



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

**“ELABORACIÓN Y EVALUACIÓN DE MICROESFERAS
MUCOADHESIVAS PREPARADAS A TRAVÉS DE LA TÉCNICA DE
GELIFICACIÓN IÓNICA UTILIZANDO ALGINATO SÓDICO Y
QUITOSANO”**

Trabajo de titulación para optar por el título de:

BIOQUÍMICO FARMACÉUTICO

AUTOR: LUIS ALFONSO VILLARROEL ORTIZ

TUTORA: ADRIANA CAROLINA RINCÓN ALARCÓN PhD

RIOBAMBA-ECUADOR

2015

ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

El tribunal de Tesis certifica que el trabajo de titulación: “ELABORACIÓN Y EVALUACIÓN DE MICROESFERAS MUCOADHESIVAS PREPARADAS A TRAVÉS DE LA TÉCNICA DE GELIFICACIÓN IÓNICA UTILIZANDO ALGINATO SÓDICO Y QUITOSANO”, de responsabilidad del señor Luis Alfonso Villarroel Ortiz, ha sido minuciosamente revisado por los Miembros del Tribunal de Tesis, quedando autorizada su presentación.

Dra. Adriana Rincón Alarcón PhD. _____

DIRECTORA DE TRABAJO
DE TITULACIÓN

BQF. Víctor Guangasig Toapanta M.Sc. _____

MIEMBRO DE TRIBUNAL

Dra. Elizabeth Escudero _____

MIEMBRO DE TRIBUNAL

NOTA DEL TRABAJO ESCRITO _____

.....
DOCUMENTALISTA SISBIB ESPOCH

Yo, Luis Alfonso Villarroel Ortiz, soy responsable de las ideas, doctrinas y resultados expuestos en esta tesis, y el patrimonio intelectual de la Tesis de Grado, pertenece a la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

Luis Alfonso Villarroel Ortiz

DEDICATORIA

Este trabajo va dedicado a mis abuelitos; quienes me criaron con mucho amor y dedicación, que a pesar de mi edad hasta el día de hoy no dejan de preocuparse por mí...

A mi abuelito Luis A. Ortiz que desde el cielo me envía cada día sus bendiciones.

A mi familia quienes por ellos soy lo que soy.

AGRADECIMIENTO

Agradezco A Dios por haberme acompañado y guiado a lo largo de mi carrera, por ser mi fortaleza en momentos de debilidad y por brindarme una vida llena de aprendizajes, experiencias y felicidad

Le doy gracias a mis padres Wilman y Fanny, por darme la vida y la libertad para vivirla, por apoyarme en todo momento por los valores que me han inculcado, y por haberme dado la oportunidad de tener una excelente educación en el transcurso de mi vida. Sobre todo por ser un buen ejemplo de vida.

Agradezco a la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, especialmente a mi querida Escuela de Bioquímica y Farmacia por abrirme las puertas para formarme profesionalmente.

Mi más profundo agradecimiento a mi directora de tesis, Dra. Adriana Rincón, por ser una de las mejores profesoras de esta Escuela, por su esfuerzo en hacer relucir lo mejor de mí en cada momento, por su dedicación, conocimiento, experiencia, paciencia y motivación.

De igual manera agradezco a mi colaborador de tesis BQF. Víctor Guangasig por todo su apoyo brindado durante mi vida estudiantil, por ser ejemplo de persona, por su rectitud en su profesión, por sus consejos y paciencia.

A la Dra. Paola Villalon, por su labor tan valiosa que lleva día a día sin desmayar, pido a Dios que siempre le de fuerzas y sabiduría en todo lo que haga.

A todos y todas ustedes, mil gracias...

Dios le pague...

TABLA DE CONTENIDO

	Páginas
RESUMEN.....	xv
SUMARY.....	xvi
INTRODUCCIÓN.....	1
CAPÍTULO I	
1. MARCO TEÓRICO REFERENCIAL.....	5
1.1. Bases teóricas.....	5
1.1.1. Mucoadhesión.....	5
1.1.1.1. Membranas mucosas.....	5
1.1.1.2. Mecanismo de mucoadhesión.....	6
1.1.1.3. Teorías de mucoadhesión.....	7
1.1.1.4. Factores que modifican la Mucoadhesión.....	8
1.1.2. Formas farmacéuticas mucoadhesivas.....	11
1.1.3. Polímeros bioadhesivos.....	14
1.1.3.1. Polímeros Aniónicos.....	15
1.1.3.2. Polímeros Catiónicos.....	15
1.1.4. Alginatos.....	15
1.1.4.1. Propiedades de los Alginatos.....	18
1.1.5. Mecanismos de Gelificación iónica con Alginatos.....	20
1.1.5.1. Gelificación externa.....	20
1.1.5.2. Gelificación interna.....	21
1.1.6. Quitosano.....	22
1.1.6.1. Propiedades del Quitosano.....	23
1.1.6.2. Propiedades fisicoquímicas del Quitosano.....	24
1.1.7. Microencapsulación.....	26
1.1.7.1. Micropartículas.....	26
1.1.8. Técnicas de Microencapsulación.....	27
1.1.8.1. Encapsulación por extrusión.....	27
1.1.8.2. Encapsulación en Emulsión.....	29

1.1.8.3.	Encapsulación mediante secado por atomización.....	30
1.1.9.	Caracterización de Micropartículas.....	30
1.1.9.1.	Morfología.....	31
1.1.9.2.	Tamaño de la Partícula.....	31

CAPÍTULO II

2.	MARCO METODOLÓGICO.....	33
2.1.	Lugar de realización.....	33
2.2.	Materiales, equipos y reactivos.....	33
2.2.1.	Materiales de laboratorio.....	33
2.2.2.	Equipos.....	33
2.2.3.	Reactivos.....	34
2.2.4.	Materia prima.....	34
2.2.5.	Materia animal.....	34
2.3.	Técnicas y Métodos.....	34
2.3.1.	Preparación de soluciones.....	35
2.3.2.	Caracterización de las soluciones poliméricas.....	37
2.3.3.	Estandarización del método de elaboración de microesferas mucoadhesivas.....	38
2.3.3.1.	Selección del instrumento de goteo.....	38
2.3.3.2.	Determinación de la altura óptima de goteo.....	39
2.3.3.3.	Mecanismo de secado.....	39
2.3.4.	Método de elaboración de microesferas mucoadhesivas.....	39
2.3.5.	Evaluación de microesferas mucoadhesivas.....	41
2.3.5.1.	Determinación de la pérdida de humedad por deshidratación de las microesferas mucoadhesivas.....	41
2.3.5.2.	Rendimiento de producción de microesferas mucoadhesivas.....	41
2.3.5.3.	Determinación del tamaño y morfología de las microesferas.....	42
2.3.5.4.	Evaluación de la mucoadhesividad “ <i>In vitro</i> ”.....	43

CAPÍTULO III

3.	MARCO DE RESULTADOS, DISCUSIÓN Y ANÁLISIS DE RESULTADOS.....	44
3.1.	Caracterización de las soluciones poliméricas.....	44
3.2.	Estandarización del método de elaboración de microesferas mucoadhesivas.....	45

3.2.1.	Selección del instrumento de goteo.....	45
3.2.2.	Determinación de la altura óptima de goteo.....	45
3.2.2.1.	Análisis estadístico del tamaño de microesferas mucoadhesivas.....	49
3.2.3.	Mecanismo de secado.....	52
3.3.	Evaluación de microesferas mucoadhesivas.....	55
3.3.1.	Determinación de la pérdida de humedad por deshidratación de las microesferas mucoadhesivas.....	55
3.3.2.	Rendimiento de producción de microesferas autoadhesivas.....	56
3.3.3.	Determinación del tamaño y de la morfología de las microesferas mucoadhesivas	
3.3.3.1.	Control de calidad de tamaños microesferas mucoadhesivas.....	62
3.3.3.2.	Distribución de frecuencias de tamaños de microesferas mucoadhesivas.....	64
3.3.4.	Evaluación de la Mucoadhesividad “ <i>In vitro</i> ”.....	68
3.3.4.1.	Control de calidad de mucoadhesión de las microesferas.....	72
	CONCLUSIONES.....	75
	RECOMENDACIONES.....	76
	BIBLIOGRAFÍA	
	ANEXOS	

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1-1.	Clasificación de la capacidad bioadhesiva de polímeros.....	14
Tabla 2-1.	Clasificación de las partículas según su tamaño.....	26

ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

Figura 1-1.	Estructura de la membrana mucosa.....	5
Figura 2-1.	Etapas de la mucoadhesión.....	6
Figura 3-1.	Estructura química del Dextrano.....	9
Figura 4-1.	Estructura química del Polietilenglicol.....	10
Figura 5-1.	Estructura química del Alginato.....	16
Figura 6-1.	Ácidos Urónicos componentes del ácido Algínico.....	16
Figura 7-1.	Segmentos de bloques de Homopolímeros.....	17
Figura 8-1.	Estructura EGG-BOX.....	19
Figura 9-1.	Mecanismos de Gelificación iónica.....	21
Figura 10-1.	Estructura química de la Quitina.....	22
Figura 11-1.	Estructura química de Quitosano.....	23
Figura 12-1.	Interacción entre el polímero bioadhesivo y la membrana mucosa.....	24
Figura 13-1.	Tipos diferentes de micropartículas.....	27
Figura 14-1.	Tipos de dispositivos extrusores.....	28
Figura 15-1.	Técnica de microencapsulación en emulsión.....	29
Figura 1-2.	Diámetro de Feret.....	42

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1-2.	Preparación de la solución de Alginato sódico.....	35
Cuadro 2-1.	Preparación de la solución de Quitosano.....	36
Cuadro 3-2.	Concentraciones de la solución ionizante.....	37
Cuadro 4-2.	Parámetros utilizados para medir la viscosidad de soluciones de Alginato sódico.....	38
Cuadro 5-2.	Diferentes alturas de goteo para la determinación del valor óptimo.....	39
Cuadro 6-2.	Formulaciones para la elaboración de microesferas mucoadhesivas.....	40
Cuadro 1-3.	Viscosidad de soluciones de Alginato sódico.....	44
Cuadro 2-3.	Tamaño y morfología de microesferas mucoadhesivas preparadas con la formulación 1.....	46
Cuadro 3-3.	Tamaño y morfología de microesferas mucoadhesivas preparadas con la formulación 2.....	47
Cuadro 4-3.	Tamaño y morfología de microesferas mucoadhesivas preparadas con la formulación 3.....	48
Cuadro 5-3.	Parámetros estadísticos de los tamaños de las microesferas mucoadhesivas.....	50
Cuadro 6-3.	Test de normalidad de los de los tamaños de las microesferas.....	51
Cuadro 7-3.	Test de homogeneidad de varianzas de los tamaños de las microesferas mucoadhesivas.....	51
Cuadro 8-3.	Análisis de varianzas (ANOVA) de los tamaños de las microesferas mucoadhesivas.....	52
Cuadro 9-3.	Fotografías de microesferas mucoadhesivas secadas a diferentes tiempos y temperatura.....	53
Cuadro 10-3.	Fotografías de microesferas mucoadhesivas secadas sobre diferentes superficies.....	54
Cuadro 11-3.	Perdida por deshidratación de microesferas mucoadhesivas.....	55

Cuadro 12-3.	Rendimiento de producción de microesferas mucoadhesivas.....	56
Cuadro 13-3.	Análisis de varianzas (ANOVA) del rendimiento de las microesferas mucoadhesivas.....	57
Cuadro 14-3.	Morfología de microesferas mucoadhesivas preparadas con la formulación 1.....	58
Cuadro 15-3.	Morfología de microesferas mucoadhesivas preparadas con la formulación 2.....	59
Cuadro 16-3.	Morfología de microesferas mucoadhesivas preparadas con la formulación 3.....	60
Cuadro 17-3.	Tamaños de microesferas mucoadhesivas de los cinco lotes preparadas con la formulación 1, 2 y 3.....	61
Cuadro 18-3.	Parámetros estadísticos de los tamaños de microesferas mucoadhesivas preparadas con la formulación 1, 2 y 3.....	61
Cuadro 19-3.	Distribución de frecuencias de tamaños de microesferas mucoadhesivas preparadas con la formulación 1.....	65
Cuadro 20-3.	Distribución de frecuencias de tamaños de microesferas mucoadhesivas preparadas con la formulación 2.....	66
Cuadro 21-3.	Distribución de frecuencias de tamaños de microesferas mucoadhesivas preparadas con la formulación 3.....	67
Cuadro 22-3.	Mucoadhesión de microesferas preparadas con la formulación 1, 2 y 3.....	68
Cuadro 23-3.	Test de Kuskal Wallis de mucoadhesión de microesfes.....	69
Cuadro 24-3.	Mucoadhesión comparativa entre la formulación 3 con Quitosano y sin Quitosano.....	71
Cuadro 25-3.	Análisis de varianzas (ANOVA) de mucoadhesión comparativa entre la formulación 3 con Quitosano y sin Quitosano en función al tiempo.....	72

ÍNDICE DE GRÁFICAS

Gráfica 1-3.	Concentración de soluciones de Alginato sódico en función a la viscosidad.....	44
Gráfica 2-3.	Rendimiento de producción de microesferas en función de la concentración de Alginato sódico.....	56
Gráfica 3-3.	Control de calidad de tamaño de microesferas preparadas con la formulación 1.....	63
Gráfica 4-3.	Control de calidad de tamaño de microesferas preparadas con la formulación 2.....	63
Gráfica 5-3.	Control de calidad de tamaño de microesferas preparadas con la formulación 3.....	64
Gráfica 6-3.	Distribución de frecuencias de tamaños de microesferas mucoadhesivas preparadas con la formulación 1.....	65
Gráfica 7-3.	Distribución de frecuencias de tamaños de microesferas mucoadhesivas preparadas con la formulación 2.....	66
Gráfica 8-3.	Distribución de frecuencias de tamaños de microesferas mucoadhesivas preparadas con la formulación 3.....	67
Gráfica 9-3.	Mucoadhesión de microesferas en función al tiempo.....	69
Gráfica 10-3.	Mucoadhesión comparativa entre la formulación 3 con Quitosano y sin Quitosano en función al tiempo.....	71
Gráfica 11-3.	Control de calidad de mucoadhesión microesferas preparadas con la formulación 1.....	73
Gráfica 12-3.	Control de calidad de mucoadhesión microesferas preparadas con la formulación 2.....	73
Gráfica 13-3.	Control de calidad de mucoadhesión microesferas preparadas con la formulación 3.....	74

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo A.	Certificado de análisis de Quitosano XI'AN LYPHAR BIOTECH CO., LTD
Anexo B.	Ficha técnica de Fosfato monobásico de Potasio
Anexo C.	Ficha técnica de Alginato de sodio
Anexo D.	Materiales y reactivos utilizados en la elaboración de microesferas mucoadhesivas
Anexo E.	Masa homogénea de Alginato sódico
Anexo F.	Goteo de solución de Alginato sódico
Anexo G.	Llenado de solución de Alginato sódico en bureta de 50 ml
Anexo H.	Gelificación de gotas de Alginato sódico en cloruro de calcio
Anexo I.	Decantación de microesferas mucoadhesivas
Anexo J.	Filtración de microesferas mucoadhesivas en tamiz metálico
Anexo K.	Microesferas mucoadhesivas antes de ser deshidratadas
Anexo L.	Secado de microesferas mucoadhesivas
Anexo M.	Desecador de bandeja marca Proingal
Anexo N.	Cloruro de calcio utilizado en la fabricación de microesferas mucoadhesivas
Anexo O.	Determinación de viscosidad de las soluciones de Alginato sódico
Anexo P.	Husillos de viscosímetro rotacional marca selecta ST 2001
Anexo Q.	Determinación del pH de la solución de ácido cítrico (5%)
Anexo R.	Determinación del pH de la solución buffer fosfato pH 7.4
Anexo S.	Microesferas colocadas sobre la mucosa intestinal de pollo
Anexo T.	Evaluación de la mucoadhesión “ <i>In vitro</i> ”

RESUMEN

La investigación consistió en la elaboración y evaluación de microesferas mucoadhesivas preparadas mediante la técnica de gelificación iónica utilizando como polímeros Alginato sódico y Quitosano y como agente ionizante Cloruro de Calcio. En una primera etapa se estandarizaron los parámetros del método de elaboración, pues el tamaño y morfología de las micropartículas están sujetas a factores como tipo de instrumento de goteo y su altura con respecto a la solución ionizante. Para ello, se prepararon tres formulaciones con diferentes concentraciones de polímeros, siendo la formulación 3 la que posee mayor concentración con respecto a la 1 y sobre las que se determinaron el mejor instrumento de capacidad de goteo y su altura óptima para cada formulación, estableciéndose además la temperatura adecuada de secado. Una vez lograda la estandarización del método, se prepararon cinco lotes de cada formulación, a los que se les determinaron parámetros como tamaño, morfología, pérdida por deshidratación, rendimiento de producción y capacidad mucoadhesiva, con el fin de establecer su calidad. El tamaño y morfología de las microesferas se evaluaron mediante el uso de técnicas de microscopía óptica, mientras que la propiedad mucoadhesiva se determinó con el método de ensayo conocido como “Wash-off”. Se encontró que las microesferas preparadas con la formulación 1, 2 y 3 presentaron un diámetro equivalente promedio de 1,08; 1,18 y 1,32 mm, respectivamente, por lo que solamente la primera formulación cumple con las especificaciones de tamaño (1000 ± 10 nm) establecidas para ser consideradas microesferas. Con respecto a la propiedad mucoadhesiva resultó ser la formulación 3 la de mejores características en comparación con la formulación 1 y 2, por lo que se establece que la capacidad mucoadhesiva de las microesferas es directamente proporcional a la concentración de polímeros. Esta investigación permitió establecer una formulación y técnica de preparación de partículas poliméricas (macropartículas) a nivel magistral con capacidad mucoadhesiva, constituyendo una oportunidad para la posterior incorporación de fármacos.

Palabras clave: <MUCOADHESIÓN>; <GELIFICACIÓN IÓNICA>; <WASH OFF>; <QUITOSANO>; <PARTÍCULAS POLIMÉRICAS>.

SUMMARY

The research involved the production and testing of mucoadhesive microspheres which were prepared with ionic gelation technique using as polymers sodium alginate, chitosan and calcium chloride as an ionizing component. In a first stage the processing parameters method were standardized, thus the size and morphology of the microparticles are based on factors such as instrument of drip type and its height from ionizing solution. These three formulations were prepared with different kinds of polymers, the formula 3 has the higher solutions than formula 1 and on which were determined the best instrument of drip capacity and its optimum height for each formula, as well as establishing suitable dry temperature. After it reaching the standardization method, five lot of each formula were prepared, which were determined parameters as size, morphology, loss by dehydration, production yield and mucoadhesive capacity in order to establish its quality. The size and morphology of the microspheres were assessed by using microscopy optical techniques, while the mucoadhesive property was determined by the test method known as “wash-off”. It was determined that the microspheres prepared with formulation 1, 2 and 3 had a diameter with 1.08; 1.18 and 1.32 millimeters (mm), respectively, so that only the first formula meets the specifications of size (1000 ± 10 nm) set to be considered microspheres. In relation to the mucoadhesive property, formula 3 has the best characteristics compared to formula 1 and 2, so it established that the microspheres mucoadhesive capacity is directly proportional to polymer concentration. This research had established a formula and technique to make polymer particles (macroparticles) with a master level with mucoadhesive capacity, with constitutes an opportunity for the back production of drugs.

Keywords: <MUCOADHESIÓN>; <GELIFICACION ION>; <WASH OFF>; >SODIUM ALGINATE>; <CHITOSAN>; < POLYMER PARTICLES >.

INTRODUCCIÓN

Situación Problemática

La esperanza y calidad de vida se han visto incrementadas en los últimos años, debido entre otros factores, a la existencia de miles de medicamentos disponibles en el mercado, que han permitido controlar enfermedades, aliviar síntomas y evitar muertes prematuras. Sin embargo, el uso de medicamentos paralelamente provoca daños colaterales ocasionando un fallo en la farmacoterapia y los objetivos deseados. Estos fallos originan un costo en la salud de los pacientes y en los recursos sanitarios y sociales, lo que los convierte en un auténtico problema de salud pública a nivel mundial. (Care, 2007).

La administración de medicamentos a través del tiempo ha generado múltiples efectos adversos e inefectividad terapéutica. Algunos tratamientos farmacológicos generan varios efectos secundarios, así por ejemplo los Antiinflamatorios No Esteroideos (AINES) se encuentran asociados a numerosos problemas en el tracto gastrointestinal como gastritis, esofagitis, pancreatitis, úlceras, perforaciones y sangrado (Pérez et al, 2002, pp. 119-138).

De la misma manera los fármacos antidepresivos como la Fluoxetina son capaces de interactuar con los receptores 5-HT₃ presentes en la mucosa gástrica y ocasionar problemas como náuseas y diarrea (Schaiquevich et al, 2006, pp. 203). Igualmente, la inefectividad terapéutica puede ser ocasionada por fármacos de fácil degradación como el Omeprazol, que en medio ácido origina un derivado inactivo que no es absorbido (Jackson et al., 2000, pp. 32-37). Del mismo modo, es conocido que algunos péptidos como la Eritropoyetina, Interferón, Estreptoquinasa, Hormonas de crecimiento e Insulina son bioquímicamente inestables en fluidos corporales como la saliva y jugos gástricos (Saez et al., 2007, pp. 98-107); sucediendo algo similar con los probióticos, que al carecer de la habilidad de sobrevivir en condiciones extremas, no soportan las altas concentraciones de acidez y de sales biliares encontradas en el tracto gastrointestinal (Rodríguez et al, 2010, pp. 159-172).

Situaciones como las anteriormente mencionadas conllevan a una actitud de rechazo al tratamiento por parte del paciente provocando un incumplimiento del mismo y por tanto un fracaso terapéutico.

Formulación del Problema

La vía oral es la más utilizada para la administración de medicamentos debido a sus numerosas ventajas, como seguridad y comodidad, sin embargo, presenta importantes limitaciones como las antes mencionadas, razón por la cual en la actualidad se trabaja en la búsqueda de nuevas formas de administración de fármacos por esta vía. La microencapsulación es una propuesta novedosa que permite la obtención de sistemas de liberación modificada previniendo la aparición de efectos adversos y mejorando la estabilidad de moléculas frágiles (Domínguez, 2008, pp. 5-8). Igualmente, los sistemas mucoadhesivos constituyen una gran solución, pues al utilizar polímeros con capacidad de adhesión a membranas biológicas, crean un contacto íntimo entre la forma farmacéutica y el lugar de absorción, favoreciendo la interacción del fármaco con el organismo (Rodríguez et al, 2000, pp. 159-172) y aumentando de esta forma la biodisponibilidad y por tanto la efectividad terapéutica (Volonté, 2012, pp. 56-71). Del mismo modo, éstos sistemas presentan numerosas ventajas, representadas por la disminución de efectos adversos y toxicidad asociada a la administración de medicamentos (Gómez, 2014, pp. 66-78).

Justificación de la Investigación

En vista de la importancia que representan los sistemas mucoadhesivos en la disminución de efectos adversos y toxicidad asociada a la administración de medicamentos (Gómez, 2014, pp. 66-78), así como en el cumplimiento de la farmacoterapia, al favorecer la interacción del fármaco con el lugar de absorción (Rodríguez et al, 2000, pp. 159-172), se planteó la elaboración y evaluación de microesferas mucoadhesivas preparadas a través de la técnica de gelificación iónica utilizando Alginato sódico y Quitosano como polímeros y Cloruro de calcio como agente ionizante. Por todo lo anteriormente expuesto, en esta investigación se buscará obtener un sistema bioadhesivo que permita la liberación del fármaco en el lugar de absorción, aumentando la biodisponibilidad y eficacia del medicamento y disminuyendo los efectos colaterales y frecuencia de administración, logrando de esta forma el éxito farmacoterapéutico.

Este proyecto es viable debido a que los insumos como los polímeros pueden ser adquiridos en importadores dentro del país y los demás materiales necesarios están disponibles en la Escuela de Bioquímica y Farmacia de la ESPOCH.

Antecedentes de la investigación

Las formas farmacéuticas mucoadhesivas surgen en los años cuarenta, con el uso de la goma tragacanto para encapsular Penicilina en dispositivos de uso odontológico. Posteriormente, en los años 70, se preparan medicamentos mucoadhesivos más eficaces y en los ochenta se realizan estudios para la utilización de nuevos polímeros bioadhesivos. Más tarde en los años noventa, estos polímeros son considerados como posibilidad para el diseño de formas farmacéuticas de liberación modificada (Rodríguez et al, 2000, pp. 159-172).

En 1996, Hari et al., elaboraron microcápsulas de Nitrofurantoina (NF) utilizando Alginato y Quitosano, para lo cual adicionaron mediante goteo una solución de Alginato que contenía la NF, sobre otra solución de Quitosano y Cloruro de calcio. Se determinó que alrededor del 80% del fármaco encapsulado se liberaba en una solución tampón fosfato pH 7.4, mientras que la liberación en medio ácido resultó relativamente baja en comparación con la del medio intestinal simulado.

En el año 2002, Gonzales et al, obtuvieron micropartículas de Diclofenaco sódico por la técnica de Gelificación iónica, utilizando Alginato y Quitosano como polímeros y como agentes ionizantes Calcio y Aluminio. Se observó que la liberación del principio activo se producía a pH alcalino y se imposibilitaba a pH ácido. Igualmente se determinó que el aumento de la concentración de Quitosano disminuía el porcentaje de liberación del activo.

