



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

Diseño de nanodispersiones poliméricas como sistemas de liberación de
clorhexidina para el tratamiento de periodontitis

INFORME DE INVESTIGACIÓN

PARA OPTAR POR EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA

Q.F.B. GUSTAVO VIDAL ROMERO



TUTOR: Dr. DAVID QUINTANAR GUERRERO 2014



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO

Presidente: Dra. Susana Elisa Mendoza Elvira

Vocal: Dra. Helgi Jung Cook

Vocal: Dr. Francisco Hernández Luis

Vocal: Dr. Efrén Hernández Baltazar

Secretario: Dra. Patricia Guadarrama Acosta

Lugar donde se realizó el proyecto de investigación:

Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán,
Campo 1. Laboratorio de Investigación y Posgrado en Tecnología Farmacéutica.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Universidad Nacional Autónoma de México por ser la estructura de mi formación profesional y por brindarme los espacios y recursos necesarios para la elaboración de mis estudios de Maestría.

Agradezco al Dr. David Quintanar Guerrero por su aprecio y apoyo en la realización de este proyecto.

I. INTRODUCCIÓN

El término nanopartículas es usado como un nombre común para describir tanto a las nanoesferas y las nanocápsulas que se diferencian en su morfología y arquitectura. Las nanoesferas son formadas por una matriz polimérica densa, mientras que las nanocápsulas están compuestas por un núcleo oleoso rodeado por una membrana polimérica, Fig.1. Las nanopartículas muestran grandes ventajas en comparación con otros materiales incluyendo los sistemas coloides utilizados en el campo odontológico, entre las cuales se incluyen; i) buena estabilidad en fluidos biológicos y durante su almacenamiento, ii) fácil preparación y existen muchas técnicas para elaborarlás, iii) fáciles de escalar a nivel industrial, iv) buena reproducibilidad entre lotes, v) pueden tener liberación controlada del principio activo. Las nanopartículas también poseen la característica de poder encapsular y entregar la sustancia activa en el órgano blanco o sitio específico (por ejemplo saco dentogingival) y también son conocidas como sistemas vectoriales o acarreadores. En general, para la preparación de las nanopartículas es preferible partir de materiales preformados, especialmente cuando se trata de polímeros. La técnica de preparación consiste básicamente en dispersar una solución orgánica del polímero dentro de una solución acuosa, la cual contiene un estabilizante lo que resultará en la obtención de una nanoemulsión y que por remoción del exceso del disolvente formará las nanopartículas. Los métodos de preparación de nanopartículas con un alto potencial en odontología a partir de polímeros preformados pueden ser clasificados dentro de cinco categorías: i) emulsificación evaporación, ii) "salting-out" iii), desplazamiento de disolvente, iv) emulsificación difusión, y v) "spray-drying" [1]. Uno de los principales problemas con estas técnicas es su baja eficiencia de encapsulación de materiales solubles en agua.

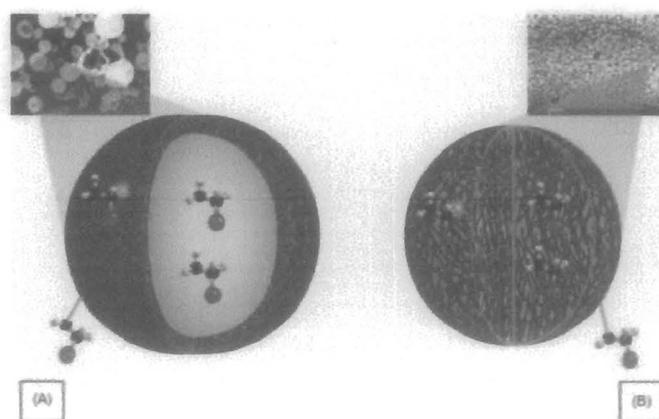


Fig. 1 Representación esquemática y micrografías de nanopartículas. (A) Nanocápsulas (B) Nanoesferas

Durante las últimas tres décadas se han desarrollado varios principios utilizados para la caracterización de nanobiomateriales [2]. Estos métodos incluyen diferentes técnicas para la caracterización de las partículas y su distribución. Algunos de ellas están basados en dispersión de la luz, otros aplican ultrasonido, como la espectroscopia de atenuación de ultrasonido para probar nanodispersiones concentradas y microemulsiones. Existen también técnicas para caracterizar la superficie de las nanopartículas en solución en cuanto a la carga o potencial zeta. Estos datos son de gran utilidad para predecir la estabilidad del sistema y prevenir su agregación o floculación. Dentro de estos métodos podemos encontrar a la microelectroforesis, dispersión de la luz electroforética y electroacústica. Las nanopartículas suelen comportarse de manera diferente a otras nanopartículas a pesar de tener un tamaño similar. Por ello es necesario el desarrollo de enfoques especializados con la finalidad de probar y monitorear sus efectos sobre la salud humana y el medio ambiente [3].

I.1. APLICACIONES ODONTOLÓGICAS DE LAS NANOPARTÍCULAS

La nanotecnología es un campo emergente con un gran potencial para generar herramientas clínicas tecnológicamente avanzadas y dispositivos para el cuidado de la salud oral. Es de esperarse que la nanotecnología traiga consigo beneficios al área clínica de la odontología [4]. La nanotecnología ha sido aplicada en odontología desde 1970 con el comienzo de la era de los microfills. La Nanodontología hará posible el mantenimiento de la salud bucal empleando nanobiomateriales [5, 6]. Actualmente los nanomateriales, son materiales con unidades estructurales básicas, granos, partículas, fibras u otros componentes menores a 100 nm en al menos una dimensión y que han provocado se ponga atención para mejorar la prevención, diagnóstico y tratamiento de enfermedades. Los nanomateriales incluyen tanto nanopartículas, nanocristales, nanofibras, nanoredes y nanopelículas [7]. Al disminuir el tamaño de un material a escala nanométrica, se aumenta dramáticamente el área superficial, se modifica su reactividad química y actividad biológica, por lo tanto la su relación área-volumen- superficie podría conducir a mejorar sus propiedades fisicoquímicas (mecánicas, eléctricas, ópticas, catalíticas y magnéticas). Por lo que los nanomateriales con excelentes propiedades han sido extensamente investigados dentro del área biomédica [8].

Las nanopartículas han sido propuestas como sistemas acarreadores de fármacos para tratamiento de caries o restauración, remineralización de dientes, hipersensibilidad en los dientes, vacunas, control de la placa dentobacteriana, infecciones, anestesia local e infecciones periodontales. Por mencionar un ejemplo, las nanopartículas pueden ser utilizadas como coadyuvantes en el tratamiento de enfermedades dentales y estructuras orales. Se ha propuesto que las nanopartículas pueden entregar el fármaco selectivamente en sitios específicos o células. Una de las más importantes aplicaciones de las nanopartículas dentro de la odontología es en el tratamiento de la enfermedad periodontal.

La enfermedad periodontal puede limitarse a la encía (gingivitis) o extenderse hacia las estructuras de soporte más profundas con la destrucción del ligamento periodontal y el hueso alveolar que soporta los dientes (periodontitis). La pérdida de inserción, junto con la formación de una bolsa periodontal, puede conducir a aflojamiento y pérdida de los dientes afectados. *P. gingivalis*, *Tannerella forsythia* y *T. denticola*, son algunos patógenos presentes en la periodontitis [9].

La enfermedad periodontal es un término adoptado en la que se incluyen varias condiciones patológicas que se caracterizan por la degeneración e inflamación del tejido que rodea y da soporte a los dientes: el tejido gingival (la encía), el ligamento periodontal, el hueso alveolar y el cemento dental pueden ser afectados [10, 11, 12-16]. La relación entre la placa subgingival y la enfermedad periodontal es bien conocida. Este proceso infeccioso muestra diferentes grados de severidad: i) gingivitis, que es la fase más temprana de la enfermedad y afecta a la encía, ii) periodontitis media, iii) periodontitis moderada y iv) periodontitis avanzada [12]. La periodontitis se manifiesta con la inflamación de las encías y del tejido periodontal más profundo, lo que conduce a una inflamación de la encía, sangrado y mal aliento. En la siguiente fase de la enfermedad, las estructuras de soporte del periodonto se ven afectadas, el hueso alveolar comienza a reabsorber y el epitelio gingival migra a lo largo de la superficie del diente formando una bolsa periodontal [10, 15, 17]. La bolsa periodontal provee un excelente medio para el crecimiento de microorganismo patógenos, tales como *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Bacteroides spp.* (*B. gingivalis* y *B. intermedius*), *Wolinella racta*, *Eikenella spp.*, *Porphyromonas gingivalis* y *Prevotella intermedia* [10, 16, 18]. El crecimiento progresivo de la bolsa conduce a la destrucción del tejido periodontal de soporte y a la pérdida o movimiento de los dientes [17]. La Fig. 2 muestra la evolución de los patrones de la enfermedad periodontal desde la encía sana hasta la enfermedad periodontal.

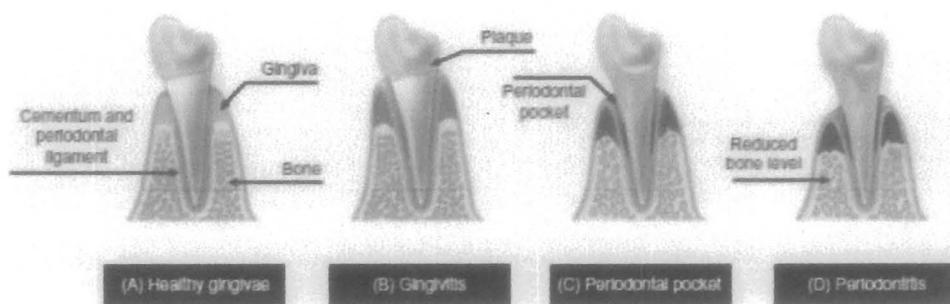


Fig. 2 Representación esquemática de las etapas de la enfermedad periodontal. A) Encía sana y diente soportado por la estructura periodontal, B) Formación de la placa dentobacteriana causante de la gingivitis, C) Formación de la bolsa periodontal (lesión entre el diente y el epitelio junctional) y tejido conectivo gradualmente destruido, D) Periodontitis, destrucción de la gingiva y soporte de los dientes.

Tan pronto como se presenta la gingivitis junto con la formación de la bolsa periodontal, el principal objetivo terapéutico debe ser controlar y reducir los factores etiológicos para disminuir o eliminar la inflamación y controlar la interacción entre la placa bacteriana y el hospedero. El objetivo primordial del tratamiento es eliminar el depósito bacteriano o la placa dentobacteriana de la superficie de los dientes por tratamiento mecánico en combinación con una adecuada higiene oral para prevenir la reinfección del área subgingival por microorganismos periodontopatológicos y por consecuencia preservar los dientes [10, 12, 18]. Tales estrategias deben controlar la formación de la placa dentobacteriana sin afectar el equilibrio biológico dentro de la cavidad oral. Sin embargo, los periodos de exposición reales a agentes antimicrobianos durante el cepillado de dientes y enjuague bucal puede ser muy cortos, aproximadamente 30s en lugar de 2 min que es lo recomendado [19].

