



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

Diseño de un sistema bioadhesivo de clorhexidina empleando pullulan como matriz para uso en mucosa oral

JEAN MARIO CASTRO RUIZ

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de ciencias, Área curricular de Farmacia
Bogotá D.C., Colombia
2014

Diseño de un sistema bioadhesivo de clorhexidina empleando pullulan como matriz para uso en mucosa oral

JEAN MARIO CASTRO RUIZ

Tesis presentada como requisito para optar al título de:
Magister en Ciencias Farmacéuticas

Director (a):

Q.F. MSc PhD Bibiana Margarita Vallejo

Línea de Investigación:

Aplicaciones farmacéuticas de biopolímeros

Grupo de Investigación:

Procesos de Transformación de Materiales para la Industria Farmacéutica

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias, Área curricular de Farmacia

Bogotá D.C., Colombia

2014

Dedicatoria

A mi hija Michelle Carolina por ser mi principal motivo para seguir adelante en cada uno de mis pasos y proyectos.

A mis padres quienes por medio de mis logros se enorgullecen cada día más y son impulsores en mi crecimiento personal y profesional.

Nunca consideres el estudio como una obligación, sino como una oportunidad para penetrar en el bello y maravilloso mundo del saber.

Albert Einstein

Agradecimientos

En primer lugar a Dios.

A mi familia por su total apoyo y motivación durante todas las etapas del desarrollo de mi tesis.

A mi directora la profesora Bibiana Vallejo y al profesor Helber Barbosa por su guía continua y las oportunidades que me brindaron a lo largo de este tiempo que trabajé con ellos.

A mis compañeros de posgrado de la Universidad Nacional de Colombia por el respaldo y continua contribución en los diferentes aspectos de mi investigación.

A todos los profesores de la Universidad Nacional que han contribuido con mi formación, y me han dado las herramientas necesarias para formarme como investigador.

A PROCAPS S.A.S por su ayuda en la consecución de este objetivo y colaboración.

En especial a mi amigo, colega y siempre jefe, el Dr. Alfredo Berthel que ha sido mi motor e impulsor para seguir formándome, a mi comadre Sirce por sus valiosos consejos y guía, a Reinaldo Sotomayor y Obed Valenzuela por su constante motivación, a Yadi como le llamo de cariño por su colaboración, a Abeimar Alvarez y demás compañeros de Procaps que siempre fueron de gran ayuda para la culminación de mi trabajo de grado.

A María del Carmen de la Hoz de Farmacápsulas, a Alexandra Llanos de Retycol, al Dr. Eduardo Egea de la Universidad del Norte y a Daniel R. Delgado de la Universidad Nacional de Colombia.

Resumen

Se desarrollaron sistemas poliméricos bioadhesivos del tipo película polimérica y comprimido usando el biopolímero pullulan, como alternativa terapéutica en el transporte de sustancias activas para el tratamiento de la gingivitis y de la enfermedad periodontal. Se realizaron estudios de caracterización *in vitro* y de mucoadhesión de las formulaciones propuestas. Como fármaco modelo se utilizó digluconato de clorhexidina. En la presente investigación se evaluó la capacidad del polímero pullulan para formar películas y tabletas. A estos sistemas poliméricos se les determinaron propiedades mecánicas, propiedades de transporte, actividad antiséptica, caracterización de las microestructuras obtenidas y se comprobó la liberación del fármaco desde los sistemas estudiados.

Palabras clave: sistemas poliméricos, pullulan, bioadhesivos, mucoadhesión

Abstract

Bioadhesive polymeric systems type polymeric film and tablet were developed using pullulan biopolymer, as a therapeutic alternative in the transport of active substances in treatment of gingivitis and periodontal disease.

Proposal formulations were described by *in vitro* characterization and mucoadhesion studies. Chlorhexidine digluconate was used as a drug model. In the present research, the ability of pullulan polymer to form films and tablets was evaluated. Mechanical and transport properties, as well as antiseptic activity and microstructures characteristics were determined for these polymeric systems; drug release behavior in the studied systems was also verified.

Keywords: polymeric systems, pullulan, bioadhesive, mucoadhesion.

Contenido

	Pág.
Resumen.....	VIII
Lista de figuras.....	XIII
Lista de tablas.....	XIV
Lista de Símbolos y abreviaturas.....	XV
Introducción	1
1. Aspectos teóricos.....	5
1.1 Pullulan.....	6
1.2 Sistemas mucoadhesivos como alternativa de transporte de principios activos.....	7
1.3 Importancia de la formación de uniones adhesivas sobre sustratos del tipo mucosa oral.....	10
1.4 Preparaciones mucoadhesivas bucales.....	12
1.4.1 Tabletas bucales.....	13
1.4.2 Películas bucales.....	14
2. Objetivos.....	15
2.1 Objetivo General.....	15
2.2 Objetivos Específicos.....	15
3. Parte Experimental.....	16
3.1 Materiales.....	16
3.2 Equipos.....	16
3.3 Estandarización del método de elaboración de los sistemas poliméricos.....	17

3.3.1 Obtención de tabletas.....	17
3.3.2 Obtención de películas.....	18
3.3.3 Determinación de la densidad de las películas.....	20
3.4 Evaluación de las propiedades de transporte.....	21
3.4.1 Hinchamiento de las tabletas.....	21
3.4.2 Índice de hinchamiento de las películas.....	22
3.3.3 Permeabilidad al vapor de agua de películas.....	22
3.5 Determinación de propiedades mecánicas.....	23
3.5.1 Dureza de las tabletas.....	23
3.5.2 Friabilidad de las tabletas.....	24
3.5.3 Resistencia a la ruptura por tensión de las películas.....	23
3.5.4 Resistencia a la ruptura por perforación de las películas.....	23
3.6 Ensayos de funcionalidad	
3.6.1 Evaluación de la capacidad mucoadhesiva <i>ex vivo</i>	24
3.7 Incorporación del principio activo en los sistemas poliméricos	25
3.7.1 Preparación de las tabletas con clorhexidina digluconato	25
3.7.2 Preparación de las películas con clorhexidina digluconato	25
3.8 Metodología para evaluar la liberación de la clorhexidina digluconato desde los sistemas poliméricos	26
3.8.1 Preparación de soluciones de la curva de calibración.....	27
3.8.2 Preparación de la muestra	28
3.8.3 Procedimiento.....	28
3.9 Evaluación de propiedad microbiológica.....	28
3.10 Determinación morfológica de películas por microscopía electrónica de barrido (SEM).....	29
3.11 Análisis estadístico de los datos.....	29
4. Resultados y Discusión.....	30
4.1 Ensayo y evaluación preliminar de las formulaciones para la obtención de películas y tabletas.....	30
4.1.1 Evaluación de tabletas.....	30
4.1.2 Evaluación de películas.....	31
4.2 Evaluación de propiedades de transporte tabletas.....	34
4.2.1 Estudios de hinchamiento.....	34

4.3 Evaluación de propiedades de transporte de películas.....	37
4.3.1 Estudios de hinchamiento.....	37
4.3.2 Estudios de transmisión de vapor de agua de las películas.....	38
4.4 Determinación de propiedades mecánicas.....	40
4.4.1 Prueba de dureza de las tabletas.....	40
4.4.2 Prueba de friabilidad de las tabletas.....	41
4.4.3 Resistencia a la ruptura por tensión de películas.....	42
4.4.4 Resistencia a la ruptura por perforación de películas.....	45
4.5 Evaluación de la capacidad mucoadhesiva <i>ex –vivo</i>	48
4.5.1 Ensayo para las tabletas.....	48
4.5.2 Ensayo para las películas.....	49
4.6 Incorporación del principio activo en los sistemas poliméricos.....	51
4.7 Liberación de la clorhexidina desde las películas poliméricas y comprimidos a base de pullulan.....	52
4.8 Evaluación de propiedad microbiológica.....	54
4.9 Determinación morfológica de películas por microscopía electrónica de barrido (SEM).....	56
5. Conclusiones y recomendaciones.....	57

Bibliografía

Lista de figuras

Figura 1. Estructura química del pullulan.....	7
Figura 2. Estructura química de la clorhexidina.....	8
Figura 3. Estructura química de clorhexidina digluconato.....	9
Figura 4. Estructura de la mucosa oral	10
Figura 5. Superficies presentes en una unión Bioadhesiva	11
Figura 6. Liberación del fármaco en los tipos de preparaciones mucoadhesivas.....	13
Figura 7. Ensayo de ruptura por penetración en instrumento TA XT plus Texture Analyser.....	24
Figura 8. Tejido bucal de cerdo.....	24
Figura 9. Fotos de las tabletas.....	31
Figura 10. Fotos de las películas mucoadhesivas.....	33
Figura 11. Porcentaje de hidratación de las tabletas en fluido símil salival.....	35
Figura 12. Erosión de las tabletas.....	36
Figura 13. Peso ganado en función del tiempo de las películas.....	39
Figura 14. Gráficas de tensión en función a la deformación de las películas poliméricas evaluadas	43
Figura 15. Esfuerzo-deformación de las películas poliméricas evaluadas.....	44
Figura 16. Gráficas de perforación de las películas poliméricas evaluadas.....	46
Figura 17. Foto tableta adherida a la mucosa oral.....	48
Figura 18. Montaje de la tableta adherida a la mucosa oral porcina.....	48
Figura 19. Foto película adherida a la mucosa oral.....	49
Figura 20. Montaje de la película adherida a la mucosa oral porcina.....	50
Figura 21. Foto del sistema blanco y del sistema cargado para las películas.....	51
Figura 22. Perfil de liberación de los sistemas poliméricos evaluados.....	52
Figura 23. Micrografías en corte transversal de las películas.....	56
Figura 24. Micrografías con vista superficial de las películas.....	57

Lista de tablas

Tabla 1. Factores considerados en el diseño experimental para las formulaciones de los comprimidos.....	17
Tabla 2. Matriz del diseño experimental seleccionado para tabletas.....	18
Tabla 3. Formulaciones a realizar según el diseño experimental.....	18
Tabla 4. Factores considerados para el diseño experimental para películas.....	19
Tabla 5. Matriz del diseño experimental seleccionado para películas.....	19
Tabla 6. Formulaciones a realizar según el diseño experimental para películas.....	20
Tabla 7. Valores medios de los ensayos físicos de las diferentes formulaciones de las tabletas obtenidas.....	32
Tabla 8. Valores medios de los ensayos físicos de las diferentes formulaciones de las películas obtenidas.....	34
Tabla 9. Parámetros en la determinación de la transmisión al vapor de agua.....	38
Tabla 10. Valores medios de la dureza de las diferentes formulaciones de las tabletas obtenidas.....	41
Tabla 11. Valores medios de la prueba de friabilidad de las diferentes formulaciones de las tabletas obtenidas	41
Tabla 12. Módulos de Young de las películas poliméricas evaluadas.....	44
Tabla 13. Resultados del ensayo de resistencia a la ruptura por perforación de las películas.....	47
Tabla 14. Resultados del ensayo de mucoadhesión <i>ex-vivo</i>	50
Tabla 15. Valores medios de los ensayos físicos a partir de las formulaciones cargadas.....	51
Tabla 16. Resultados modelo matemático Korsmeyer-Peppas.....	53
Tabla 17. Resultados de inhibición de desarrollo bacteriano para películas.....	54
Tabla 18. Resultados de inhibición de desarrollo bacteriano para tabletas.....	55

Lista de anexos

Anexo A. Estadístico de los ensayos de variación de peso de las tabletas

Anexo B. Estadístico de los ensayos de diámetro de las tabletas

Anexo C. Estadístico de los ensayos de variación de peso de películas

Anexo D. Estadístico de los ensayos de espesor de películas

Anexo E. Estadístico del % de Hidratación de tabletas

Anexo F. Estadístico del % de Erosión de tabletas

Anexo G. Estadístico del peso ganado en función del tiempo de las películas

Anexo H. Estadístico de la dureza de las tabletas

Anexo I. Estadístico de la friabilidad de las tabletas

Anexo J. Estadístico de los módulos de Young

Anexo K. Estadístico de la resistencia a la ruptura por perforación

Anexo L. Resultados de Absorbancia vs Concentración del CLX (mg/mL)

Lista de símbolos y abreviaturas

<i>ASTM</i>	Sociedad Americana para ensayos y materiales (sigla en inglés)
<i>CLX</i>	Clorhexidina
<i>STD</i>	Estándar
<i>rpm</i>	revoluciones por minuto
<i>mm</i>	milímetro
<i>cm</i>	centímetro
<i>mL</i>	mililitro
<i>ug</i>	microgramo
<i>g</i>	gramo
<i>Abs</i>	Absorbancia
<i>h</i>	Horas
<i>MCC</i>	Celulosa microcristalina (sigla en inglés)
<i>UV</i>	Ultravioleta
<i>°C</i>	Grados Centígrados
<i>nm</i>	nanómetro
<i>min</i>	minuto
<i>mg</i>	miligramo
<i>ATP</i>	Adenosín trifosfato
<i>CMI</i>	Concentración mínima inhibitoria
<i>SEM</i>	Microscopia electrónica de barrido (sigla en inglés)

Introducción

La industria farmacéutica ha mostrado particular interés en los sistemas de administración novedosos que mejoren las propiedades de los principios activos; así como la adherencia de los pacientes a los tratamientos, gracias a la comodidad que éstos sistemas presentan. La continua evolución en los sistemas de administración de sustancias activas ha permitido ofrecer a los pacientes alternativas para satisfacer sus necesidades y mejorar su calidad de vida (Martin, 2009), es por ello que los modernos avances científicos y tecnológicos aceleran el descubrimiento y desarrollo de productos farmacéuticos innovadores dotados de mejor actividad terapéutica y menos efectos secundarios (Tait, 1998).

Dentro de estas alternativas, el desarrollo de productos bioadhesivos es una posibilidad en la oferta de nuevos sistemas de entrega. El término bioadhesión se ha utilizado para describir el fenómeno relacionado con la capacidad que tienen algunas macromoléculas de origen natural y de síntesis para adherirse a tejidos biológicos, se fundamenta en los mecanismos conocidos de la adhesión convencional, con la particularidad que representan las propiedades y características de los tejidos naturales (Mathiowitz *et al.*, 1999).

Los sistemas bioadhesivos han sido empleados en el campo de la salud, especialmente para aplicaciones odontológicas y ortopédicas, como también para uso oftálmico y quirúrgico y actualmente en el estudio sobre reemplazo de tejidos y la liberación controlada y localizada de principios activos sobre mucosas (Lloyd *et al.*, 2001). Las aplicaciones potenciales de este fenómeno exigen un estudio minucioso sobre los fundamentos que rigen el comportamiento de los materiales poliméricos que se utilizan para estos desarrollos cuando se encuentran en contacto con superficies de tipo biológico y cómo, a partir del entendimiento de estos principios, es posible desarrollar materiales con mejores propiedades de desempeño y proponer formulaciones optimizadas para utilizar como sistemas bioadhesivos (Vallejo *et al.*, 2008). El empleo de polímeros sintéticos es común en diversas aplicaciones en la industria, sin embargo la tendencia mundial en la utilización de materiales biodegradables como los polímeros

naturales, constituye una herramienta eficaz gracias a sus propiedades y características biológicas, que les permite ser utilizados para el mejoramiento de los sistemas terapéuticos farmacéuticos.

Los materiales poliméricos biocompatibles obtenidos de fuente natural o sintética y destinados a ser introducidos en un sistema biológico son considerados biomateriales poliméricos o biopolímeros. Los biopolímeros constituyen la clase más extensa de los biomateriales y cobijan un gran porcentaje de las aplicaciones biomédicas y farmacéuticas disponibles en la actualidad, debido a la gran variedad de familias de polímeros que han incursionado en este campo (Abramson *et al.*, 2004).

Los polisacáridos representan una clase importante de biomateriales naturales, que incluyen el almidón, la celulosa, la agarosa, el alginato, el dextrano y la quitina, entre otros (Dhanikula *et al.*, 2004).

Dentro de los materiales de tipo biopolímero disponibles para la formulación de productos, se encuentra el pullulan; un polisacárido natural soluble en agua, obtenido por la fermentación del almidón. Este se encuentra disponible como un polvo blanco inodoro, insípido y muy estable. Es un α -D-glucano constituido por unidades repetidas de maltotriosas a través de enlaces α -1,6- glicosídicos (Oliva, 2012). Este material puede ser una alternativa como polímero objeto de estudio, para ser utilizado en un sistema de transporte farmacéutico, formulado con un principio activo antiséptico, tal como la clorhexidina, ideal por ser un agente antimicrobiano de amplio espectro (Basrani, 2009).

Los antisépticos son agentes químicos que destruyen o inhiben el crecimiento de microorganismos en los tejidos vivos de forma no selectiva, a diferencia de los desinfectantes que se utilizan sobre superficies inanimadas o sobre objetos. Los antisépticos tienen como principal objetivo disminuir la colonización de microorganismos y así evitar la infección en heridas abiertas y procedimientos invasivos como canalización venosa, intervención quirúrgica o punción diagnóstica (Saavedra *et al.*, 2007).

La clorhexidina es el agente antimicrobiano bucal más usado, efectivo y documentado (Yévenes *et al.*, 2003), debido a que esta bisguanida presenta una gran actividad antibacteriana sumado a una alta substantividad (Girón, 2001). Tiene la capacidad de unirse a proteínas tales como la albúmina presente en el suero o saliva, en la película de la superficie dentaria, glicoproteínas salivales y membranas mucosas. Es un agente antimicrobiano de amplio espectro, activo contra bacterias Gram-positivas, Gram-negativas y levaduras. Debido a su naturaleza catiónica, es capaz de unirse electrostáticamente a las superficies de las bacterias cargadas negativamente dañando

así la superficie externa de la pared celular y dejándola permeable. Dependiendo de su concentración, puede tener efecto bacteriostático y/o bactericida (Basrani, 2009).

Este agente antimicrobiano ha sido utilizado para desinfección de manos, en enjuagues bucales para el tratamiento de la gingivitis y de la enfermedad periodontal, en la preparación de la piel del paciente antes de una operación quirúrgica, para el lavado de heridas, y en el tratamiento del acné vulgar (Saavedra et al., 2007) y (Rowe et al., 2006).

Se trata de una molécula catiónica que actúa desestabilizando y penetrando las membranas de las células bacterianas, una vez allí, precipita el citoplasma e interfiere con la función de la membrana, inhibiendo la utilización de oxígeno, lo que ocasiona una disminución de los niveles de ATP y por consiguiente la muerte celular (Saavedra et al., 2007).

La clorhexidina y sus sales tienen actividad bactericida sobre microorganismos Gram-positivos y Gram-negativos. A bajas concentraciones normalmente se usa como preservante y antiséptico, sin embargo, especies de *Proteus* y *Pseudomonas* son menos susceptibles a la clorhexidina, la cual es también inactiva frente a esporas de bacterias y algunos hongos. Son efectivas también frente a algunos virus lipofílicos, tales como el adenovirus, herpes virus, y el virus de la influenza. La actividad antimicrobiana óptima se da a pH 5-7. Para Gram-positivos, la concentración mínima inhibitoria (CMI) está en un rango de 1–10 µg/mL. Es menos activa frente a especies Gram-negativas, que frente a especies Gram-positivas. El valor típico de CMI para estas especies se encuentra entre 1–15 µg/mL. La actividad de la clorhexidina frente a hongos y levaduras es baja. En las bacterias Gram-negativas, la clorhexidina afecta la membrana exterior permitiendo la liberación de las enzimas periplasmáticas. La membrana interna de estos microorganismos no es destruida, pero sí se impide la absorción de pequeñas moléculas (Rowe et al., 2006).

Para la desinfección de la piel, la clorhexidina ha sido formulada como solución en una concentración de 0,5 % p/v en etanol al 70% v/v y, en conjunto con detergentes, como jabón quirúrgico en una concentración del 4% (Saavedra et al., 2007) y (Greff et al., 1997).

Las sales de clorhexidina pueden ser usadas en la profilaxis y el tratamiento de las infecciones de boca como: la estomatitis, la estomatitis ulcerativa y la gingivitis aguda ulcerativa necrotizante, en concentraciones de 0.12% y 0.2%. También se incorporan estas sales, a una serie de instrumentos médicos como catéteres intravenosos

empleados como solución alcohólica de clorhexidina al 0,5%, vendajes antimicrobianos e implantes dentales (Martin, 2009); (Arévalo *et al.* 1998) y (Rodríguez, 2011).