Wittaya-areekul et al, en 2006, prepararon micropartículas mucoadhesivas de Prednisolona con Alginato y Quitosano, evaluando dos métodos. El primero consistía en dejar caer por goteo la Prednisolona dispersa en una solución Alginato, sobre otra con Cloruro de calcio y Quitosano. El segundo método se basaba en la dispersión del activo en una solución de Alginato, para luego dejar caer en otra con Cloruro de calcio y así las partículas formadas transferirlas a una solución de Quitosano. Para las pruebas de mucoadhesión "*In vitro*" se utilizó una porción de intestino de cerdo, determinándose que al aumentar la concentración de Quitosano, la mucoadhesión de la partícula aumentaba. Igualmente se comprobó que la liberación del principio activo ocurría a un pH ligeramente alcalino y finalmente se determinó que el primer método de elaboración era el más adecuado por presentar mejores perfiles de mucoadhesión.

En 2010 Chavarrí et al, utilizaron Quitosano y Alginato para preparar microesferas que contenían *Lactobacillus gasseri* y *Bifidobacterium bifidum*, como agentes probióticos y Quercetina como prebiótico, con el objetivo de mejorar la supervivencia de las bacterias y mantener el prebiótico intacto en el tracto gastrointestinal. En este estudio se observó que los probióticos microencapsulados resisten las condiciones gástricas simuladas y las altas concentraciones de sales biliares, por lo que se demostró que el recubrimiento de Quitosano y Alginato ofrece un medio eficaz para la supervivencia y mantenimiento de probióticos.

En 2012 Reddy et al, elaboraron microesferas mucoadhesivas de Ofloxacino, mediante la técnica de Gelificación iónica empleando Alginato y Quitosano como polímeros mucoadhesivos. El estudio de mucoadhesión se llevó a cabo a través del método conocido como “Wash-off”, para lo cual se utilizó la mucosa intestinal de pollo acoplada a un aparato desintegrador de tabletas y una solución tampón fosfato pH 7,4 como medio de disolución.

Objetivos de la Investigación

Objetivo general

Elaborar y evaluar “*In vitro*” microesferas mucoadhesivas preparadas a través de la técnica de gelificación iónica utilizando Alginato Sódico y Quitosano con Cloruro de Calcio.

Objetivos específicos

- Estandarizar los parámetros del método de elaboración de microesferas mucoadhesivas, mediante la normalización del tipo de instrumento de goteo y su altura con respecto a la solución ionizante.
- Preparar microesferas utilizando soluciones de diferentes concentraciones de Quitosano y Alginato sódico.
- Analizar a través de la microscopía óptica el tamaño y morfología de las microesferas obtenidas.
- Evaluar “*In vitro*” la mucoadhesión de microesferas mediante el método “Wash-off” utilizando la mucosa intestinal de pollo con el fin de seleccionar la formulación con la mejor capacidad mucoadhesiva.

CAPÍTULO I

1. MARCO TEÓRICO REFERENCIAL

1.1. Bases teóricas

1.1.1. *Mucoadhesión*

La bioadhesión o mucoadhesión es un fenómeno mediante el cual un material se mantiene unido a una membrana biológica por medio de fuerzas interfaciales durante prolongados períodos de tiempo. Este mecanismo ha sido estudiado por las ciencias farmacéuticas para la liberación de fármacos en sitios específicos del organismo, con el fin de aumentar su absorción. El diseño de estos sistemas mucoadhesivos permite la administración de principios activos sobre mucosas, ya sean estas oral, gastrointestinal, nasal, oftálmica y vaginal (Peppasy Huang, 2004, pp. 1675-1687) (Rojas et al., 2008, pp. 57-71).

1.1.1.1. *Membranas mucosas*

Las membranas mucosas (mucosa) son superficies húmedas que recubren las paredes de diversos órganos, como las del tracto gastrointestinal y las del aparato respiratorio. Se componen de una capa de tejido conectivo (lámina propia), cubierta por otra epitelial que se caracteriza por presencia de moco. El epitelio puede estar formado por una sola capa de células como en el caso del estómago, intestinos y bronquios o de múltiples como el esófago, vagina y córnea. El primer epitelio contiene células caliciformes secretoras de moco, mientras que el epitelio de múltiples capas está compuesto por glándulas especializadas, como las salivales, que segregan moco en la superficie epitelial (Figura 1-1). El moco puede estar presente como una capa de gel en la superficie de la mucosa o en forma soluble suspendido en la superficie luminal. Los componentes principales de todos los geles de moco son mucina, glicoproteínas, lípidos, sales inorgánicas y agua, representando esta última cerca del 95%

del peso. Las funciones principales del moco son la protección y lubricación (Boddupalli et al, 2010, p. 381).

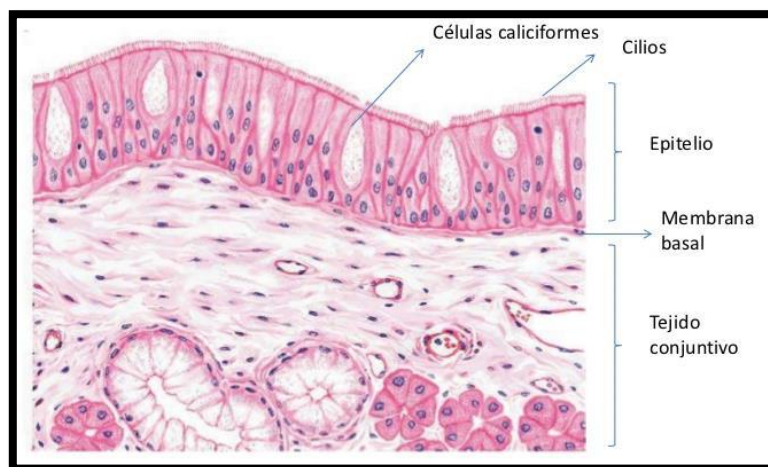


Figura 1-2: Estructura de la membrana mucosa

Fuente: Donnersberger y Lesak, 2002

1.1.1.2. Mecanismo de mucoadhesión

La adhesión de ciertas moléculas a la superficie biológica aún no se encuentra completamente estudiada. El mecanismo de mucoadhesión puede dividirse en dos etapas consecutivas, la de contacto y la de consolidación (Figura 2-1). La primera fase se caracteriza por el contacto físico del mucoadhesivo con la mucosa y la segunda por una interacción química del polímero, que al sufrir una gelificación inicia un íntimo contacto con la mucosa. Así para comenzar la primera etapa, en algunos casos como en las formulaciones oculares o vaginales, los sistemas mucoadhesivos son unidos mecánicamente sobre la membrana. En otros casos, la deposición es promovida por la aerodinámica del órgano, como en la administración nasal, mientras que en el tracto gastrointestinal, la fijación no es factible y aunque los movimientos peristálticos pueden contribuir a este contacto, existe muy poca evidencia en la literatura que confirme este fenómeno. Sin embargo, la unión puede ser explicada por el movimiento de fluidos en la cavidad de los órganos o por el movimiento browniano, que se fundamenta en la aproximación de las partículas a la superficie de la mucosa, experimentando las fuerzas de repulsión (presión osmótica, repulsión electrostática,) y las fuerzas de atracción (fuerzas de Van der Waals y la atracción electrostática), por lo que, las partículas deben superar las fuerzas repulsivas para su adhesión en la membrana. (Boddupalli et al, 2010, pp. 381).

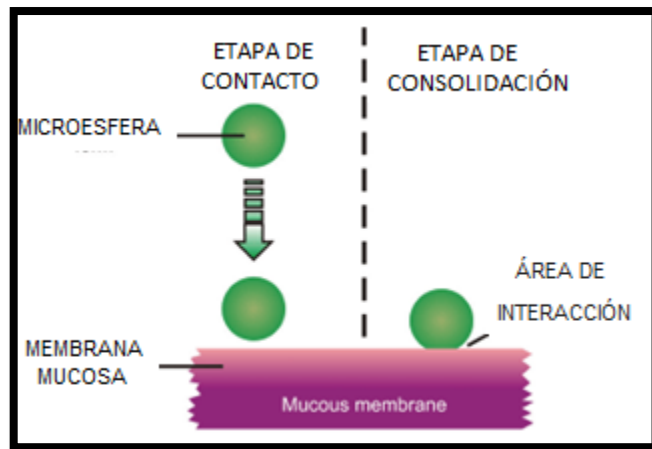


Figura 2-1: Etapas de la mucoadhesión

Fuente: Boddupalli et al, 2010

1.1.1.3. Teorías de mucoadhesión

Aunque la base fisicoquímica de la mucoadhesión aún no se encuentra completamente dilucidada existen teorías adaptadas a partir de estudios de adherencia entre polímeros que posiblemente pueden explicar este fenómeno. Entre ellas pueden citarse:

a) Teoría electrónica

Se basa en la existencia de cargas eléctricas opuestas presentes en los polímeros. Cuando éstos entran en contacto se transfieren electrones que conducen a la construcción de una doble capa electrónica en la interfase, donde las fuerzas de atracción determinan la fuerza mucoadhesiva.

b) Teoría de adsorción

Según ésta teoría un sistema mucoadhesivo se adhiere a la mucosa mediante interacciones químicas, como las fuerzas de Van der Waals, enlaces puente de hidrógeno, atracción electrostática e interacciones hidrófobas. Los enlaces puente de hidrógeno son fuerzas interfaciales que prevalecen en polímeros que contienen grupos carboxilos, considerándose las más importantes en el fenómeno de la interacción bioadhesiva, ya que, a pesar de que individualmente son débiles, un gran número de éstas podrían dar lugar a una intensa adhesión global.

c) La Teoría de la Fractura

Se fundamenta en conocer la fuerza requerida para separar dos superficies adheridas, siendo la fuerza de fractura equivalente a la fuerza de adhesión. Su cálculo se basa en la relación entre el área superficial involucrada y la fuerza de separación adhesiva. Es muy útil para estimar la rigidez del material bioadhesivo que se utilizará en la formulación.

d) Teoría Mecánica

Considera que la adhesión del polímero se debe al llenado de las irregularidades de la superficie de la mucosa.

e) Teoría de la Deshidratación

Consiste en la deshidratación que ocurre cuando los polímeros gelificados entran en contacto con el mucus. Esto se debe a que la membrana mucosa extrae el agua de la formulación, hasta que se alcance un equilibrio osmótico, de esta manera se crea una interacción entre la formulación y el mucus lo que conduce a la adherencia y al aumento en el tiempo de permanencia en la membrana mucosa (Peppas y Sahlin, 1996, pp. 1675-1687) (Smart, 2005, pp. 1556-1568) (Carvalho et al, 2010, pp. 1-17) (Parmar et al 2010, pp. 1157-1167) (Shaikh et al, 2011 pp. 89-100).

1.1.1.4. Factores que modifican la Mucoadhesión

La mucoadhesión puede verse afectada por numerosos factores dependientes del polímero como: la hidrofilia, peso molecular, densidad de reticulación, pH y la concentración del polímero.

a) Hidrofilia

Los polímeros bioadhesivos que poseen numerosos grupos funcionales hidrófilos, como hidroxilos y carboxilos, experimentan una gelificación en medio acuoso, que ocasiona una expansión y exposición de sus sitios de anclaje, lo que favorece la fuerza y eficacia en la adhesión.

b) **Peso molecular**

Se estima que la fuerza bioadhesiva aumenta con el peso molecular del polímero. Estimándose que el peso molecular óptimo para una máxima adhesión es de 100.000 Daltons, más allá de este peso no hay ganancia en la adhesión.

c) **Reticulación**

La densidad de reticulación del polímero es inversamente proporcional al grado de hinchamiento, es decir, una densidad de reticulación baja ocasionará una alta tasa de flexibilidad e hidratación, que se asocia a una mayor área superficial de éste y en consecuencia existirá una mayor fuerza mucoadhesiva. Para mejorar la mucoadhesión de los polímeros reticulados se puede incluir durante la formulación promotores de adhesión, como cadenas de polímero libre y otros polímeros injertados en la red preformada.

d) **Conformación espacial**

Además del peso molecular y la longitud de la cadena, la conformación espacial de un polímero es también importante. Así el Dextrano, a pesar de tener un peso molecular alto de 19.500.000 de Daltons, presenta una fuerza adhesiva similar a la de Polietilenglicol (PEG), con un peso de 200.000, esto debido a que el Dextrano se caracteriza por tener una conformación helicoidal que protege a muchos grupos funcionales responsables de la adhesión, a diferencia del PEG, que tiene una conformación lineal (Figura 3-1 y 4-1), que facilita la exposición de sus grupos funcionales.

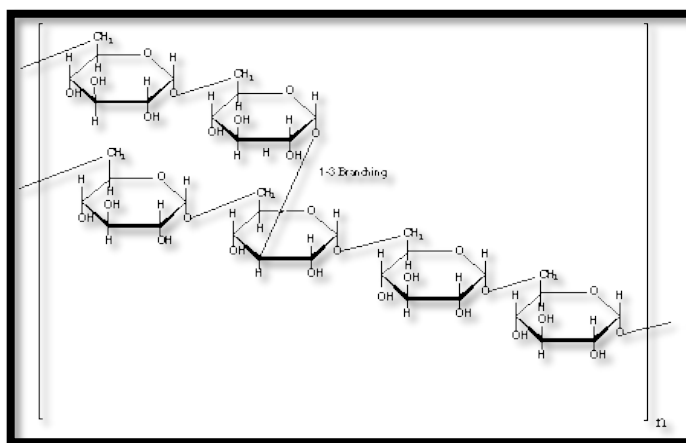


Figura 3-1: Estructura química del Dextrano

Fuente: Rodríguez y Hanssen, 2007.

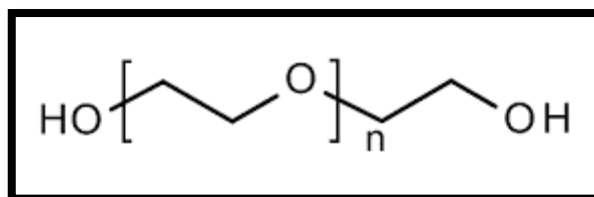


Figura 4-1: Estructura química del Polietilenglicol

Fuente: Pina et al., 2014

e) pH del medio

Este factor puede influir en la adhesión de polímeros que posean grupos ionizables. Es así como muchos polímeros usados para la administración de fármacos son polianiónicos y poseen grupos carboxilos, por lo que si el pH del medio es superior al pKa del polímero, éste se ioniza en gran medida y si el pH es inferior, los grupos funcionales se mantienen estables. Por ejemplo, el pka del Ácido poliacrílico es aproximadamente de 5 y a un pH del medio entre 4 y 5 se observa que presenta su máxima fuerza de adhesión, disminuyendo ésta gradualmente con valores de pH superiores de 6.

f) Concentración de Polímero y Principio Activo

Numerosas investigaciones han demostrado que la concentración de polímero y principio activo afectan a la mucoadhesión, de tal manera que en las formulaciones altamente concentradas de principio activo, la fuerza adhesiva se reduce significativamente, mientras que los sistemas con mayor concentración de polímero presentan mayor fuerza de adhesión

g) Factores fisiológicos.

La renovación de mucina en la capa de mucus es importante debido a que está limita el tiempo de permanencia de la formulación en la mucosa. De la misma manera esta renovación provoca un incremento sustancial de moléculas solubles de mucina, las que interaccionan con el polímero antes de que tengan la oportunidad de hacerlo con la capa de mucus, lo que supone una desventaja en la mucoadhesión en la superficie de los tejidos. Además la renovación de mucina depende de otros factores externos como la presencia de alimentos en el tracto gastrointestinal.

h) Estados patológicos

Dado que los mucoadhesivos deben usarse en estados patológicos, varias investigaciones han propuesto que las características de los polímeros mucoadhesivos se evalúen bajo estas condiciones ya que se conoce que las propiedades fisicoquímicas del mucus se modifican durante el transcurso de una enfermedad (Lejoyeux et al., 1989, pp. 893-898) (Rahamatullah et al, 2011, pp. 89) (Lahoti et al., 2011, pp. 243-251).

1.1.2. Formas farmacéuticas mucoadhesivas

Conceptualmente una forma farmacéutica bioadhesiva se concibe como la inmovilización de un sistema portador del fármaco, sea en su lugar de acción o a nivel de la membrana biológica que permite su absorción máxima. Si la acción es local, el aumento de la concentración de principio activo durante un tiempo prolongado conlleva un aumento de la eficacia terapéutica. Si la acción es sistémica la inmovilización prolongada de una concentración adecuada de fármaco permite el paso de cantidades importantes de principio activo a través de la membrana, evitando pérdidas propias de ciertas vías de administración (Kalyankar et al., 2010, pp. 23-29).

El concepto de inmovilización puede aplicarse a diferentes membranas, por ello el desarrollo de formas mucoadhesivas pueden ser destinadas a la administración sobre la mucosa bucal, gingival, gastrointestinal, nasal, vaginal, ocular y rectal (Bruschi y Freitas, 2005, pp. 293-310).

1.1.2.1. Administración bucal

Es una de las vías de administración más estudiadas debido a sus múltiples ventajas, como: escaso contenido de enzimas degradativas, permeabilidad muy aceptable, altamente vascularizada y ausencia de efecto del primer paso. La utilización de formas farmacéuticas tradicionales como geles, soluciones, comprimidos solubles, enjuagues bucales, etc. han sido poco eficientes para el tratamiento de afecciones bucales, como la Candidiasis oral. Esta falta de efectividad se debe a la liberación inmediata de toda la dosis y a la rápida eliminación del principio activo desde el sitio de acción. En función de ello se han estudiado sistemas bucoadhesivos de liberación sostenida de drogas con

cualidades farmacéuticas que permitirían aumentar la eficiencia de tratamientos locales en la cavidad bucal (Lahoti et al., 2011, pp. 243-251).

1.1.2.2. Administración oral.

Las formas mucoadhesivas de administración oral tienen como finalidad fijarse a la mucosa estomacal o intestinal suministrando de forma continua dosis de fármaco para que sea absorbido en el intestino durante períodos prolongados de tiempo. El desarrollo de comprimidos bioadhesivos presenta diversas limitaciones, como la motilidad gástrica que puede dificultar la adhesión y causar un desprendimiento del sistema; el pH estomacal (1,5-3) que no siempre resulta ser conveniente para la bioadhesión, excepto cuando se usan polímeros poliácidos como el ácido poliacrílico reticulado y la renovación de la capa de mucina que suele provocar el desprendimiento del mucoadhesivo inhabilitándose para una posterior fijación.

Estos inconvenientes pueden ser minimizados empleando polímeros que establezcan adhesiones suficientemente potentes y mediante la administración de formas multiparticulares que puedan ser retenidas en las vellosidades intestinales, desde donde ceden de forma controlada el fármaco (Lee et al., 2000, pp.106-126).

1.1.2.3. Administración nasal.

Esta vía alternativa de administración de fármacos posee excelentes características de absorción, debido a que presenta una área superficial de aproximadamente 150 cm², es altamente vascularizada y posee una estructura muy permeable, además de que con ésta, se evita el efecto de primer paso. Sin embargo, la eficacia de la absorción nasal puede verse afectada por algunos factores, como el método y técnica de administración, el lugar de deposición y la rápida remoción de los fármacos desde la mucosa nasal por acción mucociliar. Los requisitos para el uso de esta vía son dosificaciones muy pequeñas y que la forma de administración no interfiera con el movimiento de los cilios de las células epiteliales, por ello se usan polvos, micro y nanopartículas o bien líquidos acuosos de baja viscosidad, finamente dispersados (nebulizados). La permanencia en la zona mucosa para la mejora de la absorción es ampliamente estudiada en la actualidad, enfocándose en el desarrollo de formas

mucoadhesivas que permitan reducir la eliminación nasal, disminuir la dosis y los efectos colaterales, asegurando de esta forma el cumplimiento terapéutico. Con tal fin se usan polímeros como: hidroxipropilcelulosa, ácido poliacrílico, carbopol y PEG 400 (Callens y Remon, 2000, pp. 215-220).

1.1.2.4. Administración vaginal

Los sistemas vaginales poseen ventajas sobre otras vías, especialmente para la administración de fármacos sensibles a las condiciones del tracto gastrointestinal. No obstante, la biodisponibilidad y la acción local de los fármacos por vía vaginal no es muy alta, por lo que se busca incrementar su efectividad mediante el desarrollo de formas bioadhesivas. Se han realizado estudios con comprimidos matriciales, discos y micropartículas, con distribución homogénea en la vagina y formas de dosificación bioadhesiva, como los dispositivos intrauterinos, para la administración de derivados imidazólicos, del tipo del Clotrimazol, ampliamente usado para infecciones micóticas del tracto genitourinario. De esta manera se ve mejorada su biodisponibilidad respecto a sistemas de administración convencionales, del tipo cremas, tabletas, geles, irrigaciones, etc. Los principales polímeros bioadhesivos utilizados en esta vía son hidroxipropilcelulosa, policarbofil y la sal sódica del ácido hialurónico (Ceschel et al., 2001, pp. 541-547).

1.1.2.5. Administración ocular

La aplicación tópica de soluciones medicamentosas convencionales en el ojo implica una pérdida sustancial de dosis por drenaje lacrimal. En la práctica, solo pequeñas cantidades (1-3%) penetran la córnea y alcanzan tejidos intraoculares. Por ello, se han estudiado sistemas que eviten o disminuyan esta pérdida desarrollándose formulaciones que permitan prolongar el tiempo de residencia en el área de liberación, como microesferas, liposomas, nanopartículas, sistemas de gelificación “*in situ*” y sistemas mucoadhesivos. Entre los fármacos formulados en sistemas mucoadhesivos se encuentran Pilocarpina, Fluoresceína, Timolol, Bataxolol, Gentamicina y Aciclovir (Genta et al., 1997, pp. 737-742).

1.1.3. Polímeros bioadhesivos

Los polímeros fueron incluidos por primera vez en la Farmacopea de los Estados Unidos (USP XX) en el año de 1980 y desde entonces se han utilizado como auxiliares y excipientes en la formulación de medicamentos. El uso y la aplicación de estos materiales en el campo farmacéutico radican en la alta biocompatibilidad y seguridad con el sistema biológico, pudiéndose obtener de fuentes naturales como algas y crustáceos o de fuentes sintéticas. Además su uso se ha extendido en la elaboración de materiales de envase y empaques (Ratner, 2004, pp. 34-45) (Rojas et al., 2008, pp. 57-71).

Todo sistema bioadhesivo debe sus propiedades a la inclusión de uno o varios tipos de moléculas poliméricas que en condiciones apropiadas son capaces de establecer interacciones con la superficie biológica, reteniendo así la forma farmacéutica que contiene al fármaco. Las moléculas estudiadas como mucoadhesivas son numerosas y con distintas características (Volonté, 2012, pp. 56-71). En la tabla 1-1, se muestra la clasificación de polímeros de acuerdo a su capacidad bioadhesiva.

Tabla 1-1: Clasificación de la capacidad bioadhesiva de polímeros

Capacidad adhesiva	Polímero
Buena ó Excelente	Acido poliacrílico, Alginato sódico, Carbopol, Carboximetilcelulosa sódica, Carragenato, Goma Guar, Hidroxietilcelulosa, Metilcelulosa, PEG de peso molecular alto, Poliacrilamida
Mediana	Acido poliacrílico reticulado con sacarosa, Acido polimetacrílico, Gelatina, Carbopol base con vaselina/parafina hidrofílica, Goma de karaya, Hidroxipropilcelulosa
Pobre	Acacia, Acido alginico, Agar-agar, Amilopectina, Carboximetilcelulosa cálcica, Polihidroxietilmetacrilato, Polietilenglicol, Polivinilpirrolidona, Carragenato degradado, Dextranos

Fuente: Volonté, 2012

Igualmente los polímeros mucoadhesivos se pueden clasificar de acuerdo a sus propiedades físico químicas, en tres clases:

- Polímeros Aniónicos
- Polímeros Catiónicos
- Polímeros No iónicos

De éstos polímeros, los aniónicos y catiónicos han mostrado tener mayor fuerza mucoadhesiva.

1.1.3.1. Polímeros Aniónicos

Los polímeros aniónicos son los mucoadhesivos más empleados dentro de la tecnología farmacéutica debido a su alta funcionalidad y baja toxicidad. Estos polímeros se caracterizan por la presencia de grupos sulfato y carboxilo, que otorgan a la molécula una carga eléctrica negativa. Algunos ejemplos de polímeros aniónicos incluyen: Ácido poliacrílico (PAA), Carboximetilcelulosa (CMC), Carbopol y Alginato, los cuales poseen excelentes características mucoadhesivas debido a la formación de fuertes interacciones, principalmente enlaces de puente de hidrógeno.

1.1.3.2. Polímeros Catiónicos

Dentro de los polímeros catiónicos, el Quitosano es el más estudiado en la literatura científica. Constituye un polisacárido, producido por la desacetilación de la Quitina, el polisacárido más abundante en el mundo después de la celulosa. Los polímeros catiónicos se adhieren al moco a través de interacciones iónicas mediante sus grupos amino, adicionalmente, sus grupos hidroxilos pueden interactuar a través de enlaces puentes de hidrógeno (Andrews et al, 2009, pp. 505-518).

1.1.4. Alginatos

Los Alginatos corresponden a los polímeros más utilizados en la microencapsulación. Son extraídos principalmente de algunas especies de algas marrones, como *Laminaria hyperborea*, *Ascophyllum nodosum*, *Macrocystis pyrifera*, *Laminaria japónica*, *Eclonia maxima* y *Lesonia negrescens*. Los Alginatos son una familia de polisacáridos lineales no ramificados, constituidos por dos unidades monoméricas, el ácido β -D-manurónico (M) y el ácido α -L-gulurónico (G) (Figura 5-1) que se

agrupan en bloques de secuencias MM, MG, unidos por enlaces glucosídicos β (1-4); y bloques GG, GM, unidos por enlaces glucosídicos α (1-4) (Figura 6-1; 7-1) (Avendaño et al, 2013, pp. 87-96). La composición y extensión de las secuencias y el peso molecular determinan las propiedades físicas de estos polímeros (Lamas et al., 1998, pp. 375-378) (Yabur et al, pp. 43-53, 2007) (Gombotz y Wee 2012, pp. 194-205).