Los agentes clasificados generalmente como antiplaca funcionan removiendo o disrumpiendo la placa dentobacteriana o evitando la formación de esta. Sin embargo, estos no necesariamente matan a los microorganismos que la componen. Los agentes clasificados como antimicrobianos pueden actuar inhibiendo el crecimiento (bacteriostático) o matando (bactericida) los microorganismos. La absorción y penetración de agentes antimicrobianos dentro de la placa dentobacteriana es clave considerable en la administración terapéutica [20].

La administración local y sistémica de varios agentes antimicrobianos ha sido efectivamente usada para controlar las infecciones periodontales [13,15, 16]. Las dosis sistémicas de antibióticos alcanzan el tejido periodontal por trasudación desde el suero, atravesando el epitelio junctional y crevicular para llegar al surco gingival [13]. Sin embargo existen grandes desventajas en estos sistemas tales como una rápida pérdida de la concentración terapéutica del antibiótico en el plasma y el desarrollo de resistencia microbiana, además los agentes terapéuticos pueden ser asociados a reacciones secundarias tales como molestias gastrointestinales, depresión y taquicardia [10, 18]. La administración sistémica de fármacos lleva a concentraciones terapéuticas en el sitio de infección por cortos periodos de tiempo, por ello es necesario repetir la dosis y el tratamiento puede ser por largo periodos [18]. En contraste, el uso de la liberación local de antibióticos específicamente administrados en el sitio de infección (bolsa periodontal) pudiera ser muy útil en la eliminación de los patógenos y esto mejoraría el efecto de la terapia convencional sin tener las reacciones adversa de los antibióticos administrados sistémicamente [12, 21]. Las nanopartículas con agentes antimicrobianos pueden ser de especial valor si son retenidas en la superficie de los dientes y debajo de las encías. El potencial de las nanopartículas como constituyentes de agentes para el control de la placa dentobacteriana ya sea por su capacidad bioadhesiva o antiadhesiva ha crecido como un área que debe ser seriamente considerada. Las nanopartículas son potencialmente útiles debido a que es posible alterar su carga superficial, hidrofobicidad y otras propiedades físicas y químicas [22].

I.3. NANOPARTICULAS POLIMÉRICAS

Los materiales poliméricos han sido ampliamente investigados como dispositivos de liberación de fármacos y en el campo de la ingeniería de tejidos [14]. Polímeros no biodegradables así como biodegradables han sido utilizados para la preparación de micro- y nanopartículas administradas por diferentes vías entre las que se encuentran la nasal, pulmonar, oral, o las parenterales. Estos materiales poliméricos pueden ser sintéticos o naturales o sustancias naturales modificadas [10,12, 18].

Los polímeros biodegradables de origen natural o sintético han sido ampliamente utilizados como sistemas de liberación de fármacos para muchos compuestos bioactivos y son ampliamente empleados en dispositivos de liberación de fármacos en el tratamiento periodontal, debido a su biocompatibilidad pudiendo ser degradados en productos biocompatibles por procesos enzimáticos o químicos [12, 14]. Los dispositivos elaborados con materiales biodegradables no requieren ser removidos al final del tratamiento. Varios sistemas de liberación de fármacos para el tratamiento de la enfermedad periodontal están siendo diseñados con el objetivo de lograr una liberación controlada del fármaco y en el sitio específico donde se origina la enfermedad.

Polímeros como el alginato, quitosan, el polihidroxibutirato-co-hidroxivalerato, poli-(l-láctico), poli(D-L-láctico), poli(glicoles) y copolímeros como la policaprolactona y polifosfatos son utilizados para obtener los sistemas particulados. Algunos de estos acarreadores tienen la ventaja de poder ser incorporados dentro de formulaciones orales típicas, tales como suspensiones o pastas de dientes, o en algunos otros sistemas de liberación de fármacos novedosos, como los hidrogeles o en su defecto que estos puedan ser inyectados dentro de la bolsa periodontal. Los sistemas de liberación de fármacos local basados en polímeros, tales como las fibras, las películas, los geles, los sistemas vesiculares, las macropartículas o las nanopartículas han sido utilizados en odontología para la liberación local de fármacos y mejorar la concentración de fármaco directamente en el sitio de acción. Estos sistemas son usualmente insertados dentro de la bolsa periodontal o inyectados en el tejido periodontal para mejorar el efecto terapéutico del fármaco y reducir los efectos adversos que se presentan cuando son administrados de forma sistémica [10, 12, 18, 23, 24]. Varios sistemas de liberación local han sido diseñados para controlar la liberación de fármacos en el tejido periodontal; sin embargo, la complejidad para acceder al tejido periodontal hace a todos estos sistemas parcialmente útiles [18, 21, 23, 25, 26].

Las nanopartículas ofrecen grandes ventajas; como, la capacidad de penetrar en áreas extracelulares e intracelulares que pueden ser inaccesibles para otros sistemas de liberación, esto puede ser posible debido a su diminuto tamaño, inclusive pueden alcanzar áreas debajo de la bolsa periodontal [10, 23, 27, 28]. Estudios de microscopia confocal llevados a cabo por Ganem-Quintanar [29] han demostrado que las nanopartículas biodegradables, cuando son aplicadas en el surco gingival porcino son capaces de penetrar hasta el epitelio junctional. De igual forma, las nanopartículas en la bolsa periodontal pueden ser sistemas de entrega de fármacos que reducirían la frecuencia de administración, mejorar la eficiencia y acumulación del agente activo en el sitio blanco, manteniendo una velocidad de liberación de fármaco efectiva [5, 10, 18]. Además, las nanopartículas son más estables en fluidos biológicos. Desafortunadamente, hay pocos estudios sobre la preparación de nanopartículas conteniendo agentes antibacteriales para el tratamiento periodontal [23]. El ácido poli(D,L-láctico) (PLA), ácido poli(glicólico) y ácido poli(D,L-láctico-co-glicólico)(PLGA), han sido los materiales centrales en el desarrollo de nano-/micropartículas encapsulando agentes terapéuticos para aplicación de liberación controlada [30]. Estos materiales ofrecen varias ventajas tales como buena biocompatibilidad y biodegradación, resistencia mecánica y son fáciles de administrar parenteralmente; además, el uso de materiales biodegradables permite una liberación sostenida del fármaco dentro del sitio blanco por periodos de tiempo que pueden ser desde unos días o varias semanas [14, 30].

Piñón-Segundo et al. en 2005 elaboró nanopartículas cargadas con triclosan utilizando diferentes polímeros PLGA, PLA, ftalato Acetato de celulosa. Realizó su caracterización y estudios preliminares *in vivo* en perros aplicándose las nanopartículas cargadas con triclosan en la bolsa periodontal, después de 15 días encontró una clara diferencia entre el control y los sitios de

experimentación, con lo que concluyo que las nanopartículas cargadas con triclosan disminuyen la inflamación de los sitios de experimentación [25].

Muchos materiales han sido propuestos para aplicarlos en odontología mostrando grandes ventajas en comparación con las formulaciones convencionales. Varios tienen potenciales aplicaciones pero se requiere de mucho más investigación para consolidar su efecto terapéutico real. Además hasta hoy no hay suficiente información disponible para generalizar el uso de nanopartículas en el campo odontológico por lo que se sigue el desarrollo de un plan para ampliar el rango de aplicaciones. Dentro de los aspectos toxicológicos acerca de la seguridad de las nanopartículas, sigue siendo controversial esta cuestión en odontología considerando las propiedades del tejido y su potencial internalización. Por lo que estos aspectos deben ser claramente analizados. Sin embargo la investigación sobre la nanotecnología está ganando terreno introduciéndose en el campo de la odontología y muchos de estas incógnitas podrían resolverse en poco tiempo, con lo que se podría dar la consolidación de estos productos y llevarlos al mercado.

I.4. CLORHEXIDINA

La extensión de la inflamación de la encía hacia el tejido periodontal que soporta los dientes marca la transición de gingivitis a periodontitis [31,32]. En el tratamiento de la periodontitis y gingivitis, antibióticos tales como doxiciclina (DXY), tetraciclina (TCL) y metronidazol han sido utilizados [33,34]. Análogos de la tetraciclina tales como la doxiciclina y minociclina son más costosos y tienen teóricamente mayores ventajas que la tetraciclina, mostrando una mayor absorción oral, con tiempos de vida media más prolongados y mejor solubilidad en lípidos, los cuales son factores importantes para su acción antimicrobiana [34]. Sin embargo, la aplicación de éstos en un enjuague oral con dosis repetidas varias veces, no pueden alcanzar el fondo del tejido subgingival, y una administración sistémica de altas dosis de antibióticos para lograr un nivel terapéutico en la bolsa periodontal podría resultar contraproducente o en efectos secundarios [33]. Por ello, la liberación local de agentes antimicrobianos para mantener una concentración terapéutica efectiva en el fluido crevicular gingival (GCF) de la bolsa periodontal es altamente recomendada [34,35], usando acarreadores tales como fibras, geles, tiras acrílicas, nanopartículas, nanocápsulas, nanofibras [35,36].

En los últimos 30 años, la clorhexidina (CHX), un agente capaz de penetrar a través de la membrana bacteriana y su derivado soluble en agua clorhexidina digluconato (CHX-Dg) han sido usados ampliamente en enjuagues bucales para controlar la placa dentobacteriana [37-39].

La clorhexidina base, 1,6-di-(clorfenildigunido) hexano, es un sólido cristalino blanco (p.f 132 °C, PM, 505.5). La disolución de clorhexidina base en una solución de ácido gluconico provee una sal más soluble, clorhexidina gluconato y clorhexidina digluconato (PM 897.8). Las solubilidades en agua de la clorhexidina base y clorhexidina digluconato a 20 °C son 0.008% (w/v) y >70% (w/v), respectivamente [40].

El uso de la clorhexidina como agente antifúngico y antibacterial ha sido bien documentado en odontología, llegando a ser uno de los agentes más utilizados para el control de la placa dental. Además numerosos estudios también han indicado que la clorhexidina es efectiva en periodontitis [41]. La clorhexidina fue primeramente utilizada en enjuagues bucales y era recomendada como antiséptico junto con el cepillado dental. Su uso durante las fases post-operatorias de tratamientos periodontales tanto quirúrgicos y no quirúrgicos [42]. Los efectos que se atribuyen a la clorhexidina son: i) acción bacteriostática, ii) mejora la curación de las heridas y puede ser incorporada en los vendajes de pacientes recién operados; iii) control de la placa dentobacteriana. Además, estudios han demostrado que dispositivos de liberación controlada en la cavidad son efectivos, especialmente en el tratamiento de la bolsa periodontal [43,44].

La clorhexidina parece ser efectiva en la reducción de la placa y la gingivitis. Su mecanismo de acción se relaciona a la reducción de la formación, alteración y adherencia de la placa

dentobacteriana en la superficie de los dientes, alterando la pared celular bacteriana, causando su rompimiento [45]. Su acción antibacterial se debe al incremento en la permeabilidad de la membrana celular, seguida por la coagulación de macromoléculas en el citoplasma intracelular [46]. Debido a que la clorhexidina posee carga positiva, esta exhibe una alta capacidad de retención. Su estructura química le permite permanecer en la cavidad oral por periodos de tiempo prolongados después del enjuague y es por ello que se simula una liberación lenta [47]. La eficacia de la clorhexidina sobre la flora de la bolsa periodontal es dependiente del tiempo de exposición. Es por ello que la exposición de clorhexidina por periodos de tiempo prolongados tiene cambios significativos en la evolución de la enfermedad [48].