1 . Aspectos teóricos

El nacimiento de las formas mucoadhesivas suele situarse sobre 1947 con el uso de la goma de tragacanto y los polvos adhesivos dentales que incorporaban penicilina para uso odontológico. Posteriormente, se desarrolla el Orabase® (mezcla de carboximetilcelulosa sódica, pectina y gelatina en una base de aceite mineral/polietileno), con excipientes mucoadhesivos para la cavidad oral. En los años 70, se consiguieron preparados mucoadhesivos eficaces, pero es en la década de los ochenta cuando se lleva a cabo una amplia y sistemática investigación en el tema, especialmente sobre las limitaciones que imponen las variables fisiológicas de los diferentes lugares de aplicación, el estudio e incorporación de nuevos polímeros bioadhesivos responsables de la interacción con las mucosas y se toman en consideración como una posibilidad relevante para el diseño de formas de liberación durante largos periodos y con cinética de cesión de orden cero (Rodríguez *et al.*, 2000).

Existen polímeros de origen natural que presentan propiedades como: higroscopicidad, biocompatibilidad, biodegradación, diversidad de interacciones biológicas y que pueden estar funcionalizados con grupos reactivos polares; sin embargo, tienen la desventaja de presentar pobres propiedades mecánicas y pérdida de sus propiedades biológicas durante el proceso de formulación. Los polímeros sintéticos por su parte, tienen la ventaja de ser económicos, versátiles, con excelentes propiedades mecánicas y de muy buena resistencia química. Sin embargo, la mayoría de estos polímeros poseen las desventajas de no ser biocompatibles ni biodegradables y su reciclado es altamente costoso. Además, por problemas de índole ecológico, están siendo gradualmente reemplazados por materiales biodegradables, especialmente por aquellos derivados de fuentes naturales renovables. Por todo esto, en los últimos años, se ha estado trabajando en la obtención de biocompuestos, en los cuales se reúnen diferentes ventajas de ambos tipos de polímeros y se disminuyen algunas de las desventajas de ambos (Agustina *et al.*, 2008). Los polímeros mucoadhesivos biodegradables presentan una ventaja sobre los sistemas no degradables y es que evita el retiro o la recuperación de una matriz no degradable por parte de un profesional y tiene como resultado la mejora en el

cumplimiento por parte del paciente y a un menor costo terapéutico. Los sistemas biodegradables incluyen el uso del ácido poli (láctico-co-glicólico) clasificados como un sistema polimérico hidrofóbico, mientras que en los sistemas poliméricos hidrofílicos encontramos la gelatina, el polietilenglicol (PEG) y el pullulan. Los sistemas poliméricos hidrofóbicos no son compatibles con las proteínas o fármacos nucleótidos solubles en agua y la hidrofobicidad de los polímeros puede inducir al desdoblamiento de proteínas y fármacos nucleótidos obteniéndose pérdida de actividad biológica (Gupta *et al.*, 2004).

Los materiales poliméricos presentan diversas posibilidades de aplicaciones farmacéuticas. Sin embargo, el uso de polímeros como potenciales transportadores de sustancias a través de matrices y como barreras en forma de películas, debe considerar la compatibilidad con ambientes fisiológicos, estabilidad de los polímeros durante el tiempo que tarda la liberación, las propiedades mecánicas cuando se encuentran cargadas con un fármaco, la posibilidad de no presentar hinchamiento apreciable en medios acuosos y a temperaturas del orden de 37°C, la facilidad para su manufactura y el costo frente a otros sistemas terapéuticos farmacéuticos (Moreno, 2011).

1.1 Pullulan

El Pullulan es un polisacárido lineal neutro soluble en agua formado por enlaces α -(1→6) glicosídicos vinculados a residuos de maltotriosa. Se trata de un exopolisacárido producido por el hongo *Aureobasidium pullulans* a partir de almidón. Los pesos moleculares de este biopolímero se encuentra en el rango de miles a 2.000.000 de daltons, dependiendo de las condiciones de crecimiento del organismo *Aureobasidium pullulans*. Este polímero es biodegradable, no higroscópico; es fácilmente soluble en agua fría y caliente, produce soluciones viscosas y transparentes y también tiene una alta adherencia y capacidad de formar películas impermeables al oxígeno, las cuales son térmicamente estables y poseen propiedades anti-estáticas y elásticas. Entre las principales ventajas encontramos que es un polisacárido no iónico y compatible con la sangre, no es tóxico, no es inmunogénico, no es mutagénico y no es carcinogénico (Rekha *et al.*, 2007). Su estructura química se muestra en la figura 1.

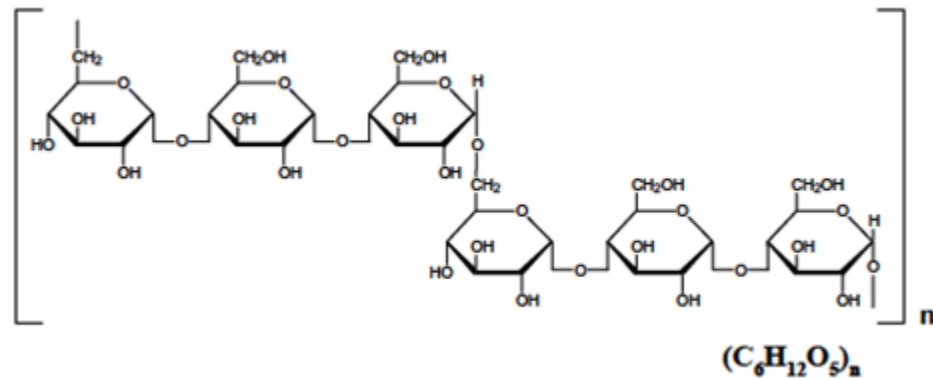


Figura 1. Estructura química del pullulan

El Pullulan es un ingrediente sumamente versátil que ofrece una plataforma de alternativas tecnológicas para la innovación de productos. Es un excelente formador de película, es termoplástico, presenta propiedades de barrera al oxígeno. En la industria de alimentos, la película de pullulan es considerada dentro de lo que se denomina “cubiertas comestibles” cuyo enfoque es el de integrar los sistemas de empaque como parte del alimento. Es importante resaltar, que algunos colorantes, aromas e ingredientes funcionales pueden ser incorporados en la matriz de la película y ser estabilizados con eficacia. También se emplea como cubierta para tabletas y en la formación de cápsulas en la industria farmacéutica. Junto con otros ingredientes como el mentol, carragenano, goma Xantan y timol, el pullulan es uno de los principales componentes de las conocidas películas antisépticas orales Listerine Pocketpaks®, indicadas para eliminar gérmenes de la cavidad oral y para refrescar el aliento (Rodríguez, 2011).

1.2 Sistemas mucoadhesivos como alternativa de transporte de principios activos

A las correspondientes formas de administración que se colocan sobre las mucosas se les denominan mucoadhesivas, siendo su objetivo mantenerse fijadas en el lugar donde se realiza la liberación y/o absorción del fármaco prolongando el tiempo de permanencia, a pesar de las circunstancias naturales que se oponen. (Rodríguez *et al.*, 2000).

Varios sistemas poliméricos han sido investigados con el objetivo de obtener un polímero mucoadhesivo adecuado, que posea grupos funcionales capaces de formar uniones puente hidrógeno, con propiedades de hinchamiento adecuadas y suficientemente flexibles. Uno de los polímeros de origen natural con las propiedades adecuadas para ser

empleado como mucoadhesivo es el pullulan, a partir del cual se puede llevar a cabo el desarrollo de nuevos sistemas terapéuticos más eficientes para aplicaciones en diversas áreas. En particular, la administración en la cavidad bucal, la cual ha recibido considerablemente atención. La mucosa oral es altamente vascularizada y más accesible tanto para la administración como para la remoción de la forma de dosificación si esto es requerido. La liberación en la cavidad oral de varios agentes terapéuticos empleando tabletas, películas, sistemas bicapas e hidrogeles ha sido estudiada y reportada por diferentes grupos de investigación (Mishra y Amin, 2011); (Mamani, 2012) y (Panchal *et al.*, 2012).

Películas con pullulan han sido estudiadas por Rodríguez A., (Rodríguez, 2011), agregándoles principios activos de extractos de origen natural con propiedades antisépticas, antiinflamatorias, bactericida y antifúngicas, demostrando actividad antimicrobiana. Uno de los antimicrobianos más utilizados en los tratamientos odontológicos por infecciones bucales es la clorhexidina (figura 2).

Se esperaría que combinando las propiedades del pullulan en un sistema polimérico cargado con el fármaco clorhexidina, se logre una curación eficaz de la infección debido al aumento del tiempo de residencia del fármaco con los lugares de acción mediante el uso de formulaciones mucoadhesivas, que se unan a la mucosa oral y eventualmente a la superficie dental, mejorando de esta forma la efectividad del fármaco.

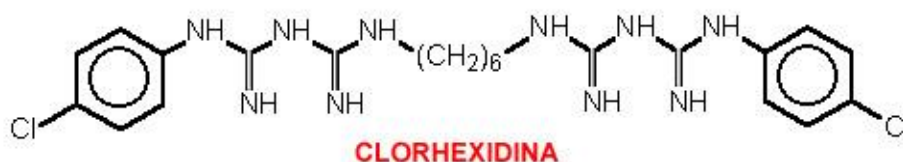


Figura 2. Estructura química de la clorhexidina

Existe una variedad de sales de clorhexidina, donde se incluye la forma acetato, gluconato, clorhidrato y digluconato, pero la forma digluconato (figura 3) es la más soluble en agua (Masquio *et al.*, 2013), a pH fisiológico se disocia fácilmente y es una sal muy estable sin embargo su descomposición a 4-cloroanilina es considerable a temperatura superior a 100°C y a pH alcalino, la mayor estabilidad de las soluciones acuosas se consigue con un pH comprendido entre 5 y 8, de allí que en los preparados

farmacéuticos se use la sal digluconato (Giron, 2001). Por esta razón la sal de elección para los sistemas poliméricos estudiados en el presente trabajo es la sal digluconato.

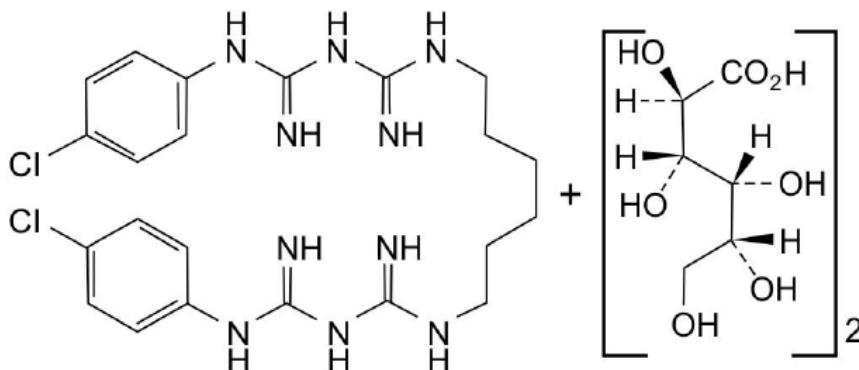


Figura 3. Estructura química de clorhexidina digluconato

La cantidad incorporada de clorhexidina digluconato en los sistemas poliméricos fue de 5 mg, teniendo como referencia las concentraciones de tabletas para chupar existentes en el mercado internacional (Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios 2002), existen chips o laminillas de clorhexidina (Periochip®, Perio products Ltd., Jerusalén, Israel), son laminillas o películas biodegradables, de gelatina hidrolizada, que contiene 2.5 mg de gluconato de clorhexidina y con un tamaño aproximado de 4 x 5 mm y un espesor de 0.35 mm que se colocan directamente dentro de la bolsa periodontal y provee una concentración de 125 mg/ml durante ocho días, tiene la ventaja de ser degradable en un plazo de 7 a 10 días y de fácil colocación (Arredondo *et al*, 1999), se trata de un sistema de liberación lenta, manteniendo niveles apropiados para evitar ser barrida por la acción del fluido crevicular (Palacio *et al*, 2008).

La clorhexidina es un agente que se caracteriza por tener una alta substantividad como ya lo habíamos descrito anteriormente. La substantividad es la medida de tiempo de contacto entre una sustancia y un sustrato en un medio dado. Al tratar infecciones dentales, la substantividad del agente antimicrobiano es de suma importancia puesto que el agente necesita un cierto tiempo de contacto con el microorganismo para inhibirlo o eliminarlo. Se dice que la clorhexidina tiene substantividad (retención de aproximadamente 30%, es decir entre 5.5 y 6.9 mg de una solución de 10 ml de clorhexidina al 0.2%). Se absorbe por las superficies orales, incluidos los dientes y luego se libera lentamente en forma activa (Girón, 2001).

En Colombia la clorhexidina solamente se encuentra comercializada en solución bucal al 0.12 y 0.2% y gel oral al 1%.

1.3 Importancia de la formación de uniones adhesivas sobre sustratos del tipo mucosa oral

La bioadhesión describe la capacidad de ciertas macromoléculas, sintéticas o biológicas, de adherirse a los tejidos del organismo. Esta definición es probablemente suficiente para identificar el fenómeno de adhesión (unión durante un tiempo suficientemente prolongado de dos superficies por fuerzas interfaciales de tipo físico y/o químico). En efecto, todo material puede adherirse a un tejido biológico sobre todo a las mucosas gracias a la naturaleza viscosa de la capa que la recubre. Pues bien, teniendo en cuenta que la mayoría de las vías de administración de fármacos están revestidas de una capa de mucus, surgió la idea de adaptar el fenómeno de adhesión a la fijación de una forma farmacéutica a una zona específica del cuerpo, desde donde se liberará el fármaco. Esto corresponde a un fenómeno de bioadhesión (una de las superficies adheridas es de naturaleza biológica), pero más específicamente de *mucoadhesión*, debido a que una de las superficies es una membrana mucosa (capa celular), o bien a la capa de mucina que recubre esta membrana superficial (figura 4) (Rodríguez *et al.*, 2000).

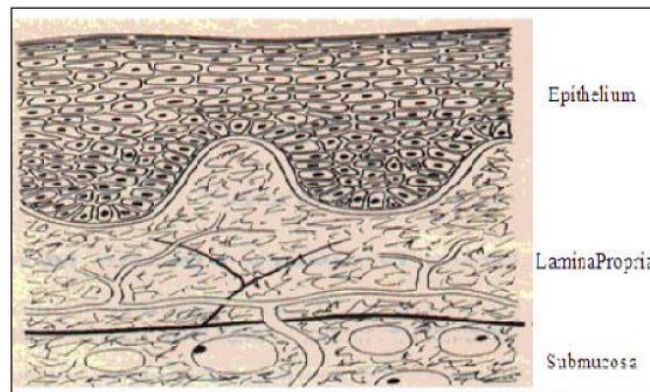


Figura 4. Estructura de la mucosa oral

Tomado de Hooda *et al.*, (2012)

Partiendo de la premisa, de que la administración tópica será tanto más efectiva cuanto más tiempo permanezca el principio activo en contacto con las áreas de la mucosa lesionada, nos encontramos con que en la cavidad oral este aspecto es especialmente

complejo por la intervención de factores como la secreción salival o los movimientos bucolinguales.

De ahí que sólo se pueda aumentar el tiempo de permanencia del fármaco en la boca de dos maneras: o bien incrementando voluntariamente la retención del mismo por parte del paciente, o bien incorporando a las formulaciones galénicas sustancias que favorezcan la adhesión a mucosa. En el primer caso, la efectividad del tratamiento lleva asociadas una serie de inconvenientes: la ausencia de control del odonto-estomatólogo del tiempo efectivo de contacto del principio activo con la mucosa y la incapacidad de retención en pacientes no colaboradores.

Además, debido a la continua dilución salival del principio activo y la deglución involuntaria por parte del paciente, existe un alto riesgo de que se pierda la mayor parte del medicamento. Este inconveniente se eliminaría o se podría reducir mediante la utilización de diversos adhesivos que facilitaran, aún sin colaboración por parte del paciente, la retención del sistema polimérico ayudando a mantener el fármaco en un contacto mayor con la mucosa oral.

La adhesión entre el polímero y la mucosa se establece mediante mecanismos termodinámicos y cinéticos debidos a la interacción y el entrecruzamiento de cadenas del polímero y glicoproteínas de la capa mucosa. Dependiendo de los grupos funcionales de ambos componentes se van a establecer diversas interacciones físicas o químicas (figura 5) (Beiro *et al.*, 2003).

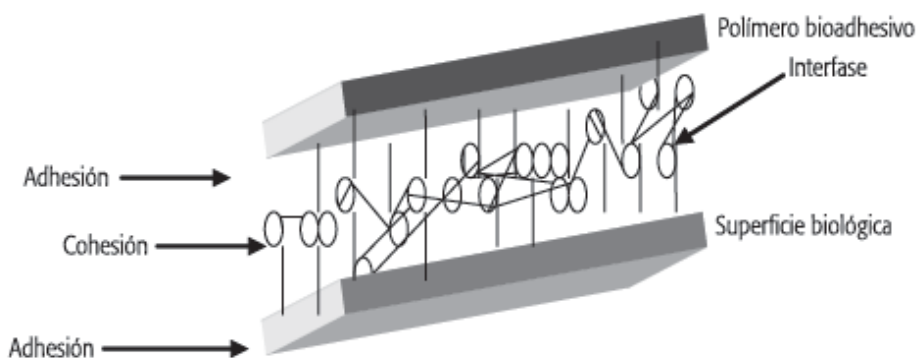


Figura 5. Superficies presentes en una unión Bioadhesiva.

Tomado de Vallejo *et al.*, (2008)

1.4 Preparaciones mucoadhesivas bucales

Uno de los métodos empleados para optimizar la liberación de fármacos en la cavidad bucal es el uso de preparaciones adhesivas (Chiappetta *et al.*, 2006). Con el fin de lograr este objetivo es necesario no sólo seleccionar el principio activo adecuado, sino que se vuelve prioritario el determinar las propiedades fundamentales de los auxiliares de formulación, ya que a través de ellos se pueden conseguir beneficios tecnológicos y biofarmacéuticos (Fajardo *et al.*, 2006).

Las preparaciones mucoadhesivas bucales poseen ventajas como la no utilización de agua para su deglución, dosis exactas, rápido comienzo de acción, fácil de transportar, sabor agradable y cumplimiento del tratamiento por parte del paciente. Estas formas de dosificación pueden ser fabricadas usando una variedad de tecnologías incluyendo secado por congelación, secado por vacío, secado por aspersion y métodos de moldeo, entre otros (Mishra y Amin, 2011).

La administración sobre mucosa oral es una alternativa de interés debido a sus ventajosas peculiaridades: escaso contenido de enzimas degradativas, permeabilidad muy aceptable, altamente vascularizada y ausencia de efecto de primer paso. Para esta zona resultan interesantes las formas de administración mucoadhesivas como: parches, comprimidos y geles (Rodríguez *et al.*, 2000).

Las preparaciones mucoadhesivas bucales se pueden clasificar en tres tipos en función de su geometría. El Tipo I se trata de un dispositivo de una sola capa donde el fármaco se libera en forma multidireccional, este tipo de forma farmacéutica se ve afectada por el problema de pérdida de fármaco debido a la ingestión. En el tipo II el dispositivo consta de una capa de soporte impermeable que se superpone en la parte superior de la capa bioadhesiva cargada con el fármaco, la creación de un dispositivo de doble capa previene la pérdida del fármaco de la superficie superior de la forma de dosificación en la cavidad bucal. El Tipo III es un dispositivo de descarga unidireccional, donde la pérdida del fármaco es mínima, ya que el fármaco es liberado en un sólo sentido desde el lado adyacente hacia la mucosa bucal. Las formas de dosificación bucal también pueden ser clasificadas de acuerdo al tipo de depósito o el tipo de matriz. De acuerdo al tipo depósito, una cantidad excesiva del fármaco está rodeado por una membrana polimérica, que controla la tasa de liberación del fármaco (Figura 6). De acuerdo al tipo de matriz, el fármaco se dispersa uniformemente en la matriz del polímero, y su liberación es

controlada por difusión a través de la red del polímero. En general, las formas de dosificación diseñadas para entrega en la cavidad oral deben ser pequeñas y lo suficientemente flexibles para ser aceptables para los pacientes, y no deben causar irritación (Salamat-Miller *et al.*, 2005).

