

**BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA
FACULTAD DE ESTOMATOLOGÍA**

Secretaría de Investigación y Estudios de Posgrado

TESIS:

“CARACTERIZACIÓN DE PELÍCULAS MUCOADHESIVAS DE
QUITOSANO PARA LA LIBERACIÓN DE L-ARGININA AL 15%”

PRESENTA:

L.E. Ana Karen Rocha Balderas
Matrícula: 221450007

PARA OBTENER EL GRADO DE:
Maestra en Estomatología con
Opción Terminal en Ortodoncia

DIRECTOR DE TESIS:
D.C. Miguel Angel Casillas Santana

DIRECTOR METODOLÓGICO:
D.C. Brenda Eréndida Castillo Silva

ASESOR DISCIPLINARIO:
M.O. Farid Alfonso Dipp Velázquez

LECTOR DE TESIS:
D.C. Julia Flores Tochiuitl

REGISTRO CIFE: 2023192

FECHA: Junio 2023



DICTÁMEN DE APROBACIÓN DE LA TESIS
Oficio No. FESIEP/CIFE/055/2023



Oficio No. FESIEP/CIFE/055/2023

C. Ana Karen Rocha Balderas
Alumna de la Maestría en Estomatología
con opción en Terminal en Ortodoncia
Matrícula No.: 221450007
Facultad de Estomatología
Benemérita Universidad Autónoma de Puebla
PRESENTE

Sirva este medio para enviarle un cordial saludo, asimismo, el que suscribe MO. Farid Alfonso Dipp Velázquez Secretario de Investigación y Estudios de Posgrado de la Facultad de Estomatología de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla; por este medio me permito informar a Usted, que, está Secretaría de Posgrado aprueba la impresión de la Tesis titulada:

"Caracterización de películas mucoadhesivas de quitosano para la liberación de L-Arginina al 15%"

misma que presentará para realizar su examen profesional y obtener el grado de Maestra en Estomatología con opción en Terminal en Ortodoncia; para su conocimiento y atención correspondiente.

Sin otro particular, reitero a Usted mi más atenta y distinguida consideración.

Atentamente
"Pensar bien, para vivir mejor"
H. Puebla de Z., 01 de junio de 2023

MO. Farid Alfonso Dipp Velázquez
Secretario de Investigación y Estudios de Posgrado
Facultad de Estomatología



*Se anexa: Formato de Impresión de Tesis (Original) - p.s.c y a.
*C.c.p. Archivo
*MTRO. F.JMA/DR.FADV/yaneth

Facultad
de Estomatología

31 Poniente 1304, Col. Volcanes,
Puebla, Pue. C. P. 72410
01 (222) 229 55 00 Ext. 6400

AUTORIZACIÓN DE IMPRESIÓN DE TESIS

BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA
FACULTAD DE ESTOMATOLOGÍA
SOLICITUD DE AUTORIZACIÓN DE IMPRESIÓN DE TESIS RECEPCIONAL

Para obtener el grado de: **Maestra en Estomatología con opción terminal en Ortodoncia**

Registro CIFE: 2023192

Fecha: 01 de junio del 2023.

Título de la Tesis: "Caracterización de películas mucoadhesivas de quitosano para la liberación de L-Arginina al 15%".

Nombre del alumno: Ana Karen Rocha Balderas **Matrícula:** 221450007

Domicilio: 13 Sur, 2510 Departamento 11-A, Colonia los Volcanes CP:72410

Tel: 44*41 05 77 74

Fecha de ingreso a la Facultad: lunes 06 de enero del 2020.

Firma: 

Director de Tesis: DC. Miguel Ángel Casillas Santana **Grado académico:** Doctor en Ciencias Odontológicas

Adscripción: Facultad de Estomatología

ID: 100526485

Tel: 44*48 46 76 45

Firma: 

Director Disciplinario: MO Farid Alfonso Dipp Velázquez **Grado académico:** Maestría en Ortodoncia

Adscripción: Facultad de Estomatología

ID: 100408155

Tel: 22*21 61 47 78

Firma: 

Director Metodológico: DC. Brenda Eréndida Castillo Silva **Grado académico:** Doctor en Ciencias Odontológicas

Adscripción: Facultad de Estomatología

ID: NSS526469

Tel: 44*42 42 60 77

Firma: 

Lector: DC. Julia Flores Tochiuhitl

Grado académico: Doctor en Ciencias

Adscripción: Facultad de Estomatología

ID: 100228022

Tel: 22*25 46 67 11

Firma: 

Nombre y firma de aprobación del Responsable de la Maestría en Estomatología con Opción terminal en Ortodoncia.