A pesar de estos atributos, la clorhexidina presenta algunas desventajas entre las cuales se incluyen el manchamiento de los dientes y disturbios en el sentido del gusto. En general la clorhexidina y otros agentes tópicos fallan en penetrar hacia la bolsa periodontal, por ellos sus efectos son limitados a las áreas supragingivales.

II. JUSTIFICACIÓN

La periodontitis es una enfermedad inflamatoria común del tejido periodontal que presenta hinchazón de las encías, pérdida del soporte alveolar y movimiento de los dientes. La etiología de la periodontitis es compleja, principalmente asociada con factores genéticos y factores de la cavidad bucal tales como la placa dentobacteriana, influyendo la higiene bucal. La clorhexidina es un agente antimicrobiano ampliamente utilizado en odontología como un agente antiplaca y ha demostrado una buena actividad antibacterial contra un amplio número de bacterias orales. Actualmente existen soluciones acuosas comerciales de clorhexidina al 2% que han mostrado ser efectivas para el tratamiento de la enfermedad periodontal. Sin embargo, es necesario el desarrollo de nuevos sistemas de liberación modificada de clorhexidina que mantengan niveles terapéuticos del fármaco por periodos de tiempo prolongados, que ayuden a (prevenir) evitar la reincidencia de la enfermedad, disminuyan la dosis de fármaco necesaria para ejercer el efecto terapéutico y reduzcan el tiempo de tratamiento provocando una mayor aceptación por parte del paciente.

III. HIPÓTESIS

Si las nanocápsulas compuestas por un polímero bioadhesivo son capaces de adherirse al tejido gingival y degradarse por efecto del pH liberando el fármaco y el eugenol que tiene propiedades analgésicas, anestésicas, desinflamatorias y potencializadoras de acción antimicrobiana, entonces se aumentará la efectividad del fármaco, provocando una disminución de la dosis administrada, el tiempo de tratamiento y la reincidencia de la enfermedad.

IV. OBJETIVOS

IV.1. Objetivo general

Desarrollar un sistema nanoparticulado cargado con clorhexidina y eugenol como una formulación novedosa y de mayor desempeño terapéutico para el tratamiento de la enfermedad periodontal.

IV.2. Objetivos particulares

- Preparar, optimizar, y caracterizar nanocápsulas (NC's) de ftalato acetato de celulosa (CAP) cargadas con clorhexidina (CHX) y eugenol por el método de Emulsificación-difusión, como una formulación novedosa y de mayor desempeño terapéutico para el tratamiento de la enfermedad periodontal.
- Llevar a cabo la caracterización de las NC's determinando el tamaño de partícula, potencial zeta, morfología, eficiencia de proceso, eficiencia de encapsulamiento y comportamiento térmico.

- Optimizar el método analítico para la cuantificación de clorhexidina mediante cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) y determinar la eficiencia de encapsulamiento.
- Realizar estudios clínicos preliminares *in vivo*, para observar la eficiencia de los sistemas nanoparticulados.

V. METODOLOGÍA

V.1. Material y Reactivos

- Agua destilada (Obtenida del equipo Milli-Q, Millipore)
- Hidróxido de sodio en hojuelas grado reactivo (J. T. Baker, México)
- Ácido clorhídrico (grado reactivo, J.T. Baker, México)
- Eugenol (Mirafill, México)
- Clorhexidina (Sigma Aldrich, México)
- Polímero Ftalato acetato de celulosa (cellulose acetate phthalate, CAP, Sigma-Aldrich, USA), con un peso molecular 2532.12 g/mol.
- Alcohol polivinílico Mowiol®(polyvinyl alcohol, PVAL, Glomarza, México).
- Etanol (grado analítico Fermont, Productos Químicos Monterrey, México)
- Metanol (grado analítico Fermont, Productos Químicos Monterrey, México)
- Metil etil cetona (grado analítico Fermont, Productos Químicos Monterrey, México)

V.2. Aparatos y Equipos

- Espectrofotómetro UV- Vis (Thermo Scientific, Geneys 10 uv Scaning, USA)
- HPLC (Varian, Pro Star)
- Zetasizer (Malvern Systems ZEN 3600, Estados Unidos de America)
- Rotavapor (Laborota® 4000, Heidolph, Alemania)
- Ultracentrífuga Óptima® LE-80K (Beckman, Estados Unidos de America)
- Liofilizadora de mesa (Laboconco®, USA)
- Calorímetro diferencial de barrido (DSC Q10, TA Instrument, USA)
- Ultrasonificador Branson® (3200, Estados Unidos de América)
- Balanza analítica (BBC 32, Boeco, Alemania)
- Parrilla eléctrica con agitación (Cimarec®, Thermoline, Estados Unidos de América)
- Agitador magnético Magnestir® (Lab-Line instruments, Estados Unidos de América)
- Agitador de velocidad variable (RZR-1; Caframo®, Alemania)
- Vortex (Mixer, modelo M 16715, Estados Unidos de América)
- pH metro (Modelo 430)
- Filtros (Millex®- GV de 2.5cm de diámetro y poro de 0.22µm, 0.1µm, y 0.45µm (Millipore®, Estados Unidos de América)
- Termómetro digital
- Material de cristalería

VI. PARTE EXPERIMENTAL

VI.1. Determinaciones previas

VI.1.1 Solubilidad

Se realizó la prueba de solubilidad de los materiales utilizados con la finalidad de determinar el mejor disolvente a utilizar en la preparación de las nanocápsulas (NC's) así como para la cuantificación de la clorhexidina (CHX).

VI.1.2. Determinación de la solubilidad de clorhexidina base

Se realizaron pruebas de solubilidad del principio activo (clorhexidina) en diferentes disolventes y en el aceite que serviría como centro oleoso de las nanocápsulas, en este caso Eugenol.

Se pesaron 10 mg de clorhexidina a los cuales se les adicionó cada uno de los disolventes en pequeñas cantidades de 20 μ L con agitación magnética constante a temperatura ambiente determinando la solubilidad en cada disolvente.

VI.1.3. Espectros de Absorción

Se determinaron las longitudes de onda (λ) de máxima absorción para una solución de clorhexidina, mezcla clorhexidina-eugenol, en una solución de metanol. Los barridos se realizaron de 200 a 400 nm. La λ de máxima absorción para el complejo PVAL con H_3BO_3 0.65M y una solución de I_2 0.05M en KI 0.15M se determinó realizando un barrido desde 400 a 800 nm.

VI.2. Curva de calibración para el complejo colorido de PVAL.

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

VI.3. Optimización del método analítico para la determinación de clorhexidina.

Se preparó una solución estándar de concentración conocida de clorhexidina disuelta en metanol leyéndose en el espectrofotómetro a una $\lambda = 260$ nm, por otro lado una muestra de la solución estándar se inyectó al sistema cromatográfico para obtener su área bajo la curva.

La clorhexidina presenta un pico con una longitud de onda de máxima absorción a 260 nm al UV, pero al mezclarse con el eugenol que presenta un pico de máxima absorción a 280 nm al UV, se suprime, lo que imposibilita detectarla y con ello cuantificarla. Por esta razón se decidió proceder a la optimización de un método analítico que nos permita separar los componentes de la mezcla, eligiéndose para esto la técnica de cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) por lo que se procedió a definir el tipo de columna a emplear, la fase móvil, la presión de trabajo y temperatura.

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

- i) Soluciones blanco de metanol y buffer de acetatos pH 3.3.
- ii) Solución de clorhexidina en metanol.
- iii) Solución amortiguadora de acetatos pH 3.3 con clorhexidina.
- iv) Solución de una mezcla clorhexidina/ eugenol.
- v) Muestra de problema de extracción de clorhexidina a partir de NC's.

VI.4. Preparación de nanocápsulas por el método de Emulsificación-difusión

Se prepararon nanocápsulas poliméricas a partir de un polímero preformado: el Ftalato Acetato de Celulosa (CAP). El método empleado fue el siguiente: en un embudo de separación se saturó el disolvente orgánico (metil etil cetona) y agua destilada, agitando suavemente y después dejando reposar por 20 min para separar ambas fases (la orgánica y la acuosa). En la fase orgánica

saturada se disolvió el polímero CAP, el principio activo (en este caso la clorhexidina) y el aceite (eugenol). Con la fase acuosa saturada se preparó una solución de polivinilalcohol (PVAL) al 5%. A la fase acuosa se le añadió la fase orgánica, la mezcla resultante se agitó mecánicamente a 2000 rpm durante 10 minutos. Posteriormente se eliminó el disolvente orgánico bajo presión reducida en un Rotavapor a 30 rpm y 30 °C. La suspensión se concentró hasta llegar a un volumen aproximado de 40 ml de un total de 60 ml. Por último dicha suspensión fue centrifugada a 12000 rpm durante 40 minutos, la pastilla obtenida se resuspendió en agua destilada, con agitación magnética durante 20 hrs, para volver a ser centrifugada. Este proceso de lavado centrifugado se realizó 2 veces.

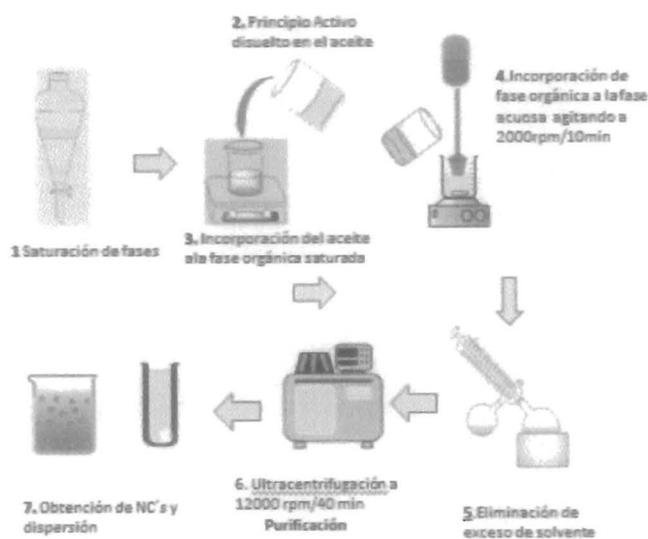


Fig. 3 Representación esquemática del método "Emulsificación-difusión" para la preparación de nanocápsulas.

Se prepararon varios lotes cada lote por triplicado y la pastilla del último centrifugado se resuspendió en agua destilada. Algunos lotes en suspensión se congelaron y se liofilizaron y algunos otros se utilizaron para algunas pruebas de caracterización de las NC's sin necesidad de ser liofilizados. En la tabla 1 se incluye la descripción de los lotes preparados incluyendo materiales y cantidades empleadas.

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

Lote	Polímero	Disolvente Saturado	Principio Activo	Principio Activo (mg)	Polímero (mg)	Disolvente saturado (mL)	PVAL 5% (mL)
1	CAP	Metil etil cetona	Clorhexidina	10	200	20	40
2	CAP	Metil etil cetona	Clorhexidina	20	200	20	40
3	CAP	Metil etil cetona	Clorhexidina	30	200	20	40

VI.5. CARACTERIZACIÓN DE NANOCÁPSULAS

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

VI.5.1. Determinación de tamaño de partícula y potencial zeta

Se determinó el tamaño de partícula promedio, la distribución de tamaño de partícula, la desviación estándar así como el índice de polidispersión por el método de dispersión de luz dinámica empleando un Zetasizer® ZEN 3600 (Malvern Instrument® Ltd.), para todos los lotes de nanocápsulas analizados se utilizó como medio de dispersión agua destilada, todas las lecturas se realizaron a 25 °C y un ángulo de incidencia de 90°. Las determinaciones se realizaron por triplicado preparándose diluciones adecuadas de una suspensión acuosa de nanocápsulas. El potencial zeta se determinó utilizando el Zetasizer® ZEN 3600 (Malvern Instrument® Ltd.) empleando una celda de capilar doblado con 150 V de corriente eléctrica; cada dispersión de nanocápsulas fue diluida con agua destilada hasta alcanzar la concentración adecuada para las mediciones [49].