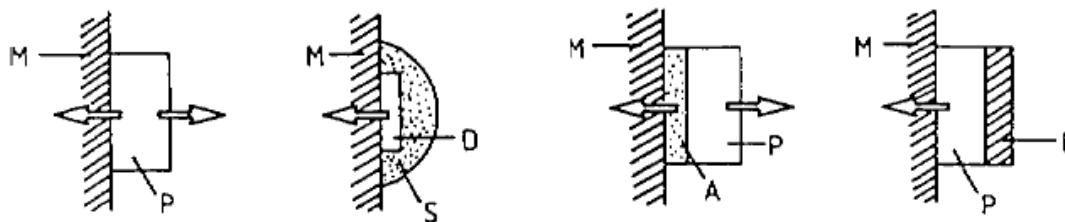


Figura 6. Liberación del fármaco en los tipos de preparaciones mucoadhesivas. M, mucosa. P, polímero. D, depósito de fármaco. S, protector adhesivo. A, capa adhesiva. B, capa impermeable de refuerzo. Tomado de Rodríguez *et al.*, (2000).

Las preparaciones mucoadhesivas bucales incluyen tabletas, parches, películas, y semisólidos (geles y pomadas), pero a continuación serán discutidas brevemente las tabletas y las películas bucales por ser las formas de administración de interés para este trabajo.

1.4.1 Tabletillas bucales

Las tabletas han sido las formas de dosificación más investigadas para la administración bucal de fármacos. Las tabletas bucales son eventualmente pequeñas (6 mm en su diámetro del núcleo), planas (2 mm de espesor) y ovales (Rodríguez *et al.*, 2000). A diferencia de las tabletas convencionales, las tabletas bucales mucoadhesivas permiten la ingesta de líquidos así como el habla sin mayor dificultad. Se ablandan, se adhieren a la mucosa y se conservan en su posición hasta que la disolución y/o liberación sea completa. Estas tabletas se pueden aplicar a diferentes sitios de la cavidad bucal, incluyendo el paladar, la mucosa que recubre la mejilla, así como entre el labio y la encía y se pueden aplicar también a los lados alternos de la boca.

El mayor inconveniente de las tabletas bucales mucoadhesivas es su falta de flexibilidad física, lo que origina el incumplimiento del paciente a largo plazo y su repetido uso (Salamat-Miller *et al.*, 2005). Bajo la forma de comprimidos mucoadhesivos se han diseñado diferentes modelos, la mayoría concebidos como comprimidos de liberación

controlada, modificados en su formulación para permitir la adhesión. Dado el fácil acceso al lugar, la fijación puede ayudarse con presión temporal del comprimido contra la mucosa. Los modelos matriciales incluyen el producto activo en un polímero bioadhesivo que una vez adherido libera el fármaco por hinchamiento y erosión (Rodríguez *et al.*, 2000).

1.4.2 Películas bucales

Las películas son las formas de dosificación de más reciente desarrollo para la administración bucal. Las películas bucales pueden ser preferibles a las tabletas mucoadhesivas en términos de flexibilidad y comodidad. Además, pueden evitar el tiempo de residencia relativamente corto de los geles orales en la mucosa, los cuales son fáciles de lavar y de ser eliminados por la saliva. Por otra parte, en el caso de la entrega local, para las enfermedades bucodentales, las películas también ayudan a proteger la superficie de la herida, ayudando así a reducir el dolor y tratar la enfermedad con más eficacia. Una película ideal debe ser flexible, elástica y suave, aún en condiciones extremas para resistir la rotura debido a la tensión de movimientos de la boca. También debe poseer una buena fuerza mucoadhesiva con el fin de mantenerse en la boca con una duración deseada para su acción. El hinchamiento de la película, si se produce, no debe ser demasiado extenso para evitar molestias. Las películas mucoadhesivas son similares a los parches laminados en términos de flexibilidad y en su proceso de fabricación (Salamat-Miller *et al.*, 2005).

2 . Objetivos

2.1 Objetivo General

Diseñar sistemas bioadhesivos modelo tipo comprimido y película polimérica con base en Pullulan, como sistemas de transporte de Clorhexidina, para uso sobre mucosa oral.

2.2 Objetivos Específicos

- 2.2.1** Estudiar el comportamiento del polímero Pullulan como soporte polimérico tanto en forma de película como en comprimido.
- 2.2.2** Formular sistemas de transporte a partir del polímero, incorporando en ellos el principio activo modelo de estudio.
- 2.2.3** Evaluar las propiedades mecánicas, de transporte y funcionalidad de los sistemas de transporte obtenidos.
- 2.2.4** Estudiar las cinéticas de liberación del principio activo, desde los sistemas terapéuticos farmacéuticos diseñados.

3 Parte Experimental

3.1 Materiales

Digluconato de Clorhexidina, lote: 20/12/118 (Merquimia); STD Acetato de Clorhexidina, lote: 083K0014 (Retycol); Pullulan PI20, lote: 1G1932 (Hayashibara); Agar, lote: K42137315 201 (Merck); Sorbitol Special Polyol, lote: 734729 (Ingredion); Cloruro Sódico, lote K42436404 (Merck); Fosfato Monobásico de Potasio, lote AO383673 305 (Merck); Fosfato Dibásico de Sodio, lote F17357886 238 (Merck); Ácido Fosfórico, lote K35C84 (Merck); agua tipo I (conductividad < 18 $\mu\text{s/m}$); Silica Gel, lote: 05144 (J.T Baker); Carbonato de Potasio, lote: A0475828 (Merck); Mucosa Oral Porcina (Matadero Camaguey).

3.2 Equipos

Durómetro Sotax HT1

Friabilizador Erweka TA3

Analizador de textura TAXT2 plus

Balanza analítica Mettler Toledo AX 204 sensibilidad 0.1mg,

Espectrofotómetro UV-VIS Agilent 8453

Balanza de precisión ML3002 sensibilidad 0.01g

Agitador JK IKA Labortechnik,

Micrómetro digital caliper

Horno Thermo Scientific lindberg blue M

Balanza analítica Mettler Toledo XP205DR

Plancha de calentamiento Thermo Scientific Cimarec

Equipo Disolutor Distek Evolution 6100

Microscopio Electrónico de Barrido FEI QUANTA 200

3.3 Estandarización del método de elaboración de los sistemas poliméricos

3.3.1 Obtención de las tabletas

Se prepararon diferentes formulaciones (Tabla 1) por medio de compresión directa. Las formulaciones fueron mezcladas homogéneamente y comprimidas utilizando un punzón con dimensiones de 6.4 mm de diámetro, en una tableteadora de tipo excéntrica. En todas las formulaciones se utilizó estearato de magnesio al 1% como lubricante, obteniéndose un peso de dosificación final para todas las formulaciones de 100 mg. En la tabla 1 se muestra la combinación de los factores para el diseño experimental.

Si bien los excipientes utilizados en las formulaciones de las tabletas pueden alterar las propiedades químicas de la superficie de la tableta, influyendo así en la adherencia del polímero, se utilizó Celulosa Microcristalina (MCC siglas en inglés-Microcrystalline Cellulose) por ser un excipiente de relleno empleado en los procesos de compresión y Dióxido de Silicio Coloidal (Aerosil 200®) por ser un agente deslizante y tener la capacidad de formar geles.

Para la preparación de la mezcla se utilizó un mezclador en V a velocidad constante de 10 r.p.m., para mezclar el pullulan y la celulosa microcristalina durante 20 minutos, luego se adicionó el dióxido de silicio coloidal y se mezcló por espacio de 10 minutos, por último se adicionó el estearato de magnesio y se mezcló por 5 minutos.

Tabla 1. Factores considerados en el diseño experimental para las formulaciones de los comprimidos

Factor		+	-
A	Pullulan	Mayor %	Menor %
B	MCC 20%	Presente	Ausente
C	Aerosil 1%	Presente	Ausente

Con el fin de estudiar las variables como hinchamiento y erosión que presentan influencia en la posible liberación de clorhexidina digluconato desde las tabletas a base de pullulan, se elaboraron comprimidos a partir de cuatro formulaciones, las cuales fueron obtenidas al aplicar un diseño experimental de tres factores. En la tabla 2 se muestra la matriz del

diseño experimental utilizado y en la tabla 3 las formulaciones realizadas según el diseño experimental seleccionado.

Tabla 2. Matriz del diseño experimental seleccionado para tabletas (Connors *et al.*, 1979)

	A-		A+	
	B-	B+	B-	B+
C-	1	2	2	1
C+	1	2	2	1

A: pullulan; B: MCC al 20%; C: Aerosil al 1%

Tabla 3. Formulaciones a realizar según el diseño experimental para tabletas

Formulación	Pullulan		MCC	Aerosil 200	Estearato de magnesio
	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)
TABFn1		79	20		1
TABFn2		78	20	1	1
TABFn3	99				1
TABFn4	98			1	1

3.3.2 Obtención de las películas

Muchas técnicas de elaboración de películas se siguieron para obtener el sistema polimérico requerido, incluyendo las técnicas evaluadas por el grupo de Investigación: Procesos de Transformación de Materiales para la Industria Farmacéutica de la Universidad Nacional, donde emplean temperaturas de secado 55 ± 5 ° C y tiempos entre 8 – 10 horas (Pulido, 2012), encontrando que con estas condiciones de secado, la dispersión polimérica aún no se encontraba en condiciones apropiadas. Por esta razón se seleccionó la propuesta de Heo *et al.*, (Heo *et al.*, 2005), donde las películas se secan a temperatura ambiente (25 ± 2 ° C) durante 36 horas.

Las películas se fabricaron mediante el método de casting, se prepararon 50 g de dispersión dejándolas en reposo por un periodo de 12 horas para su deaireación, se vertieron en moldes de acero inoxidable y acrílico con dimensiones de 15 x 15 cm, y se

dejaron secar a temperaturas de $25\pm 2^\circ\text{C}$ para ser retiradas del molde a las 36 horas. En la tabla 4 se presentan los factores considerados para el diseño experimental.

Tabla 4. Factores considerados para el diseño experimental para películas

Factor		+	-
A	Pullulan	Mayor %	Menor %
B	Sorbitol	Mayor %	Menor %
C	Agar 1%	Presencia	Ausencia
D	Glicerina 3%	Presencia	Ausencia

Con el fin de estudiar las variables que presentan influencia en la posible liberación de clorhexidina digluconato desde las películas poliméricas a base de pullulan; hinchamiento y permeabilidad al vapor de agua, se elaboraron películas a partir de cuatro formulaciones las cuales fueron obtenidas al aplicar un diseño experimental de cuatro factores (Connors *et al.*, 1979). En la tabla 5 se muestra la matriz seguido del diseño experimental y en la tabla 6 se presentan las formulaciones realizadas según el diseño experimental seleccionado.

Tabla 5. Matriz del diseño experimental seleccionado para películas (Connors *et al.*, 1979)

		A-		A+	
		B-	B+	B-	B+
C-	D-	1			2
	D+		2	1	
C+	D-		1	2	
	D+	2			1

A: pullulan; B: sorbitol; C: agar al 1% y D: glicerina al 3%

Tabla 6. Formulaciones a realizar según el diseño experimental para películas

Formulación	Pullulan		Sorbitol		Agar	Glicerina
	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)
Fn1		15		10		
Fn2		15	15		1	
Fn3	25			10		3
Fn4	25		15		1	3

Para la preparación de las dispersiones poliméricas a partir de las cuatro formulaciones descritas en la tabla 6, se utilizó el siguiente procedimiento:

Se pesó el agua y se adicionó el pullulan agitando hasta homogenizar a 50 °C en las formulaciones denominadas Fn1 y Fn3 y luego se adicionó el o los plastificantes con agitación de 900 rpm por 20 minutos, se dejó enfriar, reposar y se almacenó hasta su completa deaireación; para las dispersiones Fn2 y Fn4 se pesó el agua, se dispersó el pullulan y se adicionó agar, posteriormente se adicionó el o los plastificantes con agitación de 1200 rpm a 90 °C, luego se dejó enfriar, reposar y se almacenó hasta su completa deaireación por 12 horas. Las películas se secaron a una temperatura de $25\pm 2^{\circ}$ C por 36 horas. Las películas formadas fueron almacenadas en condiciones controladas de humedad relativa de $55\%\pm 2$ a 18°C para las determinaciones posteriores.

3.3.3 Determinación de la densidad de las películas

La densidad se calculó a partir de la masa, determinada en una balanza digital con precisión de 0.01g, y el volumen calculado a partir del área y el espesor de las películas. En el cálculo del espesor se realizaron 6 determinaciones por película de cada una de las 3 películas, empleando un micrómetro Teclock, con una precisión de 0.01mm. Con los datos de los espesores obtenidos se efectuaron análisis de varianza (ANOVA), usando Microsoft Excel 2007.

3.4 Evaluación de las propiedades de transporte

3.4.1 Hinchamiento de las tabletas

Las propiedades de hinchamiento y las características de erosión de los comprimidos se evaluaron determinando el porcentaje de hidratación y la erosión matricial. Cada comprimido se pesó w_1 (g) y sumergió en un fluido símil salival (2,38 g Na_2HPO_4 , 0,19 g KH_2PO_4 y 8,00 g NaCl por litro de agua destilada ajustada con ácido fosfórico a pH 6,75). Se hicieron mediciones cada 5 minutos, los comprimidos se retiraron del medio para ser pesados w_2 (g), previo a la pesada se les quitó el exceso de agua superficial. Los comprimidos hinchados fueron secados durante 24 h a 37 °C. Luego se colocaron en un desecador durante 48 h antes de ser pesados nuevamente w_3 (g). Los experimentos se realizaron por triplicado. El porcentaje de hidratación y la erosión matricial se calcularon de acuerdo a las ecuaciones 1 y 2 (Chiappetta *et al.*, 2006)

$$\%h = \frac{w_2 - w_1}{w_1} * 100 \quad \text{Ecuación 1}$$

$$EM = \frac{w_1 - w_3}{w_1} * 100 \quad \text{Ecuación 2}$$

Los pesos se determinaron en una balanza analítica Mettler Toledo con precisión de 0.0001g.

3.4.2 Índice de hinchamiento de las películas

El hinchamiento es una propiedad de las películas o un material, en el cual se aumenta el volumen acuoso dentro del película así como su tamaño tridimensional permitiéndole al fármaco difundirse a través de la película al medio externo (Escobar *et al.*, 2002).

Siguiendo la metodología empleada por el grupo de Investigación Procesos de Transformación de Materiales para la Industria Farmacéutica de la Universidad Nacional, se colocaron películas poliméricas de 20 x 20 mm de diámetro sobre mallas de acero, previamente pesadas, se sumergieron en agua y medio fisiológico, se realizaron mediciones cada dos minutos y se calculó la cantidad de agua atrapada por la película. El grado de hinchamiento se calculó a partir de la ecuación 3 (Li *et al.*, 1998).

$$Q_t = \frac{w_t - w_o}{w_o}$$

Ecuación 3

Donde

Q_t es el índice de hinchamiento

w_t es el peso (g) de la película al tiempo t (h)

w_o es el peso (g) de la película al tiempo cero

3.4.3 Permeabilidad al vapor de agua de películas

Es la medida del flujo de vapor de agua que atraviesa un cuerpo en un período de tiempo determinado, bajo condiciones específicas de temperatura y humedad entre ambas caras. Se expresa como $g/(m^2 \times h)$ (Belén y Pastor, 2009) .

La permeabilidad al vapor de agua se determinó utilizando un método estándar modificado del procedimiento ASTM designación E 96 M-05. (Arévalo *et al.*, 2010) Las muestras previamente cortadas en círculos, se colocaron en cápsulas de vidrio conteniendo 2 g de silica gel. Se sellaron de manera hermética con las películas elaboradas y posteriormente pesadas; después fueron introducidas dentro de una cámara con humedad controlada, La prueba se llevó a cabo durante 24 horas, realizando mediciones cada hora hasta llegar a las 12 horas. El valor de la permeabilidad al vapor de agua (TVA) es expresado en gramos de agua por unidad de tiempo por unidad de área [$g/(h.mm^2)$], el cual se calculó según la ecuación 4.

$$TVA = \frac{w - w_o}{t * A}$$

Ecuación 4

Donde TVA es transmisión de vapor de agua, w es el peso final (g), w_o es el peso inicial (g), t es el tiempo (h), A es área expuesta de la película (m^2) y (g/t) es la pendiente de la línea recta, gramos/Horas.

3.5 Determinación de propiedades mecánicas

3.5.3 Dureza de las tabletas

Se realizó la prueba de dureza a 10 tabletas. El ensayo se hizo por triplicado, empleando un durómetro Sotax HT1 (USP 36, 2013).

3.5.4 Friabilidad de las tabletas

Se realizó la prueba de friabilidad a 10 tabletas. El ensayo se hizo por triplicado, empleando un friabilizador Erweka TA3 (USP 36, 2013).

3.5.5 Resistencia a la ruptura por tensión de las películas

Para la realización de este ensayo se adaptó la metodología definida por el grupo de investigación (Vallejo, 2010), donde se tomaron películas de 20mm x 70mm sujetas entre dos mordazas de extremo a extremo, para esta prueba se empleó un analizador de Textura TA XT *Plus*, Texture Analyser, el ensayo se realizó por triplicado.

La resistencia es la fuerza de tensión necesaria para romper un material. Este ensayo reviste de importancia, debido a que brinda información con respecto a la elasticidad y fuerza de las películas, la primera de ellas representada desde la elongación como parte de un tipo de deformación y la segunda en la fuerza de tensión (Pulido, 2012). Por otro lado se realizó la determinación del módulo de elasticidad, denominado también de tracción o de Young.

3.5.6 Resistencia a la ruptura por perforación de las películas

Para la realización de este ensayo se adaptó la metodología definida por el grupo de Investigación (Vallejo, 2010), se determinó a través de un ensayo de perforación, en donde las películas fueron fijadas a una placa y perforadas por un probador que se mueve a una velocidad de 180 mm/min. Para esta prueba se empleó un analizador de Textura TA XT *Plus*, Texture Analyser (figura 7), con una sonda cilíndrica de acero inoxidable, el ensayo se realizó por triplicado.

La resistencia a la ruptura por penetración nos brinda información respecto al impacto que se ejerce sobre las películas al golpear el material a una velocidad determinada y representa el trabajo requerido para romper un material. De este modo este ensayo es

una indicación de la energía que puede absorber un material antes de romper (Cerrada, 1995).



Figura 7. Ensayo de ruptura por penetración en instrumento TA XT plus Texture Analyser

3.6 Ensayos de funcionalidad

3.6.3 Evaluación de la capacidad mucoadhesiva *ex -vivo*

Estos ensayos constituyen una forma indirecta de estudiar la adhesión de los sistemas poliméricos en la mucosa bucal. Para ello, ha sido utilizado el tejido bucal del cerdo (figura 8), debido a que su morfología no queratinizada es bastante similar al epitelio bucal humano. El tejido bucal ha sido donado por el matadero certificado del departamento del Atlántico, Camagüey S.A.; este tejido ha sido procedente de cerdos recién sacrificados. Las membranas mucosas bucales fueron separadas de forma inmediata mediante la extracción de los tejidos conjuntivos subyacentes con ayuda de un bisturí, asegurándose de no retirar la membrana basal. El grosor de los fragmentos oscilaba entre 500-600 μm . Dichas membranas fueron congeladas a una temperatura cercana a los $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta la realización de los experimentos (Jimenez *et al*, 2013).

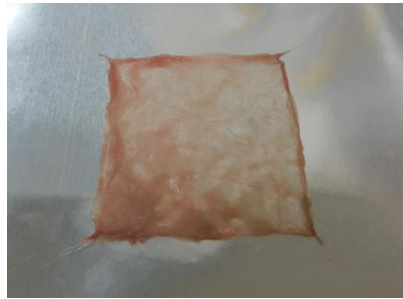


Figura 8. Tejido bucal de cerdo

Para la realización de este ensayo se adaptó la metodología de Jimenez *et al.*, (Jimenez *et al.*, 2013), las membranas mucosas bucales, fueron preparadas con un área aproximada de 4,0 cm². El tejido oral fue pegado en el fondo del vaso (lado interno) del equipo de disolución y los sistemas poliméricos se aplicaron sobre la mucosa oral porcina. Cada sistema polimérico tanto tabletas como películas fue humectado con 100 µL de fluido salival (2,38 g Na₂HPO₄, 0,19 g KH₂PO₄ y 8,00 g NaCl por litro de agua destilada ajustada con ácido fosfórico a pH 6,75) y colocados sobre la mucosa aplicando una fuerza digital durante 20 segundos. El ensayo fue realizado a una velocidad de agitación de 100 rpm utilizando 600 ml de fluido similar salival pH 6,75 a 37° C. Se observó el comportamiento de los sistemas poliméricos hasta una completa disolución o desprendimiento de los mismos (Chiappetta *et al.*, 2006).