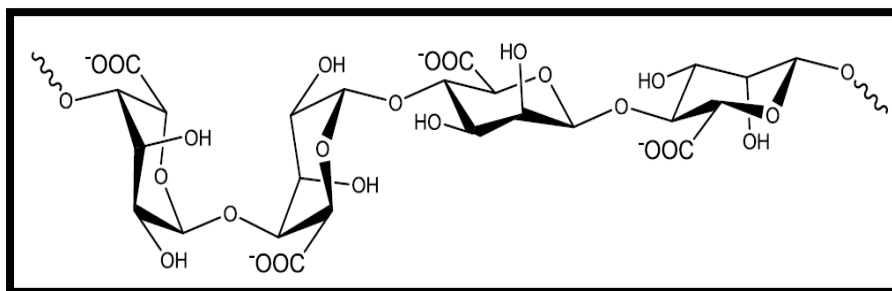


Figura 5-1: Estructura química del Alginato

Fuente. Avendaño et al, 2013.

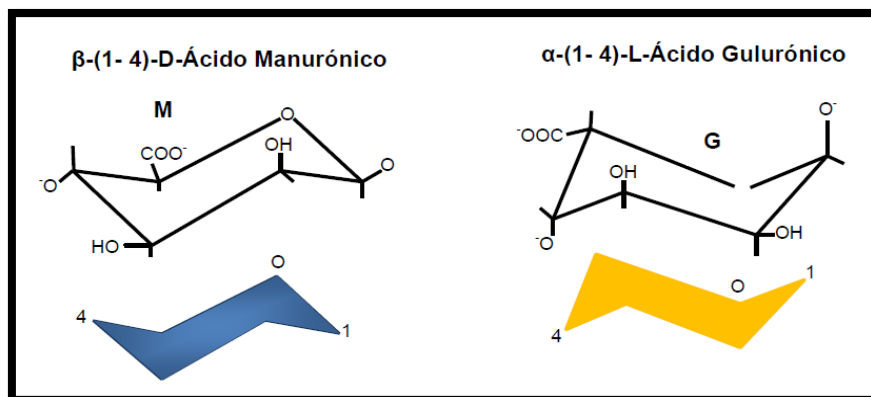


Figura 6-1: Ácidos Urónicos componentes del ácido Algínico

Fuente: Avendaño et al, 2013.

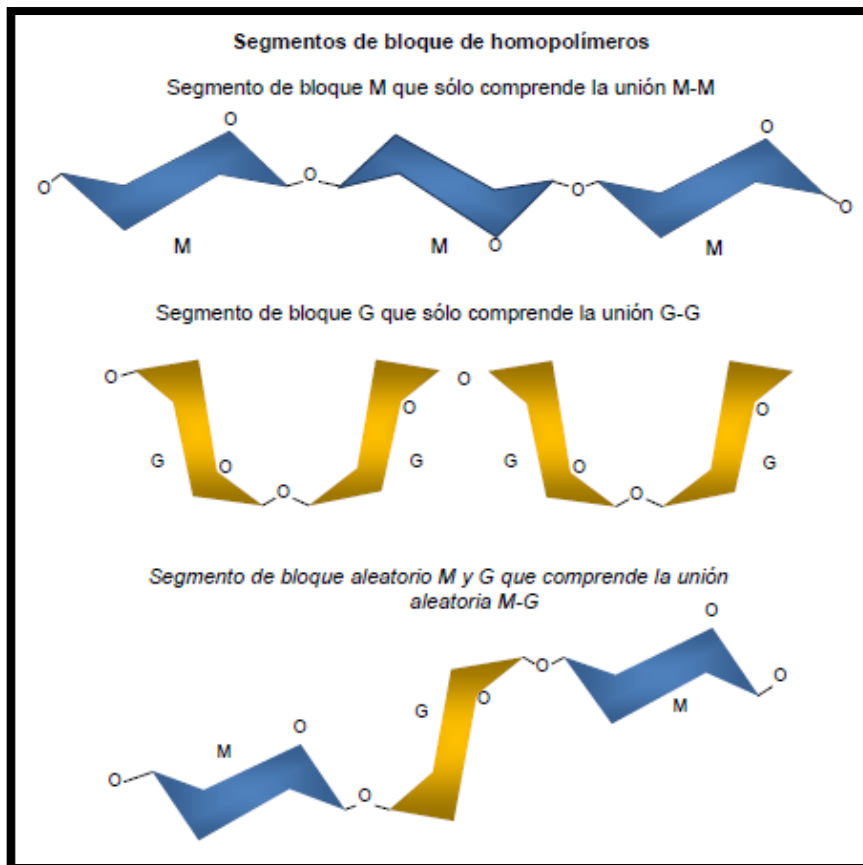


Figura 7-1: Segmentos de bloques de Homopolímeros

Fuente: Avendaño et al, 2013.

El Alginato sódico es altamente soluble en agua, cuya solución presenta un pH neutro. Existen varios efectos que pueden modificar las propiedades fisicoquímicas de las soluciones de Alginato, entre los más importantes están (Avendaño et al, 2013, pp. 87-96).

a. Efecto del peso molecular. La viscosidad de la solución acuosa de Alginato sódico depende directamente del peso molecular, es decir, del grado de polimerización del polímero.

b. Efecto de la concentración. La viscosidad de la solución aumenta logarítmicamente a medida que aumenta la concentración del Alginato sódico.

c. Efecto de la temperatura. A medida que aumenta la temperatura la viscosidad disminuye.

d. Efecto del pH. El descenso en el pH repercute directamente en la transformación del anión de Alginato soluble en ácido Algínico insoluble, lo cual se traduce en una mayor viscosidad. A un pH inferior a 2 el ácido Algínico precipita.

e. Efecto de un electrólito monovalente. El Cloruro de sodio como electrólito inorgánico libera cationes monovalentes en la solución de Alginato sódico, lo cual reduce la viscosidad, debido a un aumento en la fuerza iónica (Avendaño et al, 2013, pp. 87-96).

1.1.4.1. Propiedades de los Alginatos

a) Biocompatibilidad.

La Administración de Drogas y Alimentos (FDA) ha considerado a este polímero como seguro, pues no provoca efectos tóxicos al ser administrado oralmente. El Alginato es ampliamente utilizado en la industria alimentaria como espesante, emulsionante y estabilizante (George et al, 2006, pp. 1-14).

b) Bioadhesividad.

Varios estudios han demostrado que los polímeros de alta densidad poseen buenas propiedades mucoadhesivas, además se conoce que los polímeros aniónicos son más eficaces como bioadhesivos que los catiónicos y no iónicos. Por todo lo anterior, el Alginato al poseer grupos carboxilos presenta mayor fuerza mucoadhesiva en comparación al Quitosano y Carboximetilcelulosa (George et al, 2006, pp. 1-14).

c) Sensibilidad al pH.

El Alginato en medio ácido sufre una contracción química que impide la liberación del fármaco encapsulado en la forma farmacéutica, sin embargo, en medio alcalino el polímero se hincha convirtiéndose en una capa viscosa, que facilita la liberación del principio activo. Este fenómeno podría ser útil para el desarrollo de sistemas gastrorresistentes de administración oral (George et al, 2006, pp. 1-14).

d) Condiciones de Gelificación

La propiedad más importante del Alginato es su capacidad para formar geles al reaccionar con cationes divalentes como el Calcio. Este polímero forma una estructura en contacto con cationes, originando una red tridimensional que atrapa las moléculas del fármaco. Las microesferas se pueden preparar por gelificación iónica a partir de una solución de Alginato sódico, que se deja caer en forma de gotas sobre otra que contienen cationes como Calcio, Estroncio y Bario. La gelificación y reticulación del polímero se consiguen mediante el intercambio químico de iones de Sodio con cationes divalentes lo que provoca el apilamiento de los grupos urónicos, creando una estructura reticulada conocida como Egg-box, (Figura 8-1), que se caracteriza por contener aproximadamente un 99% de agua y presentar características muy similares a los sólidos, ya que conservan su forma y son resistentes al estrés físico. Las reacciones químicas entre los grupos urónicos del Alginato y el catión, pueden ser temporales o permanentes, por lo que empleando bajas concentraciones de calcio se consiguen asociaciones temporales que dan lugar a soluciones viscosas y tixotrópicas, mientras utilizando concentraciones altas, el polímero gelifica produciendo microesferas que precipitan formando asociaciones permanentes (George et al, 2006, pp. 1-14).

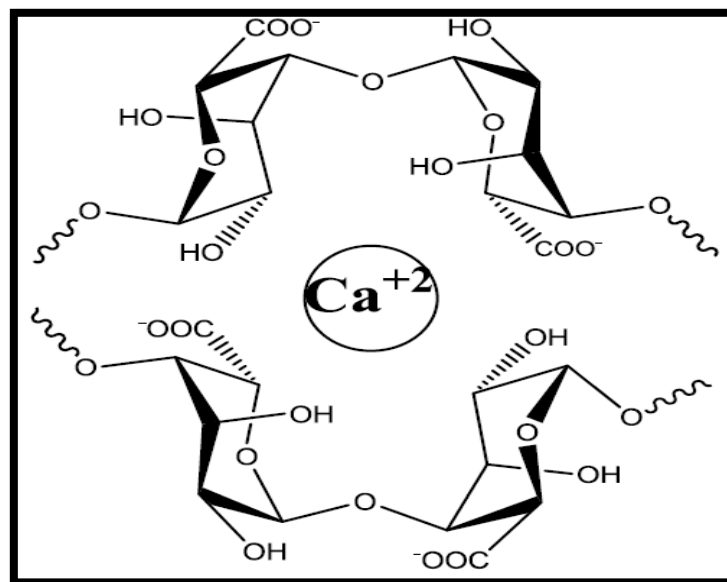


Figura 8-1: Estructura EGG-BOX

Fuente: George et al., 2006

1.1.5. Mecanismos de Gelificación iónica con Alginatos

El proceso de formación del gel se inicia a partir de una solución de sal de Alginato y una fuente de calcio externa o interna desde donde el ión calcio se difunde hasta alcanzar la cadena polimérica, como consecuencia de esta unión se produce un reordenamiento estructural en el espacio resultando en un material sólido con las características de un gel. El grado de gelificación dependerá de la hidratación del Alginato, la concentración del ión calcio y el contenido de los G-bloques (Funami et al., 2009, pp. 1746-1755). La transición sol-gel se ha visto esencialmente controlada por la habilidad de introducir el ión vinculante al Alginato. También se ha observado que la cinética de gelificación y las propiedades del gel pueden depender del tipo de contra-ión, es decir, el ión monovalente de la sal de Alginato (Potasio o Sodio). De hecho, se ha encontrado que los Alginatos de potasio presentan un proceso de transición solución-gel más rápido respecto a los Alginatos de sodio preparados a bajas concentraciones de calcio. Los mecanismos de gelificación iónica se han llevado a cabo fundamentalmente por dos procesos: la gelificación externa y la gelificación interna (Draget, 2000, pp. 117-122).

1.1.5.1. Gelificación externa

El proceso de gelificación externa ocurre con la difusión del ión calcio desde una fuente que rodea al hidrocoloide hacia la solución de Alginato de pH neutro. La formación del gel se inicia en la interfase y avanza hacia el interior a medida que la superficie se encuentra saturada de iones calcio, de manera que el ión sodio proveniente de la sal de Alginato es desplazado por el catión divalente solubilizado en agua. Este interactúa con los G-bloques de diferentes moléculas poliméricas, enlazándolas entre sí. Aunque, la fuente de calcio más usada ha sido el CaCl_2 debido a su mayor porcentaje de calcio disponible, han sido empleadas otras sales tales como el acetato monohidratado y el lactato de calcio (Saha y Bhattacharya, 2010, pp. 587-597).

1.1.5.2. Gelificación interna

El proceso de gelificación interna consiste en la liberación controlada del ión calcio desde una fuente interna de sal de calcio insoluble o parcialmente soluble dispersa en la solución de Alginato de sodio. La liberación del ión calcio puede ocurrir de dos formas, si se tiene una sal de calcio insoluble a pH neutro pero soluble a pH ácido, por lo que es necesario adicionar un ácido orgánico que al difundirse hasta la sal permita la acidificación del medio consiguiendo solubilizar los iones calcio. En este caso, las sales de calcio más empleadas son el carbonato de calcio y el fosfato tricálcico, y en casos específicos el fosfato dicálcico y el citrato tricálcico. Para la acidificación del medio se cuenta con ácidos orgánicos como el acético, adípico y el glucono delta-lactona. Si la sal de calcio es parcialmente soluble, el proceso de gelificación interna consiste en la adición a la mezcla Alginato-sal de calcio, un agente secuestrante como el fosfato, sulfato o citrato de sodio. Al adicionar un secuestrante este se enlaza con el calcio libre retardando así el proceso de gelificación, el sulfato de sodio ha sido comúnmente el más empleado debido a su bajo costo y conveniente solubilidad. Los mecanismos de gelificación iónica son descritos en la figura 9-1 (Helgerud et al., 2010, p 50-72).

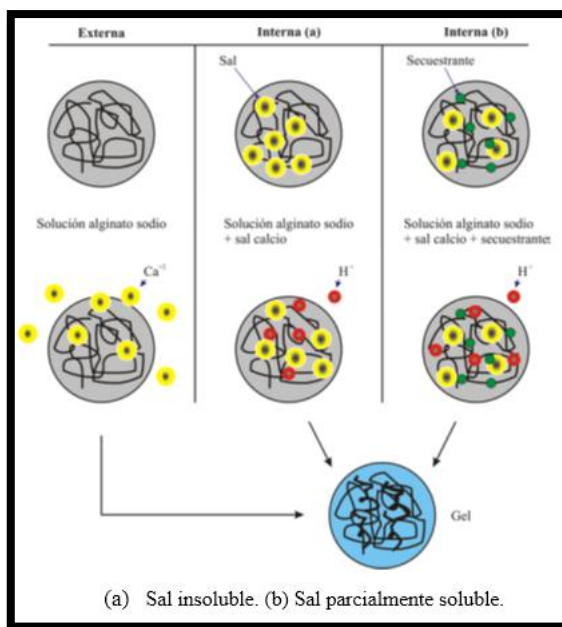


Figura 9-1: Mecanismos de Gelificación iónica.

Fuente: Helgerud et al., 2010

La principal diferencia entre el mecanismo de gelificación externa e interna es la cinética del proceso. Si lo que se pretende es el control de la transición solución-gel, en el proceso de gelificación externa los factores a manipular son la concentración de calcio y composición del polímero. Mientras que, para el proceso de gelificación interna se deben considerar la solubilidad, concentración de la sal de calcio, concentración del agente secuestrante y del ácido orgánico empleado (Draget, 2000, pp. 117-122).

1.1.6. *Quitosano*

El Quitosano es un polímero natural que se obtiene a partir de la Quitina, la cual forma parte de la estructura de numerosos organismos vivos como artrópodos, moluscos y hongos. Está constituida por unidades de 2-acetamido-2-deoxy- β -D-glucosa unidas por enlaces β -(1 \rightarrow 4) (Figura 10-1). La obtención de Quitosano a partir de Quitina se realiza por desacetilación, dejando libre el grupo amino del carbono 2, en la mayoría de veces este proceso no llega al 100%, es por ello que al Quitosano se le considera un copolímero de 2- acetamido-2-deoxy- β -D-glucosa y 2-amino-2-deoxy- β -D-glucosa (Figura 11-1). (Aldana et al, 2008, pp. 8844-8850) (Harris, 2010, pp. 10-112).

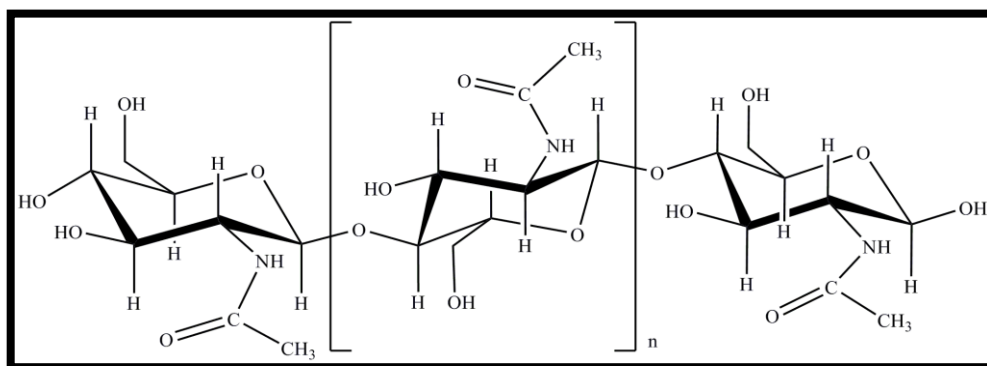


Figura 10-1: Estructura química de la Quitina.

Fuente: Harris, 2010

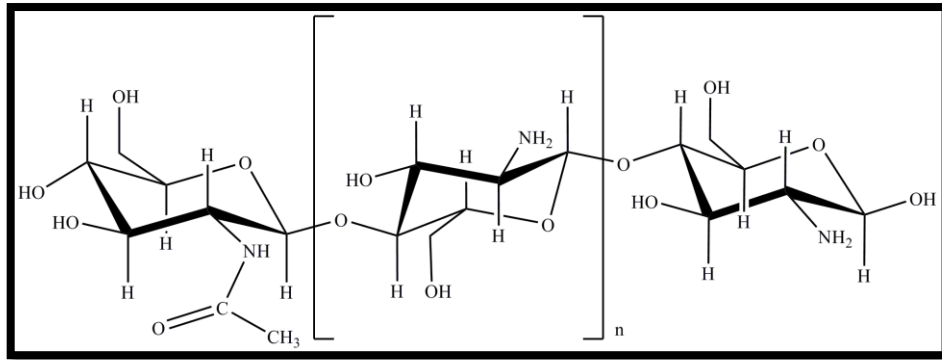


Figura 11-1: Estructura química de Quitosano.

Fuente: Harris, 2010.

1.1.6.1. *Propiedades del Quitosano*

a) Biocompatibilidad y biodegradabilidad.

El Quitosano es altamente tolerado en el organismo dado que es metabolizado por varias enzimas, especialmente la lisozima, razón por la cual se le considera como un polímero biodegradable (George et al, 2006, pp. 1-14).

b) Mucoadhesividad.

El Quitosano presenta gran interés para la industria farmacéutica, pues se ha observado que el tiempo de adherencia de un sistema bioadhesivo puede prolongarse con el uso de este polímero, además puede ser útil para la liberación de fármacos en regiones específicas del tracto gastrointestinal, debido a que su propiedad bioadhesiva la que se cree se origina al interactuar las zonas iónicas de los grupos amino cargados positivamente y la capa de moco cargado negativamente (Figura 12-1). Varios estudios han demostrado que la fuerza de adhesión aumenta con el grado de desacetilación (George et al, 2006, pp. 1-14), que no es más que el porcentaje de grupos amino libres que posee el Quitosano, por lo que mientras mayor sea la presencia de estos grupos mayor será su fuerza adhesiva (Harris, 2010, pp. 10-112).

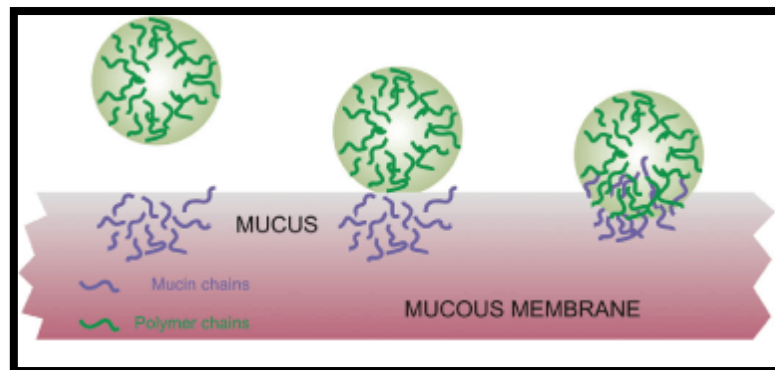


Figura 12-1: Interacción entre el polímero bioadhesivo y la membrana mucosa.

Fuente: George et al., 2006

1.1.6.2. *Propiedades fisicoquímicas del Quitosano*

La presencia de grupos aminos en la molécula de Quitosano, lo convierte en un polímero en un polieléctrolito catiónico con un pKa de 6,5; proporcionándole características fisicoquímicas muy particulares y modifica su funcionalidad; por otro lado la presencia de grupos hidroxilos, permiten la fácil modificación química de este polímero (Cho et al., 1998, pp. 3839-3843).

Las principales propiedades fisicoquímicas del Quitosano están estrechamente relacionadas con su estructura química (No et al., 2002, pp. 1511-1514).

a) **Peso molecular**

Afecta a las propiedades fisicoquímicas del Quitosano, como su viscosidad y solubilidad, por lo que, conocer este parámetro es muy importante para elucidar las características del polímero, así como también las de sus productos. Varias investigaciones han demostrado que el peso molecular del Quitosano modifica su funcionalidad como agente espesante, regulador de la viscosidad, agente ligante de color y vehículo para liberación de fármacos, entre otras aplicaciones (Tsaih y Chen, 1999, pp. 1905-1913) (Becherán et al., 2004, pp. 127-133).

b) Grado de Desacetilación

Se conoce como grado de desacetilación, el porcentaje de grupos amino libres en la molécula de Quitosano, este parámetro es el que permite la solubilidad y la bioactividad, así como también muchas de las aplicaciones de este polímero. De hecho, el Quitosano es definido como la Quitina que ha sido desacetilada en un 60-75% o más, punto en el cual se vuelve soluble únicamente en soluciones ácidos orgánicos (Khan et al., 2002, pp. 115-122).

c) Solubilidad

El Quitosano es un polímero insoluble en agua, pero es altamente soluble en soluciones de ácidos orgánicos (Park et al., 2002, pp. 194-197), es por esta razón que en esta investigación se utilizó ácido cítrico al 5% como medio de solubilización. Este ácido orgánico fue escogido debido a que presenta buenas características organolépticas en comparación al ácido acético que fue el utilizado en otras investigaciones (Chavarrí et al., 2010).

La solución de Quitosano a diferencia de la Quitina, es posible debido a la protonación de los grupos amino libres en la cadena de del polímero, generando así una sal de Quitosano. Por lo tanto las cargas positivas presentes en la molécula, determinan el comportamiento del Quitosano en la solución. Al igual que el grado de desacetilación, la distribución de los grupos amino influye en la solubilidad del Quitosano (Becherán et al., 2004, pp. 127-133).

La solubilidad no solo varía en función del peso molecular y del grado de desacetilación, sino también de otros factores como: pH, tipo de solvente, temperatura, pK y fuerza iónica y concentración del ácido (Rinaudo, 2006, pp. 603-632).

d) Viscosidad

Debido a que el Quitosano forma soluciones viscosas en soluciones ácidos orgánicos. La viscosidad de una solución depende del peso molecular y tipo de solvente utilizado. La determinación de este parámetro permite conocer el peso molecular aproximado del Quitosano (Rabea et al., 2003, pp. 1457-1465).

1.1.7. *Microencapsulación*

La microencapsulación es un proceso tecnológico en el que están inmersos una gran variedad de compuestos bioactivos (fármacos, vitaminas, ácidos nucleicos, péptidos, saborizantes, colorantes, aceites esenciales, nutrientes y pesticidas) en una matriz o un sistema de membranas. La sustancia encapsulada es generalmente un líquido, pero también puede presentarse en forma sólida. El producto obtenido mediante este proceso se define como micropartícula (Fang y Bhandari 2010, pp. 510-523). En el cuadro 2-1 se indica la clasificación de las partículas de acuerdo a su tamaño.

TABLA 2-1: Clasificación de las partículas
Según su tamaño

Denominación	Tamaño (nm)
Nanopartículas	< 1
Micropartículas	1 A 1000
Macropartículas	>1000

Fuente: Lozano et al., 2012

1.1.7.1. *Micropartículas*

Las micropartículas son pequeñas partículas que se definen como sistemas sólidos elaborados a base de polímeros, u otros materiales, de naturaleza biodegradable o no, que se utilizan para vehicular distintos tipos de compuestos bioactivos. Con respecto a su morfología y estructura interna, las micropartículas se dividen en dos tipos: las microesferas y microcápsulas.

Las denominadas “microesferas” son sistemas que tienen una estructura de tipo matricial, donde las sustancias encapsuladas pueden ser adsorbidas en la superficie de la partícula o encapsuladas en su interior. Las microesferas pueden ser sistemas dispersos homogéneos o heterogéneos en función de la sustancia encapsulada y de su estado molecular (disuelto) o en forma de partículas (en suspensión). Por su parte las microcápsulas son sistemas reservorio que poseen una estructura morfológica relativamente simple, constituidas por dos elementos claramente diferenciados: el núcleo interno, que contiene el compuesto bioactivo, y la membrana de revestimiento, por lo general de naturaleza

polimérica. A su vez, las microcápsulas pueden ser constituidas por una partícula simple como las microcápsulas mononucleares o por un *cluster* de partículas en el interior de la partícula revestida (microcápsulas polinucleares) (Figura 13-1).