VI.5.2. Determinación del PVAL residual en nanocápsulas de CAP

Se disolvió una cantidad conocida de nanopartículas liofilizadas (5-10 mg) con 5 ml de metil etil cetona en un vaso de precipitados con agitación magnética y posteriormente se llevó a sequedad. Después se agregaron 5 ml de agua destilada y se continuó la agitación magnética por al menos 3 horas. Esta solución se filtró con una membrana Millipore® de 0.22 μm , el filtrado se llevó a un volumen de 10 ml, de este se tomó 1 ml y se llevó a 5 ml con agua destilada. Los 5 ml se mezclaron con 2 mL de H_3BO_3 0.65M y 1 ml de I_2 0.05M en KI 0.15M para formar el complejo colorido. El sistema se leyó a $\lambda = 640$ nm en el espectrofotómetro, la absorbancia obtenida se interpoló en la curva de calibración para obtener la concentración del sistema.

Cuando la lectura de absorbancia era baja o alta para ser interpolada en la curva de calibración se tomaron mayores volúmenes del filtrado o bien se hacían diluciones del mismo, llevando siempre a un volumen final de 5 ml antes de mezclar con los 2 mL de H_3BO_3 0.65M y 1 ml de I_2 0.05M en KI 0.15M para formar el complejo colorido. Se utilizó como blanco un sistema de 5 ml de H_2O , 2 mL de H_3BO_3 0.65M y 1 ml de I_2 0.05M en KI 0.15M.

VI.5.3. Determinación de la eficiencia de proceso de nanocápsulas de CAP

Se prepararon lotes de nanocápsulas en base a la mejor formulación, con la finalidad de observar la eficiencia del proceso de fabricación, los lotes preparados fueron llevados a sequedad a 40° C en una estufa por 24 hrs, después el polvo obtenido se puso en un desecador a temperatura ambiente para obtener el peso constante del polvo obtenido. Se realizaron los cálculos necesarios para obtener la eficiencia del proceso en la elaboración de las nanocápsulas.

VI.5.4. Determinación de principio activo en nanocápsulas de CAP

Se disolvió una cantidad conocida de nanocápsulas liofilizadas (5-10 mg) con 4 ml de NaOH 1% en un tubo de ensaye con agitación magnética, posteriormente se agregaron 5 ml de metil etil cetona saturada con agua con la finalidad de disolver el activo disperso y se agitó en vortex, se dejó reposar la solución anterior para separar la fase acuosa de la fase orgánica. La fase orgánica se llevó a sequedad y el residuo se resuspendió en 2 ml de metanol, posteriormente se filtró con una

membrana Millipore® de 0.22µm, el filtrado se llevó a un volumen de 10 ml con metanol. La fase acuosa se filtró con una membrana Millipore® de 0.22µm, y el filtrado se llevó a un volumen de 10 ml. Las muestras tanto de fase acuosa como de fase orgánica se inyectaron en el sistema cromatográfico de líquidos de alta resolución leyéndose a una $\lambda = 260$ nm. Las áreas obtenidas de cada muestra fueron comparadas contra una solución estándar de concentración conocida para obtener la cantidad de clorhexidina en la formulación.

VI.5.5. Microscopía Electrónica de Barrido

Se observaron muestras de NC's de CAP placebo y cargadas con clorhexidina para determinar su morfología y tamaño de las nanocápsulas obtenidas. Las muestras se prepararon realizando una dilución de la dispersión de NC's. Se colocaron unas gotas sobre un cubre objetos y se dejaron secar para después colocarles un recubrimiento de oro (≈ 20 nm). Se observaron con un microscopio electrónico de barrido (MEB, JSM-25SI; JEOL, Japón).

VI.5.6. Calorimetría Diferencial de Barrido

Se determinó el comportamiento térmico de las nanocápsulas y sus constituyentes mediante calorimetría diferencial de barrido (DSC). Primero se realizó una calibración con un estándar de indio y después de cada una de las muestras se pesan (3-5 mg) directamente en charolas de aluminio hermética y se escanean entre 0°C-400°C con un calentamiento de 10°C/min y un flujo de nitrógeno de 50 ml/min utilizando el DSC Q10 (TA Instruments®, USA).

VI.6. Pruebas clínicas preliminares

Se planeó el diseño de un modelo experimental para realizar estudios clínicos empleando el nanosistema obtenido como alternativa en el tratamiento de la gingivitis y observar con esto la efectividad del sistema. Para dicha prueba se propone emplear tres sistemas que incluyen Nanocápsulas de CAP conteniendo clorhexidina, Nanoemulsiones conteniendo clorhexidina y una solución comercial que contenga clorhexidina, con fines comparativos. Dicha prueba se realizó en el Centro de Salud TII "Dr. Manuel Gutiérrez Zavala" de la Secretaría de Salud Pública del Distrito Federal.

VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

VII.1. DETERMINACIONES PREVIAS

VII.1.1. Solubilidad

Se realizaron pruebas de solubilidad de los materiales utilizados con la finalidad de determinar el mejor disolvente a utilizar en la preparación de las NC's así como en la cuantificación de CHX. Los resultados se resumen en la Tabla 2:

Tabla 2. Resultados de la prueba cualitativa de solubilidad de los distintos materiales en diferentes disolventes.

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

VII.1.2. Determinación de la solubilidad de clorhexidina base

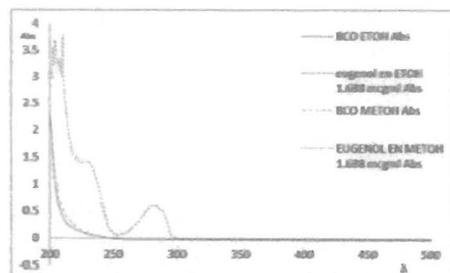
En la tabla 2 se observa que se realizó la prueba de solubilidad de clorhexidina en dos diferentes tipos de aceites, los cuales servirían como vehículo al principio activo y como centro oleoso de las nanocápsulas, obteniéndose que el principio activo es muy soluble en Eugenol y no así en el aceite Captex 200, (10mg/150 μ L y 10mg/11.75ml respectivamente). Se ha observado que el Eugenol en combinación con algunos antibióticos presenta un efecto sinérgico aumentando el efecto terapéutico del antibiótico lo que reduce la concentración mínima inhibitoria para provocar la muerte a los microorganismos [50].

Por otro lado, se observa que el polímero CAP, el eugenol y la clorhexidina son solubles en los disolventes orgánicos, metiletilcetona y acetato de etilo, este tipo de solventes son utilizados ampliamente en la industria farmacéutica debido a su baja toxicidad para los humanos [51], mientras que el PVAL fue insoluble en este tipo de disolventes, pero muy soluble en agua. Debemos destacar que se requiere que el polímero y el o los materiales a encapsular se encuentren solubles en la fase orgánica, pero insolubles en la fase acuosa. En base a esto se eligieron los materiales a utilizar en la preparación de las nanocápsulas, eligiéndose como fase orgánica la metiletilcetona, como fase acuosa agua y como vehículo oleoso del principio activo el eugenol.

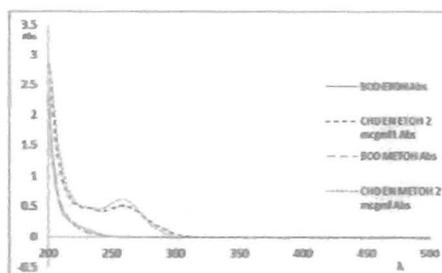
Adicionalmente se determinó la solubilidad de clorhexidina y eugenol en dos diferentes disolventes etanol y metanol, encontrándose que la clorhexidina es mucho más soluble en metanol que en etanol y que el eugenol es muy soluble en ambos disolventes, por lo anterior se decidió emplear metanol, el cual se utilizaría como disolvente para la cuantificación de principio activo en las nanocápsulas.

VII.1.3. Espectros de Absorción

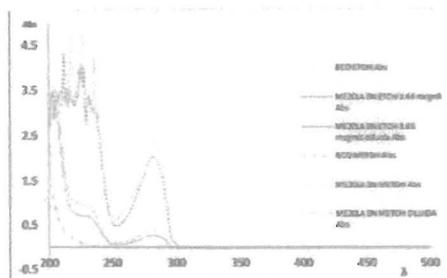
En las Gráficas de la A-E se muestran los espectros de absorción obtenidos a partir de soluciones de Eugenol, CHX y una mezcla de ambas, empleando como disolventes etanol y metanol, que son los que presentaron mejor solubilidad de los componentes. En la Grafica A se observa que la longitud de máxima absorción del Eugenol es de 280 nm en los dos disolventes empleados, de igual manera en la Grafica B se observa que la longitud de máxima absorción de la clorhexidina es de 260 nm. Los espectros de absorción obtenidos a partir de una solución de una mezcla Eugenol-CHX disueltos en EtOH o MetOH se muestran en la Grafica C, en donde se observó que se suprimía la señal de la CHX ya que esta presenta una longitud de onda muy cercana a la del eugenol que impide sea detectada. En las Gráficas D y E se realizó una comparación contra una solución concentrada y una diluida en donde se observa que efectivamente se suprime la señal de la CHX en ambos disolventes. Por lo anterior, se determinó que la Espectroscopia UV-visible no era la técnica adecuada para llevar a cabo la cuantificación del principio activo en las NC's ya que era necesario emplear una técnica de separación por lo que se optó por la técnica de cromatografía de líquidos de alta resolución para llevar a cabo dicha determinación.



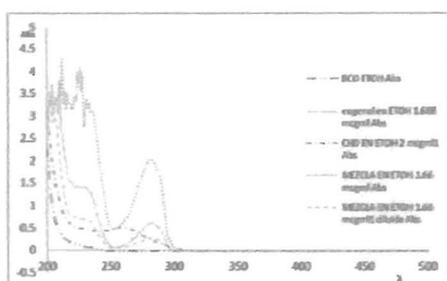
Gráfica A. Espectros de absorción de Eugenol en EtOH y MetOH.



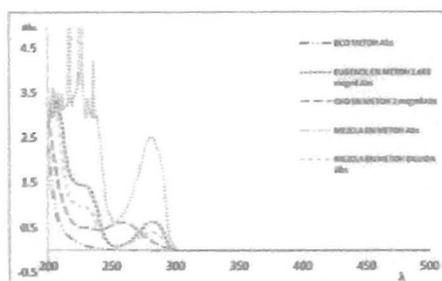
Gráfica B. Espectros de absorción de Clorhexidina disuelta en EtOH y MetOH.



Gráfica C. Espectros de absorción de mezcla CHX- Eugenol en EtOH y MeOH.



Gráfica D. Comparación de espectros de absorción de CHX, Eugenol y mezcla utilizando como disolvente EtOH.