3.7 Incorporación del principio activo en los sistemas poliméricos

3.7.3 Preparación de las tabletas con clorhexidina digluconato

De acuerdo a los resultados obtenidos de la formulación con mejores propiedades mecánicas y de transporte, el principio activo se cargó embebiendo la solución de clorhexidina digluconato en una premezcla de ingredientes sólidos, la cual se pasó por malla #8. La mezcla se secó a una temperatura de 50° C hasta alcanzar un 2% de humedad y se pasó por malla #20, se mezcló con los demás ingredientes de la formulación y se comprimió utilizando las mismas condiciones descritas en el numeral 3.3.1 Obtención de las tabletas.

3.7.4 Preparación de las películas con clorhexidina digluconato

Fue preparada una dispersión polimérica a partir de la escogencia de la formulación con las mejores propiedades mecánicas y de transporte. Se pesó el agua y se adicionó el plastificante, agitando a 150 rpm hasta homogenizar, se adicionó el pullulan con temperatura de 50°C por 20 minutos con agitación de 900 rpm, se adicionó la clorhexidina digluconato, agitando continuamente con calentamiento por 10 minutos, luego se dejó enfriar y reposar la dispersión y se almacenó hasta su completa deaireación por 12 horas.

La dispersión obtenida fue vertida en una superficie acrílica del molde de acero inoxidable con dimensiones de 15 x 15 cm, se secó a temperatura ambiente de $25 \pm 2^\circ \text{C}$ por 36 horas. Las películas formadas se desprendieron de los moldes y fueron almacenadas en condiciones controladas de humedad relativa de $55\% \pm 2$ a 18°C para las determinaciones posteriores. Las películas fueron cortadas con una dimensión de 2 cm^2 , área que aportaría 5 mg de dosificación del principio activo, igual dosificación del principio activo en la tableta.

3.8 Metodología para evaluar la liberación de la clorhexidina digluconato desde los sistemas poliméricos.

Adaptando la metodología de Chiappetta *et al.*, (Chiappetta *et al.*, 2006) para los estudios de liberación *in vitro* se empleó el método de la paleta (método II de la USP vigente). Los sistemas poliméricos (comprimidos y películas) fueron introducidos en un sinker y sumergidos en el fondo de los vasos para estudiar la liberación del fármaco. El ensayo se realizó durante 3 horas empleando como medio de disolución 500 ml de fluido símil salival (2,38 g Na_2HPO_4 , 0,19 g KH_2PO_4 y 8,00 g NaCl por litro de agua destilada ajustada con ácido fosfórico a pH 6,75) a una temperatura de $37^\circ \text{C} \pm 0,5^\circ \text{C}$. La velocidad de agitación del ensayo fue de 50 rpm. A tiempos predeterminados se tomaron y filtraron 10 ml de muestra. Después de cada toma de muestra se agregaron 10 ml de medio de disolución fresco para mantener el volumen constante, los tiempos de muestreo fueron 15, 30, 60, 120 y 180 minutos. La determinación cuantitativa de clorhexidina fue realizada mediante espectrofotometría UV a una longitud de onda de 254 nm.

Para la curva de calibración se utilizó un estándar de acetato de clorhexidina y se realizaron soluciones de concentraciones conocidas. Como solución blanco se utilizó fluido símil salival.

Con el fin de comparar los perfiles de disolución obtenidos a partir de los sistemas poliméricos evaluados en fluido símil salival y para conocer el efecto de la composición de cada lote sobre la velocidad de liberación del fármaco, se utilizaron los índices propuestos por Moore y Flanner (Moore *et al*, 1996). Este modelo independiente, utiliza dos índices matemáticos para calcular los factores de diferencia f_1 (Ecuación 5) y similitud f_2 (ecuación 6) entre los perfiles de disolución:

$$f_1 = \frac{\sum_{j=1}^n |R_j - T_j|}{\sum_{j=1}^n R_j} \times 100$$

Ecuación 5

$$f_2 = 50 \times \log \left\{ \left[1 + \left(\frac{1}{n} \right) \sum_{j=1}^n w_j |R_j - T_j|^2 \right]^{-0.5} \times 100 \right\}$$

Ecuación 6

Donde n es el número de puntos temporales, R_j es el valor de disolución de la tanda de referencia en el tiempo t , y T_j es el valor de disolución de la tanda de prueba en el tiempo t .

El factor de similitud (f_2) es una transformación de raíz cuadrada recíproca logarítmica de la suma del error cuadrado y es una medición de la similitud en la disolución porcentual (%) entre las dos curvas.

Para que las curvas se consideren similares, los valores de f_1 deberán estar cerca de 0, y los valores de f_2 deberán estar cerca de 100. Por lo general, los valores de f_1 de hasta 15 (0-15) y los valores de f_2 mayores de 50 (50-100) aseguran la igualdad o equivalencia de las dos curvas y, por lo tanto, del rendimiento de los productos de prueba y referencia (tomado de la guía CDER, 1997).

3.8.1 Preparación de soluciones de la curva de calibración

Se transfirieron 14,0 mg del estándar de clorhexidina acetato (equivalentes a 20 mg de clorhexidina digluconato) a un matraz aforado de 100 ml, se adicionaron 10 ml de agua, se agitó hasta disolución completa, se enfrió, se aforó a volumen con agua y se mezcló. Se tomaron alícuotas de: 2.0, 3.0, 4.0, 5.0, 6.0 y 7.0 mL y se transfirieron cada una, a un matraz aforado de 100 ml, se aforó a volumen con medio y se mezcló. Estas soluciones corresponden respectivamente a los niveles 40%, 60%, 80%, 100%, 120% y 140%.

3.8.2 Preparación de la muestra

Se colocaron tanto películas como comprimidos dentro de un sinker y se introdujeron en cada vaso del equipo disolutor, se inició la prueba de liberación tomando de cada vaso el volumen de muestreo para cada tiempo estipulado, con la reposición de medio correspondiente, hasta completar nuevamente volúmenes.

3.8.3 Procedimiento

Se determinaron las absorbancias en un espectrofotómetro UV a una longitud de 254 nm de cada una de las soluciones estándar de los diferentes niveles utilizando como referencia las soluciones blanco para las curvas estándar correspondientes, y las absorbancias de las soluciones muestras, utilizando como blanco las soluciones blanco para las muestras correspondientes.

En una hoja de cálculo de Excel se realizó una gráfica de concentración versus absorbancia con los datos obtenidos de las lecturas de los estándares y se halló: la ecuación de la recta (Ecuación 5), de donde se “x” es la concentración, “y” es la respuesta, “b” es la pendiente y a, el intercepto.

$$y=b*x+a$$

Ecuación 5

Con la ecuación de la recta y las absorbancias de las muestras se dedujeron la cantidad de clorhexidina digluconato liberado en cada tiempo.

3.9 Evaluación de propiedad microbiológica

La elección de los microorganismos adecuados para la evaluación microbiológica depende de la zona de empleo prevista para el agente antiséptico a comprobar. Debería incluir una especie bacteriana gram-positiva, otra gram-negativa, una levadura y un moho (Flamenco y Guevara, 2011).

Adaptando la metodología de Flamenco y Guevara, (Flamenco y Guevara, 2011), se realizaron medidas a través de un ensayo de inhibición de desarrollo bacteriano, colocando los sistemas poliméricos cargados con el fármaco objeto de estudio en contacto con tres cepas, *Escherichia coli* (ATCC 8739), *Pseudomona aeruginosa* (ATCC 9027) y *Candida albicans* (ATCC 10231). La temperatura bajo la cual se realizó el ensayo fue de $35 \pm 2^\circ$ C durante 24 horas para las bacterias y de $25 \pm 2^\circ$ C por 5 días para la levadura, se emplearon tres tiempos de contacto entre el desinfectante y el microorganismo de prueba (5, 10,15 minutos).

3.10 Determinación morfológica de películas por microscopía electrónica de barrido (SEM)

La inspección morfológica de las películas se determinó en un Microscopio Electrónico de Barrido FEI QUANTA 200. Las muestras se sometieron a un tratamiento previo de recubrimiento por metalización, realizado en un Sputter SDC-050 de la Marca Balzers, en condiciones de prevacío (<10-1 torr) con argón como gas de ataque (plasma) sobre una placa (ánodo) de oro-paladio (8:2). La película se deposita sobre las muestras (cátodo) a corriente de descarga de +/- 50mA y el espesor típico es de +/- 200 nm.

Se analizaron cortes transversales y vistas superficiales de las películas magnificando la observación entre 280x y 2400x aumentos.

3.11 Análisis estadístico de los datos

La interpretación estadística de los datos a nivel de laboratorio fue llevada a cabo mediante un análisis de varianza (ANOVA) y test HSD Tukey con un nivel de confianza del 95%. Para tal fin se utilizó el software Statgraphics Centurión para Windows.

4 . Resultados y Discusión

4.1 Ensayo y evaluación preliminar de las formulaciones para la obtención de películas y tabletas.

4.1.1 Evaluación de tabletas:

En total se prepararon cuatro formulaciones por compresión directa, en la cual cada una de ellas se realizó bajo tres etapas determinantes: el tamizado, el mezclado y la compresión (Cornejo y Cordero, 2007); ninguna formulación tuvo inconvenientes en el proceso de manufactura de las mismas. Se encontró que las tabletas obtenidas de todas las formulaciones mostraron buena apariencia. Se obtuvieron tabletas redondas, lisas, de color blanco y libre de material extraño (figura 9).

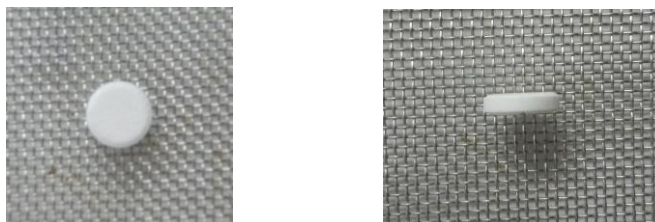


Figura 9. Fotos de las tabletas

En la tabla 7 se reportan los valores del peso promedio final y dimensiones de cada una de las formulaciones de las tabletas para las cuatro formulaciones estudiadas. A los datos obtenidos se les realizó el análisis de varianza (ANOVA), con un nivel de confianza del 95%. Después del análisis estadístico se pudo evidenciar que se presentan diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) en el peso promedio final y dimensiones entre los tratamientos de estudio, en lo que respecta a las dimensiones de la tableta, esto se puede deber a que después del proceso de compresión experimentan

fenómenos de expansión, influenciado por los materiales utilizados y la composición cuantitativa de cada uno de los excipientes en cada una de las formulaciones. De acuerdo con el análisis del test de Tukey se denota que la formulación TABFn2 tiene rasgos diferentes a las demás formulaciones.

Tabla 7. Valores medios de los ensayos físicos de las diferentes formulaciones de las tabletas obtenidas.

Formulación	Peso (mg) \pm SD		Diámetro		Espesor	
	Final		(mm) \pm SD		(mm) \pm SD	
TABFn1	100.57	\pm 0.55	6.48	\pm 0.01	2.65	\pm 0.01
TABFn2	101.64	\pm 0.16	6.43	\pm 0.01	2.66	\pm 0.01
TABFn3	101.39	\pm 0.39	6.46	\pm 0.01	2.60	\pm 0.01
TABFn4	101.24	\pm 0.35	6.49	\pm 0.04	2.65	\pm 0.01

Las dimensiones de las tabletas para uso en la cavidad bucal revisten de gran importancia, en el presente documento ya se ha mencionado el diámetro (6 mm) y el espesor (2 mm) a las que comúnmente son preparadas las tabletas o comprimidos mucoadhesivos.

Las tabletas formuladas en el desarrollo de este trabajo están dentro de los rangos cuando de dimensiones para preparados mucoadhesivos se trata. De acuerdo al diámetro se ajustarían perfectamente en las distintas superficies de la cavidad bucal.

El espesor de las tabletas del presente trabajo aun cuando estén un poco por encima de lo comúnmente encontrado en el mercado para este tipo de tabletas, reduciendo su espesor se podría afectar la estructura de la tableta, produciendo un efecto contrario a lo esperado y es el de desintegrarse muy rápido en la cavidad bucal, siendo el fármaco arrastrado por la saliva y los constantes movimientos internos de la boca, imposibilitándolo para ejercer su acción local.

4.1.2 Evaluación de películas:

Las condiciones para la preparación de las películas que se siguieron para el estudio se enfocaron preliminarmente en el trabajo de Pulido, (Pulido, 2012), sin embargo luego de muchos intentos por obtener un secado donde la película no se viera afectada, se

condujo a tratar las muestras de acuerdo al método de secado de Heo *et al.*, (Heo *et al.*, 2005), caracterizando de esta forma el desarrollo de las películas.

De acuerdo a las observaciones de las características físicas de las diferentes películas elaboradas, las formulaciones Fn1 y Fn3 mostraron buena apariencia, formaron películas transparentes y brillantes, lo que indica que es una ventaja en su aplicación sobre la superficie de la mucosa bucal como se muestra en la figura 10, mostrando no solo un aspecto estético adecuado al paciente sino que permite dar un nivel de confianza para su uso. Al olfato no se percibe algún olor característico y mostraron notablemente buena flexibilidad. La película obtenida de la formulación Fn2 mostró rugosidad en su superficie y cierto grado de opacidad. Se le atribuye esta característica a la adición del agar.

Las películas obtenidas fueron segmentadas en cuadrados de 2 x 2 cm. Con la escogencia de las películas con mejores propiedades mecánicas y de transporte, en esta área se garantiza que las películas quedarán cargadas con 5 mg de principio activo, igual cantidad con que se formularon las tabletas.

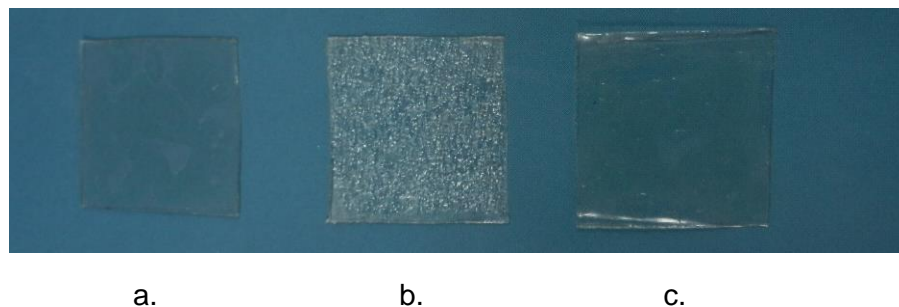


Figura 10. Fotos de las películas mucoadhesivas. a. formulación Fn1, b. formulación Fn2, c. formulación Fn3

Debido a la concentración del agar y la mayor concentración de pullulan usado en la fabricación de la formulación Fn4, se encuentra un aumento de la viscosidad al dejarse enfriar y reposar hasta completa deaireación. La preparación gelifica previo al vertimiento sobre los moldes y en el intento de un recalentamiento, se obtiene un resultado que no corresponde con el tipo de película buscada.

El desprendimiento de las películas de cada una de las formulaciones fabricadas se hizo cuidadosamente, debido a que por su alta adherencia se pegan a sí mismas, ocasionando daños sobre la estructura.

En la tabla 8 se reportan los valores del peso promedio final de cada una de las tres formulaciones elaboradas, así como el espesor y densidad de las mismas. A los datos obtenidos se les realizó el análisis de varianza (ANOVA), con un nivel de confianza del 95%. Después del análisis estadístico se pudo evidenciar que presentan diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$). El análisis del test de Tukey demuestra que la formulación Fn2 tiene características diferentes para todas las pruebas, evidenciándose la diferencia en la formulación respecto a Fn1 y Fn3.

Tabla 8. Valores medios de los ensayos físicos de las diferentes formulaciones de las películas obtenidas.

Formulación	Peso (g) \pm SD	Espesor (mm) \pm SD	Densidad (g/mm) \pm SD
Fn1	0.36 \pm 0.01	0.39 \pm 0.03	0.925 \pm 0.03
Fn2	0.48 \pm 0.01	0.54 \pm 0.01	0.875 \pm 0.02
Fn3	0.37 \pm 0.01	0.39 \pm 0.01	0.933 \pm 0.06

La formulación Fn2 mostró una diferencia en cuanto a sus valores medios de peso, espesor y densidad, esto se debe a la rugosidad de la película obtenida, inducida por la inclusión del agar.

Las películas mucoadhesivas de acuerdo con sus características de textura y diámetro, tendrían ventajas sobre las tabletas. Estas ventajas se asociarían al cumplimiento del tratamiento y preferencia por parte del paciente, al ser más cómodo de colocar y ser casi imperceptible al estar en contacto con las superficies de la boca, ya que por el tipo de lesión presentada, la tableta pudiere causar algún tipo de molestia por carecer de flexibilidad.

4.2 Evaluación de propiedades de transporte de tabletas

4.2.1 Estudios de hinchamiento

Los estudios de hinchamiento se llevaron a cabo para investigar el grado de hidratación de las diferentes formulaciones. En este caso la tableta entra en contacto con el medio acuoso, produciéndose una interacción en la interfase agua/polímero, la tableta se

humecta primero en la superficie y luego dentro de la matriz a través de poros microscópicos (Chiappetta *et al.*, 2006); (Sandoval *et al.*, 2008).

Los perfiles de hidratación observados en la figura 11 fueron similares para las formulaciones TABFn2, TABFn3 y TABFn4 hasta los 10 minutos, luego se ve una diferencia entre estas, se observa que la formulación TABFn2 sigue hidratándose, mientras que las formulaciones TABFn3 y TABFn4 no siguen captando más agua. La formulación TABFn2 que contiene Aerosil 200 sigue captando agua debido a que este por ser de naturaleza hidrofílica tendría la capacidad de retener agua, por otro lado su hinchamiento se ve retrasado a diferencia de la formulación TABFn1 que contiene MCC pero no Aerosil 200. Así bien, para el caso de la formulación TABFn1, esta muestra un comportamiento diferente al resto de formulaciones, esto se debe al alto contenido de Celulosa Microcristalina en el comprimido. Al representar una alta proporción en el sistema, la estructura interna de la matriz cambia, llegando a ser más porosa y menos restrictiva para que se difunda el agua hacía el interior del comprimido, produciendo de esta manera la relajación de las cadenas poliméricas con posterior hidratación del mismo y la continuación del proceso de erosión.

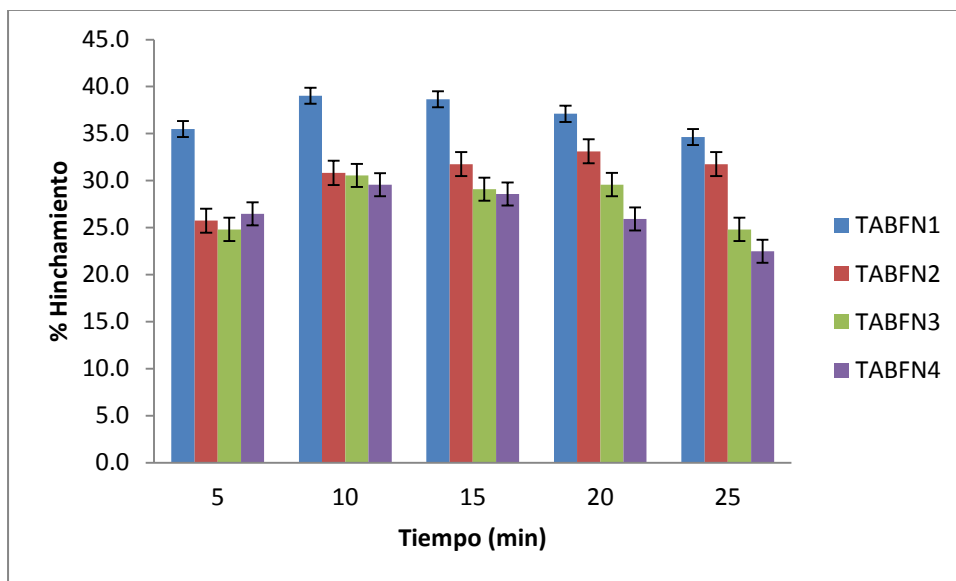


Figura 11. Porcentaje de hidratación de las tabletas en fluido símil salival. Cada valor representa la media de tres réplicas. Las barras de error corresponden a la desviación estándar.