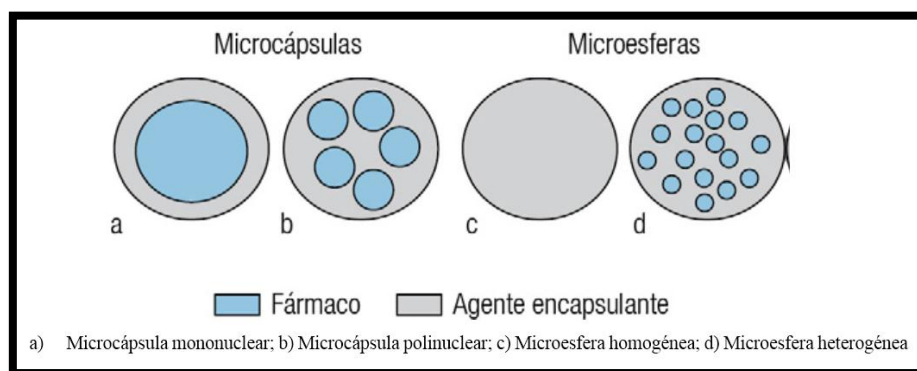


Figura 13-1: Tipos diferentes micropartículas

Fuente: Aftabrouchad y Doelker, 1992.

1.1.8. Técnicas de Microencapsulación

La microencapsulación puede realizarse por diferentes técnicas, cuya selección está determinada por las propiedades físicoquímicas de la sustancia a encapsular y del material de soporte, además de la aplicación y funcionalidad. Básicamente las técnicas de encapsulación pueden clasificarse en tres tipos, encapsulación por extrusión, emulsión y secado por atomización (Pal et al., 2009, pp. 123-131).

1.1.8.1. Encapsulación por extrusión

Esta técnica consiste en la formación de gotas de una solución de polímero mediante el uso de un dispositivo. Las gotas formadas caen sobre un baño que contiene el agente gelificante, lo que induce la gelificación mediante el mecanismo de gelificación externa. La principal limitación que presenta esta técnica es el gran tamaño de las micropartículas, que dependen del diámetro de la boquilla del dispositivo extrusor. Entre otras desventajas se encuentra, la dificultad de producción a gran escala debido a que la formación de las micropartículas se logra una a una, lo cual trae como consecuencia largos tiempos de gelificación (Mofidi et al., 2000, pp. 885-888). Adicionalmente, existen otros factores que influyen en el tamaño y morfología de las partículas, como por ejemplo: la distancia de separación

de la boquilla al baño, el efecto de la gravedad y la tensión superficial de la solución que induce la gelificación. A pesar de todos estos factores, la técnica de microencapsulación por extrusión ha sido empleada tradicionalmente para la obtención de microcápsulas con tamaños uniformes.

Recientes estudios, demuestran que la aplicación de esta técnica mejora notablemente al incorporar dispositivos extrusores como boquillas múltiples y discos aspersores, inyectoros con impulsos vibratorios (Dohnal y Štěpánek, 2010, pp. 254-259) e incluso con flujo de aire incorporado, todos diseñados bajo el mismo objetivo, la producción masiva de micropartículas. En la figura 14-1 se muestran diferentes tipos de dispositivos extrusores para la preparación de microcápsulas (Zuidam y Shimoni, 2010, pp. 3-29).

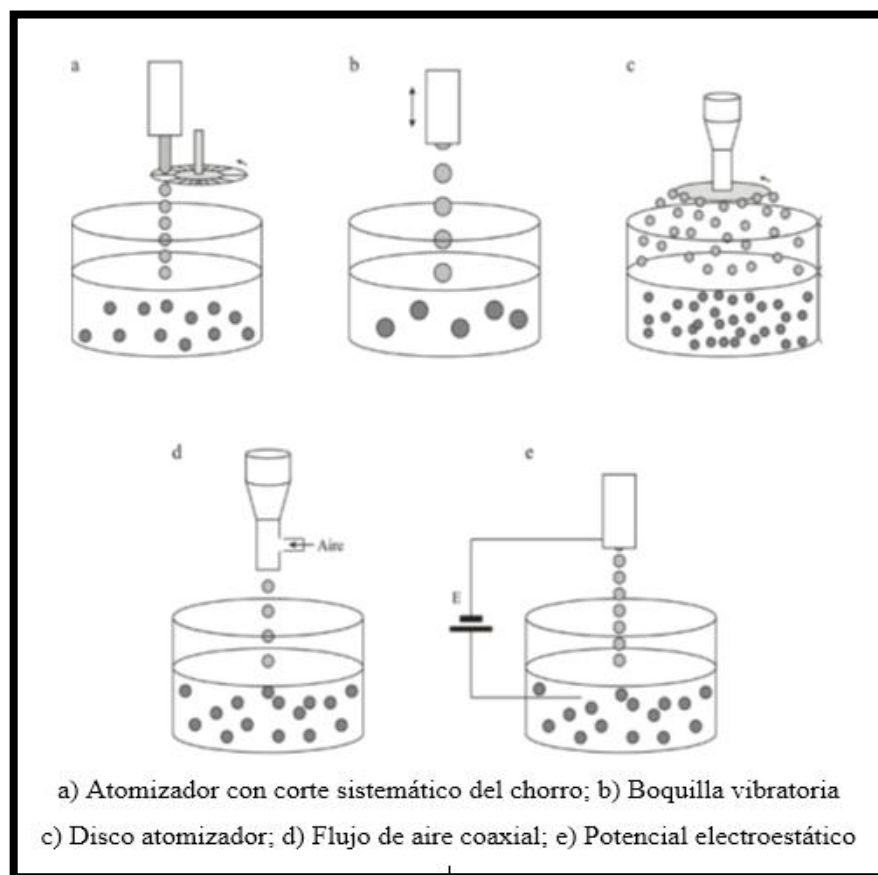


Figura 14-1: Tipos de dispositivos extrusores

Fuente: Zuidam y Shimoni, 2010.

1.1.8.2. Encapsulación en Emulsión

La técnica de encapsulación en emulsión se ha definido como el proceso de dispersión de un líquido en otro líquido inmiscible donde la fase dispersa consta de la matriz que incluye el componente a encapsular. La adición de un tensioactivo mejora la formación y estabilidad de la emulsión, así como la distribución de tamaño de las gotas (Poncelet, 2001, pp. 74-82). En este sentido, la preparación de micropartículas por emulsificación puede llevarse a cabo empleando el mecanismo de gelificación externa o interna. Para el primer caso, la gelificación externa en emulsión, consta en la dispersión de una mezcla solución de polímero y un componente en una fase continua no acuosa, seguido de la adición de una fuente de calcio que al difundirse a la fase dispersa inicie la gelificación permitiendo la encapsulación, y a su vez, la desestabilización de la emulsión para la separación de las cápsulas formadas. Mientras que, la técnica en emulsión por gelificación interna se fundamenta en la liberación del ión calcio desde un complejo insoluble o parcialmente soluble en cuyo caso se adiciona un agente secuestrante, contenido en una solución de polímero-componente el cual es dispersado en una fase continua no acuosa generando una emulsión agua en aceite (W/O) (Gouin, 2004, pp. 330-347). La liberación del ion calcio ocurre con la adición de un ácido orgánico soluble en la fase continua que al difundirse disminuye el pH del medio solubilizando la sal y produciendo la gelificación. Las técnicas de microencapsulación en emulsión se describen en la figura 15-1.

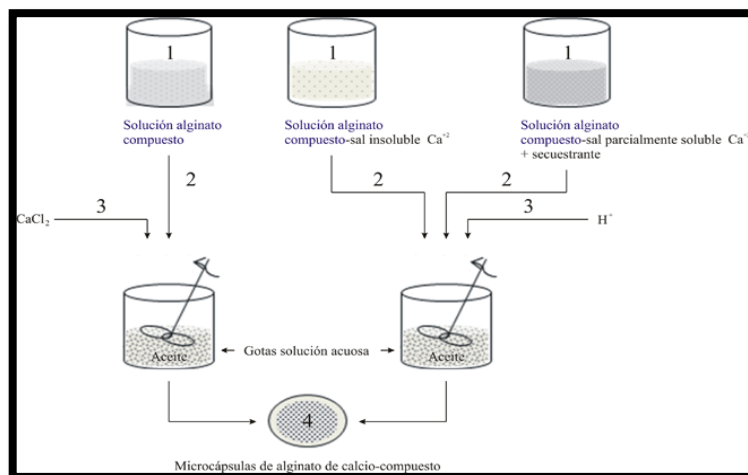


Figura 15-1: Técnica de microencapsulación en emulsión.

Fuente: Champagne y Fustier, 2007.

En este orden de ideas, investigaciones recientes han determinado la posibilidad de combinar las técnicas de microencapsulación o modificar las propuestas, al incorporar dispositivos mecánicos más efectivos e incluso procesos físico-químicos adicionales que los optimicen.

1.1.8.3. Encapsulación mediante secado por atomización

El secado por atomización ha sido una tecnología ampliamente usada por la industria debido a su reproducibilidad y economía. Ha sido usado para enmascarar sabores, aromas y la encapsulación de vitaminas. El procedimiento consiste en la preparación de una emulsión o suspensión que contenga al compuesto a encapsular y el material polimérico, el cual es pulverizado sobre un gas caliente que generalmente es aire promoviendo así la evaporación instantánea del agua, permitiendo que el principio activo presente quede atrapado dentro de una película de material encapsulante. Las micropartículas en polvo obtenidas son separadas del gas a bajas temperaturas. Una de las grandes ventajas de este proceso es, además de su simplicidad, que es apropiado para materiales sensibles a altas temperaturas debido a que los tiempos de exposición son muy cortos (5 a 30 segundos). A pesar, que la suspensión o emulsión a pulverizar con la técnica de secado por atomización se ha limitado a formulaciones acuosas, trabajos recientes han demostrado que la combinación de distintos biopolímeros de fuentes naturales como las gomas (carregenato, goma arábica y Alginato), proteínas (suero, caseinatos y gelatina), maltodextrinas, dextrosas, ceras y sus mezclas, crean nuevas matrices poliméricas altamente versátiles y que por tanto facilitan ser empleadas con otras formulaciones (Gharsallaoui et al., 2007, pp. 1107-1121).

1.1.9. Caracterización de Micropartículas

La caracterización de estas formas farmacéuticas consiste en el estudio de diferentes parámetros como: tamaño, morfología, perfil de liberación, solvente residual, eficiencia de encapsulación, humedad, entre otras características. Todos estos parámetros forman parte de los controles de calidad de las formulaciones farmacéuticas elaboradas en el proceso de microencapsulación.

1.1.9.1. Morfología

La morfología de estas partículas se estudia mediante técnicas de microscopía, de estas la más utilizada es la microscopía electrónica de barrido. Actualmente también se están usando otros tipos de microscopía; por ejemplo, la microscopía de fluorescencia, utilizada para conocer la estructura interna de las micropartículas, de la misma manera, la microscopía de fuerza atómica, es empleada para el estudio de superficies de las nanoesferas. Sin embargo, varias investigaciones han demostrado que la microscopía óptica, es una técnica simple, la cual resulta útil para conocer la forma y distribución de tamaño de las micropartículas.

El estudio de las características morfológicas de las micropartículas revela características importantes, como: forma, presencia de poros, regularidad de la superficie, continuidad de membrana, presencia de defectos y agregación. Todas estas características repercuten en las aplicaciones y propiedades de las micropartículas obtenidas. Por ejemplo, la presencia de poros puede influir en la liberación del principio activo encapsulado y modificar el mecanismo por el cual ocurre esta liberación, a su vez la agregación resulta indeseable, ya que afecta la homogeneidad del producto.

Las propiedades morfológicas de las micropartículas pueden verse influenciadas por la técnica de microencapsulación y básicamente por las condiciones experimentales en que las que se obtengan. Así, por ejemplo, el tipo y concentración de polímeros puede ocasionar diferencias en la morfología de las partículas (Saez et al., 2007, pp. 98-107).

1.1.9.2. Tamaño de la Partícula

El tamaño de las partículas es un parámetro importante. Y según referencias bibliográficas el tamaño de las microesferas oscila entre 1 a 1000 nm (Lozano et al., 2012, pp. 78-102), sin embargo se conoce que por la técnica de gelificación iónica se pueden obtener partículas que van desde 1 a 5 μ m (Calero et al., 2008, pp. 27-30).

Existen varias condiciones experimentales que pueden afectar al tamaño de las microesferas. Así, por ejemplo, el tipo, concentración y el peso molecular del polímero, la proporción polímero-fármaco, velocidad de agitación de la solución ionizante, son los factores que más inciden en este parámetro.

En la actualidad existen muchas técnicas para la determinación del tamaño de las micropartículas, entre las principales se encuentran: la sedimentación, centrifugación, ultracentrifugación, dispersión de la luz, difracción láser, conductividad eléctrica, microscopía óptica y electrónica, entre otras. Sin embargo, no todas estas las técnicas son específicas para esta determinación, ya no cubren el rango de tamaños y generan inconsistencia en los resultados, únicamente la microscopía electrónica posee la ventaja de expresar datos congruentes (Saez et al., 2007, pp. 98-107).

CAPÍTULO II

2. MARCO METODOLÓGICO

2.1. Lugar de realización

La presente investigación se desarrolló en el Laboratorio de Tecnología Farmacéutica de la Facultad de Ciencias, de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

2.2. Materiales, equipos y reactivos

2.2.1. *Materiales de laboratorio*

- Balón aforado de 250, 500 y 1000 mL.
- Vasos de precipitación de 250 mL.
- Trípode.
- Varilla de agitación.
- Soporte universal.
- Pizeta.
- Jeringa de 20 mL marca Nipro.
- Embudo simple.
- Probeta de 100 mL.

2.2.2. *Equipos*

- Agitador magnético
- Balanza Analítica
- Microscopio óptico OLYMPUS CX31
- Secador de bandejas marca PROINGAL

- Viscosímetro rotacional SELECTA ST-2001
- pH metro marca HANNA
- Desintegrador de tabletas QC-21 (USP 30)

2.2.3. Reactivos

- Ácido Cítrico
- Cloruro de Calcio
- Fosfato Monobásico de Potasio.

2.2.4. Materia prima

- Alginato sódico (USP) Laboratorio Cevallos.
- Quitosano (USP) XI'AN LYPHAR BIOTECH CO., LTD

2.2.5. Materia animal

- Mucosa intestinal de pollo (*Gallus gallus domesticus*)

2.3. Técnicas y Métodos

Para la obtención de las microesferas mucoadhesivas fue necesario la preparación de diferentes soluciones de polímeros y de otras requeridas para la evaluación de sus propiedades mucoadhesivas.

2.3.1. Preparación de soluciones

2.3.1.1. Solución de Alginato sódico (solución A)

Para la preparación de 250 mL de esta solución se adicionó la cantidad en gramos de Alginato Sódico (USP, Laboratorio Cevallos) requerida según su concentración (Cuadro 1-2) en 25 mL de agua desmineralizada; se agitó manualmente hasta formar una pasta homogénea (Anexo E) incorporándose el agua restante en porciones de 25 mL con agitación constante. Posteriormente se mantuvo en reposo durante 24 horas con el fin de hidratar uniformemente el polímero, hasta obtener una solución viscosa y homogénea (Reddy et al, 2012, pp. 93-96).

Cuadro 1-2: Preparación de la solución de Alginato sódico

Formulación	Cantidad de Alginato sódico (g)	Concentración de Alginato Sódico (%p/v)
F1	4	1,6
F2	5	2
F3	6	2,4

Realizado por: Luis Villarroel, 2015.

2.3.1.2. Solución de Ácido Cítrico 5 % (medio solubilizante)

La solución de Ácido Cítrico al 5 % (p/v), fue preparada con el propósito de crear un medio de disolución para el Quitosano, debido a que éste polímero es insoluble en agua y solventes orgánicos, pero es soluble en soluciones acuosas de ácidos orgánicos (Park et al, 2012, pp. 194-197). Para su preparación se disolvió 2,5 g de Ácido cítrico en 250 mL de agua destilada y posteriormente se filtró a través de un papel filtro.

2.3.1.3. Solución de cloruro de calcio (solución B)

Esta solución fue preparada con el fin de crear un medio ionizante para la gelificación de la solución de Alginato sódico, para ello se disolvió 50 gramos de CaCl_2 en 250 mL de agua destilada y posteriormente se filtró a través de un papel filtro.

2.3.1.4. Solución de Quitosano (solución C)

Para la preparación de esta solución fue necesario el empleo de la solución de ácido cítrico como medio solubilizante. Para ello se pesó la cantidad en gramos de Quitosano (USP, Xian Lyphar Biotech Co., Ltd) requerida según concentración (Cuadro 2-2) la cual se incorporó en 250 mL de solución de medio solubilizante, agitándose manualmente para dejar en reposo durante 24 horas.

Cuadro 2-2: Preparación de la solución de Quitosano

Formulación	Cantidad de Quitosano (g)	Concentración de Quitosano (%p/v)
F1	0,5	0,2
F2	1	0,4
F3	1,5	0,6

Realizado por: Luis Villarroel, 2015.

2.3.1.5. Mezcla de solución de Cloruro de calcio (solución B) y Quitosano (solución C) para obtención de solución ionizante

En un vaso de precipitación de 250 mL se colocó 20 mL de la solución B (CaCl_2) y 20 mL de la solución C (Quitosano), mezclándose. Tomando en consideración que se empleó la solución C con cada una de sus concentraciones (F1, F2 y F3 de Quitosano), se obtuvieron soluciones ionizantes con diferentes concentraciones, que se representan el cuadro 3-2.

Cuadro 3-2: Concentraciones de la solución ionizante

Formulación	Concentración de Quitosano (%p/v)	Concentración de Cloruro de Calcio (%p/v)
F1	0,1	10
F2	0,2	10
F3	0,3	10

Realizado por: Luis Villarroel, 2015.

2.3.1.6. *Preparación de solución tampón fosfato pH 7.4*

Esta solución fue preparada con el propósito de crear un medio de disolución que simule el pH intestinal, para ello 6,805 g de Fosfato monobásico de Potasio (Laboratorios Cevallos) fueron disueltos en 250 mL de agua destilada, posteriormente toda esta solución se coloca en un balón aforado de 1000 mL, después se agregó 195,5 mL de una solución de Hidróxido de sodio 0,2 M y se adicionó agua destilada hasta su aforo (Farmacopea de los Estados Unidos de América-USP 30, 2007).

2.3.1.7. *Preparación de solución de hidróxido de sodio 0,2 M*

Para preparar esta solución se disolvió 2 gramos de Hidróxido de sodio en agua destilada y se aforó hasta un volumen de 250 mL.

2.3.2. *Caracterización de las soluciones poliméricas*

Una vez preparadas las soluciones de diferentes concentraciones de Alginato sódico, se procedió a su caracterización, específicamente a la determinación de la viscosidad, ya que este valor condiciona la selección del tipo de instrumento de goteo, además de influir en la morfología de la gota producida, la cual pudiera verse afectada a diferentes alturas de goteo en función de la viscosidad de la solución de Alginato sódico. Para esta determinación se utilizó Viscosímetro rotacional marca Selecta ST-2001, empleando los parámetros presentados en la cuadro 4-2, establecidos en función de la

viscosidad de las soluciones poliméricas y basados en estudios preliminares utilizando un temperatura constante de 18°C.

Cuadro 4-2: Parámetros utilizados para medir la viscosidad de soluciones de Alginato sódico.

Formulación	Alginato sódico (% p/v)	Husillos	Velocidad (rpm)
F1	1,6	L2	10
F2	2	L2	6
F3	2,4	L3	12

Realizado por: Luis Villarroel, 2015.

Cabe destacar que para cada formulación de Alginato sódico se realizaron cinco determinaciones de este parámetro, con el fin de determinar el valor medio de la viscosidad. En anexo O, se muestran los husillos empleados en este ensayo.

La importancia de esta valoración radica en conocer como la viscosidad de las soluciones afecta al tamaño de la gota, a través de la altura del tipo de instrumento goteo seleccionado.

2.3.3. Estandarización del método de elaboración de microesferas mucoadhesivas.

Para llevar a cabo la elaboración de microesferas mucoadhesivas se realizaron una serie de experimentos preliminares, con el fin de estandarizar los parámetros que inciden directamente en la morfología y tamaño de las partículas. Para ello se llevaron a cabo las siguientes valoraciones:

- Selección del instrumento de goteo.
- Evaluación de la altura óptima de goteo.
- Mecanismo de secado de microesferas.

2.3.3.1. Selección del instrumento de goteo.

Según especificaciones bibliográficas, el tamaño de las microesferas debe ser máximo de 1mm de diámetro (Lozano et al., 2012, pp. 78-102); además se ha comprobado que el valor de éste parámetro se

encuentra estrechamente relacionado con el tamaño de la gota de la solución de Alginato sódico empleado en el método de gelificación iónica (López y Villalta, 2009, pp. 22-188), razón por la cual se evaluaron 2 dispositivos de goteo:

- Bureta de 50 mL
- Jeringa de 20 mL marca Nipro sin aguja

2.3.3.2. *Determinación de la altura óptima de goteo*

La altura de goteo constituye otro parámetro importante que influye en el tamaño y la morfología de las microesferas (López y Villalta, 2009, pp. 22-188). Para evaluar este efecto se utilizaron 3 alturas diferentes (Cuadro 5-2), obtenidas desde la superficie de la solución ionizante hasta la punta del instrumento de goteo.

Cuadro 5-2: Diferentes alturas de goteo para la determinación del valor óptimo.

Parámetro	Altura de goteo (cm)
Altura 1	2,5
Altura 2	5
Altura 3	10

Realizado por: Luis Villarroel, 2015.

2.3.3.3. *Mecanismo de secado*

El secado de las microesferas obtenidas fue realizado en secador de bandeja marca PROINGAL, para lo cual fue necesario la estandarización de los parámetros críticos del proceso como: la temperatura, el tiempo y la superficie sobre la cual se depositan las microesferas durante el secado.

2.3.4. *Método de elaboración de microesferas mucoadhesivas*

Una vez lograda la estandarización del método de elaboración, se procedió a la preparación de las microesferas utilizando tres formulaciones con diferentes concentraciones de polímeros, ya que según

estudios realizados, la concentración de Alginato sódico y Quitosano para una adecuada elaboración de microesferas mucoadhesivas es aproximadamente de 2% y 0.2% respectivamente, (Reddy et al, 2012, pp. 93-96). Con el fin de seleccionar la formulación que permita la obtención de microesferas con las mejores características de mucoadhesión, se prepararon las indicadas en el cuadro 6-2.

Cuadro 6-2: Formulaciones para la elaboración de microesferas mucoadhesivas.

Formulación	Concentración de Alginato sódico (%P/V) A	Concentración de Quitosano (%P/V)	Concentración de Cloruro de Calcio (%P/V)
F1	1,6	0,1	10
F2	2	0,2	10
F3	2,4	0,3	10

Realizado por: Luis Villarroel, 2015.

A continuación se indica el método de elaboración de microesferas mucoadhesivas utilizando la técnica de gelificación iónica.

- Se colocó 40 mL de la solución ionizante en un vaso de precipitación de 250 mL, se agita a 500 rpm con la ayuda de un agitador magnético, durante toda la preparación.
- Se colocó 20 mL de la solución A (Alginato sódico) en una jeringa de 20 mL sin ajuga.
- Se mide y se ajusta para cada formulación la altura de goteo seleccionada, medida desde la superficie de la solución ionizante del vaso de precipitación hasta la punta del instrumento de goteo.
- Se permitió el goteo de la solución A sobre la solución ionizante mantenida en agitación, (anexo H)
- Se detiene la agitación y se deja en reposo durante 2 horas con el fin de permitir el endurecimiento de las microesferas obtenidas.
- Por medio de decantación se separaron las microesferas del seno de la solución, finalmente se tamizaron a través de una malla N° 16 (Normas ASTM E-11/95: 1,18mm) (anexo I).

- Las microesferas se secaron en una caja hecha de papel de empaque en un secador de bandeja a temperatura ambiente durante 20 horas (anexo L), (Wittaya-areekul et al, 2006, pp. 113-118) (López y Villalta, 2009, pp. 22-188).

2.3.5. *Evaluación de microesferas mucoadhesivas*

2.3.5.1. *Determinación de la pérdida de humedad por deshidratación de las microesferas mucoadhesivas.*

Se colocan 2 gramos de microesferas obtenidas en cada formulación, para ser deshidratadas sobre una caja de papel de empaque en un secador de bandeja a temperatura ambiente durante 20 horas. El porcentaje de agua eliminada se calcula de la siguiente manera, (Hernández, 2014, pp. 15-88):

Cálculo:

$$\text{Pérdida por deshidratación (\%)} = \frac{m - m1}{m} \times 100$$

Donde:

m: peso en gramos de microesferas antes de la deshidratación.

m1: peso en gramos de microesferas después de la deshidratación.

2.3.5.2. *Rendimiento de producción de microesferas mucoadhesivas*

El rendimiento permite determinar el porcentaje de microesferas obtenidas con respecto a la cantidad total de material empleado (López y Villalta, 2009, pp. 22-188) (Zhang et al., 2011) (Zava et al, 2014, pp. 117-125), para ello se pesaron las microesferas obtenidas al final del proceso en cada formulación, con el fin de determinar cuál de ellas presente mayor porcentaje de rendimiento.

Cálculo

$$\text{Rendimiento (\%)} = \frac{M}{\text{Alginato} + \text{CaCl}_2 + \text{Quitano}} \times 100$$

Donde:

M: gramos de microesferas obtenidas al final de la elaboración.

Alginato: gramos de Alginato sódico utilizado.

CaCl₂: gramos de Cloruro de Calcio utilizado.

Quitosano: gramos de Quitosano utilizado.