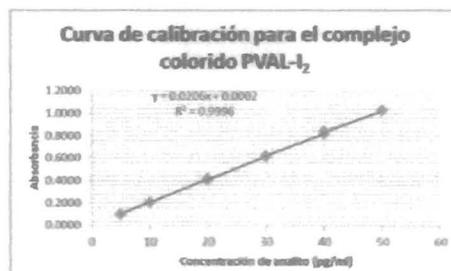


Gráfica E. Comparación de espectros de absorción de CHX, Eugenol y mezcla utilizando como disolvente MeOH.

VII.1.4. Curva de calibración para el complejo colorido de PVAL.

El polímero empleado como estabilizante durante la preparación de las nanocápsulas por el método de Emulsificación-difusión fue el PVAL, ya que evita la agregación de las nanocápsulas cuando se encuentran en dispersión y con ello disminuye su velocidad de sedimentación, obteniendo sistemas mucho más estables, este proceso se da ya que las cadenas de PVAL poseen una gran afinidad a la superficie de las nanocápsulas y se une fuertemente a la superficie de éstas, formando una capa estable, propuesto por Quintanar-Guerrero, D., et al., 1998 [1]. Su principal inconveniente de utilización, es que, éste polímero estabilizante es difícil removerlo completamente de las nanocápsulas obtenidas.

La cantidad residual de estabilizante (PVAL) en las nanocápsulas se determinó con base a un método validado por Raygoza, T., et al., 1995 [52]. El PVAL forma un complejo colorido con yodo en presencia de ácido bórico, el compuesto formado es de color verde y dicho complejo es estable por 15 min. Para dicha prueba se llevó a cabo el montaje de una curva de calibración (Gráfica F) con la finalidad de determinar la cantidad de PVAL residual en las nanocápsulas. De acuerdo al análisis estadístico podemos observar que se obtuvo una r^2 0.9996 lo cual indica que los puntos experimentales se ajustan a una línea recta ya que r^2 es muy cercana a 1. El porcentaje de C.V. es aceptable ya que el valor obtenido con este método espectrofotométrico es menor 3% lo cual sería un indicativo de que la dispersión del conjunto de los datos de la curva de calibración es bajo.



Gráfica F. Curva de calibración para el complejo colorido PVAL-I₂.

Para todos los lotes se obtuvieron residuos de PVAL muy bajos (< 5%) como se observa en la Tabla 3, lo cual indica que los lavados realizados durante el proceso con la finalidad de eliminar el exceso de PVAL son adecuados. Quintanar- Guerrero (1998) han reportado 6-8% de PVAL residual en nanoesferas de PLA preparadas por el método de emulsificación difusión [1] así como Piñon-Segundo, E, (2003), que reporto PVAL residual menor al 4% para NE's de PLGA, PLA y CAP preparadas por el mismo métodos [53].

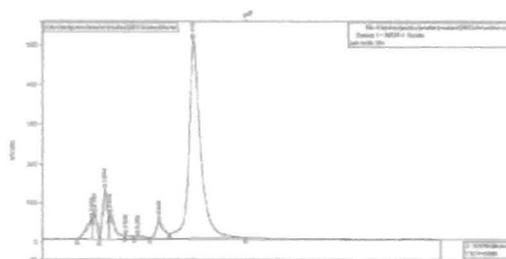
Tabla 3. Porcentaje de PVAL residual en nanocápsulas.

Lote	% PVAL residual
1	4.7412
2	3.6303
3	4.5520

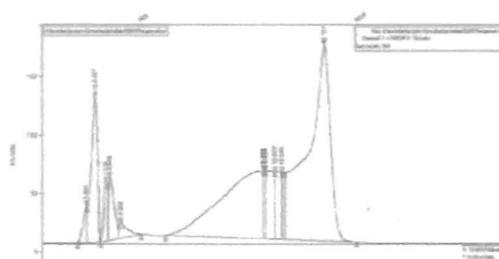
VII.1.5. Optimización del método analítico para la determinación de clorhexidina.

Con la finalidad de determinar la cantidad de clorhexidina encapsulada en las NC's se preparó una solución estándar de clorhexidina de concentración 20 µg/ml que fue inyectada al sistema cromatografico para determinar su área bajo la curva y con esto calcular la clorhexidina presente en las muestras problema de las NC's.

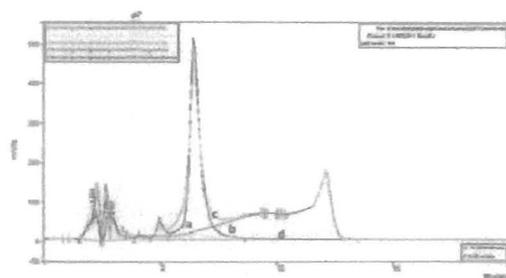
La clorhexidina presenta un pico con una longitud de onda de máxima absorción de 260 nm al UV, pero al mezclarse con el eugenol que presenta un pico de máxima absorción de 280 nm al UV, se suprime lo que imposibilita detectarla y con ello cuantificarla. La técnica elegida para la cuantificación de la clorhexidina en las NC's fue la cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC), para ello se realizaron pruebas inyectando una serie de muestras al sistema cromatografico variando la composición de la fase móvil, obteniendo lo que se muestra en las siguientes Graficas G-K. Todas las muestras se leyeron a 260 nm y una velocidad de flujo de 1ml/min.



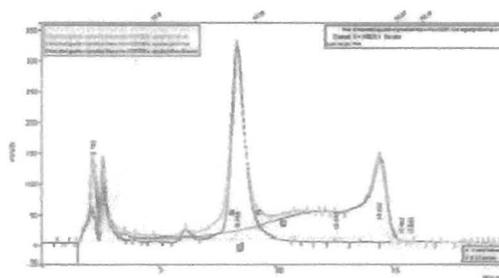
Grafica G. Cromatograma de solución estándar de clorhexidina.



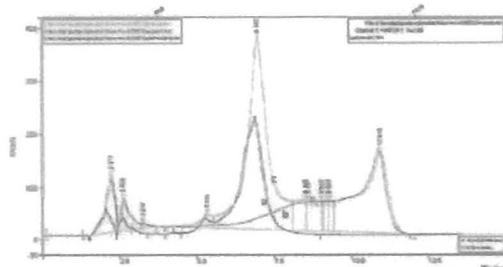
Grafica H. Cromatograma de solución estándar de Eugenol.



Grafica I. Cromatogramas obtenidos a partir de una solución estándar de CHX (a), solución estándar de eugenol (b), mezcla de CHX-eugenol (c) y muestra problema (d) empleando una fase móvil Acetonitrilo/Buffer de acetato pH 3.3 al 0.5% TEA.



Grafica J. Cromatogramas obtenidos a partir de una solución estándar de CHX (a), solución estándar de eugenol (b), mezcla de CHX-eugenol (c) y muestra problema (d) empleando una fase móvil Acetonitrilo/Buffer de acetato pH 3.3 al 0.5% TEA/Agua (20:65:15).



Grafica K. Cromatogramas obtenidos a partir de una solución estándar de CHX (a), solución estándar de eugenol (b), mezcla de CHX-eugenol (c) empleando una fase móvil Acetonitrilo:Buffer de acetatos pH 3.3 al 0.5% TEA: MeOH (35:65:10).

Se inyectó una solución estándar de clorhexidina de concentración conocida ($\approx 20 \mu\text{g/ml}$), también una solución estándar de eugenol ($\approx 738.5 \mu\text{g/ml}$) y una mezcla de ambos analitos de concentración $\approx 758.5 \mu\text{g/ml}$. En las gráficas se observa que el tiempo de retención de la clorhexidina varía conforme se modifica la composición de la fase móvil (Tret = 6.419, 8.364, 6.871 respectivamente) debido a que se utilizó la cromatografía en fase reversa para llevar a cabo la separación, lo que significa que los compuestos menos polares serán retenidos por la fase estacionaria y los más polares serán arrastrados por la fase móvil con mayor facilidad de acuerdo a su composición. En las gráficas I y J se puede observar que el pico de CHX presenta una resolución adecuada y no así en la gráfica K. Por otro lado, al inyectar la mezcla de ambos analitos al sistema cromatográfico no se observa una completa separación de los analitos debido a que la muestra tenía una concentración elevada (Gráficas I, J, K) pero al inyectar una muestra problema de extracción de CHX a partir de NC's se observa que hay una separación de ambos analitos (Gráfica I, J).

De acuerdo a lo anterior se determinó que las condiciones óptimas para llevar a cabo la cuantificación de clorhexidina contenida en las NC's se obtienen utilizando una columna LiChrospher 100RP-18, $5 \mu\text{m}$ ($125 \times 4 \text{ mm}$), una fase móvil Acetonitrilo:Buffer de acetatos pH 3.3 (35:65) al 0.5 % de trietilamina, una velocidad de flujo de 1 ml/min y una detección UV a 260 nm .

VII.2. Preparación de nanocápsulas por el método de Emulsificación-difusión

Las nanocápsulas fueron preparadas por el método de Emulsificación-difusión, como se describió anteriormente, esta técnica involucra el uso de solventes parcialmente miscibles con agua, los cuales son previamente saturados en agua con la finalidad de asegurar el equilibrio termodinámico de ambos líquidos. La selección del tipo de solventes a utilizar para la preparación de las nanocápsulas se apoyó en trabajos de investigación en los que se han preparado nanoesferas y nanocápsulas con PLA, PLGA y CAP [53].

Cabe recordar que los compuestos o principios activos que pueden ser encapsulados por la técnica de Emulsificación-difusión deben ser insolubles en agua. El principio activo incorporado en las nanocápsulas fue la clorhexidina base que es ampliamente utilizada como antibiótico. La clorhexidina base es insoluble en agua y soluble en disolventes orgánicos a diferencia de sus sales que son muy solubles en medios acuosos.

VIII. CARACTERIZACIÓN DE NANOCÁPSULAS

El tamaño de partícula y la distribución del tamaño de partícula son características importantes de los sistemas nanoparticulados, debido a que ellos determinan su distribución *in vivo*, su destino biológico, su toxicidad, su capacidad de dirección, además de influenciar en la carga de fármaco y en la estabilidad de las nanopartículas. La liberación del fármaco es afectada por el tamaño, esto se debe a que las partículas pequeñas tienen una gran área superficial lo que facilita una rápida liberación a diferencia de partículas grandes que poseen un mayor núcleo por lo que la difusión del fármaco será lenta. Debido a su tamaño, las nanopartículas tienen un alto riesgo de agregación durante su almacenamiento y transportación [54].

Las cargas eléctricas tienen un importante papel en la determinación de la interacción de las partículas indicando la estabilidad física de la dispersión coloidal. El potencial Z de una nanopartícula es utilizado para caracterizar la carga de la superficie; este refleja el potencial eléctrico de las partículas y es influenciado por la composición de la matriz y por el medio en el que son dispersadas. Como se muestra en la tabla 4 las nanopartículas con potencial Z entre (\pm) 30mV son estables en suspensión y la carga en la superficie previene la agregación de las partículas. El potencial Z puede ser usado para determinar si un material con carga activa se encuentra encapsulado en el centro de una nanopartícula o adsorbido en la superficie [55].

Tabla 4. Estabilización de suspensiones en base a su potencial Z [49].