Teniendo en cuenta los resultados anteriores de la hidratación de las tabletas, se evaluó el porcentaje de erosión producidas por el desgaste de las mismas (figura 12). Se observa que la formulación TABFn2 no se erosiona tan fácilmente como las otras tres formulaciones. Esto se da por la capacidad del Aerosil 200 de formar geles y de ejercer algún tipo de control sobre la viscosidad del preparado al entrar en contacto con un medio acuoso. Es decir, se ve reflejado tanto en la hidratación como en la erosión el marcado efecto que ejerce el uso del Aerosil 200.

En la prueba se observa que no existe un hinchamiento exagerado de la tableta, si bien el hinchamiento se produce a los primeros 5 minutos de entrar en contacto con el medio acuoso, a los 10 minutos ya empieza a erosionarse disminuyendo su diámetro considerablemente.

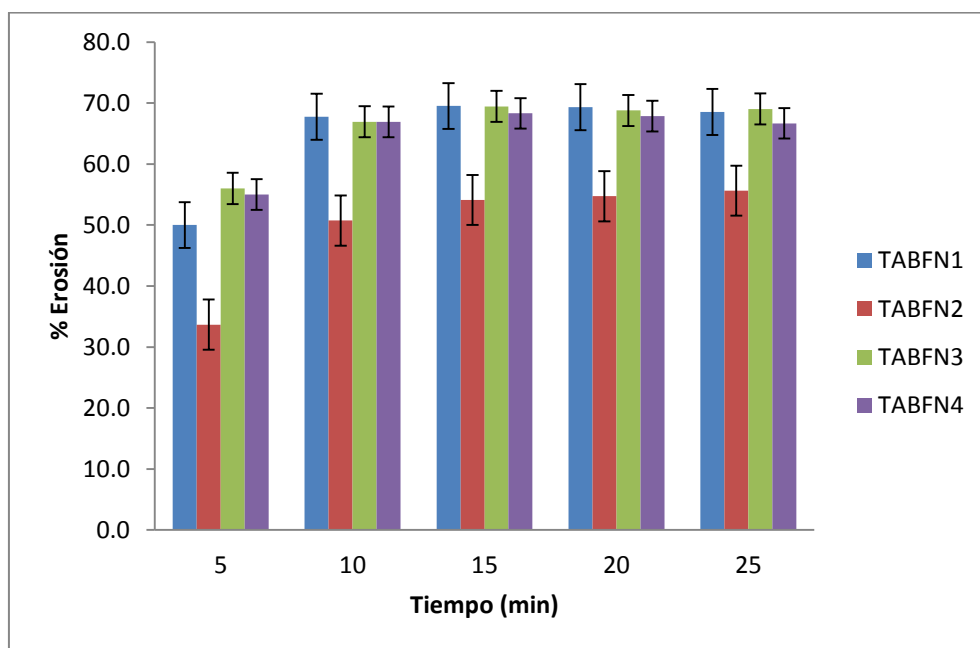


Figura 12. Erosión de las tabletas. Cada valor representa la media de tres réplicas. Las barras de error corresponden a la desviación estándar.

De lo anterior se deduce que el uso de las tabletas y su aplicabilidad en cualquier superficie de la mucosa bucal no ejercerían ningún tipo de inconveniente producto de su hinchamiento. Por el contrario, puede ser una ventaja ya que al relajarse las cadenas del polímero, el fármaco podría difundir desde sus redes de una manera controlada.

A los datos obtenidos se les realizó el análisis de varianza (ANOVA), con un nivel de confianza del 95%. Después del análisis estadístico se pudo evidenciar que presentan diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$). El análisis del test de Tukey demuestra que la formulación TABFn2 tiene rasgos diferentes para la prueba de erosión a todas las demás pero que en la prueba de hidratación comparte rasgos con la formulación TABFn1 que también contiene celulosa microcristalina.

4.3 Evaluación de propiedades de transporte de películas

4.3.1 Estudios de hinchamiento

En la prueba de hinchamiento, la integridad de las películas de las tres formulaciones ensayadas se vio drásticamente afectada ya que en pocos minutos (2 min) las muestras sumergidas tanto en agua destilada y medio fisiológico pH 6,75 sufren un proceso de ablandamiento, tan rápido, que no permite realizar las mediciones y pesajes de las mismas, a la vez que se torna muy pegajosa, conllevando a su adherencia sobre el recipiente que contiene el medio acuoso y no quedando íntegra en la malla que la contenía.

Vale la pena destacar que una hidratación excesiva conlleva a una rápida destrucción de la película, mientras que a través de una hidratación e hinchamiento controlado se predice un perfil de liberación del fármaco gradualmente, manteniendo la integridad de la película y proporcionando una liberación sostenida en el tiempo. El sistema de entrega del fármaco debe permanecer estable al entrar en contacto con el ambiente biológico y no cambiar su tamaño por efecto del hinchamiento, llevando a un tipo de liberación controlada en la cual la difusión del fármaco se logre a través de las macromoléculas del polímero (Pulido, 2012).

De acuerdo a lo anteriormente descrito se puede decir que las películas compuestas con el biopolímero pullulan se adaptan rápidamente a cualquier superficie de la mucosa oral, haciendo de estas películas ideales para entrega de fármacos en la cavidad bucal. El pullulan se puede combinar con otros polímeros que le confieran otras características de transporte, como por ejemplo la gelatina o alginato (Rodríguez *et al.*, 2011). Por lo tanto, se evidencia que la película experimenta un mayor cambio conformacional al relajar sus

cadena, favoreciendo así el paso del medio a través de ésta. A diferencia de la amilosa el pullulan tiene la facultad de disolverse en agua rápidamente y sin dejar trazas. Comúnmente, una película de pullulan de hasta 0.2 mm de espesor desaparece en contacto con el agua a 30° C en menos de un minuto (Hijiya *et al*, 1972). Esto probablemente se debe a la presencia de mayor cantidad de grupos hidroxilo capaces de interaccionar por puente de hidrogeno con el agua.

4.3.2 Estudios de transmisión de vapor de agua de las películas

En cuanto a los resultados obtenidos para el ensayo de la transmisión de vapor de agua de las películas, estos se presentan en la tabla 9.

Tabla 9. Parámetros en la determinación de la transmisión al vapor de agua

Tiempo (h)	Formulación		
	Fn1 (g/h-m ²)	Fn2 (g/h-m ²)	Fn3 (g/h-m ²)
1	5.23 ± 0.66	5.01 ± 0.98	4.77 ± 0.81
2	5.14 ± 0.63	4.39 ± 0.76	4.67 ± 0.66
3	4.82 ± 0.54	4.21 ± 0.61	4.50 ± 0.65
4	4.80 ± 0.88	4.35 ± 0.39	4.44 ± 0.76
5	4.43 ± 1.29	4.67 ± 0.38	4.35 ± 0.44
6	4.54 ± 1.05	4.32 ± 0.36	4.13 ± 0.41
7	4.12 ± 0.70	4.38 ± 0.06	4.07 ± 0.45
8	4.21 ± 0.41	4.56 ± 0.08	4.06 ± 0.32
9	4.07 ± 0.44	4.63 ± 0.52	4.21 ± 0.46
10	3.86 ± 0.29	4.58 ± 0.46	4.06 ± 0.35
11	3.90 ± 0.29	4.53 ± 0.17	4.08 ± 0.52
12	4.14 ± 0.25	4.40 ± 0.35	4.02 ± 0.45
TVA	5.22	4.54	4.71

En general, los polisacáridos forman películas con buenas propiedades mecánicas y de barrera al O₂ y CO₂, pero no a la humedad (al igual que las proteínas) debido a que son

también muy hidrofílicos, pero bien es cierto que su resistencia al agua es menor que el de las películas basadas en proteínas (López, 2013).

El pullulan es de carácter hidrofílico, lo cual favorece esta propiedad de transporte. La inclusión del agar afecta un poco esta propiedad, probablemente debido a que las películas con agar tiene la particularidad de ser insolubles en agua en condiciones ambientales, al igual que el agar solo (López, 2013).

Se observa que la película preparada según la formulación Fn1 presenta una mayor transmisión de vapor de agua (5.22 g/h-m^2), indicando que permite un mayor intercambio con el medio. La formulación Fn3 tiene una TVA mayor a la formula Fn2 pero no muy lejana, esta última formulación es la que contiene el agar. De acuerdo a los resultados, se puede decir que se mantuvo un rango uniforme en la transmisión del vapor de agua para todas las preparaciones, indicando que se presenta el paso de ésta a través de las películas en alguna proporción (Pulido, 2012). Sin embargo observando los resultados de la figura 13, nos podemos dar cuenta que a pesar de que la formulación Fn2 es la que mayor ganancia de agua obtuvo en función del tiempo, fue la que arrojó los menores resultados de transferencia al vapor de agua. Esto podría ser debido a la presencia del agar, el cual capta mucha agua en sus redes poliméricas pero no deja pasar el vapor de agua de la misma manera que las películas fabricadas sólo con pullulan. Esto indicaría que una película de agar combinada con pullulan podría eventualmente retardar la liberación del fármaco desde un soporte polimérico.

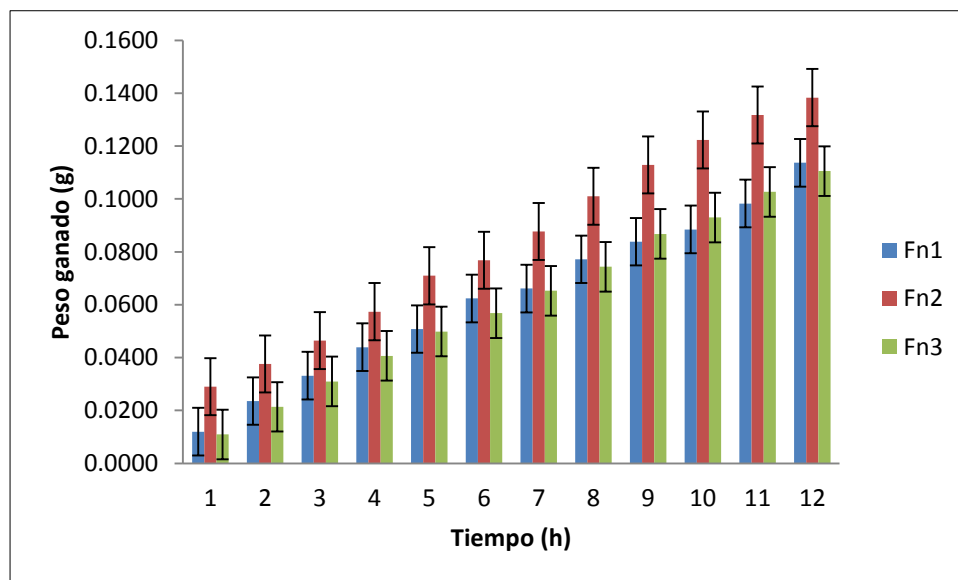


Figura 13. Peso ganado en función del tiempo de las películas. Cada valor representa la media de tres réplicas. Las barras de error corresponden a la desviación estándar.

Idealmente una película debe permitir una permeabilidad que no sea tan alta que conlleve a una caída abrupta de su fuerza adhesiva debido a la sobrehidratación, así como tampoco debe ser tan baja como para que el fármaco no sea capaz de ser liberado a través de la matriz polimérica.

A los datos obtenidos se les realizó el análisis de varianza (ANOVA), con un nivel de confianza del 95%. Después del análisis estadístico se pudo evidenciar que no se presentan diferencias estadísticamente significativas ($p > 0.05$). El análisis del test de Tukey demuestra que todas las formulaciones tienen rasgos similares para estas pruebas.

4.4 Determinación de propiedades mecánicas

Se efectuaron ensayos de resistencia mecánica tanto para películas y tabletas. En el caso de las películas se evalúa su comportamiento frente a dos tipos de fuerza diferente, una de perforación y otra de tensión, lo que permite tener una idea más amplia respecto al apropiado uso de las películas y como objetivo puntual determinar el efecto de la concentración del polímero bioadhesivo y de los plastificantes presentes en las formulaciones. Para el caso de las tabletas, se evalúa la dureza y la friabilidad como importantes parámetros de control en este tipo de forma farmacéutica.

4.4.1 Prueba de dureza de las tabletas

En la tabla 10 se reportan los valores de dureza promedio de cada una de las formulaciones de las tabletas obtenidas. Donde se evidencia que las formulaciones preparadas sólo con pullulan alcanzan durezas más altas trabajadas bajo las mismas condiciones. Las tabletas mucoadhesivas no deberían ser muy duras ya que podría originar molestias al paciente y por consiguiente el incumplimiento del tratamiento, incluso la liberación del fármaco puede verse afectado. Tampoco deberían ser muy blandas, ya que al entrar en contacto con la humedad de la cavidad bucal podría ocurrir una desintegración muy rápida que conlleve a que el fármaco sea arrastrado por la saliva y los movimientos de la boca. Si la tableta no queda adherida el tiempo suficiente, el fármaco no alcanzaría a ser liberado en su totalidad.

Tabla 10. Valores medios de la dureza de las diferentes formulaciones de las tabletas obtenidas.

Test	Dureza (Kp)			
	TABFn1	TABFn2	TABFn3	TABFn4
1	4.9	4.6	6.0	6.3
2	5.4	4.7	5.9	5.7
3	5.4	4.7	6.2	6.6
Prom	5.23	4.65	6.02	6.19
SD	0.254	0.162	0.180	0.472

A los datos obtenidos se les realizó el análisis de varianza (ANOVA), con un nivel de confianza del 95%. Después del análisis estadístico se pudo evidenciar que presentan diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$). El análisis del test de Tukey demuestra que las formulaciones TABFn1 y TABFn2 tienen rasgos similares, los cuales contienen MCC en su formulación y estos a su vez fueron diferentes a las formulaciones TABFn3 y TABFn4 las cuales contienen sólo pullulan en su formulación.

4.4.2 Prueba de friabilidad de las tabletas

En la tabla 11 se reportan los valores de friabilidad de cada una de las formulaciones de las tabletas obtenidas. Donde se evidencia que las formulaciones preparadas arrojaron valores muy bajos en esta prueba y se puede decir que tienen excelente friabilidad. Las tabletas que no presenten buena friabilidad, tienden a desgastarse con facilidad, un desgaste alto en los procesos de manufactura, conllevaría a obtener tabletas porosas y de mal aspecto, además en las pruebas de disolución generarían un efecto burst, el cual es la salida abrupta del fármaco de la forma farmacéutica.

Tabla 11. Valores medios de la prueba de friabilidad de las diferentes formulaciones de las tabletas obtenidas.

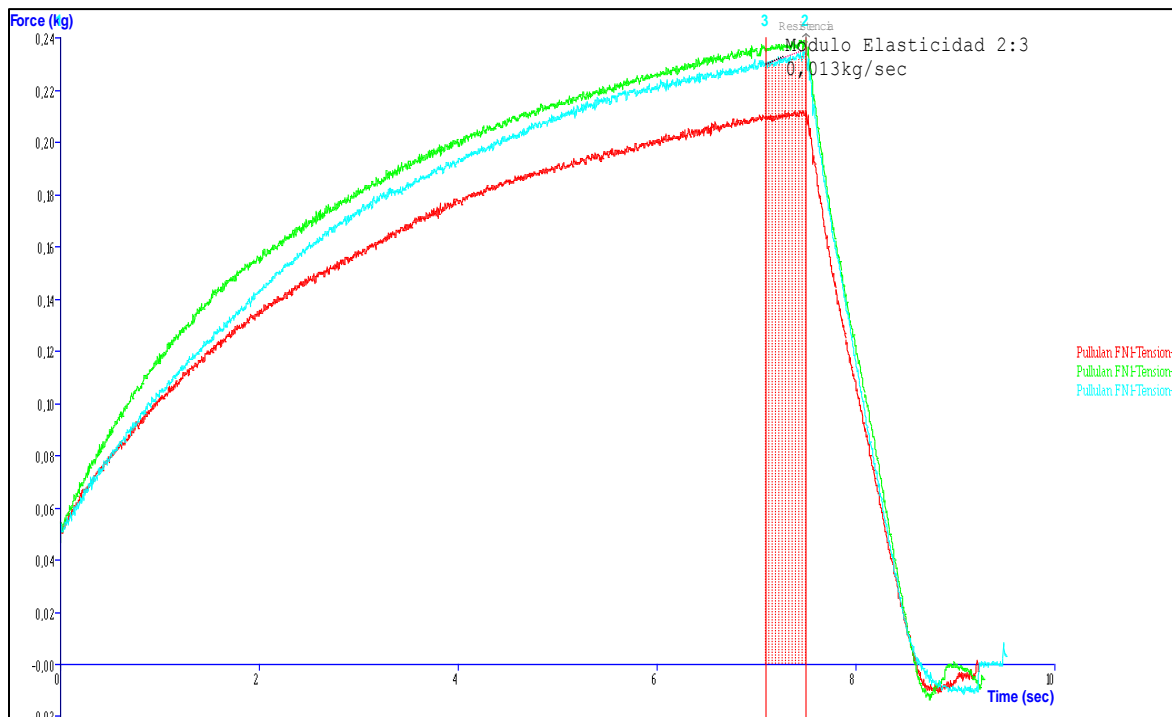
Test	Friabilidad (%)			
	TABFn1	TABFn2	TABFn3	TABFn4
1	0.07	0.06	0.02	0.04
2	0.04	0.08	0.02	0.02
3	0.05	0.01	0.03	0.02
Prom	0.05	0.05	0.02	0.03
SD	0.02	0.04	0.01	0.01

A los datos obtenidos se les realizó el análisis de varianza (ANOVA), con un nivel de confianza del 95%. Después del análisis estadístico se pudo evidenciar que no se presentan diferencias estadísticamente significativas ($p > 0.05$). El análisis del test de Tukey demuestra que todas las formulaciones tienen rasgos similares para esta prueba.

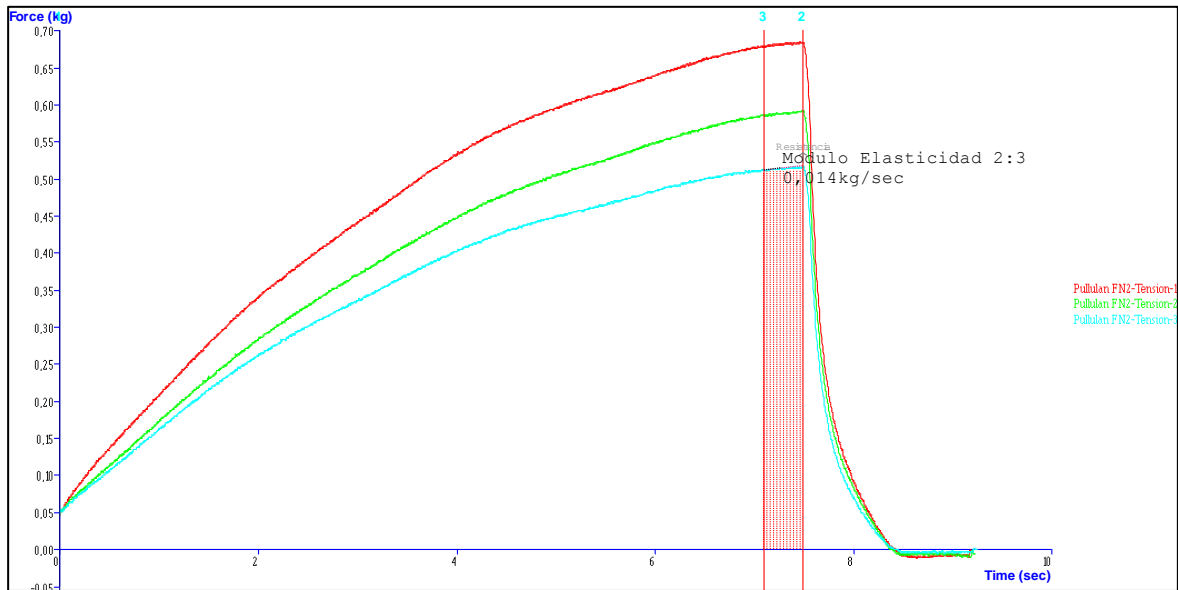
4.4.3 Resistencia a la ruptura por tensión de películas

En estos ensayos ninguna película sufrió ruptura por la tensión aplicada, únicamente se elongaron mas no se rompieron, de modo que al finalizar la prueba retornaron a su longitud inicial, por lo anterior, el comportamiento de estas películas es del tipo de comportamiento clásico de un material elástico o flexible y adaptables al contorno de las superficies de la cavidad oral.