2.3.5.3. *Determinación del tamaño y morfología de las microesferas.*

El tamaño y morfología de las microesferas mucoadhesivas se evaluaron utilizando un microscopio óptico marca Olympus CX31, con objetivos de 4X, para lo cual se colocaron las microesferas sobre un campo cuadrulado, cuyo tamaño de cuadrícula es de 1mm (López y Villalta, 2009, pp. 22-188) (Zhang et al., 2011, pp. 11-19) (Ribeiro et al., 2012 pp. 433-441) (Garrait et al., 2014, pp. 363-372).

Debido a que no todas las microesferas obtenidas son partículas totalmente esféricas, la determinación del tamaño se basó en la medición del diámetro de Feret (Figura 1-2), el cual asume que la partícula es hipotéticamente esférica, por lo que este diámetro relaciona el tamaño de una partícula no esférica con su partícula esférica equivalente. La determinación se realizó midiendo la distancia entre dos tangentes trazadas de forma perpendicular (Lozano et al, 2012, pp. 78-102).

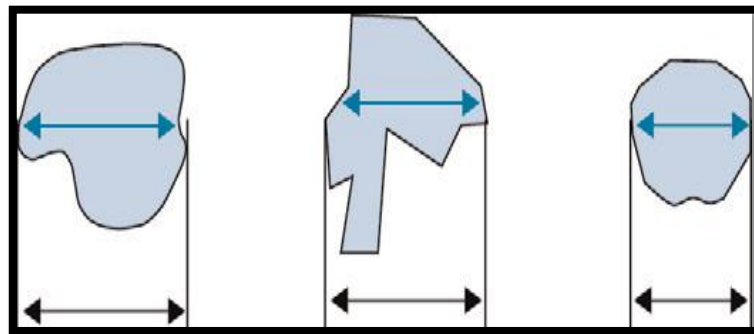


Figura 1-2: Diámetro de Feret

Fuente: Lozano et al., 2012

2.3.5.4. *Evaluación de la mucoadhesividad “In vitro”*

La propiedad mucoadhesiva de las microesferas se evaluó con el método de ensayo conocido como “Wash-off”, (Ratnaparkhi et al, 2014) (Parmar et al, 2010, pp. 1157-1167). Para ello se utilizó el aparato desintegrador de tabletas (según la USP 35), reemplazando el cestillo o canasta, por la mucosa intestinal de pollo atada con un hilo de algodón. En el beaker de 1 L se colocó una solución tampón fosfato pH 7,4 a 37+/- 2°C, que simula el fluido intestinal. Posteriormente se extendieron 20 microesferas mucoadhesivas sobre el intestino y se procedió al encendido del equipo que se caracteriza por proporcionar movimientos ascendentes y descendentes (30 veces/minuto) simulando el peristaltismo intestinal (Anexo T). Se valoró la cantidad de microesferas adheridas, restando del total el número de microesferas despejadas de cada 30 minutos, durante 6 horas (Reddy et al, 2012, pp. 93-96) (Pal et al., 2012, pp. 123-131). El porcentaje de microesferas adheridas se calculó de la siguiente manera (Malik et al., 2013, pp. 44):

$$\text{Mucoadhesión (\%)} = \frac{\text{Número de microesferas adheridas}}{\text{Número total de microesferas aplicadas}} \times 100$$

Se realizó un análisis de control de calidad basado en la mucoadhesión que presentan las microesferas. El análisis se fundamenta en el teorema de Chebyshev, el cual brinda cierto margen de probabilidad en el que los valores pueden estar fuera de una distancia establecida (± 3 desviaciones estándares) respecto a la media (Freund y Miller, 2000, p 25-58.). Este estudio resulta útil para conocer el intervalo de tiempo en el que las microesferas presentan un óptima mucoadhesión, además permite identificar las fluctuaciones de adhesión durante este ensayo.

CAPÍTULO III

3. MARCO DE RESULTADOS, DISCUSIÓN Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

3.1. Caracterización de las soluciones poliméricas

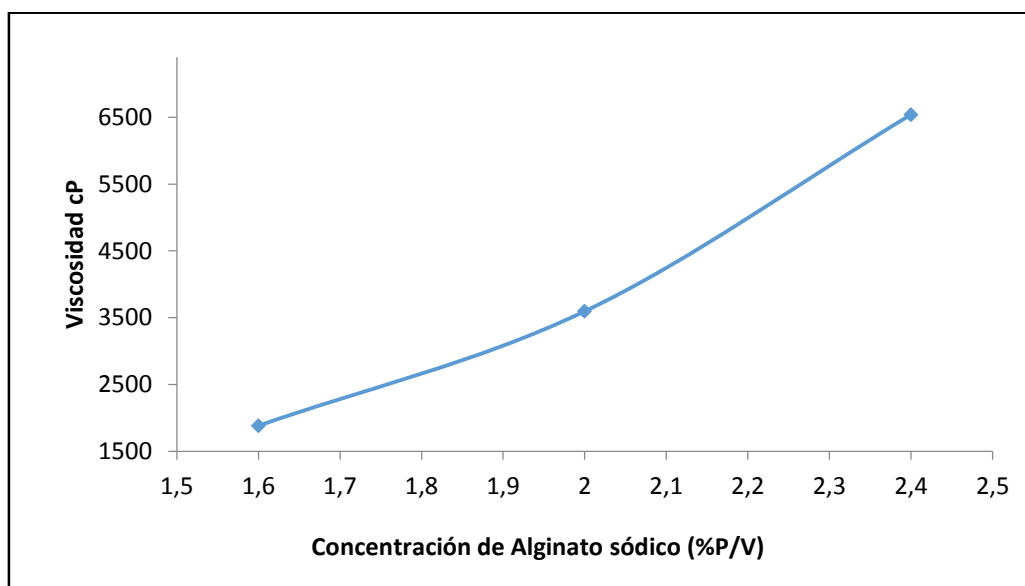
Una vez preparadas las soluciones de Alginato sódico a las diferentes concentraciones, se procedió a la medición de la viscosidad que presenta cada una de ellas. A continuación en cuadro 1-3, se indican los valores de la viscosidad de las soluciones.

Cuadro 1-3.: Viscosidad de soluciones de Alginato sódico.

Formulación	Alginato sódico (%p/v)	Viscosidad (cP)
F1	1,6	1881,94
F2	2	3595,94
F3	2,4	6540,26

Realizado por: Luis Villarroel, 2015.

Gráfica 1-3: Concentración de soluciones de Alginato sódico en función a la viscosidad.



Realizado por: Luis Villarroel, 2015.

Como era de esperarse, a medida que aumenta la concentración del polímero aumenta la viscosidad de la solución (Figura 1-3), esto se debe a la naturaleza propia de la sustancia (Arvizu et al., 2002, pp. 27-36). Los datos obtenidos en esta determinación son importantes para la selección del instrumento de goteo, por lo que constituyen resultados preliminares a la estandarización del método de elaboración.

3.2. Estandarización del método de elaboración de microesferas mucoadhesivas.



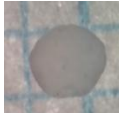
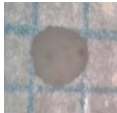

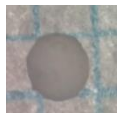
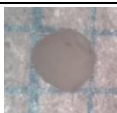















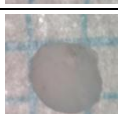





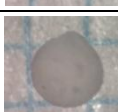

3.2.1. Selección del instrumento de goteo.

En esta determinación se evaluaron dos instrumentos: la bureta de 50 mL y jeringa de 20 mL sin ajuga. Durante los ensayos preliminares se observó que al colocar las formulaciones de Alginato sódico (F1, F2 y F3) cuyas concentraciones y viscosidades se muestran en el cuadro 1-3. Con la bureta el llenado de las soluciones no era uniforme y por tanto la capacidad de goteo resultó deficiente (anexo G). Contrariamente se determinó que con la jeringa de 20 mL sin ajuga, el llenado de las soluciones era uniforme y existía un correcto goteo de las mismas (anexo F). Por todo lo anterior, se descartó la bureta de 50 mL y se seleccionó a la jeringa de 20 mL como instrumento de goteo para la elaboración de las microesferas mucoadhesivas.

3.2.2. Determinación de la altura óptima de goteo.













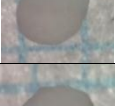










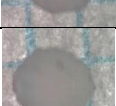



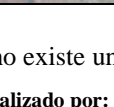
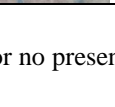
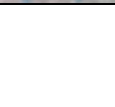
Para la obtención de mejores características de morfología y tamaño en las microesferas, se realizaron varios estudios utilizando alturas de goteo de 2,5; 5 y 10 cm del dispositivo con la solución de Alginato sódico. A continuación se muestran las fotografías de las microesferas obtenidas con cada formulación a diferentes alturas.

Cuadro 2-3: Tamaño y morfología de microesferas mucoadhesivas preparadas con la formulación 1.

Altura 2,5 cm		Altura 5 cm		Altura 10 cm	
Morfología	Diámetro (mm)	Morfología	Diámetro (mm)	Morfología	Diámetro (mm)
	0,96		1,40		1,29
	1,10		1,14		1,00
	1,09		1,27		1,17
	0,96		1,43		1,14
	1,00		1,20		1,17
	1,10		1,11		1,29
	1,23		1,28		1,36
	1,15		1,33		1,18
	1,32		1,25		1,22
	1,27		1,22		1,27

Realizado por: Luis Villarroel, 2015.














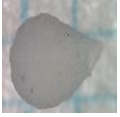






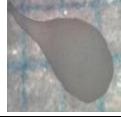



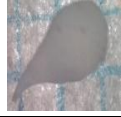

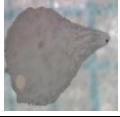


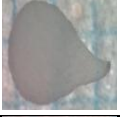



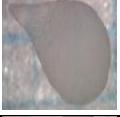






Cuadro 3-3: Tamaño y morfología de microesferas mucoadhesivas preparadas con la formulación 2.

Altura 2,5 cm		Altura 5 cm		Altura 10 cm	
Morfología	Diámetro (mm)	Morfología	Diámetro (mm)	Morfología	Diámetro (mm)
	-		1,39		1,68
	-		1,43		1,33
	-		1,34		1,51
	-		1,33		1,43
	-		1,35		1,43
	-		1,17		1,43
	-		1,23		1,39
	-		1,14		1,29
	-		1,14		1,39
	-		1,19		1,39

- no existe una medición del tamaño por no presentar forma esférica

Realizado por: Luis Villaruel, 2015.

Cuadro 4-3: Tamaño y morfología de microesferas mucoadhesivas preparadas con la formulación 3.

Altura 2,5 cm		Altura 5 cm		Altura 10 cm		Altura 70 cm	
Morfología	Diámetro (mm)	Morfología	Diámetro (mm)	Morfología	Diámetro (mm)	Morfología	Diámetro (mm)
	-		-		-		1,43
	-		-		-		1,49
	-		-		-		1,51
	-		-		-		1,47
	-		-		-		1,43
	-		-		-		1,43
	-		-		-		1,60
	-		-		-		1,54
	-		-		-		1,25
	-		-		-		1,44

- no existe una medición del tamaño por no presentar forma esférica

Realizado por: Luis Villarroel, 2015.

Como se puede observar en los cuadros 2-3; 3-3 y 4-3, las microesferas obtenidas en cada formulación presentan un tamaño y morfología variada. Así por ejemplo, las obtenidas a una altura de goteo de 2,5 cm con la formulación 2, y las obtenidas a 2,5; 5 y 10 cm con la formulación 3 presentan una forma irregular semejante a una forma piriforme. Debido a que los parámetros de calidad indican que las microesferas deben presentar una morfología esférica (López y Villalta, 2009, pp. 22-188), se descartaron del estudio todas aquellas que no cumplieran con este parámetro. En el caso de la formulación 3, en vista de que ninguna de las alturas de goteo establecidas permitía la obtención de partículas esféricas, se realizaron una serie de ensayos encontrándose que a una altura de goteo de 70 cm, se obtenían microesferas con adecuadas características morfológicas.

Esta deformación en la morfología puede deberse a un aumento en la viscosidad de las soluciones de Alginato sódico, básicamente a la tensión superficial, que es la fuerza encargada de formar una partícula esférica cuando un líquido se encuentra en caída libre. A medida que la viscosidad de un líquido aumenta, la tensión superficial disminuye, debido a que la viscosidad ejerce una resistencia la cual impide la formación de una partícula esférica. Por esta razón, se requiere de una mayor altura en el dispositivo de goteo con el fin de aumentar el tiempo, para que la tensión superficial transforme a la gota de la solución de Alginato sódico en un cuerpo esférico (Andueza et al., 2000, pp. 224-228) (Fuentes et al., 2001, pp. 181-188).

De igual manera, la variación en los tamaños de las microesferas puede ser explicado por el aumento en la concentración de Alginato sódico, que al aumentar su viscosidad, incrementa el tamaño de la gota y por tanto se produce un mayor diámetro en las partículas (Reddy et al., 2009, pp. 93-96).

3.2.2.1. Análisis estadístico del tamaño de microesferas mucoadhesivas

Se realizaron una serie de análisis estadísticos con el fin de seleccionar la altura óptima para cada formulación, mediante la cual se puede obtener microesferas mucoadhesivas con adecuadas características de morfología y tamaño. A continuación se presentan los análisis realizados en cada formulación.

Cuadro 5-3: Parámetros estadísticos de los tamaños de las microesferas mucoadhesivas obtenidas con las diferentes formulaciones.

Formulación	Altura (cm)	Estadístico	Resultado
1	2,5	Media	1,12
		Mediana	1,1
		Varianza	0,02
		Desviación estándar	0,13
		Mínimo	0,96
		Máximo	1,32
	5	Rango	0,36
		Media	1,26
		Mediana	1,26
		Varianza	0,01
		Desviación estándar	0,1
		Mínimo	1,11
	10	Máximo	1,43
		Rango	0,32
		Media	1,21
Mediana		1,2	
Varianza		0,01	
Desviación estándar		0,1	
2	5	Mínimo	1
		Máximo	1,36
		Rango	0,36
		Media	1,27
		Mediana	1,28
		Varianza	0,01
	10	Desviación estándar	0,11
		Mínimo	1,14
		Máximo	1,43
		Rango	0,29
		Media	1,43
		Mediana	1,41
	70	Varianza	0,01
		Desviación estándar	0,11
		Mínimo	1,29
Máximo		1,68	
Rango		0,39	
Media		1,46	
3	70	Mediana	1,46
		Varianza	0,01
		Desviación estándar	0,09
		Mínimo	1,25
		Máximo	1,6
		Rango	0,35

Realizado por: Luis Villarroel, 2015.

Como se observa en cuadro 5-3, las microesferas preparadas con la formulación 1 presentan un diámetro equivalente de $1,12 \pm 0,13$; $1,26 \pm 0,10$ y $1,21 \pm 0,10$ mm, para una altura de goteo de 2,5; 5 y 10 cm, respectivamente, mientras que las obtenidas en la formulación 2, presentan un diámetro de $1,27 \pm 0,11$ mm a 5 cm y $1,43 \pm 0,11$ mm a 10 cm, y las preparadas con la formulación 3, $1,46 \text{ mm} \pm 0,09$ a una altura de 70 cm. Con el fin de conocer si existen diferencias significativas en los tamaños de las microesferas de cada formulación, se realizaron pruebas estadísticas que se presentan a continuación.

Cuadro 6-3: Test de normalidad de los de los tamaños de las microesferas

Formulación	Altura (cm)	Estadístico	Df	Significancia
1	2,5	0,93	10	0,49
	5	0,97	10	0,89
	10	0,95	10	0,65
2	5	0,89	10	0,21
	10	0,87	10	0,08
3	70	0,9	10	0,22

Realizado por: Luis Villarroel, 2015.

Al realizar la prueba de Shapiro-Wilk, se determinó que los valores de los tamaños de las microesferas obtenidos en la formulación 1, 2 y 3 siguen una distribución normal, lo que nos da a entender que el 95 % de los datos se encuentra en un rango entre ± 2 desviaciones entandares.

Cuadro 7-3: Test de homogeneidad de varianzas de los tamaños de las microesferas mucoadhesivas

Formulación	Levene	Df1	Df2	Significancia
1	0,38	2	27	0,69
2	1,04	1	18	0,32

Realizado por: Luis Villarroel, 2015.

De la misma manera se comprobó mediante la prueba de Levene que los datos obtenidos en la formulación 1 y 2, presentan varianzas homogéneas.

Cuadro 8-3: Análisis de varianzas (ANOVA) de los tamaños de las microesferas mucoadhesivas

Formulación		Suma de cuadrados	Df	Media de cuadrados	F	Significancia
1	Entre Grupos	0,1	2	0,054	4,38	0,02
	Dentro de Grupos	0,33	27	0,012		
	Total	0,44	29			
2	Entre Grupos	0,12	1	0,12	10,44	0,005
	Dentro de Grupos	0,21	18	0,012		
	Total	0,33	19			

Realizado por: Luis Villarroel, 2015.


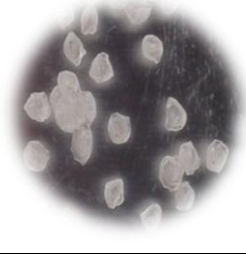
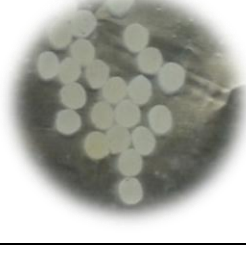
Al realizar un análisis de varianzas (ANOVA) se determinó que con un 95% de confianza, los diámetros equivalentes de las tres alturas de goteo de la formulación 1 y de las dos alturas en la formulación 2 son estadísticamente diferentes, es decir, existen diferencias significativas en el tamaño de las microesferas. Por ello, se seleccionó como la mejor altura de goteo la correspondiente a 2,5 cm para la formulación 1 y 5 cm para la formulación 2, ya que permiten la obtención de microesferas con un tamaño más próximo al de referencia $1 \pm 0,1$ mm (López y Villalta, 2009, pp. 22-188) (Lozano et al., 2012, pp. 78-102).

3.2.3. *Mecanismo de secado*

La determinación de las condiciones de secado de las microesferas se estudiaron bajo criterios establecidos en fuentes bibliográficas con diferentes valores de temperatura y tiempo. Al ensayar con una temperatura y tiempo de secado de 105 °C durante 1,5 horas respectivamente (López y Villalta, 2009, pp. 22-188), se observó la degradación y pérdida de las características iniciales de las microesferas, de la misma manera al realizar el secado a 60 °C por 2 horas (Mladenovska et al, 2007, pp. 59-69) (Crcarevska et al., 2008, pp. 565-578), se obtuvo un resultado negativo puesto que las microesferas se deshidrataron de una manera incorrecta perdiendo así su morfología. Todo lo anterior conlleva a experimentar condiciones con menores valores de temperatura y tiempo, lo que permitió determinar

como valor óptimo la temperatura ambiente (20 - 25°C) para el secado, empleando un desecador de bandeja durante un tiempo de 20 horas, lo cual concuerda con lo expuesto en otras investigaciones (Mennini et al., 2012, pp. 67-75).


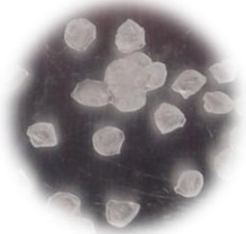
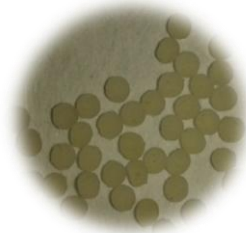
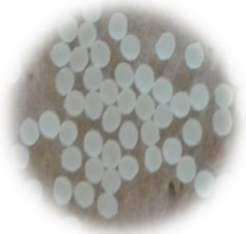
Cuadro 9-3. Fotografías de microesferas mucoadhesivas secadas a diferentes tiempos y temperatura

Temperatura (°C)	Tiempo (h)	Resultado
105	1,5	
60	2	
20-25	20	

Realizado por: Luis Villarroel, 2015.

Según fuentes bibliográficas se conoce que estas formas farmacéuticas deben ser deshidratadas en un cilindro rotatorio con temperatura y tiempo controlados (Ramos et al., 2001, pp. 126-135), para que de esta manera se obtengan microesferas con adecuadas características morfológicas. Al no contar con la disponibilidad de este sistema de secado, se optó por realizar ensayos con la finalidad de determinar la superficie sobre la cual se depositan las microesferas para su secado. A continuación en cuadro 10-3 se indica los resultados de las pruebas.

Cuadro 10-3. Fotografías de microesferas mucoadhesivas secadas sobre diferentes superficies.

Prueba	Material	Resultado
1	Malla tamiz #16	
2	Papel aluminio	
3	Papel filtro	
4	Papel empaque	

Realizado por: Luis Villarroel, 2015.

Como se muestra en el anterior cuadro, al utilizar un tamiz número 16, papel aluminio y una canasta hecha de papel filtro se encontró que las microesferas deshidratadas en estos sistemas no presentan buenas características morfológicas, mientras que al utilizar una canasta hecha de papel de empaque, las microesferas deshidratadas presentaron excelentes características morfológicas. Este material fue

seleccionado para el sistema de secado, debido a que presenta una mayor capacidad de absorción de agua y su tiempo de secado es menor en comparación a los anteriormente mencionados.

3.3. Evaluación de microesferas mucoadhesivas

Una vez estandarizado el método de elaboración de las microesferas mucoadhesivas, se prepararon cinco lotes de cada formulación. A continuación se muestran la evaluación realizadas a cada formulación.

3.3.1. *Determinación de la pérdida de humedad por deshidratación de las microesferas mucoadhesivas.*

Se determinó la cantidad de agua eliminada por deshidratación a cada lote preparado. A continuación se indica la cantidad de agua promedio eliminada en cada formulación.

Cuadro 11-3: Pérdida por deshidratación de microesferas mucoadhesivas.

Formulación	Antes de la deshidratación (g)	Después de la deshidratación (g)	Pérdida por deshidratación (%)
F1	10,72	1,03	90,42
F2	11,24	1,15	89,72
F3	11,85	1,20	89,86

Realizado por: Luis Villarroel, 2015.

Como se observa en cuadro 11-3, la pérdida de humedad promedio que experimentan las microesferas durante su deshidratación es de 90,42; 89,72 y 89,86 % para la formulación F1, F2 y F3, respectivamente. Según trabajos realizadas (George et al., 2006, pp. 1-14), se conoce que éstas formas farmacéuticas pueden perder una cantidad agua alrededor de 90 a 95%, lo cual concuerda con lo encontrado en esta evaluación. Este parámetro resulta útil para conocer de forma aproximada e indirecta la capacidad de hinchamiento que puede experimentar el polimero durante un proceso de hidratación (Chiappetta et al., 2007, pp. 360).

3.3.2. Rendimiento de producción de microesferas mucoadhesivas

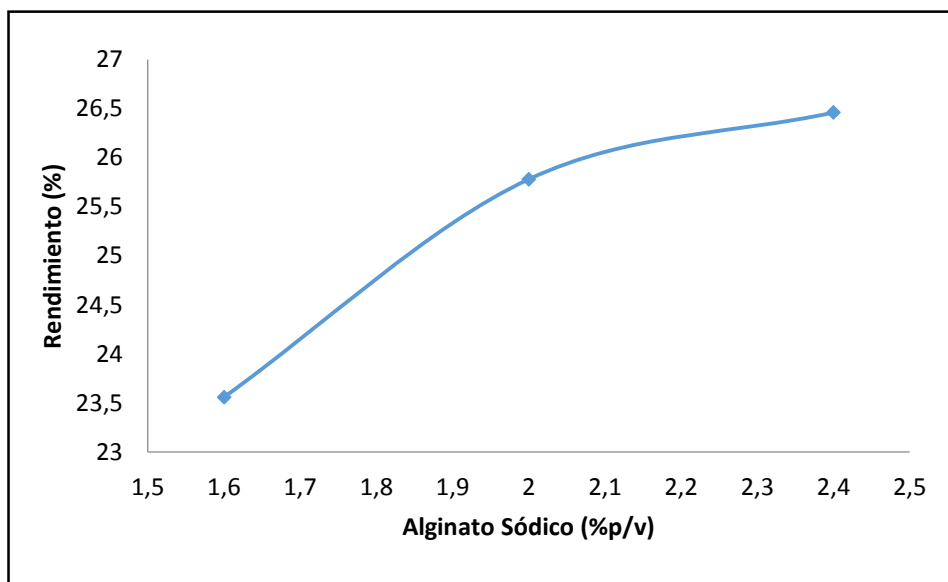
Las microesferas obtenidas de cada formulación, fueron pesadas, calculándose el rendimiento de acuerdo a la cantidad de material utilizado. En el cuadro 12-3, se indica el rendimiento promedio de producción en cada formulación.

Cuadro 12-3: Rendimiento de producción de microesferas mucoadhesivas.

Formulación	Alginato sódico (g)	Quitosano (g)	Cloruro de calcio (g)	Microesferas (g)	Rendimiento (%)
1	0,32	0,02	2	0,55	23,56 ± 2,23
2	0,4	0,04	2	0,63	25,78 ± 1,54
3	0,48	0,06	2	0,67	26,46 ± 1,22

Realizado por: Luis Villarroel, 2015.

Gráfica 2-3. Rendimiento de producción de microesferas en función de la concentración de Alginato sódico.



Realizado por: Luis Villarroel, 2015.

Cuadro 13-3: Análisis de varianzas (ANOVA) del rendimiento de las microesferas mucoadhesivas.