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

Para la medición de tamaño de partícula se utilizó el sistema de caracterización de partículas Zetasizer® basado en la dispersión de luz dinámica, en donde las partículas son iluminadas con un láser; la intensidad de las fluctuaciones de la dispersión de luz y su rango van a depender del tamaño de las partículas obteniendo así el llamado diámetro hidrodinámico y se refiere a como difunde una partícula en un fluido [49]. Los resultados de promedio de tamaño de partícula, índice de polidispersidad y potencial Z de los lotes preparados con diferente cantidad de principio activo se muestran en la Tabla 5.

Tabla 5. Tamaño de partícula promedio, Índice de polidispersidad (I.P) y Potencial Z para nanocápsulas de CAP cargadas con CHX.

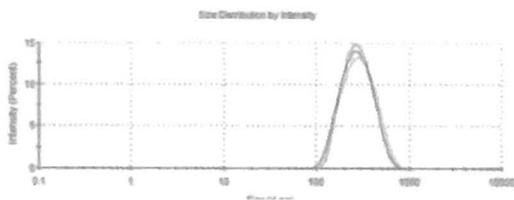
Lote	Cantidad de P.A mg	Tamaño d.(nm)	Desv. std	I.P	Potencial Z mV	Eficiencia de proceso %	Eficiencia de encapsulamiento %
1	10	301	15.09	0.116	-18.16	84.12	61.84
	10	274.6	9.80	0.154	-18.73	83.67	65.12
	10	296.3	8.25	0.150	-23.6	85.12	56.62
	\bar{x}	290.65			-20.16		
2	20	390	38.69	0.207	-17.8	73.04	64.01
	20	288	18.98	0.247	-15.53	72.89	64.04
	20	294	24.57	0.261	-23	70.09	65.42
	\bar{x}	324.46			-18.77		
3	30	291.36	56.37	0.252	-11	69.44	62.26
	30	305.5	30.80	0.354	-22.7	68.76	56.83
	30	292.2	42.06	0.269	-21.5	69.56	60.55
	\bar{x}	296.35			-18.71		

De manera general, todos los lotes preparados presentan un tamaño submicronico y todas las partículas se encuentran en un rango de 250-300 nm, como se muestra en la tabla 5. Se puede apreciar que al aumentar la cantidad de clorhexidina en las NC's el tamaño de partícula se va incrementado ligeramente así como el índice de polidispersidad. La dispersidad es una medida de la heterogeneidad de los tamaños de las moléculas o partículas en una mezcla. Una colección de

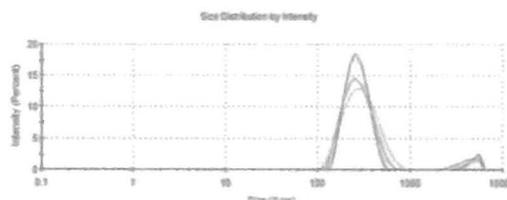
partículas se denomina monodispersas si las partículas tienen el mismo tamaño, forma, o masa. Una muestra de partículas que tienen una inconsistente distribución del tamaño, de la forma y de la masa es llamada polidispersa. Los rangos del índice de polidispersión varían desde un valor teórico de 0.000, para una población de gotitas idealmente monodispersas a 0.500 para las distribuciones relativamente amplias. En la práctica, los valores de índice de polidispersión de 0.030-0.050 son encontrados para las dispersiones látex estándares consideradas como monodispersas. Los lotes con mayor cantidad de principio activo presentan una mayor desviación estándar en la distribución del tamaño de partícula, lo cual es indicativo de un aumento en su índice de polidispersidad que sería indicativo de la presencia de una población polidispersa y lo cual se observa en las Gráficas L, M, N.

El potencial Z fue medido en un Zetasizer® empleando una celda de capilar doblado y mediante la aplicación de un campo eléctrico a través de la dispersión, las partículas con carga migran hacia el electrodo de carga opuesta, con una velocidad proporcional a la magnitud del potencial Z [49]. Una dispersión de nanopartículas con un potencial Z por arriba de (\pm) 30 mV ha demostrado ser estable, en gran parte debido a que la carga de la superficie impide la agregación de las partículas al provocar la repulsión entre éstas [54]. La determinación del potencial Z tuvo como finalidad conocer la estabilidad que presentan las NC's así como observar si el principio activo se encontraba encapsulado.

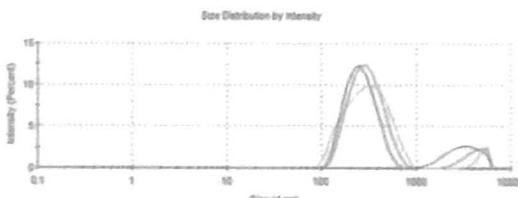
Los resultados de potencial Z obtenidos para las NC's se muestran en la Tabla 5 y las Gráficas O, P, Q observando que todos los lotes presentan una potencial Z mayor a -30 mV. En base a lo reportado en la Tabla 5 las NC's se encuentran en el umbral de dispersión, cabe mencionar que la dispersión de sólidos en líquidos puede ser estabilizada tanto por ausencia o presencia de barreras eléctricas o por barreras estéricas y en este caso el mecanismo de acción del estabilizante PVAL no es por repulsión de cargas si no por protección estérica debida a las cadenas de estabilizante que se encuentran adsorbidas en la superficie de las NC's lo que impide su aglomeración y aunando su talla nanométrica se obtiene una adecuada dispersión de Nc's de CAP [56]. Por otro lado, la carga que presentan las NC's es negativa que podría ser indicativo que la clorhexidina esta encapsulada en el centro de las NC's ya que ésta presenta carga positiva y la carga detectada se debe a la presencia del PVAL adsorbido en la superficie de las NC's.



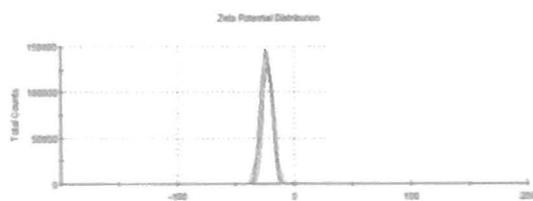
Gráfica L. Distribución de tamaño de partícula de NC's cargadas con 10 mg de P.A



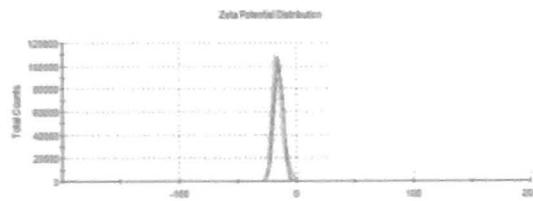
Gráfica M. Distribución de tamaño de partícula de NC's cargadas con 20 mg de P.A



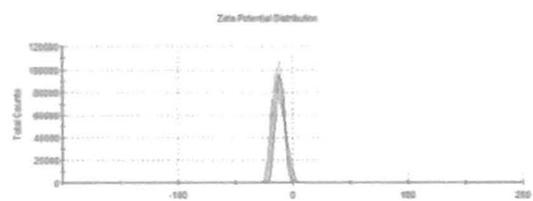
Gráfica N. Distribución de tamaño de partícula de NC's cargadas con 30 mg de P.A



Grafica O. Potencial Z de NC's cargadas con 10 mg de P.A



Grafica P. Potencial Z de NC's cargadas con 20 mg de P.A



Grafica Q. Potencial Z de NC's cargadas con 30 mg de P.A

Después de determinar la cantidad de CHX presente en las NC's por medio de la técnica HPLC se procedió a determinar la eficiencia de encapsulamiento (%E.E) y eficiencia de proceso (E.P). Los datos se resumen en la tabla 5, donde se considera que para todos los lotes el porcentaje de encapsulación puede considerarse como alto para CHX, alrededor de 60% con respecto a la cantidad teórica de clorhexidina colocada pues es difícil alcanzar eficiencias de encapsulación altas. Los datos son similares a los reportados previamente para nanocápsulas utilizando poly(ϵ -caprolactona) por Hassan Lbotounne et. al, [57]. Esto podría deberse a que en el proceso de elaboración las NC's son sometidas a varios procesos de purificación lo que podría facilitar la liberación del fármaco al medio y con ello su pérdida. En cuanto a la eficiencia de proceso se observa que al aumentar la cantidad de clorhexidina la eficiencia de proceso disminuye, lo que podría deberse a que el proceso de elaboración de las NC's no soporta el aumento de principio activo, ya que al momento de realizar los lotes 2 y 3 se observó una precipitación del polímero, que podría deberse tal vez a una sobresaturación del sistema, lo cual se ve reflejado en el aumento del tamaño de partículas (Tabla 5) e índice de polidispersidad a pesar de tener una eficiencia de encapsulamiento similar en todos los lotes.

Con base a los resultados obtenidos se determinó que la mejor formulación sería el lote 1 que presenta un tamaño de partícula en un rango de entre 250-300nm, una población considerada como monodispersa, una eficiencia de encapsulamiento de alrededor de 60% y con una alta eficiencia de proceso 80%. Lo que nos aseguraría tener un sistema estable que sería útil para la realización de futuras pruebas.

IX. Microscopia Electrónica de Barrido

Los estudios de microscopia electrónica de barrido fueron realizados con el lote 1 que fue el que presentó mejores resultados. Se observó que la morfología de las nanocápsulas cargadas con clorhexidina, tenían una forma esférica y una superficie sólida y lisa. Asimismo el tamaño de partícula concordó con el determinado por el método de dispersión de luz medido en el Zetasizer.

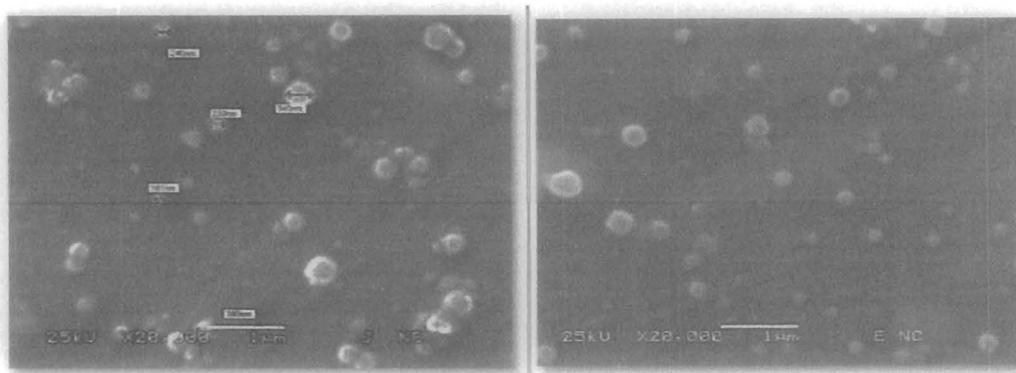


Fig. 4 Micrografías de NC's de CAP cargadas con CHX, 20 000x (Barra=1μm)

X. Calorimetría Diferencial de Barrido

Mediante la calorimetría diferencial de barrido (DSC), se puede establecer la relación que existe entre la matriz de las NC's y el fármaco para saber si éste se encuentra disperso molecularmente en la matriz o en forma de cristales. Cuando existe una dispersión molecular del fármaco en las NC's no se detecta el pico endotérmico característico de la fusión del principio activo, por lo que se caracterizaron las NC's cargadas con clorhexidina mediante esta técnica [53]. En la Figura 5 se presentan los termogramas correspondientes a la clorhexidina, eugenol, polivinilalcohol, ftalato acetato de celulosa y el sistema de nanocápsulas así como de una mezcla física. Se presenta el endoterma de fusión de la clorhexidina base pura 135.65°C seguido de su degradación. En el caso de las NC's no se observa el pico endotérmico característico del punto de fusión de la clorhexidina además de observarse una disminución en la temperatura de transición vítrea del polímero lo que nos indica que el fármaco se encuentra encapsulado dentro de la matriz polimérica de las NC's.