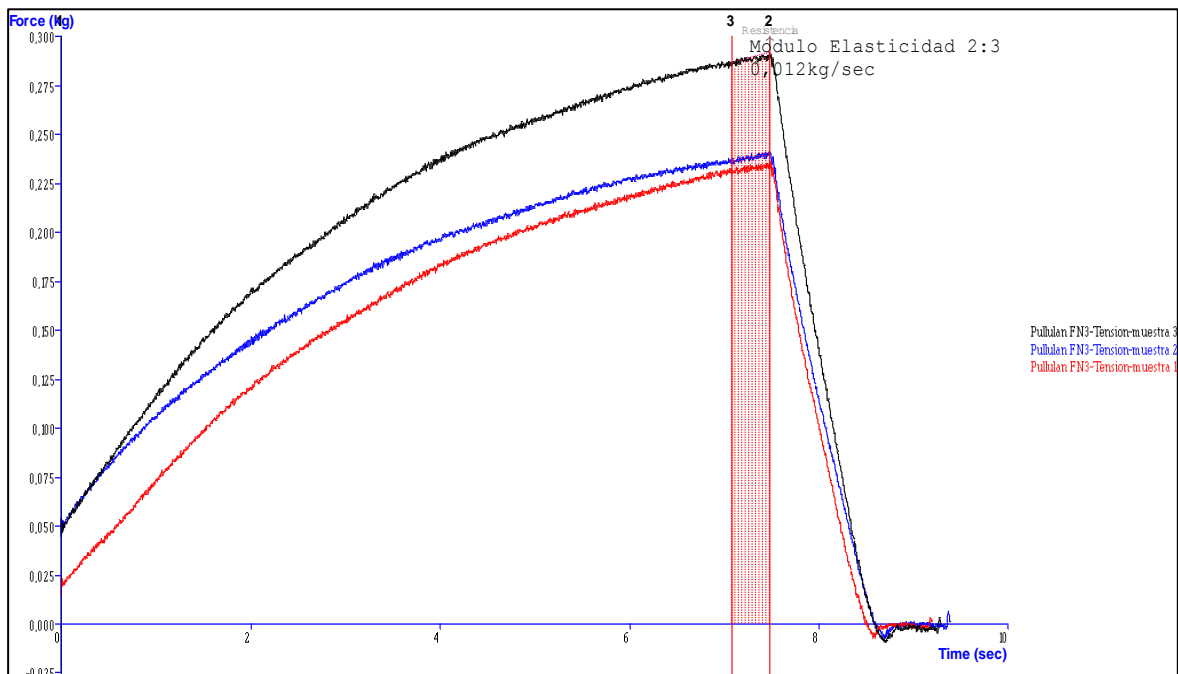
En la figura 14, se muestran la gráficas de tensión en función de la deformación de las películas evaluadas.



a.



b.



c.

Figura 14. Gráficas de tensión en función a la deformación de las películas poliméricas evaluadas. a. formulación Fn1, b. formulación Fn2, c. formulación Fn3. Cada valor representa la media de tres réplicas.

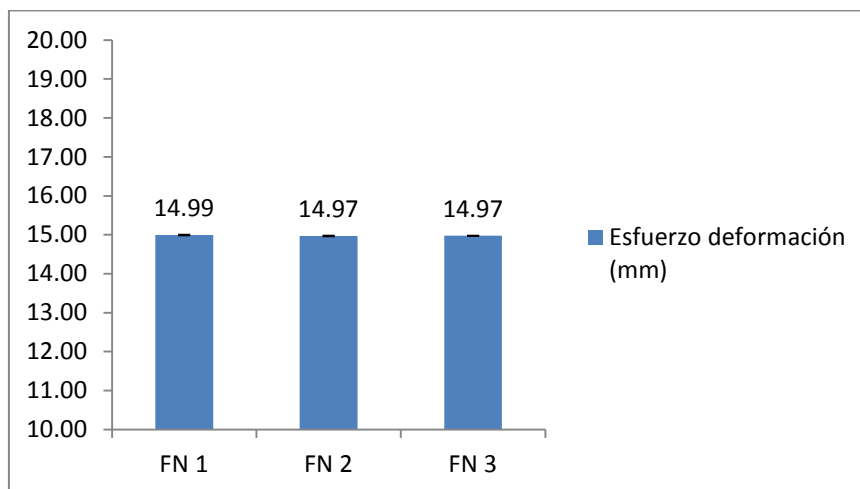


Figura 15. Esfuerzo-deformación de las películas poliméricas evaluadas. Cada valor representa la media de tres réplicas. Las barras de error corresponden a la desviación estándar.

La figura 15 demuestra el estiramiento de cada una de las películas cuando es halada desde los extremos, todas las películas tuvieron una elongación similar.

Tabla 12. Módulos de Young de las películas poliméricas evaluadas

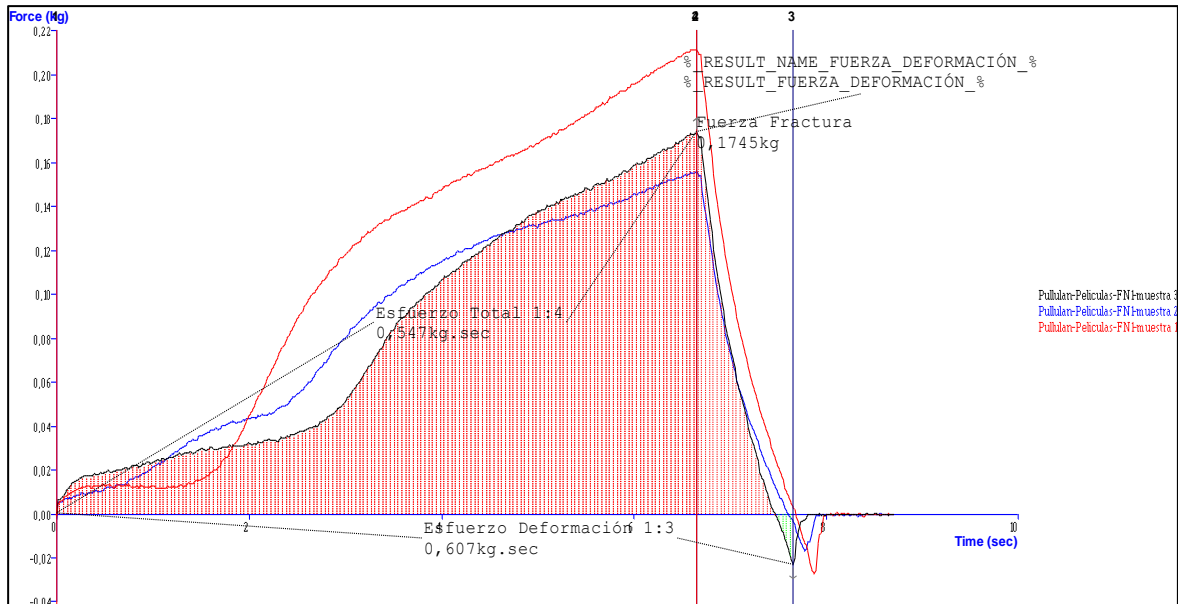
Película	Módulo de Young (N/mm ²) ± SD
Fn1	0.76 ± 0.07
Fn2	1.44 ± 0.17
Fn3	0.83 ± 0.11

Los valores arrojados por el módulo de Young de las formulaciones Fn1, Fn2 y Fn3 (tabla 12), muestran valores bajos en los módulos de Young, indicando que las películas no son rígidas y que presentan una elevada elasticidad, se deforman con facilidad y presentan gran capacidad de elongación y resistencia. Las fibras de elastina presentes en la dermis también tienen bajos módulos de Young, con valores de 6×10^5 N/m², o bien, 0.6 N/mm² estirándose hasta un 250% de su longitud inicial. El colágeno por su parte, es muy flexible y se rompe cuando el esfuerzo de tensión es de aproximadamente 500 millones de Newtons por metro cuadrado, es decir, que su resistencia es similar a la del acero

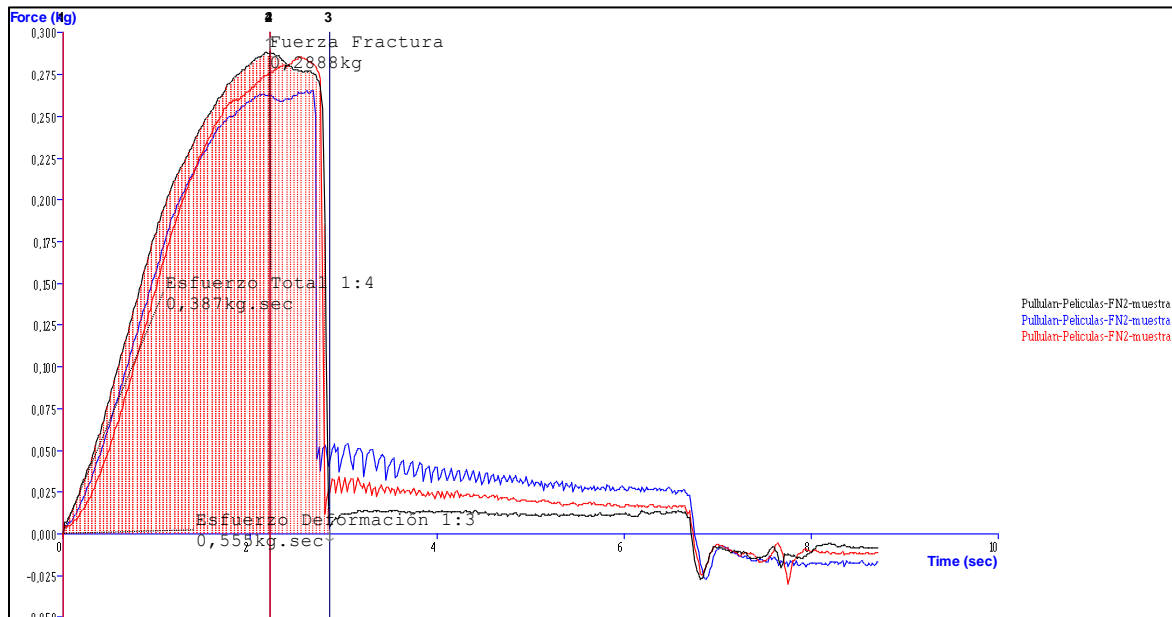
(Gutiérrez, 2000). A los datos obtenidos se les realizó el análisis de varianza (ANOVA), con un nivel de confianza del 95%. Después del análisis estadístico se pudo evidenciar que presentan diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$). El análisis del test de Tukey demuestra la rigidez de la formulación Fn2 ante las demás formulaciones.

4.4.4 Resistencia a la ruptura por perforación de películas

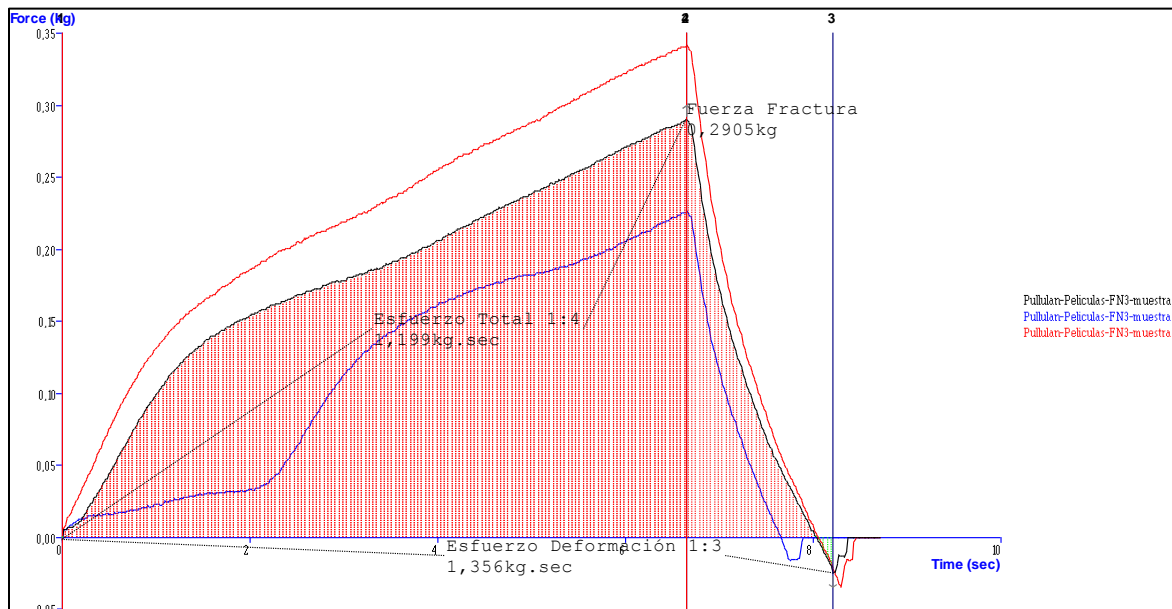
Esta prueba está enfocada principalmente a la evaluación de materiales de empaque y envase y mide la resistencia que opone un material al tratar de ser perforado. Es útil en este caso por permitir hacer comparación entre las diferentes formulaciones evaluadas. (Pulido, 2012).



a.



b.



c.

Figura 16. Gráficas de perforación de las películas poliméricas evaluadas. a. formulación Fn1, b. formulación Fn2, c. formulación Fn3. Cada valor representa la media de tres réplicas.

Tabla 13. Resultados del ensayo de resistencia a la ruptura por perforación de las películas

Películas	Elasticidad (mm)	Esfuerzo deformación (Kg.sec)
FN 1	19.91	0.683
FN 2	7.35	0.511
FN 3	19.97	1.290

En la figura 16, se muestran las gráficas de perforación – deformación de las películas de las formulaciones evaluadas. Ninguna película fue perforada, pero en la resistencia al esfuerzo formado, se observó que la película polimérica formulada con agar (Fn2) tuvo un comportamiento más rígido al tratar de ser perforada en su superficie, observándose en la elasticidad efectuada en esta prueba (tabla 13). Lo anterior podría atribuirse a observaciones como las realizadas por Cerrada, (Cerrada, 1995), donde atribuye a numerosos factores estructurales, junto con la composición química, el peculiar comportamiento mecánico de los polímeros, como son su peso molecular, entrecruzamiento y ramificación, cristalinidad y morfología cristalina, copolimerización, plastificación, orientación molecular, cargas, mezclas, separación de fases y orientación en bloques.

Los polímeros lineales de alto peso molecular y no iónico forman películas fuertes, como es el caso del agar, las películas producidas por este polímero presentan una apariencia clara y en general son fuertes, aunque son frágiles y poco flexibles (López, 2013). Esto demuestra el resultado arrojado de la película Fn2 la cual contiene agar, donde la película tuvo una menor resistencia a la deformación, sin embargo fue la que menos elasticidad tuvo, confirmando así su rigidez. A los datos obtenidos se les realizó el análisis de varianza (ANOVA), con un nivel de confianza del 95%. Después del análisis estadístico se pudo evidenciar que presentan diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$). El análisis del test de Tukey demuestra que la formulación Fn2 tiene rasgos distintos a las demás formulaciones.

Se desea desde el desempeño funcional de productos, que la película no presente excesiva rigidez que dificulte su manipulación durante la colocación sobre la mucosa; los valores obtenidos muestran que la formulación Fn1 presenta el comportamiento mecánico esperado, para la aplicación.

4.5 Evaluación de la capacidad mucoadhesiva *ex-vivo*

4.5.1 Ensayo para tabletas



Figura 17. Foto tableta adherida a la mucosa oral

En el ensayo de mucoadhesión *ex vivo*, de las cuatro formulaciones ensayadas, las formulaciones que permanecieron adheridas a la mucosa oral hasta su completa erosión y dispersión fueron la TABFn2, TABFn3 y TABFn4, ninguna tableta se despegó de la mucosa oral hasta su completa erosión al final de la prueba (120 min). De la formulación TABFn1, una de las tabletas se desprendió a los 105 min, las restantes permanecieron adheridas a la mucosa oral hasta su completa erosión. Esta últimas formulación TABFn1 al igual que TABFn2 contienen MCC en su composición, sin embargo la TABFn1 la contiene en un mayor porcentaje. La MCC aunque juega un papel fundamental en el complejo matricial ya que logra mantener la estructura del comprimido casi intacta a través del tiempo, de cierta forma puede afectar un poco la capacidad bioadhesiva del comprimido. En la figura 17, se observa la tableta adherida a la mucosa oral, mostrando que el tamaño es apropiado para ser colocado en la cavidad bucal de un adulto normal, para el ensayo de mucoadhesión hecho en condiciones dinámicas simulando un esfuerzo asociado con el movimiento de las pieza móvil de la boca, la cual actúa exigiendo el fenómeno de adhesión, se busca que falle la unión adhesiva cuando se pone en movimiento el aparato disolutor. A continuación ver figura 18.



Figura 18. Montaje de la tableta adherida a la mucosa oral porcina

4.5.2 Ensayo para películas



Figura 19. Foto película adherida a la mucosa oral

En el ensayo de mucoadhesión *ex vivo*, las tres formulaciones resultantes ensayadas Fn1, Fn2 y Fn3, permanecieron adheridas a la mucosa bucal hasta su completa erosión y dispersión, ninguna se despegó de la mucosa oral porcina.

La alta adhesión del pullulan (Rekha *et al*, 2007), permite que la película fabricada con este polímero quede adherida a la mucosa oral hasta su completa erosión. Varias clases de polímeros se han investigado con el fin de cumplir los requisitos de mucoadhesividad, tales como grupos funcionales apropiados para formar enlaces de hidrógeno, que tengan propiedades humectantes adecuadas, hinchamiento en agua, propiedades de carga y una flexibilidad suficiente para el enredo con la red del tejido (Salamat-Miller *et al*, 2005). Todas estas propiedades las tiene el pullulan, excepto la carga como propiedad de algunos polímeros, tales como el quitosan. El quitosan tiene una carga de naturaleza catiónica, este tiene la habilidad de interactuar fuertemente con las cargas eléctricas aniónicas de las glicoproteínas presentes en el mucus (Pulido, 2012). Sin embargo autores como Salamat-Miller y colaboradores, argumentan que los mecanismos de unión de los polímeros a las superficies mucosas aún no se tienen claro completamente. Algunas teorías de bioadhesión han sugerido que podría ocurrir a través de enredos físicos (teoría de la difusión) y/o interacciones químicas, tales como electrostática, hidrofobicidad, enlaces por puente de hidrógeno e interacciones Van der Waals (teorías de adsorción y electrónicas).

En la figura 19, se aprecia la película adherida a la mucosa oral, evidenciándose que al adherirse a la superficie de la mucosa, esta se adapta fácilmente y toma la forma del sitio de aplicación, para el ensayo de mucoadhesión hecho en condiciones dinámicas simulando un esfuerzo asociado con el movimiento de la pieza móvil de la boca, la cual

actúa exigiendo el fenómeno de adhesión, se busca que falle la unión adhesiva cuando se pone en movimiento el aparato disolutor. A continuación ver figura 20.



Figura 20. Montaje de la película adherida a la mucosa oral porcina

La tabla 14 consigna los resultados anteriormente descritos de mucoadhesión *ex vivo* para los dos sistemas poliméricos estudiados.