M.O. Laura Mónica López Pérez Franco

Firma: 

La Secretaría de Investigación y Estudios de Posgrado de la Facultad de Estomatología,
autoriza la impresión de la Tesis.

MO. Farid Alfonso Dipp Velázquez



Fecha: 01 de junio del 2023.

Sello

**OFICIO DE ACEPTACIÓN DE PROYECTO (C.I.F.E.)
CONSTANCIA NO. FESIEP/CIFE/077/2023**



Constancia No. FESIEP/CIFE/077/2023

BUAP

DC. Miguel Ángel Casillas Santana
Responsable del Proyecto
Facultad de Estomatología
Benemérita Universidad Autónoma de Puebla
PRESENTE

Sirva este medio para enviarle un cordial saludo, asimismo, la Secretaria de Investigación y Estudios de Posgrado de la Facultad de Estomatología de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla; informa, que, el Proyecto de Investigación (Colectivo):

"Caracterización y Biocompatibilidad de películas mucoadhesivas de quitosano para la liberación de L-Arginina al 15%".

Presentado por:

No.	Cargos	Nombres	ID - Matrículas
1	Responsable del Proyecto:	DC. Miguel Ángel Casillas Santana	100526485
2	Director Metodológico:	DC. Brenda Eréndira Castillo Silva	NSS526469
3	Director Disciplinario:	MO. Farid Alfonso Dipp Velázquez	100408155
4	Alumna de Maestría: Terminal en Ortodoncia	C. Ana Karen Rocha Balderas	221450007

quedo registrado ante el Comité de Investigación de la Facultad de Estomatología (C.I.F.E.), en el libro de registros 08 en la hoja 01 con No. de registro 2023192, y con fecha asentada el día viernes 17 de febrero del presente año.

Por lo anterior, **se hace constar**, que, el día viernes 26 de mayo del año en curso, se recibió ante C.I.F.E. la notificación de cambio de título de Proyecto, por parte del responsable del Protocolo, para dar continuidad a lo mencionado con el siguiente rubro:

Título anterior registrado ante C.I.F.E.:	Caracterización y Biocompatibilidad de películas mucoadhesivas de quitosano para la liberación de L-Arginina al 15%.
Título actualmente registrado ante C.I.F.E.:	Caracterización de películas mucoadhesivas de quitosano para la liberación de L-Arginina al 15%.

Para los fines legales que los interesados convengan, y sin otro particular, reitero a Usted mi más atenta y distinguida consideración.

Atentamente
"Pensar bien, para vivir mejor"
H. Puebla de Z., 26 de mayo de 2023

MO. Farid Alfonso Dipp Velázquez
Secretario de Investigación y Estudios de Posgrado
Facultad de Estomatología



*C.c.p. Archivo
*MTRO. FJMA/DR.FADV/Yaneth

Facultad
de Estomatología

31 Poniente 1304, Col. Volcanes,
Puebla, Pue. C. P. 72410
01 (222) 229 55 00 Ext. 6400

REPORTE DE SIMILITUD ANTI PLAGIO

Turnitin Informe de Originalidad

Procesado el: 06-jun.-2023 10:27 a. m. CST

Identificador: 2110400248

Número de palabras: 27383

Entregado: 1

Orto Por Ana Karen Rocha

<p>Índice de similitud</p> <p>14%</p>	<p>Similitud según fuente</p> <p>Internet Sources: N/A</p> <p>Publicaciones: 10%</p> <p>Trabajos del estudiante: 6%</p>
--	--

AGRADECIMIENTOS

A mi asesor de Tesis, D.C. Miguel Ángel Casillas Santana, por el apoyo, guía y asesoramiento brindado para la realización de esta tesis, por su apoyo académico en la ejecución del proyecto y por contribuir con su gestión a la compra de los reactivos utilizados en los experimentos.