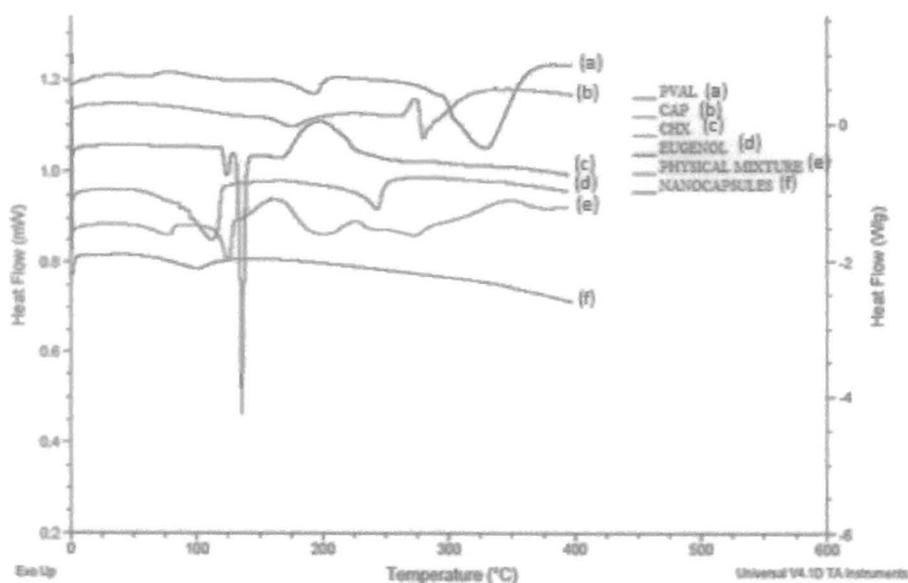


Fig. 5 Termogramas obtenidos a partir de los componentes de la formulación de NC's, PVAL(a), CAP (b), CHX (c), Eugenol (d), Mezcla física (e) y Nanocápsulas (f).

XI. PRUEBAS CLINICAS PRELIMINARES

Se planeó el diseño de un modelo experimental para realizar estudios clínicos empleando el nanosistema obtenido, como alternativa en el tratamiento de la enfermedad periodontal y observar con esto la efectividad del sistema. Para dicha prueba se propone emplear tres sistemas que incluyen, Nanocápsulas de CAP conteniendo clorhexidina, Nanoemulsiones conteniendo clorhexidina y una solución comercial que contenga clorhexidina, con fines comparativos.

Los resultados de las pruebas clínicas preliminares se resumen en la Grafico R, en donde la formulación que presenta mejores resultados es la nanoemulsión que contiene clorhexidina, seguida de las nanocápsulas conteniendo clorhexidina y por último la solución comercial.

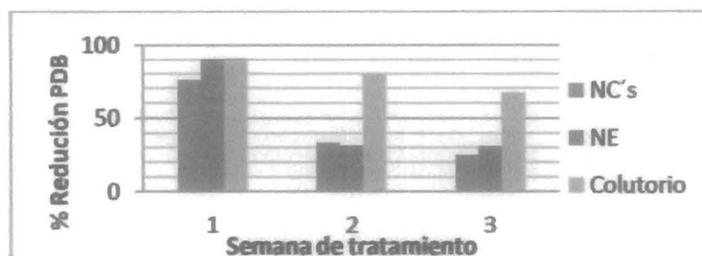


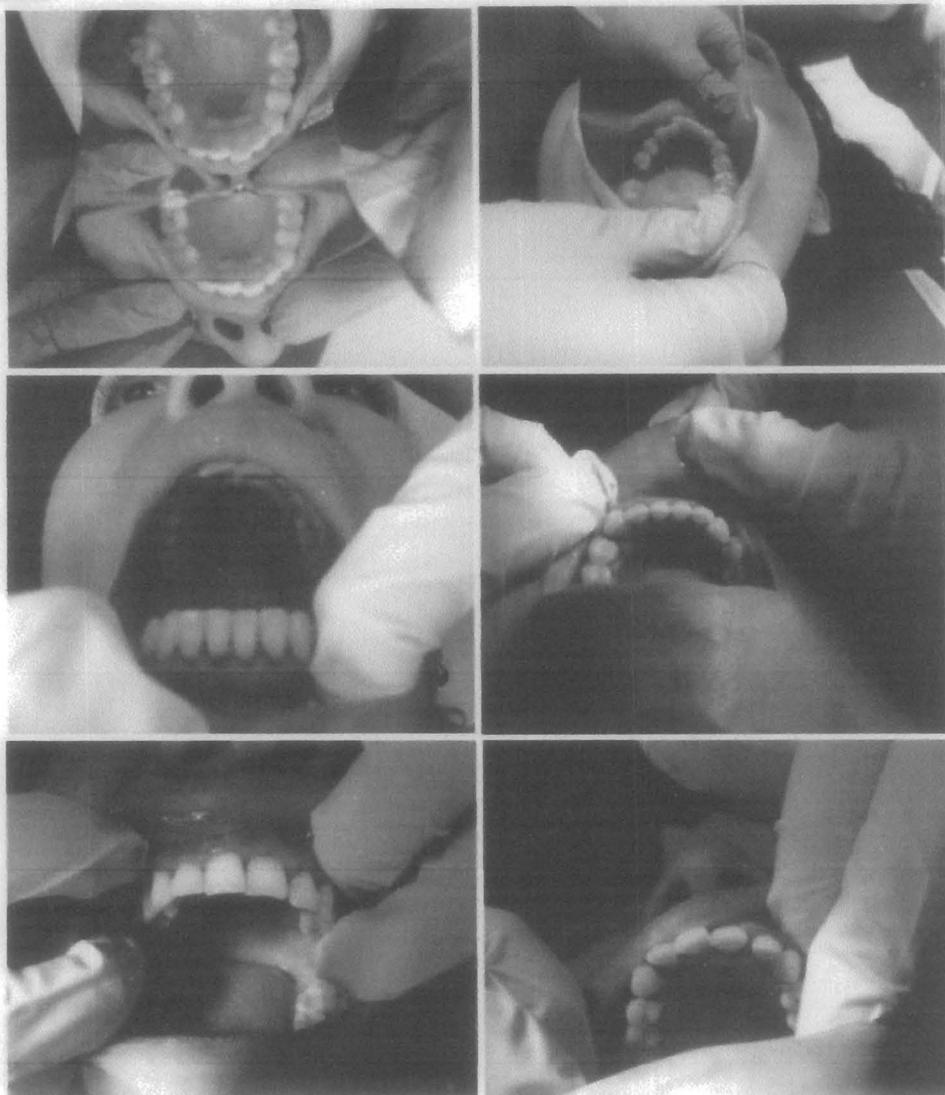
Grafico R. Comparación de eficacia de NC's (nanocápsulas), NE (nanoemulsión) y Solución colutoria conteniendo clorhexidina.

En las imágenes 1-6 se muestra la evolución clínica del paciente voluntario que utilizó el sistema compuesto por nanocápsulas cargadas con clorhexidina. A continuación se resume el procedimiento que se llevó a cabo y el cual se explicó al paciente antes de ser realizado con previa autorización del paciente, firmando un informe de consentimiento informado, donde acepta seguir las indicaciones de tratamiento y se compromete a finalizarlo.

1. En primer lugar se lleva a cabo un proceso de odontoxesis en donde se elimina el cálculo supragingival.
2. Seguido por un curetaje cerrado por cuadrante.
3. Sondaje periodontal.
4. Control de placa bacteriana utilizando el índice de O'leary, Llenado de periodontograma.
5. Profilaxis con cepillo, copa de hule y pasta para profilaxis sin flúor.
6. Instrucciones de la técnica de cepillado de Bass.
7. Toma de impresión de Alginato.
8. Corrido de modelos para la realización de guardas.
9. Obtención de modelos marcaje y elaboración de guarda en acetato blando calibre 80.
10. Recorte de guarda oclusal superior e inferior.
11. Explicación del manejo del sistema a utilizar por el paciente.
12. Colocación o administración del sistema sobre guardas.
13. Colocación de guardas en el paciente.

En las imágenes se observa la evolución clínica de un paciente que presenta periodontitis, que se caracteriza por la inflamación de las encías, acumulación de cálculo supragingival, sin movimiento aun de las piezas dentales. Al paciente se le realizó el procedimiento antes mencionado, recibiendo indicaciones de administrar el equivalente a 8 mg de CHX contenida en las NC's (125 gotas aproximadamente) cada tercer día por un periodo de 15 días, aplicando el sistema en las guardas y utilizándolas solo por las noches, que es el periodo del día en donde se presenta mayor actividad bacteriana. De acuerdo al índice de O'leary que es un indicativo de la actividad dentobacteriana se pudo observar la disminución de la placa como se muestra en la Grafica R y lo cual se puede corroborar en las imágenes 1-6 en donde se observa una disminución gradual de la inflamación de las encías. Por otro lado se pudo percibir que la aceptación por parte del paciente es aceptable ya que no requiere de aplicar el sistema varias veces al día y al ser una sola

aplicación por la noche le permite realizar sus actividades cotidianas sin que la guarda le moleste además de que esta presenta una consistencia blanda que no irrita la cavidad oral. Cabe mencionar que la dosis administrada es inferior a la usualmente aplicada en formulaciones comerciales.



XII. CONCLUSIONES

Se optimizó el método de Emulsificación-difusión que permitió obtener un sistema nanoparticulado estable con un rendimiento y una eficiencia de encapsulamiento de clorhexidina adecuados. La caracterización de las NC's obtenidas, nos dicen que estos sistemas son ideales para ser incorporadas y utilizadas como una formulación novedosa para el tratamiento de la enfermedad periodontal. Se desarrolló y optimizó la metodología analítica por medio de la técnica de cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC), para la identificación y determinación del principio activo, a partir de los nanosistemas.

Se llevó a cabo una prueba clínica preliminar, aplicando tres diferentes sistemas que contienen clorhexidina, con la finalidad de observar la efectividad del sistema realizado, obteniéndose que el sistema que presenta mejores resultados en base a la reducción de la placa dentobacteriana, es la nanoemulsión reduciéndola en un 60 % , seguida de las nanocápsulas con un 50% y por último el colutorio con un 25%.