Tabla 14. Resultados del ensayo de mucoadhesión *ex vivo*

Formulación Tableta	Tiempo de desprendimiento de la mucosa (min)
TABFN1	105
TABFN2	Ninguna se desprende
TABFN3	Ninguna se desprende
TABFN4	Ninguna se desprende
Formulación Película	Tiempo de desprendimiento de la mucosa (min)
FN1	Ninguna se desprende
FN2	Ninguna se desprende
FN3	Ninguna se desprende

4.6 Incorporación del principio activo en los sistemas poliméricos

De acuerdo con los resultados obtenidos en los diferentes ensayos llevados a cabo durante el presente estudio, considerando las propiedades mecánicas, de transporte y uno de los factores más determinante como es el ensayo de mucoadhesión *ex-vivo*, se optó por evaluar el perfil de liberación del fármaco clorhexidina y la microbiología a partir de la formulación para las películas Fn1 y a partir de la formulación para los comprimidos TABFn2. La tabla 15 presenta los resultados de los análisis correspondientes a Valores medios de los ensayos realizados a los sistemas poliméricos.

La película cargada con el principio activo clorhexidina exhibió una apariencia similar a la de su blanco, de acuerdo a su transparencia y brillantez (figura 21).

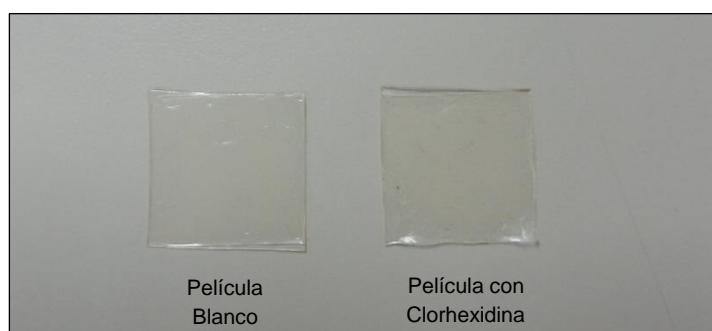


Figura 21. Foto del sistema blanco y del sistema cargado para las películas.

Tabla 15. Valores medios de los ensayos físicos a partir de las formulaciones cargadas

Película	Formulación Fn1 (Blanco) \pm SD	Formulación Fn1CLX (Cargado) \pm SD
peso (g)	0.36 \pm 0.01	0.37 \pm 0.01
espesor (mm)	0.39 \pm 0.03	0.40 \pm 0.01
densidad (g/mm ³)	0.924 \pm 0.03	0.933 \pm 0.04
Tableta	Formulación TABFn2 (Blanco) \pm SD	Formulación TABFn2CLX (Cargado) \pm SD
peso (mg)	101.64 \pm 0.16	100.95 \pm 0.02
Diámetro (mm)	6.43 \pm 0.01	6.45 \pm 0.02
espesor (mm)	2.66 \pm 0.01	2.55 \pm 0.02

Se escogió una prueba determinante como es la mucoadhesión *ex-vivo* y se hicieron los ensayos a los sistemas cargados para películas y tabletas (Fn1CLX y TABFn2CLX) con el fin de evaluar la incidencia del fármaco en los preparados. El correspondiente a tres réplicas de los dos sistemas poliméricos permanecieron adheridos a la mucosa oral porcina hasta su completa erosión y dispersión, conservando la propiedad de mucoadhesión.

4.7 Liberación de la clorhexidina desde las películas poliméricas y comprimidos a base de pullulan

De acuerdo con los resultados obtenidos en los diferentes ensayos llevados a cabo durante el presente estudio, considerando tanto las propiedades mecánicas, así como de hinchamiento y mucoadhesión, se optó por evaluar el perfil de liberación a partir de la formulación para las películas Fn1 y a partir de la formulación para los comprimidos TABFn2 cargados con el fármaco objeto de estudio.

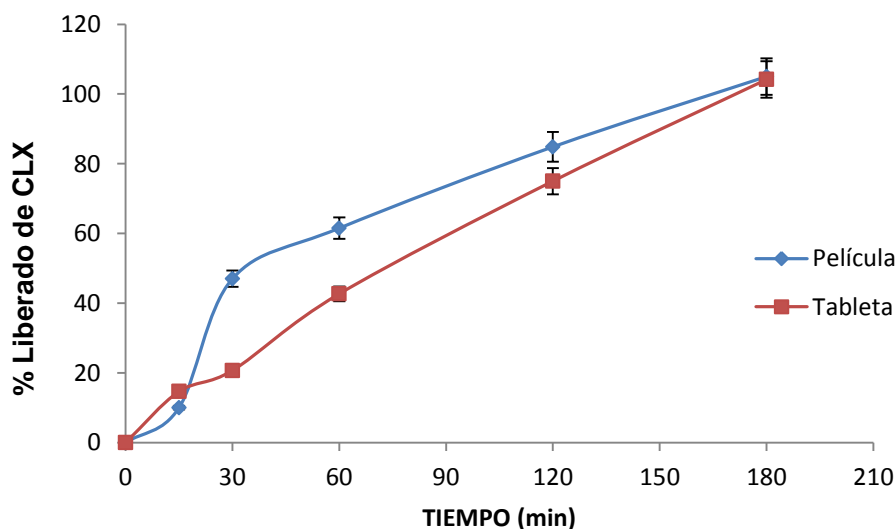


Figura 22. Perfil de liberación de los sistemas poliméricos evaluados. Cada valor representa la media de seis réplicas. Las barras de error corresponden a la desviación estándar.

Al aplicar el modelo independiente de los factores de similitud y diferencia a los perfiles obtenidos a partir de las películas y comprimidos (figura 22) se observa que los datos de disolución de películas y comprimidos son diferentes, arrojando resultados de similitud

(f_2) de 41 (50-100) y de diferencia (f_1) de 20 (0-15). Sin embargo, la cesión de clorhexidina digluconato a partir de los sistemas poliméricos llega a un 100% de fármaco disuelto. Este marcado efecto prolongado por parte del comprimido es el resultado de erosionarse más lento que la película, mientras que la película se erosiona y dispersa a los pocos minutos, la erosión de la tableta se logró observar a los 60 minutos reteniendo el fármaco por más tiempo en sus redes poliméricas. A los 180 minutos, ambos perfiles demuestran el 100% de fármaco disuelto. El modelo matemático dependiente al cual se ajustan los perfiles de disolución de los dos sistemas poliméricos después de hacer los respectivos ajustes de los datos de liberación, es el de Korsmeyer y Peppas, el modelo matemático propuesto es generalmente lineal para valores de $M_t/M_\infty < 0,6$. Este modelo intenta explicar mecanismos de liberación de fármacos donde se presenta erosión y/o disolución de la matriz, y no es más que una forma generalizada de la ecuación de Higuchi como se expresa en la ecuación 7.

$$\frac{M_t}{M_\infty} = K \cdot t^n$$

Ecuación 7

Donde K es la constante de velocidad de liberación que incorpora características estructurales y geométricas del sistema de liberación y n es el exponente que indica el mecanismo mediante el cual ocurre la liberación. El valor del exponente n brinda información sobre la cinética de liberación del fármaco, por lo que si n es igual a 0,5, la liberación del fármaco tiene lugar a través de un fenómeno de difusión de tipo fickiano, si n toma valores entre 0,5 y 1 indica que la liberación del fármaco es debida a un mecanismo de difusión no fickiano o anómalo y cuando n es igual a 1, el mecanismo de liberación del fármaco depende del proceso de relajación de las cadenas poliméricas (Aragón *et al.*, 2009).

Tabla 16. Resultados modelo matemático Korsmeyer peppas

Formulación	Modelo Korsmeyer Peppas	
	n	(r^2)
TABFn2CLX	0.9858	0.9997
Fn1CLX	0.9926	0.9989

Teniendo en cuenta las consideraciones arriba descritas y el modelo de Korsmeyer-Peppas (Tabla 16) la velocidad de difusión del fármaco y la velocidad de relajación de las cadenas del polímero son del mismo orden de magnitud. En este caso, el proceso de difusión no fickiano se denomina anómalo, el cual puede ser interpretado como un proceso complejo, que no puede ser descrito como un modelo simple para predecir las observaciones experimentales. Los datos experimentales fueron evaluados cinéticamente utilizando el programa computacional (KinetDS 3.0®).

4.8 Evaluación de propiedad microbiológica

Para la evaluación de la actividad antimicrobiana de los sistemas poliméricos cargados con el fármaco, se calculó el promedio de la reducción logarítmica para los tres microorganismos de prueba y para los tres tiempos de ensayo. En la tabla 17 y 18 se muestran los resultados de inhibición de desarrollo bacteriano para películas y tabletas.

Tabla 17. Resultados de inhibición de desarrollo bacteriano para películas

<i>E.coli</i> ATCC 8739						
	Caja 1	Caja 2	Caja 3	Promedio	Logaritmo	Diferencia
Control +	917 x 10 ⁹	901 x 10 ⁹	886 x 10 ⁹	901 x 10 ⁹	11.9547	-----
5 minutos	63 x 10 ⁹	70 x 10 ⁹	67 x 10 ⁹	66 x 10 ⁹	10.8195	1.1352
10 minutos	0	0	0	---	---	---
15 minutos	0	0	0	---	---	---
<i>P.aeruginosa</i> ATCCC 9027						
	Caja 1	Caja 2	Caja 3	Promedio	Logaritmo	Diferencia
Control +	181 x 10 ⁹	174 x 10 ⁹	185 x 10 ⁹	180 x 10 ⁹	11.2553	-----
5 minutos	18 x 10 ⁹	11 x 10 ⁹	15 x 10 ⁹	14 x 10 ⁹	10.1461	1.1092
10 minutos	0	0	0	---	---	---
15 minutos	0	0	0	---	---	---
<i>C.albicans</i> ATCC 10231						
	Caja 1	Caja 2	Caja 3	Promedio	Logaritmo	Diferencia
Control +	321 x 10 ⁷	330 x 10 ⁷	319 x 10 ⁷	323 x 10 ⁷	9.5092	-----
5 minutos	55 x 10 ⁷	61 x 10 ⁷	64 x 10 ⁷	60 x 10 ⁷	8.7782	0.731
10 minutos	0	0	0	---	---	---
15 minutos	0	0	0	---	---	---

Tabla 18. Resultados de inhibición de desarrollo bacteriano para tabletas

<i>E.coli</i> ATCC 8739						
	Caja 1	Caja 2	Caja 3	Promedio	Logaritmo	Diferencia
Control +	917 x 10 ⁹	901 x 10 ⁹	886 x 10 ⁹	901 x 10 ⁹	11.9547	-----
5 minutos	63 x 10 ⁹	70 x 10 ⁹	67 x 10 ⁹	66 x 10 ⁹	10.8195	1.1352
10 minutos	0	0	0	---	---	---
15 minutos	0	0	0	---	---	---
<i>P.aeruginosa</i> ATCC 9027						
	Caja 1	Caja 2	Caja 3	Promedio	Logaritmo	Diferencia
Control +	181 x 10 ⁹	174 x 10 ⁹	185 x 10 ⁹	180 x 10 ⁹	11.2553	-----
5 minutos	18 x 10 ⁹	11 x 10 ⁹	15 x 10 ⁹	14 x 10 ⁹	10.1461	1.1092
10 minutos	0	0	0	---	---	---
15 minutos	0	0	0	---	---	---
<i>C.albicans</i> ATCC 10231						
	Caja 1	Caja 2	Caja 3	Promedio	Logaritmo	Diferencia
Control +	321 x 10 ⁷	330 x 10 ⁷	319 x 10 ⁷	323 x 10 ⁷	9.5092	-----
5 minutos	55 x 10 ⁷	61 x 10 ⁷	64 x 10 ⁷	60 x 10 ⁷	8.7782	0.731
10 minutos	0	0	0	---	---	---
15 minutos	0	0	0	---	---	---

Se observó para todos los ensayos efectuados que luego de los 5 minutos de contacto, hay una considerable reducción del número de microorganismos sobrevivientes y a los 10 min de contacto no se encontró ningún sobreviviente, indicando que la clorhexidina digluconato en ambos sistemas poliméricos es efectiva contra los microorganismos de prueba y confirmando que hay liberación del principio activo desde estos sistemas de transporte diseñados.

Los sistemas mucoadhesivos objeto de estudio se convierten de esta forma en un aporte innovador, el cual puede ser reproducido a escala industrial y ser comercializado para dar solución a un problema, mejorando las condiciones de vida para el paciente. Así mismo el presente trabajo sería entonces una excelente posibilidad de abrir camino a futuras investigaciones por parte de estudiantes, convirtiéndose de esta manera en un desafío en la búsqueda de nuevas alternativas que superen las limitaciones que imponen las variables fisiológicas de los diferentes lugares de aplicación.

4.9 Determinación morfológica de películas por microscopía electrónica de barrido (SEM)

Teniendo en cuenta el criterio de selección acogido para el ensayo de liberación, esta determinación se realizó únicamente sobre las películas blanco obtenidas de la formulación Fn1 y de las películas cargadas obtenidas de la formulación Fn1CLX.

Las primeras cuatro micrografías de la figura 23, corresponden a una observación hecha en corte transversal de las películas blanco y cargadas, en dos aumentos diferentes.

Se observa una buena distribución de los polímeros, no se presenta separación de fases entre estos y la película presenta una morfología suave y uniforme tanto en la película blanco como en la película con clorhexidina.

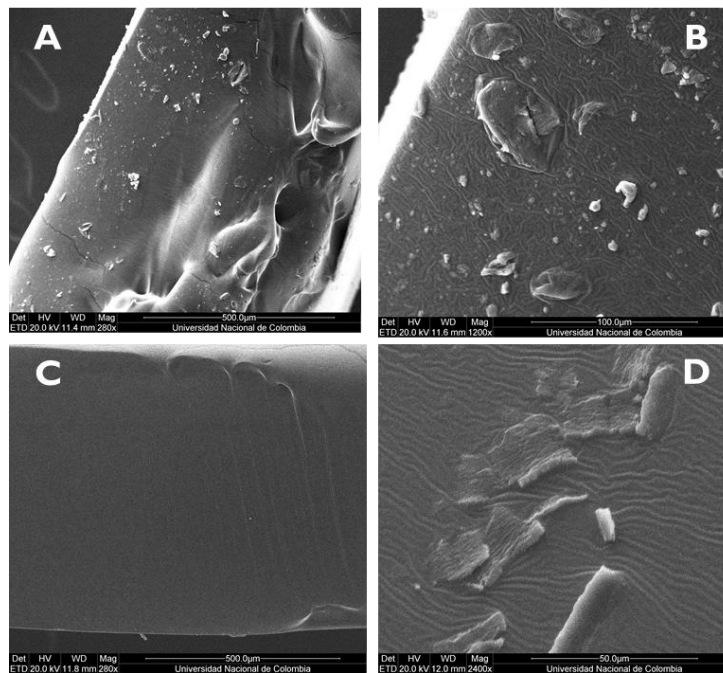


Figura 23. Micrografías en corte transversal de las películas Fn1 y Fn1CLX. A y B corresponden a las micrografías de las películas blanco en menor (280x) y mayor (1200x) aumento, respectivamente; C y D son las micrografías de las películas con clorhexidina, igualmente en menor (280x) y mayor (2400x) aumento de izquierda a derecha.

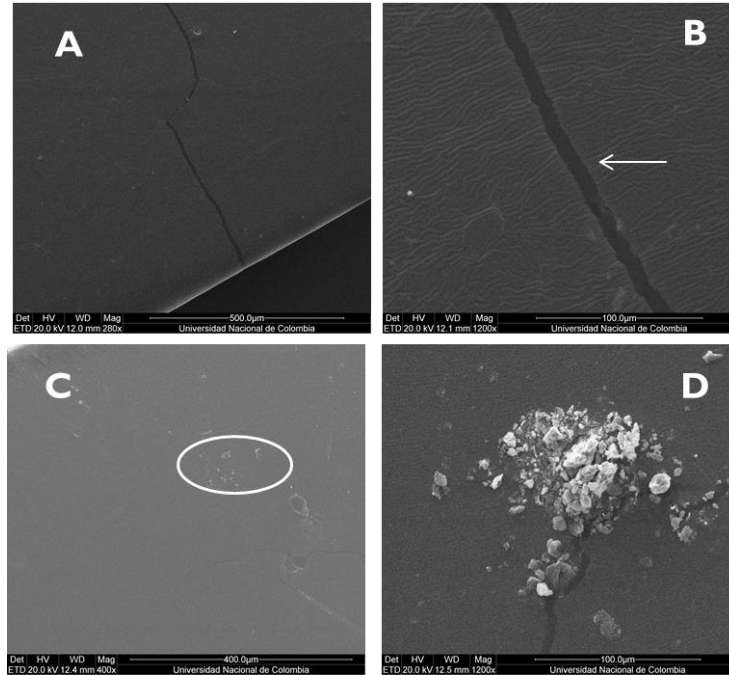


Figura 24. Micrografías con vista superficial de las películas Fn1 y Fn1CLX. A y B corresponden a las micrografías de las películas blanco en menor (280x) y mayor (1200x) aumento, respectivamente; C y D son las micrografías de las películas con clorhexidina, igualmente en menor (400x) y mayor (1200x) aumento de izquierda a derecha.

En la observación de las películas vistas desde la superficie de la figura 24, para todas las muestras se observa una distribución suave y sin fluctuaciones, se observa una ligera fractura en las películas blanco que puede deberse a la manipulación de esta al someterla a la criofractura para su análisis, según lo señala la flecha. En las películas cargadas con clorhexidina, magnificando el aumento, se observan cristales, que pudieren corresponder al fármaco, pero esto no lo podemos asegurar dado a que no se hizo el análisis correspondiente para su determinación, sin embargo en las micrografías la distribución homogénea hace alusión a la ausencia de poros.

5 Conclusiones y recomendaciones

5.1 Conclusiones

El uso del pullulan como polímero biodegradable a partir de la realización de esta investigación, demuestra su utilidad como un soporte polimérico versátil en la manufactura de dos tipos de preparados para su uso en la cavidad bucal.

Los sistemas poliméricos estudiados de acuerdo a las propiedades evaluadas, reúnen características que le confieren la posibilidad de incorporar el principio activo clorhexidina digluconato para preparados mucoadhesivos.

Se logró desarrollar películas poliméricas funcionales como un sistema alternativo de elección para transportar fármacos que deban ser fijados a la mucosa bucal, indistintamente que se dispersen en medio acuoso en pocos minutos.

Las tabletas mucoadhesivas se convierten en preparados alternativos para liberar fármacos de una manera gradual, para aquellos fármacos que requieren fijarse en las superficies de la mucosa oral por un tiempo de residencia mayor.

Las películas de pullulan sin estar en combinación con otros polímeros, demuestran tener excelentes propiedades mecánicas y de transporte, permitiendo que se fijen a cualquier superficie de la mucosa bucal y faciliten el paso de los fluidos biológicos a través de sus cadenas poliméricas cediendo el fármaco de elección.

Los estudios de liberación demostraron que ambos sistemas poliméricos entregan el principio activo en su totalidad, permitiendo de esta manera prever la posible eficacia frente a las infecciones de la boca.

Los sistemas poliméricos objeto de estudio en el presente trabajo cargados con el principio activo clorhexidina digluconato, demuestran efectividad, inhibiendo el desarrollo de microorganismos como bacterias y levaduras.

5.2 Recomendaciones

Combinar el pullulan con otros polímeros que puedan mejorar de alguna manera las propiedades mecánicas y de transporte para los dos sistemas poliméricos estudiados.

Evaluar a nivel *in vitro*, la liberación del fármaco en agua u otros medios diferentes al evaluado en este estudio.

En posteriores ensayos, evaluar en las propiedades de transporte, el oxígeno y dióxido de carbono, que brinde un soporte más completo a los ensayos de permeabilidad.

Evaluar en posteriores estudios, la estabilidad del fármaco en los sistemas poliméricos evaluados.

En posteriores investigaciones, realizar la corrección organoléptica en los sistemas poliméricos obtenidos, ya que no se tuvo en cuenta en el presente trabajo por no ser objeto principal del estudio.