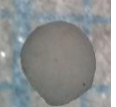




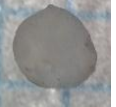
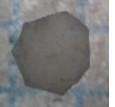



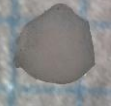




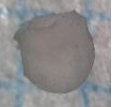
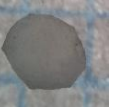




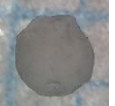


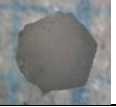
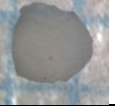



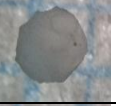





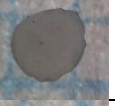


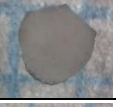
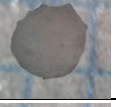
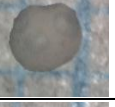


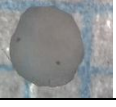


	Suma de cuadrados	Df	Media de cuadrados	F	Significancia
Entre Grupos	23,00	2	11,50	3,91	0,05
Dentro de Grupos	35,25	12	2,94		
Total	0,33	24			

Realizado por: Luis Villarroel, 2015.

Como se observa en el gráfica 2-3, el rendimiento promedio de las microesferas es de $23,56 \pm 2,23$; $25,78 \pm 1,54$ y $26,46 \pm 1,22$ % para la formulación 1, 2 y 3. Después de realizar un análisis de varianza (ANOVA), se encontró que con un 95% de confianza, los rendimientos de las tres formulaciones son estadísticamente diferentes, es decir, la concentración de Alginato sódico influye en el rendimiento de producción de microesferas, por lo tanto, a medida que aumenta la concentración de este polímero aumenta también el porcentaje de rendimiento. Los porcentajes de rendimiento obtenidos en este estudio son relativamente bajos en comparación con los encontradas en otras investigaciones, donde el rendimiento es de 33,33% (López y Villalta 2009), 35,45% (Zhang et al., 2011, pp. 11-19) y 60.95% (Zava et al., 2014, pp. 117-125), por otra parte existen reportes de investigaciones (Porjazoska et al, 2004, pp. 215-229) (Kosobe et al., 2005, pp. 623-629) en las cuales el rendimiento va desde 50 a un 87%, sin embargo, no existen especificaciones oficiales de un porcentaje que se considere adecuado. Además este bajo rendimiento en la producción puede ser explicado por la incidencia de varios factores, entre ellos: la técnica de microencapsulación empleada, que no permitieron conseguir buenos rendimientos de producción, debido a que la solución de Alginato sódico se adhiere en las paredes internas del dispositivo de goteo, impidiendo la completa caída de esta solución (Mofidi et al., 2000, pp. 885-888) (Rodríguez et al., 2003, pp. 1-5) (Calero et al., 2008, pp. 27-30). Igualmente, las altas concentraciones de cloruro de Calcio utilizadas pueden disminuir el rendimiento de producción, pues al utilizar una cantidad mayor, el remanente de esta sal continua siendo elevada al final del proceso de gelificación , provocando que el polímero gelifique rápidamente produciendo microesferas que precipitan formando asociaciones permanentes (George et al, 2006, pp. 1-14).

3.3.3. *Determinación del tamaño y de la morfología de las microesferas mucoadhesivas.*

Cuadro 14-3: Morfología de microesferas mucoadhesivas preparadas con la formulación 1.

Lote 1	Lote 2	Lote 3	Lote 4	Lote 5
				
				
				
				
				
				
				
				
				
				


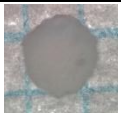



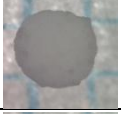
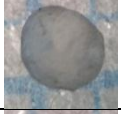



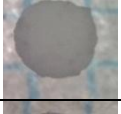
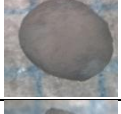

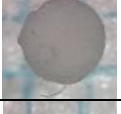
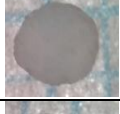
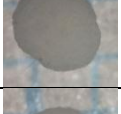



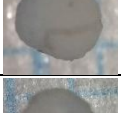




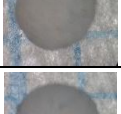




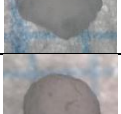




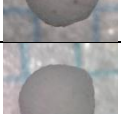

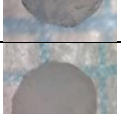
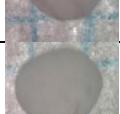
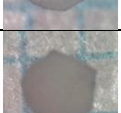




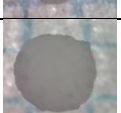

Realizado por: Luis Villarroel, 2015.

Cuadro 15-3: Morfología de microesferas mucoadhesivas preparadas con la formulación 2

Lote 1	Lote 2	Lote 3	Lote 4	Lote 5
				
				
				
				
				
				
				
				
				
				

Realizado por: Luis Villarroel, 2015.

Cuadro 16-3: Morfología de microesferas mucoadhesivas preparadas con la formulación 3

Lote 1	Lote 2	Lote 3	Lote 4	Lote 5
				
				
				
				
				
				
				
				
				
				

Realizado por: Luis Villarroel, 2015.

Cuadro 17-3: Tamaños de microesferas mucoadhesivas de los cinco lotes preparadas con la formulación 1, 2 y 3.

Formulación 1					Formulación 2					Formulación 3				
L1 (mm)	L2 (mm)	L3 (mm)	L4 (mm)	L5 (mm)	L1 (mm)	L2 (mm)	L3 (mm)	L4 (mm)	L5 (mm)	L1 (mm)	L2 (mm)	L3 (mm)	L4 (mm)	L5 (mm)
1,05	1,03	1,10	1,08	1,02	1,17	1,19	1,16	1,18	1,16	1,38	1,27	1,27	1,26	1,28
1,06	1,15	1,03	1,13	1,01	1,19	1,18	1,19	1,20	1,19	1,26	1,29	1,35	1,26	1,36
1,07	1,10	1,08	1,12	1,12	1,17	1,16	1,18	1,18	1,17	1,32	1,37	1,32	1,27	1,34
1,08	1,02	1,09	1,11	1,07	1,15	1,19	1,19	1,16	1,19	1,32	1,35	1,39	1,30	1,25
1,07	1,11	1,14	1,03	1,14	1,15	1,19	1,15	1,17	1,18	1,36	1,35	1,28	1,28	1,32
1,02	1,15	1,02	1,09	1,03	1,15	1,17	1,15	1,18	1,17	1,27	1,39	1,37	1,28	1,29
1,01	1,09	1,07	1,09	1,11	1,18	1,18	1,17	1,19	1,18	1,35	1,36	1,38	1,34	1,31
1,07	1,13	1,09	1,10	1,07	1,20	1,20	1,17	1,18	1,19	1,25	1,31	1,26	1,31	1,28
1,08	1,09	1,07	1,03	1,05	1,15	1,20	1,18	1,20	1,18	1,39	1,38	1,32	1,29	1,35
1,11	1,11	1,03	1,07	1,03	1,20	1,17	1,15	1,19	1,19	1,34	1,35	1,32	1,27	1,36

L1) Lote 1; L2) Lote 2; L3) Lote 3; L4) Lote 4; L5) Lote 5

Realizado por: Luis Villarroel, 2015.

A continuación se presentan en cuadro 18-3, los parámetros estadísticos correspondientes a los tamaños de las microesferas obtenidas en los diferentes lotes de cada formulación.

Cuadro 18-3: Parámetros estadísticos de los tamaños de microesferas mucoadhesivas preparadas con la formulación 1, 2 y 3.

Estadístico	Formulación 1	Formulación 2	Formulación 3
Media	1,08	1,18	1,32
Mediana	1,08	1,18	1,32
Moda	1,07	1,19	1,32
Desviación estándar	0,04	0,02	0,04
Varianza	0,00	0,00	0,00
Rango	0,14	0,05	0,14
Mínimo	1,01	1,15	1,25
Máximo	1,15	1,20	1,39

Realizado por: Luis Villarroel, 2015.

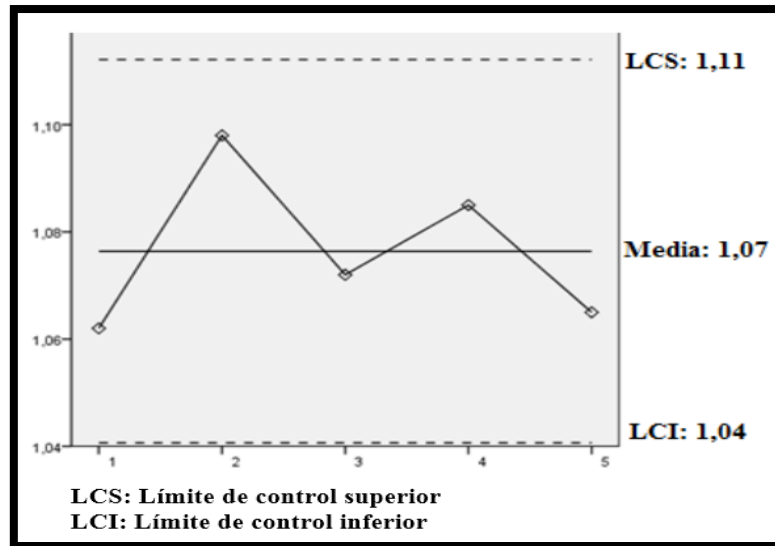
Las microesferas mucoadhesivas obtenidas en cada formulación presentaron una morfología esférica a simple vista, pero a la luz del microscopio presentan una forma esferoide e irregular. En cuanto al tamaño, las microesferas de la formulación 1,2 y 3 tienen de diámetro equivalente de $1,08 \pm 0.04$; $1,18 \pm 0.02$ y $1,32 \pm 0.04$ mm, respectivamente.

Según referencias bibliográficas se conoce que el tamaño de las microesferas oscila entre 1 y 1000 nm (Lozano et al., 2012, pp. 78-102), sin embargo, algunas investigaciones afirman que por el método de microencapsulación por extrusión se pueden obtener partículas que van desde 1 a 2 mm de diámetro (Pasin, et al., 2012, pp. 130-151), así mismo, otros estudios aseveran que mediante la técnica de gelificación iónica se pueden obtener partículas con tamaños que oscilan entre 1 a 5 mm (Calero et al., 2008, pp. 27-30). Actualmente no existen valores de tamaños de partículas que se consideren adecuados, sin embargo, se conoce que a medida que el tamaño de partícula disminuye, el área superficial aumenta (Sáez et al., 2003). Esta área superficial resulta importante ya que se encuentra íntimamente relacionada con la velocidad de disolución y con otros fenómenos como la mucoadhesión (Vallejo et al., 2008, pp. 33-61).

3.3.3.1. Control de calidad de tamaños microesferas mucoadhesivas

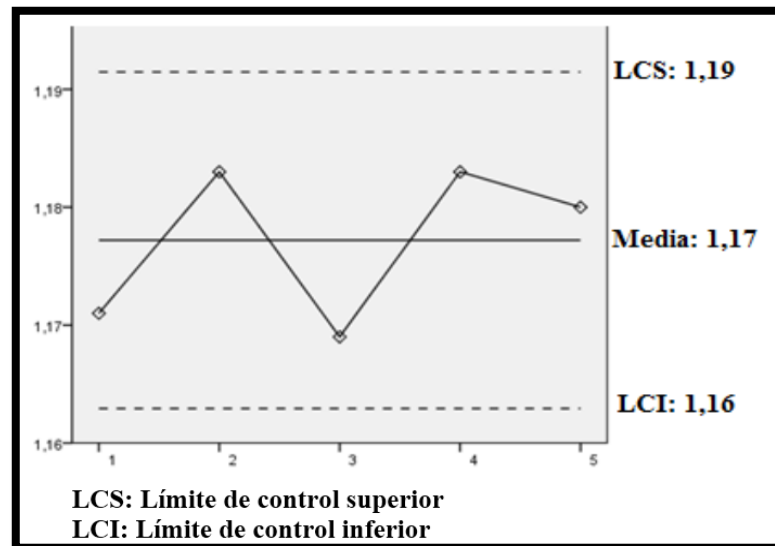
Con el fin de conocer si las microesferas obtenidas con cada formulación presentan un tamaño homogéneo se realizó un análisis de control de calidad, el cual se basa en establecer límites en los cuales las partículas presentan un tamaño estadísticamente adecuado.

Gráfica 3-3. Control de calidad de tamaño de microesferas preparadas con la formulación 1.



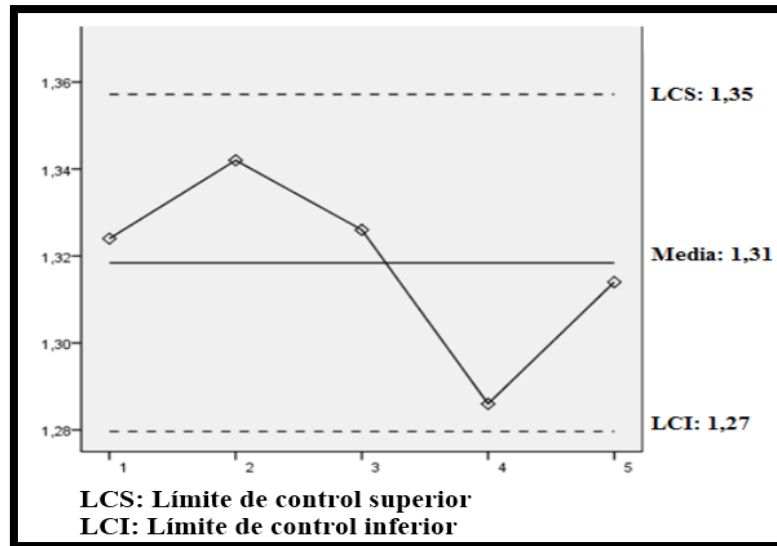
Realizado por: Luis Villarroel, 2015.

Gráfica 4-3. Control de calidad de tamaño de microesferas preparadas con la formulación 2.



Realizado por: Luis Villarroel, 2015.

Gráfica 5-3. Control de calidad de tamaño de microesferas preparadas con la formulación 3.



Realizado por: Luis Villarroel, 2015.

Como se puede observar en las gráficas 3-3; 4-3 y 5-3, las microesferas obtenidas con cada formulación presentan un tamaño estadísticamente óptimo, debido que las medias de los tamaños no sobrepasan los límites establecidos. Por todo lo anterior, se puede decir que el proceso de elaboración se encuentra estandarizado y normalizado.

3.3.3.2. Distribución de frecuencias de tamaños de microesferas mucoadhesivas

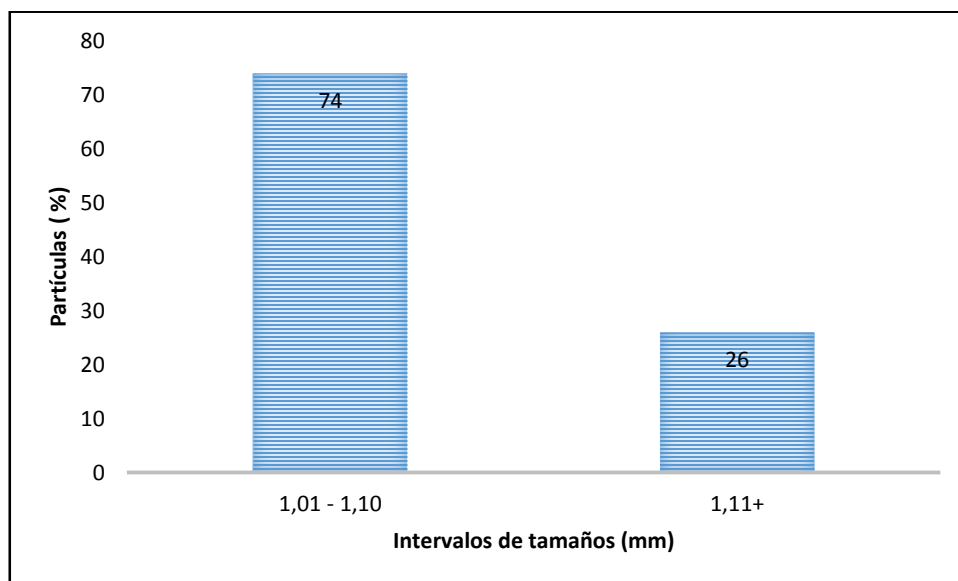
Después de haber determinado que el método de elaboración de microesferas mucoadhesivas se encuentra estandarizado, se realizó un análisis de distribución por frecuencias de los tamaños de las microesferas obtenidas en cada formulación.

Cuadro 19-3. Distribución de frecuencias de tamaños de microesferas mucoadhesivas preparadas con la formulación 1.

Intervalo de tamaño (mm)	Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje acumulado
1,01 - 1,10	37	74	74
1,11+	13	26	100
Total	50	100	

Realizado por: Luis Villarroel, 2015.

Gráfica 6-3. Distribución de frecuencias de tamaños de microesferas mucoadhesivas preparadas con la formulación 1.



Realizado por: Luis Villarroel, 2015.

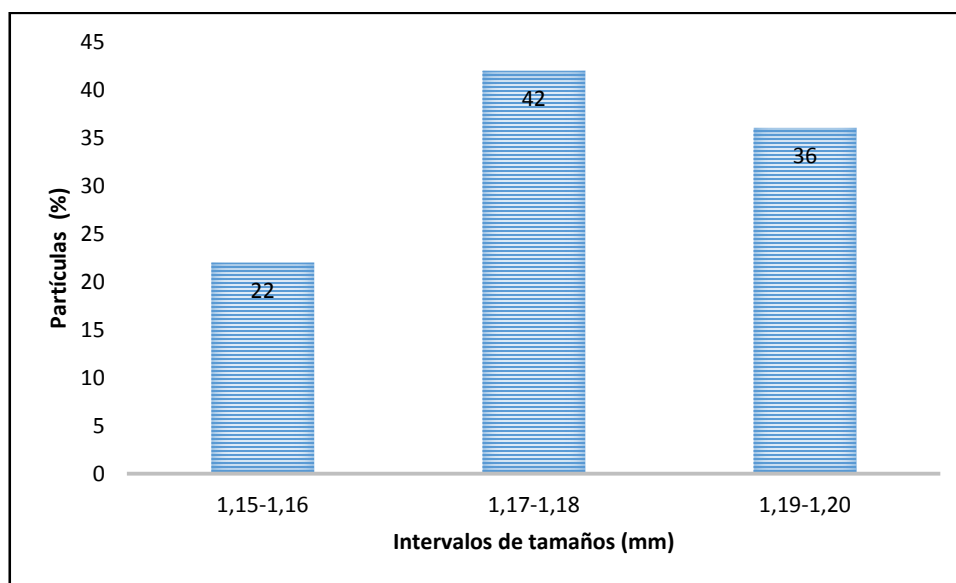
Como puede observarse en el cuadro 21-3, el 74 % de las partículas preparadas con la formulación 1 cumplen con el requisito de tamaño establecido en fuentes bibliográficas para ser consideradas microesferas, mientras el 26 % restante se las puede denominar macropartículas (Lozano et al., 2012, pp. 78-102).

Cuadro 20-3: Distribución de frecuencias de tamaños de microesferas mucoadhesivas preparadas con la formulación 2.

Intervalo de tamaño (mm)	Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje acumulado
1,15-1,16	11	22	22
1,17-1,18	21	42	64
1,19-1,20	18	36	100
Total	50	100	

Realizado por: Luis Villarroel, 2015.

Gráfica 7-3. Distribución de frecuencias de tamaños de microesferas mucoadhesivas preparadas con la formulación 2.



Realizado por: Luis Villarroel, 2015.

En la distribución de tamaños de la formulación 2, se puede observar que el mayor porcentaje de partículas (42%) se encuentra entre un tamaño de 1,17 y 1,18 mm (Gráfica 7-3) lo cual concuerda

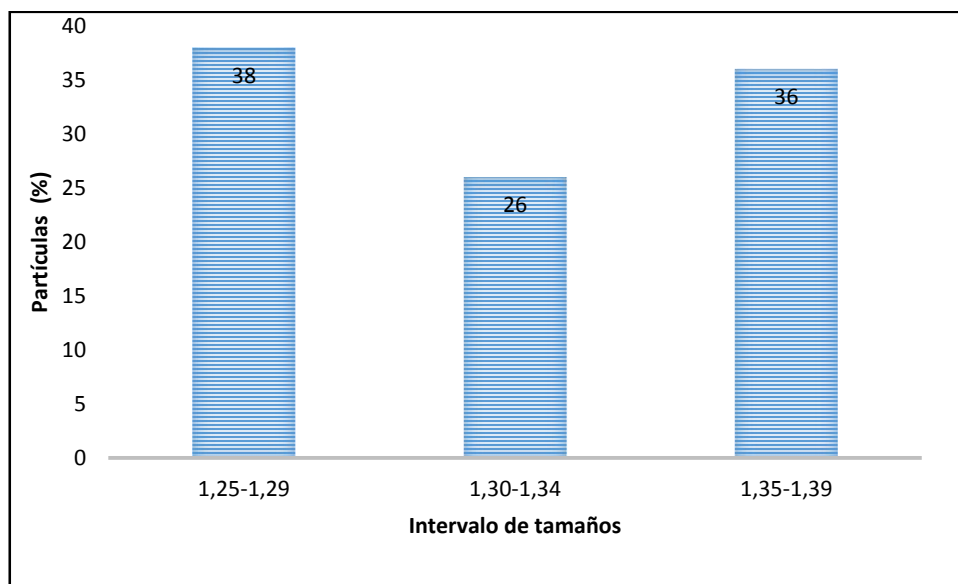
con la media de los tamaño, por lo que no se ajusta a los criterios de tamaño establecidos para ser consideradas micropartículas.

Cuadro 21-3: Distribución de frecuencias de tamaños de microesferas mucoadhesivas preparadas con la formulación 3.

Intervalo de tamaño (mm)	Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje acumulado
1,25-1,29	19	38	38
1,30-1,34	13	26	64
1,35-1,39	18	36	100
Total	50	100	

Realizado por: Luis Villarroel, 2015.

Gráfica 8-3: Distribución de frecuencias de tamaños de microesferas mucoadhesivas preparadas con la formulación 3.



Realizado por: Luis Villarroel, 2015.

Con respecto a la formulación 3, se puede observar el mayor porcentaje de partículas se encuentra distribuido entre tamaños de 1,25-1,29 y 1,35-1,39; razón por la cual son consideradas macropartículas

3.3.4. Evaluación de la Mucoadhesividad “In vitro”

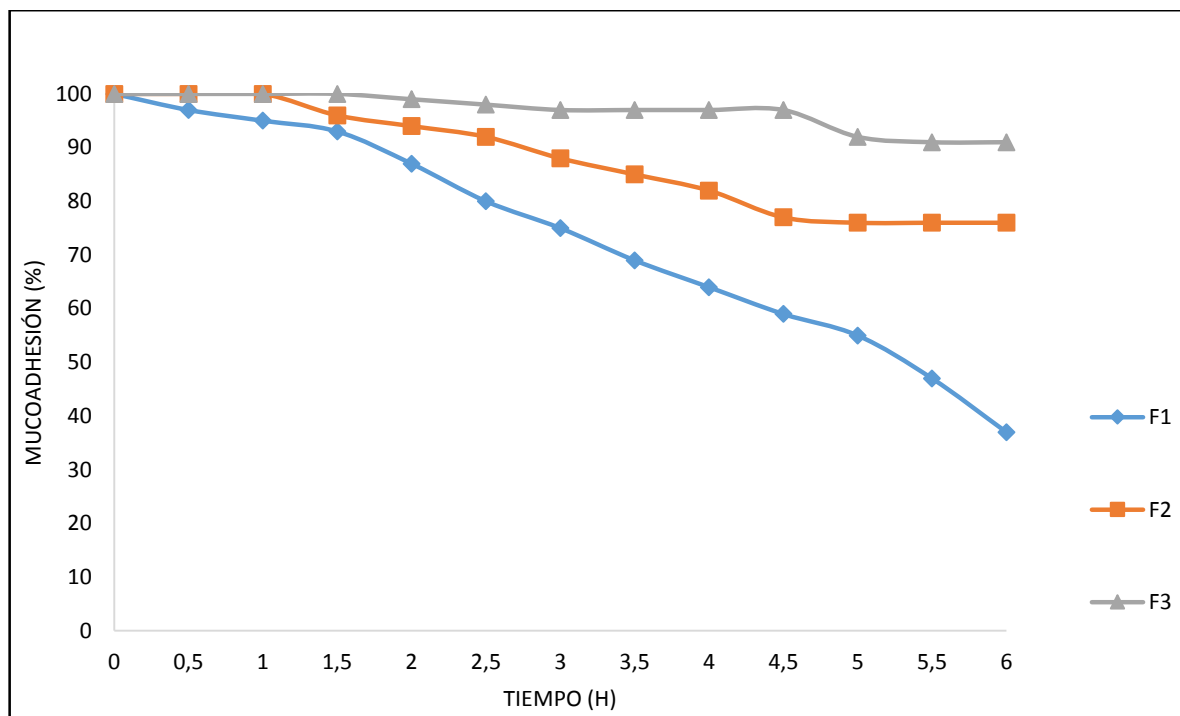
Se realizó el ensayo de mucoadhesión utilizando las microesferas de los cinco lotes de cada formulación. En el cuadro 22-3 se indican el promedio de microesferas adheridas y su respectivo porcentaje de mucoadhesión en cada periodo de tiempo.