XIII. REFERENCIAS

- [1] D. Quintanar-Guerrero, E. Allémann, H. Fessi, E. Doelker, Preparation techniques and mechanisms of formation of biodegradable nanoparticles from preformed polymers, *Drug. Dev. Ind. Pharm.* 24 (1998) 1113-1128.
- [2] R. Zsigmondy, *Colloids and the ultramicroscope*, Wiley & Sons, New York, NY, 1914.
- [3] A.S. Dukhin, P.J. Goetz, *Ultrasound for Characterizing Colloids*, Elsevier, 2002.
- [4] S.A. Saunders, Current practicality of nanotechnology in dentistry. Part 1: Focus on nanocomposite restoratives and biomimetics, *Clin. Cosmet. Invest. Dent.* 1 (2009) 47-61.
- [5] R.A. Freitas, *Nanomedicine/Basic Capabilities*, vol.1, Landes Bioscience, Georgetown, TX, 1999, pp. 345-347
- [6] J.H. Kinney, S. Habelitz, S.J. Marshall, G.W. Marshall, The importance of intrafibrillar mineralization of collagen on the mechanical properties of dentin, *J. Dent. Res.* 82 (2003) 957-961.
- [7] J. W. Freeman, L. D. Wright, C. T. Laurencin, S. Bhattacharyya, in: K.E. Gonsalves, C.R. Halberstadt, C.T. Laurencin, L.S. Nair (Eds.), *Biomedical Nanostructures*, Wiley & Sons, NJ, 2008, pp. 3-24.
- [8] B.D. Fahlman, *Materials Chemistry*, Springer, Dordrecht, The Netherlands, 2007.
- [9] L.A. Ximenez-Fyvie, A.D. Haffajee, S.S. Socransky, Comparison of the microbiota of supra and subgingival plaque in health and periodontitis, *J. Clin. Periodontol* 27 (2000) 648-657.
- [10] N. Jain, G. K. Jain, S. Javed, Z. Iqbal, S. Talegaonkar, F. J. Ahmad, et al., Recent approaches for the treatment of periodontitis, *Drug Discov. Today* 13 (2008) 932-943.
- [11] S. Sharma, S. E. Cross, C. Hsueh, R. P. Wali, A. Z. Stieg, J. K. Gimzewski, Nanocharacterization in dentistry, *Int. J. Mol. Sci.* 11 (2010) 2523-2545.
- [12] A. Luzardo Álvarez, F. Otero Espinar, J. Blanco Méndez, The application of microencapsulation techniques in the treatment of endodontic and periodontal diseases, *Pharmaceutics* 3 (2009) 538-571.
- [13] R. S. Leite, K. L. Kirkwood, Present and future non-surgical therapeutic strategies for the management of periodontal diseases, in: J. Manakil (Ed.), *Periodontal Diseases-A clinician's Guide*, InTech, 2012. Available from: <http://www.intechopen.com/books/periodontal-diseases-a-clinician-s-guide/present-and-future-non-surgical-therapeutic-strategies-for-the-management-of-periodontal-diseases/>
- [14] F. M. Chen, R. M. Shelton, Y. Jin, I. L. C. Chapple, Localized delivery of growth factors for periodontal tissue regeneration: role, strategies, and perspectives, *Med. Res. Rev.* 29 (2009) 472-513.
- [15] M. L. Bruschi, H. Panzeri, O. de Freitas, E. H. G. Lara, M. P. D. Gremiao, Sistemas de liberacao de fármaco intrabolsa periodontal, *Braz. J. Pharm. Sci.* 42 (2006) 29-47.
- [16] A. Leszczyńska, P. Buczek, W. Buczek, M. Pietruska, Periodontal pharmacotherapy an updated review, *Adv. Med. Sci.* 56 (2011) 123-131.
- [17] S. P. Vyas, V. Sihorkar, V. Mishra, Controlled and targeted drug delivery strategies towards intraperiodontal pocket diseases, *J. Clin. Pharm. Ther.* 25 (2000) 21-42.
- [18] S. Pragati, S. Ashok, S. Kuldeep, Recent advances in periodontal drug delivery systems, *Int. J. Drug Deliv.* 1 (2009) 1-14.
- [19] F.J. vander Ouderaa, Antiplaque agents. Rationale and prospects for prevention of gingivitis and periodontal disease, *J. Clin. Periodontol.* 18 (1991) 447-454.
- [20] P.S. Stewart, Diffusion in biofilms, *J. Bacteriol.* 185(2003)1485-1491.
- [21] R.L. Dunn, A.J. Tipton, R.J. Harkrader, J.A. Rogers, *Intragingival delivery systems for the treatment of periodontal disease*, US005324520A, 1994.
- [22] A.E. Nel, L. Madler, D. Velegol, T. Xia, E.M.V. Hoek, P. Somasundaran, et al., Understanding biophysicochemical interactions at the nanobiointerface, *Nat. Mater.* 8 (2005) 543-557.
- [23] T.S.J. Kashi, S. Eskandarion, M. Esfandyari-Manesh, S.M.A. Marashi, N. Samadi, S.M. Fatemi, et al., Improved drug loading and antibacterial activity of minocycline-loaded PLGA nanoparticles prepared by solid/oil/water ion pairing method, *Int. J. Nanomed.* 7 (2012) 221-234.
- [24] L.M. Shaddox, C.B. Walker, Treating chronic periodontitis: current status, challenges, and future directions, *Clin. Cosmet. Invest. Dent.* 2 (2010) 79-91.

- [25] E. Piñon-Segundo, A. Ganem-Quintanar, V. Alonso-Pérez, D. Quintanar-Guerrero, Preparation and characterization of triclosan nanoparticles for periodontal treatment, *Int. J. Pharm.* 294 (2005) 217-232.
- [26] X.-M. Liu, R.A. Reinhardt, D. Wang, Drug delivery strategies for common orofacial diseases, *J. Drug Target.* 14 (2006) 583-597.
- [27] A. Bhardwaj, S. V. Bhardwaj, R. Pandey, Advances in periodontal drug delivery systems, *Int. J. Novel Drug Deliv. Tech.* 2 (2012) 271-275.
- [28] S. K. Sahoo, S. Parveen, J. J. Panda, The present and future of nanotechnology in human health care, *Nanomedicine* 3 (2007) 20-31.
- [29] A. Ganem-Quintanar, Étude de la perméabilité de la muqueuse orale: évaluation de différentes approches pour augmenter le passage des principes actifs, Ph. D. thesis, Université de Genève/Université Claude Bernard, Lyon, Genève, 1997.
- [30] R. C. Mundargi, V. R. Babu, V. Rangaswamy, P. Patel, T. M. Aminabhavi, Nano/microtechnologies for delivering macromolecular therapeutics using poly(D,L-lactide-co-glycolide) and its derivatives, *J. Control. Release* 125 (2008) 193-209
- [31] F.A. Carranza Jr., F.R. Saglie, *Glickman's Clinical Periodontology*, W.B.Saunders, New York, 1990.
- [32] C.L. Drisko, C.M. Cobb, W.J. Killoy, B.S. Michalowicz, B.L. Pihlstrom, R.A. Lowenguth, J.G. Caton, M. Encarnacion, M. Knowles, J.M. Goodsen, Evaluation of periodontal treatments using controlled release tetracycline fibers: clinical response, *J. Periodontol.* 66 (1995) 692-698.
- [33] F.J. Vander Quderaa, Anti-plaque agents: rationale and prospects of prevention of gingivitis and periodontal disease, *J. Clin. Periodontol.* 18 (1991) 449-454.
- [34] R.A. Seymour, P.A. Heasman, Tetracyclines in the management of periodontal diseases, *J. Clin. Periodontol.* 22 (1995) 22-35.
- [35] A. Buchter, U. Meyer, K.-L. Birgit, U. Joos, J. Kleinheinz, Sustained release of doxycycline for the treatment of peri-implantitis: randomized controlled trial, *Br. J. Oral Maxillofac. Surg.* 42 (2004) 439-444.
- [36] E. Kenawy, G.L. Bowlin, K. Mansfield, J. Layman, G.D. Simpson, E.H. Sanders, G.E. Wnek, Release of tetracycline hydrochloride from electrospun poly(ethylene-co-vinyl acetate), poly(lactic acid), and a blend, *J. Control. Release* 81 (2002) 57-64.
- [37] Mandel ID. Antimicrobial mouth rinses: overview and update. *J Am Dent Assoc* 1994;125(Suppl 2):2S-10S.
- [38] Magnusson I. Local delivery of antimicrobial agents for the treatment of periodontitis. *Compend Contin Educ Dent* 1998;19(10):953-6.
- [39] Ciancio SG. Local delivery of chlorhexidine. *Compend Contin Educ Dent* 1999;20(5):427-32.
- [40] N. Senior, Some observations on the formulation and properties of chlorhexidina, *J. Soc. Cosmet. Chem.* 24 (1973) 259-278.
- [41] H.S. Swai, M.P. Patel, M. Braden, Release of chlorhexidine from methacrylate polymers, *Proc. Int. Symp. Controlled Release Bioact. Mater.* 24 (1997) 1025-1026.
- [42] M. Addy, P. Renton-Harper, Local and systemic chemotherapy in the management of periodontal disease: an opinion and review of the concept, *J. Oral Rehab.* 23 (1996) 219-231.
- [43] K.S. Kornman, Controlled release local delivery antimicrobials in periodontics. Prospects for the future, *J. Periodontol.* 64 (1993) 782-791.
- [44] D. Steinberg, M. Friedman, A. Soskolne, M.N. Sela, A new degradable controlled release device for treatment of periodontal disease. *In vitro* release study, *J. Periodontol.* 61 (1990) 393-398.
- [45] J.P. Fiorellini, D.W. Paquette, The potential role of controlled release delivery systems for chemotherapeutic agents in periodontics, *J. Periodontol.* 66 (1992) 870-877.
- [46] G. Gofin, Efficacy of a sustained local delivery of chlorhexidine Periochip as an adjunct to scaling and root planing in the treatment of chronic periodontal disease, *Int. Dent. Rev.* (1998) 1-18.
- [47] P. Bonesvoll, P. LoÈkken, G. RoÈlla, P.N. Paus, Retention of chlorhexidine in the human oral cavity after mouth rinses, *Arch. Oral Biol.* 19 (1974) 209-212.
- [48] A. Stabholz, M.N. Sela, M. Friedman, G. Golomb, A. Soskolne, Clinical and microbiological effects of sustained release chlorhexidine in periodontal pockets, *J. Clin. Periodontol.* 13 (1986) 783-788.

- [49] <http://malvern.com> (2009).
- [50] Moon S.E, Kim H.Y, Cha J.D. Synergistic effect between clove oil and its major compounds and antibiotics against oral bacterial. *Archives of oral biology* 2011, 56, 907-916.
- [51] ICH Impurities: Guideline for residual solvents Q3C (R3), November 2005.
- [52] T. Raygoza " Estudio de liberación del clorhidrato de pseudoefedrina en matrices hidrofílicas de PVAL 522 y su relación con el hinchamiento". Tesis de licenciatura, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Universidad Nacional Autónoma de México, México (1995).
- [53] Piñon-Segundo, E., Desarrollo tecnológico y caracterización de partículas submicrónicas poliméricas como vectores terapéuticos para el tratamiento de enfermedades periodontales. Tesis de Maestría, Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Químicas, Universidad Nacional Autónoma de México, México. (2003).
- [54] V.J. Mohanraj and Y. Chen. Nanoparticles – A Review. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research* 5 (1), (2006) 561-573.
- [55] T. M. Riddick. Control of Colloid Stability through Zeta Potential. Zeta-Meter Inc., New York, 1968.
- [56] M. J. Rosen. Surfactants and interfacial phenomena. Dispersion and aggregation of solids in liquid media by surfactants 3^a Ed. Wiley & Sons 2004 344-364.
- [57] H.Lboutounne, J. F. Chaulet, C. Ploton, F. Falson, F. Pirot. Sustained ex vivo skin antiseptic activity of chlorhexidine in poly(E-caprolactone) nanocapsule encapsulated form and as a digluconate. *J. Cont. Rel.* 2 (2002) 319-334.