Anexo A: Estadístico de los ensayos de variación de peso de las tabletas

Tabla ANOVA para Variación de peso

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	1,86269	3	0,620897	4,13	0,0482
Intra grupos	1,2024	8	0,1503		
Total (Corr.)	3,06509	11			

Pruebas de Múltiple Rangos para Variación de Peso

Método: 95,0 porcentaje Tukey HSD

<i>Tab Varia</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
TABFn1	3	100,573	x
TABFn4	3	101,243	xx
TABFn3	3	101,39	xx
TABFn2	3	101,637	x

Anexo B: Estadístico de los ensayos de diámetro de las tabletas

Tabla ANOVA para Diámetro

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	0,007	3	0,00233333	5,09	0,0292
Intra grupos	0,00366667	8	0,000458333		
Total (Corr.)	0,0106667	11			

Pruebas de Múltiple Rangos para Diámetro

Método: 95,0 porcentaje Tukey HSD

<i>Tab dia</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
TABFn2	3	6,42667	X
TABFn3	3	6,45667	XX
TABFn1	3	6,48333	X
TABFn4	3	6,48667	X

Anexo C: Estadístico de los ensayos de variación de peso de películas

Tabla ANOVA para Peso por Pelicula

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	0,02456	2	0,01228	89,01	0,0000
Intra grupos	0,000827733	6	0,000137955		
Total (Corr.)	0,0253877	8			

Pruebas de Múltiple Rangos para Peso por Pelicula

Método: 95,0 porcentaje LSD

<i>Pelicula</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
FN1	3	0,362517	x
FN3	3	0,36763	x
FN2	3	0,4758	x

Anexo D: Estadístico de los ensayos de espesor de películas

Tabla ANOVA para Espesor Pelicula

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	0,0452062	2	0,0226031	69,86	0,0001
Intra grupos	0,00194133	6	0,000323556		
Total (Corr.)	0,0471476	8			

Pruebas de Múltiple Rangos para Espesor Pelicula

Método: 95,0 porcentaje Tukey HSD

<i>Pelicula</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
FN1	3	0,392667	X
FN3	3	0,394667	X
FN2	3	0,544	X

Anexo E: Estadístico del % de Hidratación de tabletas

Tabla ANOVA para % Hidratación Tableta

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	1452,5	3	484,168	6,74	0,0010
Intra grupos	2587,93	36	71,887		
Total (Corr.)	4040,44	39			

Pruebas de Múltiple Rangos para % Hidratación Tableta

Método: 95,0 porcentaje Tukey HSD

<i>Tab Hidra</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
TABFN4	9	20,3778	X
TABFN3	9	21,7333	X
TABFN1	11	29,1	XX
TABFN2	11	35,3182	X

Anexo F: Estadístico del % de Erosión de tabletas

Tabla ANOVA para % Erosión Tableta

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	656,239	3	218,746	5,69	0,0024
Intra grupos	1539,09	40	38,4771		
Total (Corr.)	2195,32	43			

Pruebas de Múltiple Rangos para % Erosión Tableta

Método: 95,0 porcentaje Tukey HSD

<i>Tab Erro</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
TABFN2	11	54,6545	X
TABFN4	11	62,5091	X
TABFN3	11	63,7273	X
TABFN1	11	64,1545	X

Anexo G: Estadístico del peso ganado en función del tiempo de las películas

Tabla ANOVA para peso ganado Película

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	0,00313836	2	0,00156918	1,26	0,2958
Intra grupos	0,0409587	33	0,00124117		
Total (Corr.)	0,044097	35			

Pruebas de Múltiple Rangos para peso ganado Película

Método: 95,0 porcentaje Tukey HSD

<i>Pelicula</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
Fn3	12	0,0527083	X
Fn1	12	0,0532917	X
Fn2	12	0,0728	X

Anexo H: Estadístico de la dureza de las tabletas

Tabla ANOVA para Dureza Tableta

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	4,61047	3	1,53682	19,07	0,0005
Intra grupos	0,6446	8	0,080575		
Total (Corr.)	5,25507	11			

Pruebas de Múltiple Rangos para Dureza Tableta

Método: 95,0 porcentaje Tukey HSD

<i>Tab dure</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
TABFn2	3	4,65	x
TABFn1	3	5,23333	x
TABFn3	3	6,02333	x
TABFn4	3	6,18667	x

Anexo I: Estadístico de la friabilidad de las tabletas

Tabla ANOVA para %Friabilidad Tableta

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	0,00216667	3	0,000722222	1,70	0,2438
Intra grupos	0,0034	8	0,000425		
Total (Corr.)	0,00556667	11			

Pruebas de Múltiple Rangos para %Friabilidad Tableta

Método: 95,0 porcentaje Tukey HSD

<i>Tab Fria</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
TABFn3	3	0,0233333	X
TABFn4	3	0,0266667	X
TABFn2	3	0,05	X
TABFn1	3	0,0533333	X

Anexo J: Estadístico de los módulos de Young.

Tabla ANOVA para Modulo de Young

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	0,832475	2	0,416237	25,04	0,0012
Intra grupos	0,099718	6	0,0166197		
Total (Corr.)	0,932193	8			

Pruebas de Múltiple Rangos para Modulo de Young

Método: 95,0 porcentaje Tukey HSD

<i>Pelicula</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
FN1	3	0,756733	X
FN3	3	0,8312	X
FN2	3	1,4359	X

Anexo K: Estadístico de la resistencia a la ruptura por perforación.

Tabla ANOVA para resistencia a la ruptura Pelicula

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	1,00332	2	0,501658	8,44	0,0181
Intra grupos	0,356817	6	0,0594696		
Total (Corr.)	1,36013	8			

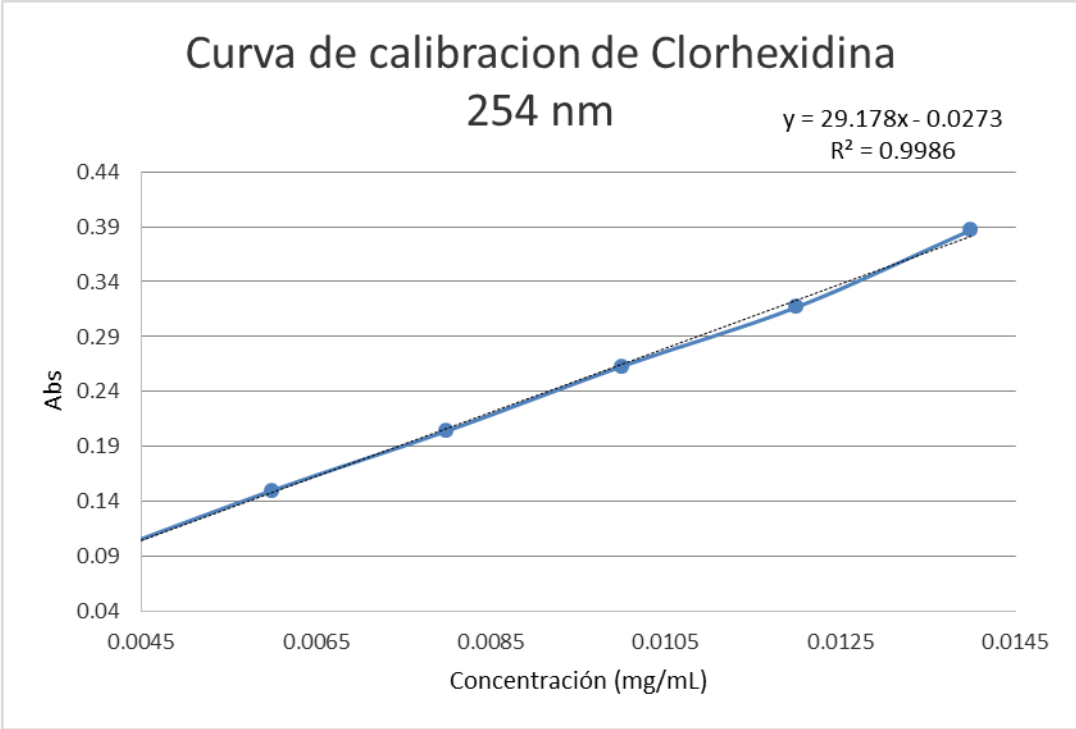
Pruebas de Múltiple Rangos para resistencia a la ruptura Pelicula

Método: 95,0 porcentaje Tukey HSD

<i>Pelicula IV</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
FN2	3	0,511333	X
FN1	3	0,683	XX
FN3	3	1,28967	X

Anexo L: Resultados de Absorbancia vs Concentración del CLX (mg/mL).

Réplica 1		Réplica 2		Réplica 3	
[mg/mL]	A	[mg/mL]	A	[mg/mL]	A
0,0040	0.09093	0,0040	0.09076	0,0040	0.09040
0,0060	0.14958	0,0060	0.15005	0,0060	0.15006
0,0080	0.20393	0,0080	0.20441	0,0080	0.20400
0,0100	0.26362	0,0100	0.26283	0,0100	0.26247
0,0120	0.31669	0,0120	0.31675	0,0120	0.31700
0,0140	0.38726	0,0140	0.38729	0,0140	0.38722



Ecuación de la forma $y = a + bx$	
Parámetro	Valor
Coefficiente de determinación (r^2)	0,9986
Coefficiente de determinación ajustado (r^2)	0,999
Intercepto (a)	-0,0273
Pendiente (b)	29.178

Bibliografía

Abramson S., Alexander H., Best S., "Biomaterials Science", Elsevier, San Diego, 2004, p.67- 68.

Agustina A., Martinelli M., Strumia M., Desarrollo de un sistema mucoadhesivo empleando quitosán como matriz. Su posible aplicación en lesiones de la mucosa oral. 2do Encuentro de Jóvenes Investigadores en Ciencia y Tecnología de Materiales, 2008.

Amaguayo S., Elaboración de tabletas adelgazantes a partir de tres plantas existentes en la provincia de Chimborazo a escala piloto, tesis para obtener título de Bioquímico Farmacéutico, Escuela superior politécnica de Chimborazo, Ecuador, 2013. p. 17 – 18.

Aragón J., González R., Brizuela N., Oliver L., Estudio cinético de liberación in vitro en un biomaterial compuesto por HAP-200/POVIAC/CaCO₃, Revista Iberoamericana de Polímeros, V 10 (2), 2009.

Arévalo N., Alemán M., Rojas M., Morales R., Películas biodegradables a partir de residuos de cítricos: propuesta de empaques activos, Rev Latinoam Biotecnol Amb Algal 1(2), 2010, p.124 -134.

Arévalo J., Arribas J., Hernandez M^a., Lizan M., Guía de utilización de antisépticos, Grupo de trabajo sobre desinfectantes y antisépticos, 1998, p. 11.

Arredondo C., Ramirez O., Ajouria M., Ortega L., Gonzales R., Herrera R., Aplicación local de tetraciclina y metronidazol en bolsas periodontales, Revista Medicina Oral, Vol. I, No.3, 1999, p. 76.

ASTM E 96/E 96M – 05, Standard Test Methods for Water Vapor Transmission of Materials applications, American Society for Testing and Materials, 2005.

Bajdik J., Regdon G., Marek T., Eros I., Suvegh K., The effect of the solvent on the film forming parameters of hydroxypropyl – cellulose, *Internacional Journal of Pharmaceutics*, 2005.

Basrani B, Update en Clorhexidina, *Canal Abierto: Revista de la sociedad de endodoncia de Chile*, N° 20, 2009, p. 6.

Beiro R., Vidal M.C., Vidal I., Orgeira J., Papel de los bioadhesivos en el tratamiento tópico de las enfermedades orales, *Revista de la SEMG N° 50*, Enero 2003, p. 486.

Belén L y Pastor A, Preparación, caracterización y evaluación de películas de quitosano proveniente de calamar gigante “para uso médico, *Rev Soc Quím Perú*, 75 (1), 2009.

Centro de evaluación e investigación de drogas (CDER), guía para la industria: prueba de disolución de formas farmacéuticas de dosificación oral sólidas de liberación inmediata, 1997.

Cerrada M, Propiedades mecánicas, comportamiento viscoelástico y anisotropía de copolímeros de alcohol vinílico y etileno, tesis doctoral, Universidad Complutense de Madrid, 1995. p.57 – 59.

Chiappetta D. A., Gergic E. P., Legaspi M. J., Cantarelli G. N., Garcia M. F., Bregni C., Comprimidos Bioadhesivos Formulados con Excipientes Hidrofílicos para Uso Bucofaríngeo, *Acta Farm. Bonaerense* 25 (3) 2006. p. 360 - 365.

Connors K., Amidon G., Kennon L., Chemical stability of pharmaceuticals, *A handbook for pharmacists*, John Wiley & Sons, 1979, p. 108 - 119.

Cornejo L., Cordero M., Evaluación de las propiedades farmacotécnicas en el diseño y formulación de tabletas de clorfeniramina por compresión directa, tesis para optar al título de químico farmacéutico, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú, 2007.

Dhanikula A., Panchagnula R., Development and characterization of biodegradable chitosan films for local delivery of paclitaxel, *AAPS J*, 6: E27, 2004.

Escobar J., García D., Zaldivar D., Katime I., Hidrogeles. Principales características en el diseño de Sistemas de liberación controlada de fármacos, *Revista Iberoamericana Polímeros* 3, 2002.

Fajardo L. C., "Evaluación de la capacidad de la yodopovidona para la formación de películas", Proyecto de Grado, Universidad Nacional de Colombia, 2006, p. 6.

Flamenco J., Guevara G., Formulación de tres productos desinfectantes y evaluación de su actividad antimicrobiana, Trabajo de grado para optar al título de Licenciatura en Química y Farmacia, Universidad de El Salvador, San Salvador, 2011, p. 47.

Girón M., Determinación de la concentración, pH, estabilidad y el tiempo en el que permanece estable el principio activo de la clorhexidina preparada en las clínicas de cirugía de la facultad de odontología de la Universidad de San Carlos de Guatemala. Trabajo de grado para optar al título de cirujano dentista, Universidad de San Carlos de Guatemala, 2001.

Greff R., Byram M., US05684042 Cyanoacrylate compositions comprising an antimicrobial agent, 1997.

Gupta M., Gupta A. K., In vitro cytotoxicity studies of hydrogel pullulan nanoparticles prepared by aot/n-hexane micellar system, J Pharm Pharmaceut Sci (www.ualberta.ca/~csps) 7(1), 2004, p. 38-46.

Gutiérrez, M., Biomecánica: la física y la fisiología: Instituto de Ciencia de Materiales, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, 2000.

Hayashibara International Representação Ltda, Pullulan: A natural innovative polysaccharide from Hayashibara, consultado el 28/02/2011. Disponible en la versión imprimible <http://www.hayashibara-intl.com/spain/food/pullulan.html>.

Heo K. C., Lee J. J., Park S. Y., and Rhim J. W. Characteristics of pullulan-based edible films, Department of Food Engineering, Mokpo National University, South Korea, 2005.

Hijiya H., Shiosaka M., Procedimiento de fabricación de un cuerpo perfilado de pululano, Hayashibara, Japón, 1972.

Hooda R., Tripathi M., Kapoor K., A Review on Oral Mucosal Drug Delivery System, The Pharma Innovation, Vol. 1, No. 1, 2012, p. 14.

Jiménez R., Mora C., Estudios de liberación in-vitro y permeación ex-vivo de microesferas de Alginato- Quitosano conteniendo Benzocaína, tesis para optar al título de químico farmacéutico, Universidad del Atlántico, 2013.

Li J. K. Wang, N. Wu X., Poly (vinyl alcohol) nanoparticles prepared by freezing-thawing process for protein/peptide drug delivery. *Journal of Controlled Release*, 56, 1998, p. 117-126.

Lin S., Zuckerman O., Weiss EI, Fuss Z., Antibacterial Efficacy Of A New Chlorhexidine Slow-Releasing Device To Disinfect Dentinal Tubules. *Journal Endodontology*, 29, 2003, p. 416.

Lloyd A., Swarbrick J., "Drug Delivery and Targeting", New York, 2001, p. 154 - 156.

López A., Diseño, desarrollo y aplicación de envases comestibles potencialmente bioactivos, tesis para optar al grado de doctor, Universidad Complutense de Madrid, 2013. p. 11 – 13.

Martín A., "Diseño y formulación de películas poliméricas como sistema de transporte de clorhexidina", tesis para optar al título de químico farmacéutico, Universidad Nacional de Colombia, 2009, p. 3.

Masquio F., Correa M., Nunes H., Development and validation of a microbiological assay for determination of chlorhexidine digluconate in aqueous solution, *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, Vol. 49, No.2. 2013. p. 351 - 352.

Mathiowitz E., Chickering D., y Lehr C., "Bioadhesive Drug Delivery Systems Fundamentals, novel approaches and development", Marcel Dekker Inc, New York, 1999, p. 3 - 65.

Miranda B., Modificación del pH en la cavidad oral en personas de la tercera edad, por medio de colutorios de fluoruro de sodio, clorhexidina y fluoruro de sodio-clorhexidina (estudio comparativo), tesis para obtener el título de maestro en ciencias, Universidad de Colima, 2000, p. 7 - 20.

Mishra R., Amin A., Formulation and Characterization of Rapidly Dissolving Films of Cetirizine hydrochloride using Pullulan as a Film Forming Agent, *Indian Journal of Pharmaceutical Education and Research*, 45, 2011, p. 71.

Moreno N., Simulación molecular del comportamiento mucoadhesivo de biopolímeros farmacéuticos en contacto con mucinas, Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de Magister en Ingeniería Química, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá D.C., 2011, p. 21.

Oliva G., Plásticos Biodegradables, Proyecto final de carrera, Universidad Zaragoza, 2012, p. 40.

Palacio P., Herrera L., Duque A., Sistemas de liberación controlada de antibióticos en periodoncia: Revisión de literatura, *Revista CES odontología*. 21 (2), 2008, p. 69 - 72.

Panchal M., Patel H., Bagada A., Vadalía K., Formulation and Evaluation of Mouth Dissolving Film of Ropinirole Hydrochloride by Using Pullulan Polymers, *International Journal of Pharmaceutical Research & Allied Sciences*, Vol 1, 2012, p. 60-72.

Pulido A., Diseño de una Película de Quitosán Como Sistema Terapéutico Farmacéutico Alternativo para el Tratamiento de Úlceras Cutáneas, Tesis presentada como requisito para optar al título de: Magister en Ciencias Farmacéuticas, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá D.C, 2012.

Rekha M. R., Sharma C. P., Pullulan as a Promising Biomaterial for Biomedical Applications: A Perspective, *Trends Biomater. Artif. Organs*, Vol. 20 (2), 2007, p.1.

Rodríguez A., Elaboración de biopelículas a base de quitosán y pululano adicionadas con extractos de cinco diferentes plantas y su evaluación en cultivos de microorganismos periodontopatógenos, Requisito parcial para obtener el Grado de Doctor en ciencias con especialidad en biotecnología, Universidad Autónoma de Nuevo León, 2011, p. 6.

Rodríguez I., Cerezo A., Salem I., Sistemas de liberación Bioadhesivos, *Ars Pharmaceutical*, 41, Vol 1, 2000, p. 124.

Rowe R., Sheskey P., Owen S., Handbook of Pharmaceutical Excipients, Fifth edition. Pharmaceutical Press and American Pharmacists Association. Washington, USA, 2006, p. 163-166.

Saavedra J., Terrón M., Antisépticos, Guía ABE. Infecciones en Pediatría, versión 1, 2007.

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

Sandoval P., Baena Y., Aragón M., Rosas J., Ponce L., Mecanismos generales de cesión de principios activos a partir de matrices monolíticas hidrofílicas preparadas con éteres de celulosas, *Revista colombiana de ciencias químico farmacéuticas*. Vol. 37 (2), 2008.

Tait K., *Industria Farmacéutica*, enciclopedia de salud y seguridad en el trabajo, Capitulo 79. 1998.

USP 36 - NF 31, *U.S Pharmacopeia National Formulary*, 2013, p. 972 - 974.

Vallejo B., “Estudio del fenómeno de adhesión a superficies biológicas de películas obtenidas a partir de biopolímeros, para aplicación en el área de la salud”, Tesis Doctoral, Universidad Nacional de Colombia, 2010, p. 63 y 67.

Vallejo B. M., Perilla J.E., Elementos conceptuales para estudiar el comportamiento bioadhesivo en polímeros. *Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm.* Vol. 37 (1), 2008, p. 34.

Yévenes I., Reyes J., Campos N., Saragoni, V. Efecto inhibitorio en placa microbiana y propiedades antibacterianas de enjuagatorios de clorhexidina. *Revista Avances en Periodoncia e Implantología*, Universidad de Chile, Chile; 15 (1), 2003, p. 19-24.