Cuadro 22-3: Mucoadhesión de microesferas preparadas con la formulación 1, 2 y 3

Tiempo (min)	Formulación 1		Formulación 2		Formulación 3	
	Mucoadhesión (und)	Mucoadhesión (%)	Mucoadhesión (und)	Mucoadhesión (%)	Mucoadhesión (und)	Mucoadhesión (%)
0	20,00 ± 0,0	100	20,00 ± 0,0	100	20,00 ± 0,0	100
30	19,40 ± 0,54	97	20,00 ± 0,0	100	20,00 ± 0,0	100
60	19,00 ± 0,70	95	19,00 ± 0,0	95	20,00 ± 0,0	100
90	18,60 ± 1,14	93	19,20 ± 1,30	96	20,00 ± 0,0	100
120	17,40 ± 1,51	87	18,80 ± 1,30	94	19,80 ± 0,45	99
150	16,00 ± 1,23	80	18,40 ± 1,14	92	19,60 ± 0,55	98
180	15,00 ± 1,23	75	17,60 ± 1,82	88	19,40 ± 0,55	97
210	13,80 ± 1,92	69	17,00 ± 1,0	85	19,40 ± 0,55	97
240	12,80 ± 2,05	64	16,40 ± 1,14	82	19,40 ± 0,55	97
270	11,80 ± 1,92	59	15,40 ± 1,14	77	19,40 ± 0,55	97
300	11,00 ± 1,41	55	15,20 ± 1,30	76	18,40 ± 0,55	92
330	9,40 ± 2,19	47	15,20 ± 1,30	76	18,20 ± 0,83	91
360	7,40 ± 1,14	37	15,20 ± 0,83	76	18,20 ± 0,83	91

Realizado por: Luis Villarroel, 2015.

Gráfica 9-3: Mucoadhesión de microesferas en función al tiempo



Realizado por: Luis Villarroel, 2015.

Para probar diferencias en la mucoadhesión, se aplicó un test de Kruskal Wallis, para un valor de significancia de $\alpha=0,05$, que proceden de poblaciones de lotes con similares medianas y cuya medición se hace en base a tiempos que responden a una escala ordinal.

Cuadro 23-3: Test de Kuskal Wallis de mucoadhesión de microesferas

	Adhesión
Chi-cuadrado	58,123
Df	12
Asymp. Sig.	0

Realizado por: Luis Villarroel, 2015.

Después de realizar un test de Kuskal Wallis se determinó que con 95 % de confianza, la mucoadhesión que presentan las microesferas preparadas con la formulación F1, F2 y F3, es estadísticamente diferente (Cuadro 23-3), es decir, la concentración de polímeros influye directamente en la propiedad mucoadhesiva de las microesferas, siendo así que la formulación 1, 2 y 3 presenta 37, 76 y 91% de mucoadhesión, en un tiempo de 6 horas (Gráfica 9-3), con lo que se comprueba que a medida que incrementa la concentración de polímeros, aumenta también la capacidad mucoadhesiva de la forma farmacéutica (Reddy et al., 2012, pp. 93-96).

En referencias bibliográficas, en donde se prepararon microesferas con concentraciones de polímeros similares a las de este estudio, se consiguieron porcentajes de mucoadhesión de 70, 85 y 95% (Reddy et al., 2012, pp. 93-96). No obstante, se conoce que estos sistemas pueden presentar un porcentaje de mucoadhesión entre un 40 y 70% (Patel et al., 2005, pp. 49-55). Por otro lado, existen publicaciones donde el porcentaje de mucoadhesión varían considerablemente; así por ejemplo: 40 a 75 % (Fernandes et al., 2013, pp. 116-124), entre 4 a 8 %, (Zhang, et al., 2013, pp. 334-346) con 68 %, (Nappinnai y Sivanewari, 2013, pp. 304-309), con 39 %; (Kyada et al., 2014, pp. 61-68) entre un 10 a 30 %; (Malik et al., 2014, pp. 109-124) entre 78 a 95 % y entre un 75 a 90% (Ige et al., 2015, pp. 26-32). Sin embargo, no existen especificaciones oficiales de un porcentaje de mucoadhesión que se considere adecuado para un sistema mucoadhesivo de vía oral.

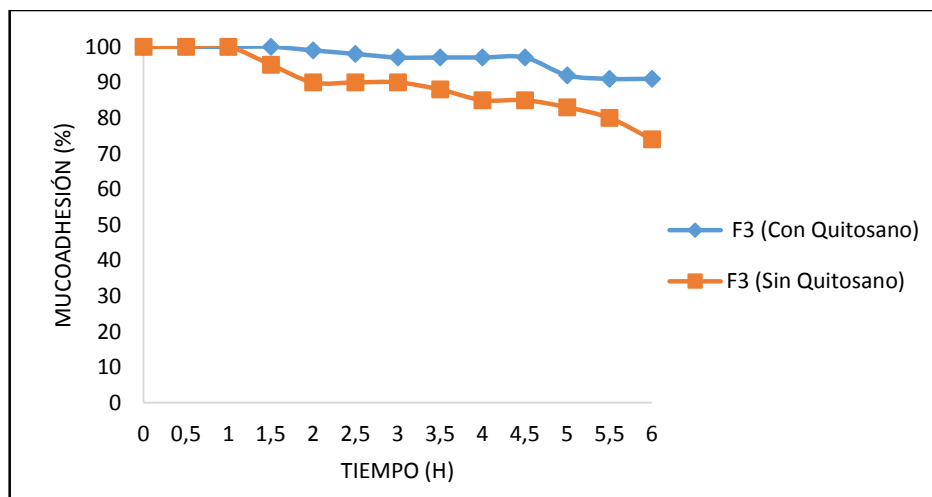
Según investigaciones realizadas, el tiempo de adhesión de un sistema bioadhesivo puede prolongarse con el uso de Quitosano (George et al., 2006, pp. 1-14) (Wittaya-areekul et al., 2006, pp. 113-118), por lo que con el fin de confirmar si éste polímero tiene la capacidad de aumentar dicha propiedad, se llevó a cabo un ensayo de mucoadhesión utilizando las microesferas de la formulación con mayor capacidad mucoadhesiva y sin Quitosano. A continuación se muestra los porcentajes de mucoadhesión promedios de la formulación 3 con Quitosano y sin Quitosano (Cuadro 24-3).

Cuadro 24-3: Mucoadhesión comparativa entre la formulación 3 con Quitosano y sin Quitosano

Tiempo (h)	F3 (Con Quitosano)		F3 (Sin Quitosano)	
	Microesferas Mucoadheridas (und)	Mucoadhesión (%)	Microesferas Mucoadheridas (und)	Mucoadhesión (%)
0	20,00 ± 0,0	100	20,00 ± 0,0	100
30	20,00 ± 0,0	100	20,00 ± 0,0	100
60	20,00 ± 0,0	100	20,00 ± 0,0	100
90	20,00 ± 0,0	100	19,49 ± 0,71	95
120	19,80 ± 0,45	99	18,97 ± 1,41	90
150	19,60 ± 0,55	98	18,20 ± 0,28	90
180	19,40 ± 0,55	97	18,20 ± 0,28	90
210	19,40 ± 0,55	97	17,80 ± 0,28	88
240	19,40 ± 0,55	97	17,49 ± 0,71	85
270	19,40 ± 0,55	97	16,90 ± 0,14	85
300	18,40 ± 0,55	92	16,70 ± 0,14	83
330	18,20 ± 0,83	91	15,49 ± 0,71	80
360	18,20 ± 0,83	91	14,49 ± 0,71	74

Realizado por: Luis Villarroel, 2015.

Gráfica 10-3. Mucoadhesión comparativa entre la formulación 3 con Quitosano y sin Quitosano en función al tiempo



Realizado por: Luis Villarroel, 2015

Cuadro 25-3. Análisis de varianzas (ANOVA) de mucoadhesión comparativa entre la formulación 3 con Quitosano y sin Quitosano en función al tiempo

	Suma de cuadrados	Df	Media de cuadrados	F	Significancia
Entre Grupos	0,009	3	0,002	1,52	0,23
Dentro de Grupos	0,067	88	0,001		
Total	0,076	90			

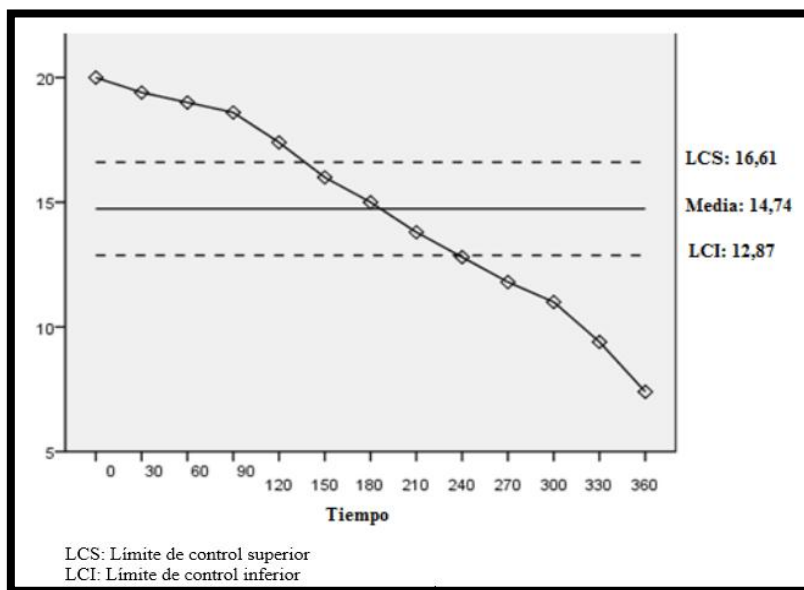
Realizado por: Luis Villarroel, 2015.

Después de realizar un análisis de varianza, se determinó que con un 95 % de confianza, existen diferencias significativas en la mucoadhesión entre las microesferas preparadas sin Quitosano y las preparadas utilizando la formulación 3 con Quitosano, es decir, la presencia de este polímero en las microesferas aumenta el tiempo de permanencia del sistema mucoadhesivo, lo que concuerda con lo expuesto en investigaciones realizadas (George et al., 2006, pp. 1-14) (Wittaya-areekul et al., 2006, pp. 113-118).

3.3.4.1. *Control de calidad de mucoadhesión de las microesferas*

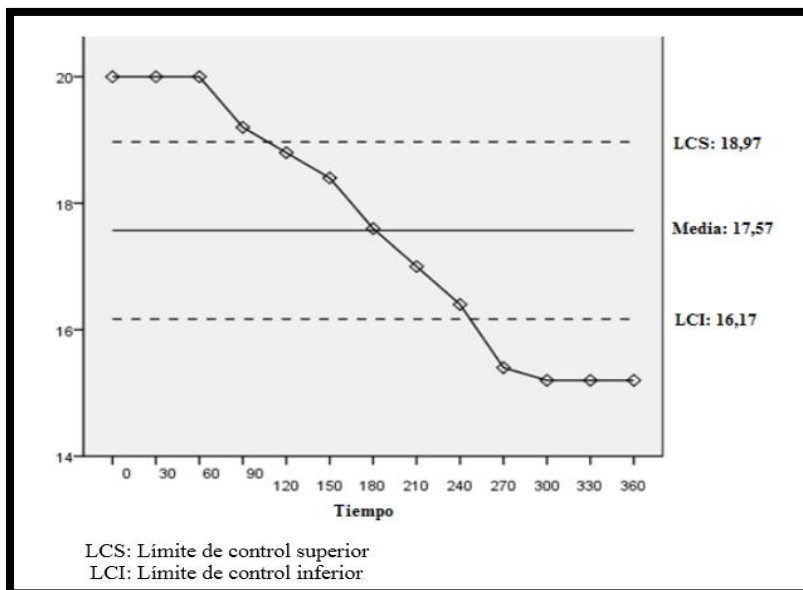
Al realizar el análisis de control de calidad se conoció el intervalo de tiempo, es decir, el límite inferior y superior del tiempo del ensayo en el que ocurre la mucoadhesión óptima de las microesferas. A continuación se presentan las gráficas que representan los resultados para cada formulación

Gráfica 11-3. Control de calidad de mucoadhesión de microesferas preparadas con la formulación 1



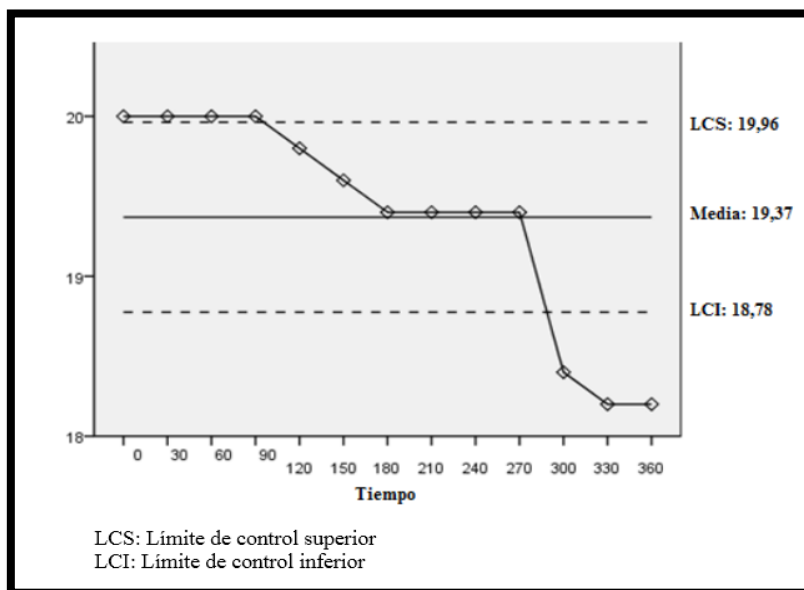
Realizado por: Luis Villarroel, 2015.

Gráfica 12-3. Control de calidad de mucoadhesión de microesferas preparadas con la formulación 2.



Realizado por: Luis Villarroel, 2015.

Gráfica 13-3: Control de calidad de mucoadhesión de microesferas preparadas con la formulación 3.



Realizado por: Luis Villarroel, 2015.

En la gráfica 11-3 y 12-3, se observa que las microesferas preparadas con la formulación 1 y 2, presentan una mucoadhesión óptima hasta un tiempo de 240 minutos, pasado este tiempo la mucoadhesión de las microesferas no ubican dentro los límites de tiempo establecidos, mientras que las microesferas de la formulación 3 presentan una mucoadhesión óptima hasta los 270 minutos (Gráfica 13-3). Esta diferencia en el tiempo de mucoadhesión podría deberse a un aumento en la concentración de polímeros presentes en esta formulación.

CONCLUSIONES

Se logró estandarizar los parámetros del método de elaboración de microesferas mucoadhesivas preparadas mediante la técnica de gelificación iónica, normalizándose el tipo de instrumento de goteo, la altura de éste y el sistema de secado. El uso de la jeringa de 20 mL sin aguja resultó ser el instrumento de goteo más eficiente y se encontró que para cada formulación dependiendo de la concentración de los polímeros, la altura para la obtención de microesferas adecuadas fue diferente, obteniéndose que al aumentar la concentración de Alginato sódico, se requiere una mayor altura de goteo. Así mismo, se determinó que las condiciones ideales para el secado fueron a temperatura ambiente (20-25°C) por 20 horas en un desecador de bandeja.

Se prepararon con la técnica estandarizada, cinco lotes de microesferas para cada formulación, las que al evaluarse mediante microscopía óptica, presentaron una morfología esférica. Sin embargo, los diámetros equivalentes obtenidos mostraron un tamaño para la formulación 1, 2 y 3 de 1,08; 1,18 y 1,32 mm, respectivamente, por lo que solamente la primera formulación cumple con las especificaciones de tamaño (1000 ± 10 nm) establecidas en referencias bibliográficas para ser consideradas microesferas. En tal sentido, las formulaciones 2 y 3 al presentar un tamaño mayor corresponden a partículas poliméricas, denominadas macropartículas.

Al evaluar las propiedades mucoadhesivas de las partículas poliméricas mediante el método “*In vitro*” “Wash-off”, se determinó que la formulación 3 presentó mejor capacidad mucoadhesiva en comparación con la formulación 1 y 2, por lo que se establece que la capacidad adhesiva de la microesferas es directamente proporcional a la concentración de polímeros. De la misma manera, se confirmó que la presencia de Quitosano en la forma farmacéutica aumenta dicha propiedad

Esta investigación permite establecer una formulación y técnica de preparación de partículas poliméricas (macropartículas) a nivel magistral con capacidad mucoadhesiva, constituyendo una oportunidad para la posterior incorporación de fármacos.

RECOMENDACIONES

Determinar en futuras investigaciones la eficiencia de encapsulación y cesión de fármaco en las partículas poliméricas obtenidas mediante la técnica de gelificación iónica.

Se recomienda que en proyectos posteriores en las que se emplee la técnica de gelificación iónica, se optimice el método de elaboración, con la finalidad de obtener mejoras en el tamaño, morfología y rendimiento de producción de las microesferas.

Implementar la técnica de encapsulación por gelificación iónica como práctica de laboratorio en la cátedra de Tecnología Farmacéutica, como alternativa de investigación, para que los estudiantes se familiaricen con dicha técnica y los beneficios que aportan las formas farmacéuticas mucoadhesivas.

BIBLIOGRAFÍA

AFTABROUCHAD, Chéhérazad; DOELKER, Eric. *Méthodes de préparation des microparticules biodégradables chargées en principes actifs hydrosolubles.* STP pharma sciences, 1992, vol. 2, no 5, pp. 365-380.

ALDANA, Jose; WANG, Y. Andrew; PENG, Xiaogang. *Photochemical instability of CdSe nanocrystals coated by hydrophilic thiols.* Journal of the American Chemical Society, 2001, vol. 123, no 36, pp. 8844-8850.

ANDREWS, Gavin P.; LAVERTY, Thomas P.; JONES, David S. *Mucoadhesive polymeric platforms for controlled drug delivery.* European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 2009, vol. 71, no 3, pp. 505-518.

ANDUEZA, Isabel; ÁVILA, Gisela; ATTIAS, Doris. *Caracterización física de hidroxipropilmetilcelulosa con potencial aplicación oftalmológica: pH, tensión superficial, característica de la película.* Journal of the Mexican Chemical Society, 2000, vol. 44, no 3, pp. 224-228.

ARVIZU-HIGUERA, Dora Luz, et al. *Parámetros que afectan la conversión del ácido algínico en alginato de sodio* Parameters affecting the conversion of alginic acid to sodium alginate. Ciencias Marinas, 2002, vol. 28, no 1, pp. 27-36.

AVENDAÑO-ROMERO, G.; LÓPEZ-MALO, A.; PAOLU, E. *Propiedades del alginato y aplicaciones en alimentos.* Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos, 2013, vol. 7, no 1, pp. 87-96.

BECHERÁN-MARÓN, L.; PENICHE, C.; ARGÜELLES-MONAL, W. *Study of the interpolyelectrolyte reaction between chitosan and alginate: influence of alginate composition and chitosan molecular weight.* International journal of biological macromolecules, 2004, vol. 34, no 1, pp. 127-133.

BODDUPALLI, Bindu M., et al. *Mucoadhesive drug delivery system: An overview.* Journal of advanced pharmaceutical technology & research, 2010, vol. 1, no 4, pp. 381.

BRUSCHI, M. *Oral bioadhesive drug delivery systems.* Drug development and industrial pharmacy, 2005, vol. 31, no 3, pp. 293-310.

CALERO, José, et al. *Elaboración y Caracterización de microcápsulas gastrorresistentes de Diclofenac obtenidas por Gelificación Iónica.* Universitas (León). Revista Científica de la UNAN-León., 2008, vol. 2, no 1, pp. 27-30.

CALLENS, Catherine; REMON, Jean Paul. *Evaluation of starch–maltodextrin–Carbopol® 974 P mixtures for the nasal delivery of insulin in rabbits.* Journal of controlled release, 2000, vol. 66, no 2, pp. 215-220.

CARE, Fundación Pharmaceutical, et al. *Tercer consenso de Granada sobre problemas relacionados con medicamentos (PRM) y resultados negativos asociados a la medicación (RNM).* 2007.

CARVALHO, Flávia Chiva, et al. *Mucoadhesive drug delivery systems.* Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences, 2010, vol. 46, no 1, pp. 1-17.

CESCHEL, G. C., et al. *Development of a mucoadhesive dosage form for vaginal administration.* Drug development and industrial pharmacy, 2001, vol. 27, no 6, pp. 541-547.

CHÁVARRI, María, et al. *Microencapsulation of a probiotic and prebiotic in alginate-chitosan capsules improves survival in simulated gastro-intestinal conditions.* International journal of food microbiology, 2010, vol. 142, no 1, pp. 185-189.

CHIAPPETTA, Diego A., et al. *Comprimidos Bioadhesivos formulados con excipientes hidrofílicos para uso bucofaríngeo.* Acta farmacéutica bonaerense, 2007, vol. 25, no 3, pp. 360.

CHO, Young In; NO, Hong Kyoony; MEYERS, Samuel P. *Physicochemical characteristics and functional properties of various commercial chitin and chitosan products.* Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1998, vol. 46, no 9, pp. 3839-3843.

CRCAREVSKA, Maja Simonoska; DODOV, Marija Glavas; GORACINOVA, Katerina. *Chitosan coated Ca–alginate microparticles loaded with budesonide for delivery to the inflamed colonic mucosa.* European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 2008, vol. 68, no 3, pp. 565-578.

DOHNAL, Jiří; ŠTĚPÁNEK, František. *Inkjet fabrication and characterization of calcium alginate microcapsules.* Powder Technology, 2010, vol. 200, no 3, pp. 254-259.

DOMÍNGUEZ P. *Nuevas formas farmacéuticas de liberación modificada: revisión y relevancia.* 2008 Hoja de evaluación de medicamentos 9(1): pp. 5-8

DONNERSBERGER, Anne B.; LESAK, Anne E. *Libro de laboratorio de anatomía y fisiología.* Editorial Paidotribo, 2002, pp. 223-234.

DRAGET, Kurt I., et al. *Ionic and acid gel formation of epimerised alginates; the effect of AlgE4.* International journal of biological macromolecules, 2000, vol. 27, no 2, pp. 117-122.

FANG, Zhongxiang; BHANDARI, Bhesh. *Encapsulation of polyphenols—a review.* Trends in Food Science & Technology, 2010, vol. 21, no 10, pp. 510-523.

FERNANDES, Mariana, et al. *Modulation of stability and mucoadhesive properties of chitosan microspheres for therapeutic gastric application.* International journal of pharmaceutics, 2013, vol. 454, no 1, pp. 116-124.

FUENTES, J.; DE RAMOS, AL López. *Nuevo método para medir la tensión superficial mediante la técnica de la gota colgante.* Información tecnológica, 2001, vol. 12, no 2, pp. 181-188.

FREUND, John E.; MILLER, Irwin; MILLER, Marylees. *Estadística matemática con aplicaciones.* Pearson Educación, 2000, p 25-58.

FUNDUEANU, Gheorghe, et al. *Preparation and characterization of Ca-alginate microspheres by a new emulsification method.* International journal of pharmaceutics, 1998, vol. 170, no 1, pp. 11-21.

FUNAMI, Takahiro, et al. *Rheological properties of sodium alginate in an aqueous system during gelation in relation to supermolecular structures and Ca²⁺ binding.* Food Hydrocolloids, 2009, vol. 23, no 7, pp. 1746-1755

GARCÍA COUCE, Jomarlen, et al. *Recubrimiento de microesferas de quitosana-ibuprofeno con un complejo interpolimérico pH dependiente.* Revista Cubana de Farmacia, 2014, vol. 48, no 4, pp. 646-657.

GARRAIT, Ghislain; BEYSSAC, Eric; SUBIRADE, Muriel. *Development of a novel drug delivery system: chitosan nanoparticles entrapped in alginate microparticles.* Journal of microencapsulation, 2014, vol. 31, no 4, pp. 363-372.

GENTA, I., et al. *Bioadhesive microspheres for ophthalmic administration of acyclovir.* Journal of pharmacy and pharmacology, 1997, vol. 49, no 8, pp. 737-742.

GEORGE, Meera; ABRAHAM, T. Emilia. *Polyionic hydrocolloids for the intestinal delivery of protein drugs: alginate and chitosan—a review.* Journal of controlled release, 2006, vol. 114, no 1, pp. 1-14.

GHARSALLAOUI, Adem, et al. *Applications of spray-drying in microencapsulation of food ingredients: An overview.* Food Research International, 2007, vol. 40, no 9, pp. 1107-1121.

GOMBOTZ, Wayne R.; WEE, Siow Fong. *Protein release from alginate matrices.* Advanced drug delivery reviews, 2012, vol. 64, pp. 194-205.

GONZÁLEZ-RODRIGUEZ, M. L., et al. *Alginate/chitosan particulate systems for sodium diclofenac release.* International Journal of Pharmaceutics, 2002, vol. 232, no 1, pp. 225-234.

GOUIN, Sebastien. *Microencapsulation: industrial appraisal of existing technologies and trends.* Trends in food science & technology, 2004, vol. 15, no 7, pp. 330-347.

HARI, P. R.; CHANDY, Thomas; SHARMA, Chandra P. *Chitosan/calcium alginate microcapsules for intestinal delivery of nitrofurantoin.* Journal of microencapsulation, 1996, vol. 13, no 3, pp. 319-329.

HARRIS EXPÓSITO, Ruth. *Quitosano, un biopolímero con aplicaciones en sistemas de liberación controlada de fármacos.* (Tesis doctoral). Universidad Complutense de Madrid. Facultad de Farmacia. Madrid-España. 2010, pp. 10-112.

HERNÁNDEZ DÁVILA, César Augusto. *Elaboración y caracterización de Microcápsulas mediante Gelificación Iónica externa, de la fracción alcaloidea de (Ilex guayusa) con alginato sódico, y su utilización en la formulación de una forma de dosificación sólida.* (Tesis Pregrado) Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. Facultad de Ciencias. Escuela de Bioquímica y Farmacia. Riobamba-Ecuador. 2015, pp. 15-88.

HELGERUD, Trond, et al. *Alginates. Food stabilisers, thickeners and gelling agents.* Wiley-Blackwell, Oxford, 2010, pp. 50-72.

IGE, Pradum Pundlikrao; AGRAWAL, Kapil; PATIL, Upesh. *Enhanced in vitro dissolution of Iloperidone using Caesalpinia Pulcherrima mucoadhesive microspheres.* Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences, 2015, vol. 4, no 1, pp. 26-32.

ISSA, Mohamed M.; KÖPING-HÖGGÅRD, Magnus; ARTURSSON, Per. *Chitosan and the mucosal delivery of biotechnology drugs.* Drug Discovery Today: Technologies, 2005, vol. 2, no 1, pp. 1-6.

ILLUM, Lisbeth; FARRAJ, Nidal F.; DAVIS, Stanley S. *Chitosan as a novel nasal delivery system for peptide drugs.* Pharmaceutical research, 1994, vol. 11, no 8, pp. 1186-1189.

ILLUM, L., et al. *Chitosan as a novel nasal delivery system for vaccines.* Advanced drug delivery reviews, 2001, vol. 51, no 1, pp. 81-96.

JACKSON, D., et al. *Estudio comparativo de biodisponibilidad entre dos formulaciones diferentes de omeprazol tras su administrtación por vía oral a voluntarios sanos.* Farmacia Hospitalaria, 2000, vol. 24, no 1, pp. 32-37.

KALYANKAR, T. M., et al. *Bioadhesive drug delivery systems, A Review.* Journal of Pharmacy Research, 2010, vol. 3, no 7, pp. 23-29.

KHAN, Tanveer Ahmad; PEH, Kok Khiang; CH'NG, Hung Seng. *Reporting degree of deacetylation values of chitosan: the influence of analytical methods.* J Pharm Pharmaceut Sci, 2002, vol. 5, no 3, pp. 205-212.

KOSOBE, Toshiyuki, et al. *Size and surface charge effect of 5-aminolevulinic acid-containing liposomes on photodynamic therapy for cultivated cancer cells.* Drug development and industrial pharmacy, 2005, vol. 31, no 7, pp. 623-629.

KRASAEEKOOPT, Wunwisa; BHANDARI, Bhesh; DEETH, Hilton. *Evaluation of encapsulation techniques of probiotics for yoghurt.* International Dairy Journal, 2003, vol. 13, no 1, pp. 3-13.

KYADA, C.; RANCH, K.; SHAH, D. *Optimization of Mucoadhesive Microspheres of Acyclovir by Applying 3 2 Full Factorial Design.* Journal of Drug Delivery Science and Technology, 2014, vol. 24, no 1, pp. 61-68.

LAHOTI, Sandeep S., et al. *Mucoadhesive Drug Delivery System: A Review.* Ind Glob J Pharm Sci, 2011, vol. 1, pp. 243-251.

LAMAS, M. C., et al. *Hydrogel microspheres for flutamide obtained by multiple emulsions.* STP pharma sciences, 1998, vol. 8, no 6, pp. 375-378.

LEJOYEUX, F.; PONCHEL, G.; DUCHÊNE, D. *Influence of some technological parameters on the bioadhesive characteristics of polyacrylic acid matrices.* STP Pharma, 1989, vol. 5, no 12, pp. 893-898.

LOPEZ C., Lya C.; VILLALTA H, Marvin A., *Propuesta de un método para la elaboración de microesferas matriciales de ácido acetilsalicílico utilizando alginato de sodio por la técnica de gelificación iónica.* (Tesis pregrado). (Química Farmacéutica), Universidad del Salvador, Facultad Química y Farmacia. San Salvador-El Salvador. 2009, pp. 29.

LOZANO, M. C.; CÓRDOBA, D.; CÓRDOBA, M. *Manual de Tecnología Farmacéutica.* 2012, pp. 78-102.

MALIK, Raj Kaur, et al. *Fabrication and in vitro evaluation of mucoadhesive ondansetron hydrochloride beads for the management of emesis in chemotherapy.* International journal of pharmaceutical investigation, 2013, vol. 3, no 1, pp. 42.

MALIK, Rafi, et al. *Polymeric nanofibers: targeted gastro-retentive drug delivery systems.* Journal of drug targeting, 2014, vol. 23, no 2, pp. 109-124.

MARTÍN, María J., et al. *Development of alginate microspheres as nystatin carriers for oral mucosa drug delivery.* Carbohydrate polymers, 2015, vol. 117, pp. 140-149.

MENNINI, N., et al. *Quality by design approach for developing chitosan-Ca-alginate microspheres for colon delivery of celecoxib-hydroxypropyl- β -cyclodextrin-PVP complex.* European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 2012, vol. 80, no 1, pp. 67-75.

MLADENOVSKA, Kristina, et al. *5-ASA loaded chitosan-Ca-alginate microparticles: Preparation and physicochemical characterization.* International Journal of Pharmaceutics, 2007, vol. 345, no 1, pp. 59-69.

MOFIDI, N.; AGHAI-MOGHADAM, M.; SARBOLOUKI, M. N. *Mass preparation and characterization of alginate microspheres.* Process Biochemistry, 2000, vol. 35, no 9, pp. 885-888.

NAPPINNAI, M.; SIVANESWARI, S. *Formulation optimization and characterization of gastroretentive cefpodoxime proxetil mucoadhesive microspheres using 3 2 factorial design.* Journal of Pharmacy Research, 2013, vol. 7, no 4, pp. 304-309.

NAYAK, Amit Kumar; PAL, Dilipkumar; SANTRA, Kousik. *Tamarind seed polysaccharide–gellan mucoadhesive beads for controlled release of metformin HCl.* Carbohydrate polymers, 2014, vol. 103, pp. 154-163.

NO, H. K., et al. *Antibacterial activities of chitosans and chitosan oligomers with different molecular weights on spoilage bacteria isolated from tofu.* Journal of Food Science, 2002, vol. 67, no 4, pp. 1511-1514.

PAL, Dilipkumar; NAYAK, Amit Kumar. *Novel tamarind seed polysaccharide-alginate mucoadhesive microspheres for oral gliclazide delivery: in vitro–in vivo evaluation.* Drug Delivery, 2012, vol. 19, no 3, pp. 123-131.

PARMAR, H., et al. *Different methods of formulation and evaluation of mucoadhesive microsphere.* International Journal of Applied Biology and Pharmaceutical Technology. (2010) 1(3), pp. 1157-1167.

PARK, S. Y.; MARSH, K. S.; RHIM, J. W. *Characteristics of different molecular weight chitosan films affected by the type of organic solvents.* JOURNAL OF FOOD SCIENCE-CHICAGO-, 2002, vol. 67, no 1, pp. 194-197.

PASIN, Bryshila Lupo; AZÓN, C. G.; GARRIGA, A. M. *Microencapsulación con alginato en alimentos. Técnicas y aplicaciones.* Revista venezolana de Ciencia y Tecnología de Alimentos, 2012, vol. 3, no 1, pp. 130-151.

PATEL, Jayvadan K., et al. *Formulation and evaluation of mucoadhesive glipizide microspheres.* AAPS PharmSciTech, 2005, vol. 6, no 1, pp. 49-55.

PEPPAS, Nicholas A.; HUANG, Yanbin. *Nanoscale technology of mucoadhesive interactions.* Advanced drug delivery reviews, 2004, vol. 56, no 11, pp. 1675-1687.

PÉREZ RUIZ, Andrés A.; LÓPEZ MANTECÓN, Ana Marta; GRAU LEÓN, Ileana. *Antiinflamatorios no esteroideos (AINES): Consideraciones para su uso estomatológico.* Revista Cubana de Estomatología, 2002, vol. 39, no 2, pp. 119-138.

PINA, D. Infante, et al. *Eficacia, tolerancia y seguridad a largo plazo del polietilenglicol 3350 con electrolitos en el tratamiento del estreñimiento funcional en niños.* En *Anales de Pediatría.* Elsevier Doyma, 2014, pp. 278-284.

PONCELET, D. *Production of alginate beads by emulsification/internal gelation.* Annals of the New York Academy of Sciences, 2001, vol. 944, no 1, pp. 74-82.

PORJAZOSKA, ALEKSANDRA, et al. *Poly (lactide-co-glycolide) microparticles as systems for controlled release of proteins-Preparation and characterization.* Acta pharmaceutica, 2004, vol. 54, no 3, pp. 215-229.

RABEA, Entsar I., et al. *Chitosan as antimicrobial agent: applications and mode of action.* Biomacromolecules, 2003, vol. 4, no 6, pp. 1457-1465.

RAHAMATULLAH SHAIKH, Thakur Raghu Raj Singh, et al. *Mucoadhesive drug delivery systems.* Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences, 2011, vol. 3, no 1, pp. 89.

RAMOS PICOS, Diana; GÓMEZ CARRIL, Martha; FERNÁNDEZ MENA, Dianelis. *Métodos de obtención de microesferas biodegradables.* Revista Cubana de Farmacia, 2001, vol. 35, no 2, pp. 126-135.

RATNER, Buddy D., et al. *Biomaterials science: an introduction to materials in medicine*. Academic press, 2004, pp. 34-45.

REDDY, B. VishnuVardhan, et al. *Preparation and in-vitro evaluation of ofloxacin mucoadhesive microspheres*. Int J Pharm Pharm Sci, 2012, vol. 4, no 1, pp. 93-96.

RIBEIRO, Andreia, et al. *α -Tocopherol microencapsulation using chitosan and alginate: swelling behaviour under different pH*. 2012, pp. 433-441.

RINAUDO, Marguerite. *Chitin and chitosan: properties and applications*. Progress in polymer science, 2006, vol. 31, no 7, pp. 603-632.

RODRÍGUEZ-LLIMOS, A. C., et al. *Micropartículas de alginato conteniendo paracetamol*. 2003, pp. 1-5.

RODRÍGUEZ, Olga Viviana; HANSEN, Henry. *Obtención de dextrano y fructosa, utilizando residuos agroindustriales con la cepa *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B512-F*. Revista EIA, 2007, no 7, pp. 159-172.

ROJAS CORTÉS, Manuel; VALLEJO DÍAZ, Bibiana; PERILLA, Jairo. *Los biopolímeros como materiales para el desarrollo de productos en aplicaciones farmacéuticas y de uso biomédico*. Ingeniería e Investigación, 2008, vol. 28, no 1, pp. 57-71.

SAEZ, Vivian; HERNÁNDEZ, José; PENICHE, Carlos. *Las Microesferas como sistemas de liberación controlada de péptidos y proteínas*. Biotecnol Apl, 2007, vol. 24, pp. 98-107.

SALAGER, Jean Louis; ANTON, Raquel. *Métodos de medición de la tensión superficial o interfacial*. Universidad de Los Andes, Facultad de Ingeniería, Escuela de Ingeniería Química, Lab. Formulación, Interfases, Reología y Procesos, Mérida, Venezuela, 2005, pp. 44.

SCHAIQUEVICH, Paula. *Formulaciones de liberación modificada para compuestos psicoactivos*. Volumen XVII-Nº 67–Mayo–Junio 2006, pp. 203.

SAHA, Dipjyoti; BHATTACHARYA, Suwendu. *Hydrocolloids as thickening and gelling agents in food: a critical review.* Journal of food science and technology, 2010, vol. 47, no 6, pp. 587-597.

SHAIKH R., et al. *Mucoadhesive drug delivery systems.* J. Pharm. Bioallied Sci. (2011), 3 (1), pp. 89-100.

SMART, John D. *The basics and underlying mechanisms of mucoadhesion.* Advanced drug delivery reviews, 2005, vol. 57, no 11, pp. 1556-1568.

THE UNITED STATES CONVENTION. *Farmacopea de los Estados Unidos de América: Formulario Nacional, Compendios de normas oficiales.* USP 30 – NF 25. Rockville. USA. 2007

TSAIH, Min Larng; CHEN, Rong Huei. *Molecular weight determination of 83% degree of decetylation chitosan with non-Gaussian and wide range distribution by high-performance size exclusion chromatography and capillary viscometry.* Journal of applied polymer science, 1999, vol. 71, no 11, pp. 1905-1913.

VALLEJO DÍAZ, Bibiana M.; PERILLA, Jairo E. *Elementos conceptuales para estudiar el comportamiento bioadhesivo en polímeros.* Revista Colombiana de Ciencias Químico-Farmacéuticas, 2008, vol. 37, no 1, pp. 33-61.

VOLONTÉ M. G. *Bioadhesive drug delivery systems.* Revista Farmacéutica. (2012). 154 N° 1-2, pp. 56-71.

WITTAYA-AREEKUL, Sakchai; KRUEENATE, Jittiporn; PRAHSARN, Chureerat. *Preparation and in vitro evaluation of mucoadhesive properties of alginate/chitosan microparticles containing prednisolone.* International journal of pharmaceutics, 2006, vol. 312, no 1, pp. 113-118.

YABUR, Ricardo; BASHAN, Yoav; HERNÁNDEZ-CARMONA, Gustavo. *Alginate from the macroalgae Sargassum sinicola as a novel source for microbial immobilization material in wastewater treatment and plant growth promotion.* Journal of Applied Phycology, 2007, vol. 19, no 1, pp. 43-53.

ZAVA, Willie Jaikel, et al. Encapsulación de ácido A-aminolevulínico en microesferas de alginato. *Revista Iberoamericana de Polímeros*, 2014, vol. 15, no 2, pp. 117-125.

ZHANG, Yueling, et al. *Preparation and evaluation of alginate–chitosan microspheres for oral delivery of insulin.* *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 2011, vol. 77, no 1, pp. 11-19.

ZHANG, Tao, et al. *Spray drying tenofovir loaded mucoadhesive and pH-sensitive microspheres intended for HIV prevention.* *Antiviral research*, 2013, vol. 97, no 3, pp. 334-346.

ZUIDAM, Nicolaas Jan; SHIMONI, Eyal. *Overview of microencapsulates for use in food products or processes and methods to make them. Encapsulation technologies for active food ingredients and food processing.* Springer New York, 2010, pp. 3-29.

ANEXOS

Anexo A. Certificado de análisis de Quitosano XI'AN LYPHAR BIOTECH CO., LTD.

Test	Specifications	Result
Deacetylation Degree :	≥85.0%	87.6%
Appearance:	Off-White Powder	Complies
Odor & taste:	Characteristic	Complies
Viscosity(1%):	30-1000mpa.s	78mpa.s
Loss on drying :	≤8.0%	0.28%
Heavy metals:	≤10.0PPM	Complies
Moisture:	≤10.00%	7.1%
Particle Size:	100% Through 80 Mesh Sieve	Complies
Ash:	≤0.75%	0.45%
Microbiology:		
Total Plate Count:	<1000cfu/g	36cfu/g
Yeast & Mold:	<100cfu/g	17cfu/g
E.Coli:	Negative	Complies
S. Aureus:	Negative	Complies
Salmonella:	Negative	Complies
Conclusion:	Conform with specification	

Packing description:	Sealed export grade drum & double of sealed plastic bags
Storage:	Store in cool & dry place not freeze., keep away from strong light and heat
Shelf life:	2 years when properly stored

Quality Assurance Officer: Li Wang	Corrector: Ding Na	Analyst: Li Cheng
--	------------------------------	-----------------------------


Xi'an Lyphar Biotech Co., LTD Tel.: 0086-29-89196322 Fax: 0086-29-85891941
 Add: No. 11, The South of Tangyan Road, Hi-Tech Industrial Zone, Xi'an City, Shaanxi Province, China
 Email: sales@lyphar.com Web: www.lyphar.com

Anexo B. Ficha técnica de Fosfato monobásico de Potasio

 PO0260		Ficha de Datos Técnicos	
Potasio dihidrogenofosfato, para análisis, ACS, ISO, Reag. Ph Eur			
Identificación			
KH_2PO_4 M = 136,09 g/mol CAS [7778-77-0] EC number: 231-913-4 Taric code: 2835 24 00			
Sinónimos			
Potasio bifosfato, Potasio fosfato monobásico			
Aplicaciones			
analytical chemistry; in buffer solutions.			
Especificaciones			
contenido (acidimétrico):	min. 99,5 %	N total	max. 0,001 %
identidad	pasa test	arsénico (As)	max. 0,0002 %
aparición de la solución (10 %, H ₂ O)	clara e incolora	metales pesados (como Pb)	max. 0,001 %
insoluble en agua	max. 0,01 %	hierro (Fe)	max. 0,001 %
pH (5 %, H ₂ O)	4,2 - 4,5	sodio (Na)	max. 0,005 %
cloruros (Cl)	max. 0,0005 %	sustancias reductoras KMnO ₄	pasa test
sulfatos (SO ₄)	max. 0,003 %	pérdida por secado (105 °C, 1h)	max. 0,2 %
Presentaciones			
Presentaciones	Código		
250 g	PO02600250		
500 g	PO02600500		
1 kg	PO02601000		
5 kg	PO0260005P		
25 kg	PO0260025P		
Datos físicos			
• Aspecto: bright crystals, colourless • Densidad específica: 2,34 g/cm ³ • Dens. de amoniamiento: - 1200 kg/m ³ • : (20 °C): 222 g/l • Punto de fusión: - 253 °C (decomposes) • pH(30 g/l H ₂ O, 20 °C) - 4,4			
Datos Toxicológicos			
• WGK: 1 • Poison class CH (Swiss): 5			

Anexo C. Ficha técnica de Alginato de sodio

Alginato de sodio


WOLF CANYON ASIA PACIFIC LTD.

BATCH: 20131120
MANFG DATE: 20 NOV 2013
EXPIRY DATE: 19 NOV 2015

PRODUCT SPECIFICATION

SODIUM ALGINATE

Product: Sodium Alginate is an anionic polysaccharide distributed widely in the cell walls of brown algae, where it, through binding water, forms a viscous gum. In extracted form it absorbs water quickly; it is capable of absorbing 200-300 times its own weight in water. Its colour ranges from white to yellowish-brown. It is sold in filamentous, granular or powdered forms. It is used as a stabilizer, thickener, emulsifier, food additive, and gelling agent in many products such as ice cream, thickening drinks, and cosmetics.

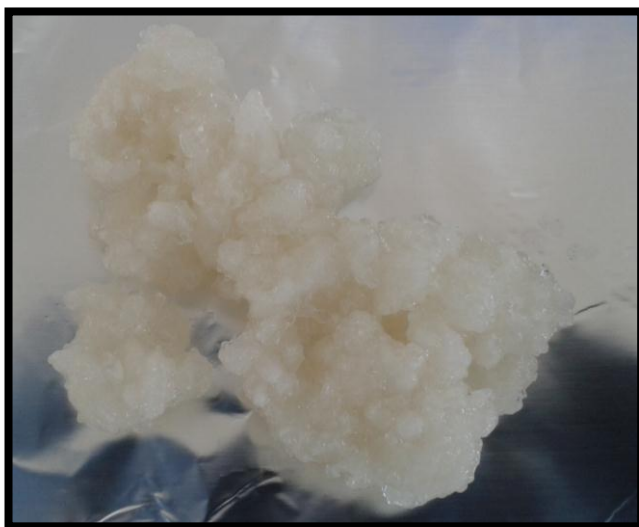
E-Code:	E 401
Chemical Formula:	$C_6H_7O_6Na$
Viscosity:	400 – 600 cps
pH (1% sol.):	6.0 – 8.0
Loss on drying:	15.0% max.
Substances insoluble in water:	2% max.
Formaldehyd:	50 mg/kg max.
Arsenic:	3 mg/kg max.
Lead:	5 mg/kg max.
Mercury:	1 mg/kg max.
Cadmium:	1 mg/kg max.
TPC:	5000 cfu/g max.
Yeast & Mold:	500 cfu/g max.
E.coli:	Negative in 5 g
Salmonella:	Negative in 10 g

Product is in accordance with FCC (Food Chemical Codex), GRAS, and EU directive 231/12

Anexo D. Materiales y reactivos utilizados en la elaboración de microesferas mucoadhesivas.



Anexo E. Masa homogénea de Alginato sódico



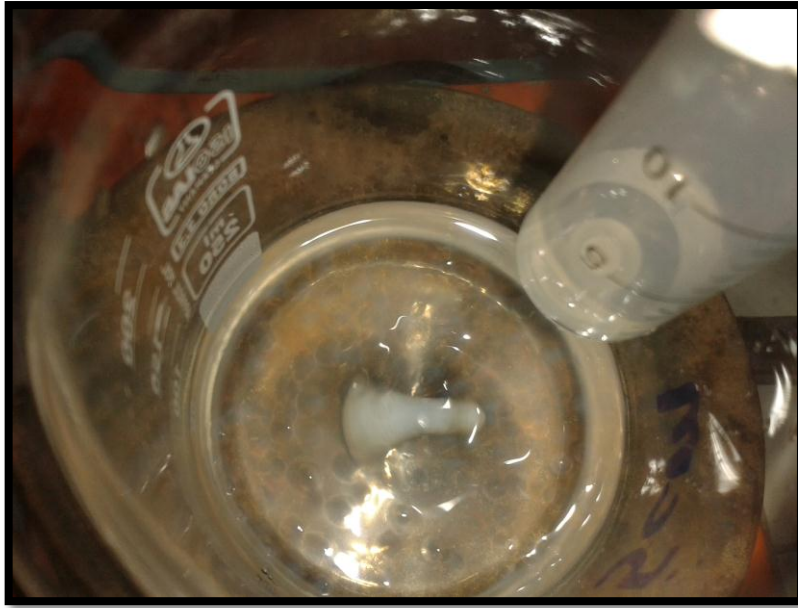
Anexo F. Goteo de solución de Alginato sódico



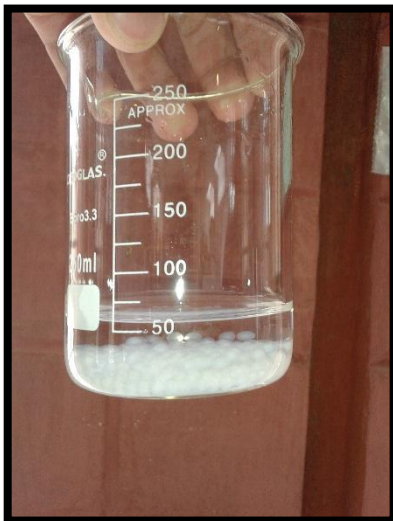
Anexo G. Llenado de solución de Alginato sódico en bureta de 50 ml.



Anexo H. Gelificación de gotas de Alginato sódico en cloruro de calcio



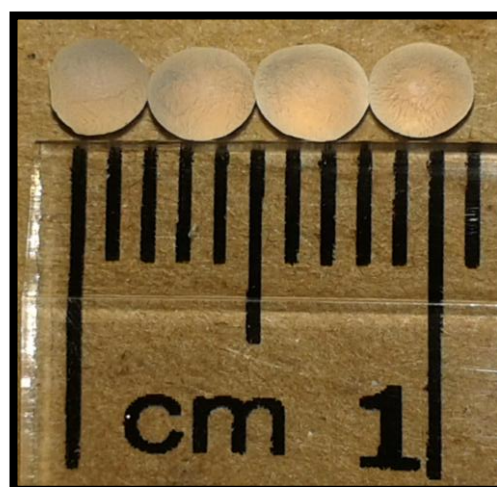
Anexo I. Decantación de microesferas mucoadhesivas



Anexo J. Filtración de microesferas mucoadhesivas en tamiz metálico



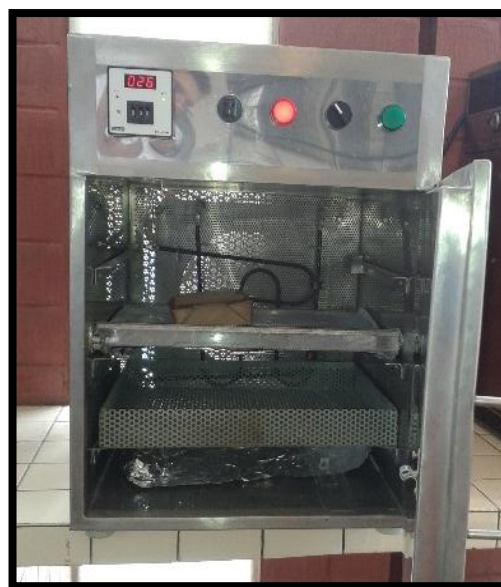
Anexo K. Microesferas mucoadhesivas antes de ser deshidratadas



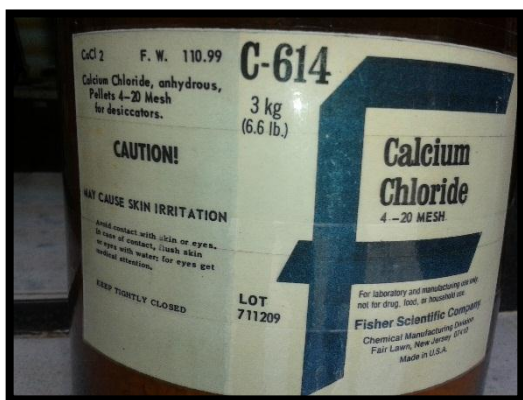
Anexo L. Secado de microesferas mucoadhesivas



Anexo M. Dsecador de bandeja marca Proingal



Anexo N. Cloruro de calcio utilizado en la fabricación de microesferas mucoadhesivas



Anexo O. Determinación de viscosidad de las soluciones de Alginato sódico



Anexo P. Husillos de viscosímetro rotacional marca selecta ST 2001.



Anexo Q. Determinación del pH de la solución de ácido cítrico (5%)



Anexo R. Determinación del pH de la solución buffer fosfato pH 7.4



Anexo S. Microesferas colocadas sobre la mucosa intestinal de pollo.



Anexo T. Evaluación de la mucoadhesión “*In vitro*”