A la Dra. Olivia Hernández Cruz, de la Facultad de Ciencias Químicas por su gran apoyo en la parte experimental del método de liberación, así como en la interpretación y procesamiento de los datos experimentales de dicha prueba, además de mostrarse siempre atenta, amable y disponible para resolver cualquier duda y proponer diversos métodos para lograr la realización de la caracterización de nuestras películas. También al Mtro. Eric Reyes Cervantes, por su ayuda y apoyo en las pruebas realizadas en las instalaciones del DITCO y por habernos permitido usar los equipos de ese laboratorio.

Quiero reconocer a los profesores y alumnos pasantes de la FEBUAP pertenecientes al laboratorio multidisciplinario, microbiología y biomateriales por sus ideas que contribuyeron a la realización de la tesis y por su amabilidad y disponibilidad cuando se requería el uso de las instalaciones de los mismos.

A mis profesores de la maestría que me brindaron su sabiduría y conocimiento durante todo este tiempo, fue muy enriquecedor para mi, gracias por su paciencia.

Un gran reconocimiento a mis amigos de generación que con su gran dedicación me motivaron para concluir el trabajo de la mejor manera y que con su compañía y amistad hicieron de esta maestría la mejor experiencia académica, gracias David, Sarita, Julio y Mariana, siempre estarán presentes en mi. También a mi compañera de maestría Rebeca, quien pertenece a la línea de investigación de este proyecto y que junto con ella fuimos resolviendo y encontrando soluciones a los problemas que se nos presentaban para la elaboración de nuestras tesis.

A mi familia por el apoyo incondicional que me brindan siempre, por sus mensajes de ánimo y por estar siempre presentes. Y finalmente a Dios por permitirme llegar hasta aquí y por las oportunidades dadas en mi vida.

DEDICATORIA

A mis padres Samuel y Esperanza, que me han impulsado y apoyado desde pequeña a cumplir y luchar por mis sueños. Con todo mi amor en eterno agradecimiento e infinito cariño por los consejos, valores, comprensión y confianza que siempre me han brindado. Gracias por el ejemplo de dedicación, amor, entrega y profesionalismo que son para mí y con lo cual he logrado culminar mi maestría.

A mis compañeros de posgrado que se convirtieron en mis maestros, amigos y familia al estar siempre presentes y formando un gran equipo para salir adelante juntos.

A Dios, a mis amigos y familia por acompañarme a lo largo del camino de la vida.

La vida es una historia de aventuras. . .

- Anónimo

ÍNDICE GENERAL

1. RESUMEN Y PALABRAS CLAVE	1
2. INTRODUCCIÓN	2
3. ANTECEDENTES	5
3.1 Antecedentes generales	5
3.1.1 Sistemas de Liberación Controlada	5
3.1.2. El origen de los Sistemas de Liberación Controlada	6
3.1.3. Rutas o vías de administración de fármacos	8
3.1.4. Sistema de liberación de fármacos mucoadhesivos en cavidad oral.....	9
3.1.5 Mecanismo de Mucoadhesión	11
3.1.6 Biopelículas / Parches.....	13
3.1.7. Materiales mucoadhesivos.....	13
3.1.8. Quitosano.....	14
3.1.9. Carboximetilcelulosa	16
3.1.10. L-Arginina.....	18
3.1.11. Oxido Nítrico (NO).....	19
3.1.12. L-Arginina y óxido nítrico en el movimiento dental.....	19
3.1.13. Propiedades y características de las películas	20
3.1.14. Liberación.....	20
3.1.15. Microestructura	21
3.1.16. Hinchamiento o capacidad de absorción de agua	21
3.1.17. pH.....	22
3.1.18. Espectroscopía de Infrarrojo con Transformada de Fourier (FTIR).....	23
3.1.19. Espesor/grosor.....	23
3.1.20. Rugosidad	24
3.1.21. Porosidad y distribución de poros	24
3.2. Antecedentes específicos.....	26
4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	35
5. JUSTIFICACIÓN	36
6. HIPÓTESIS	37

7. OBJETIVOS	38
7.1. Objetivo general.....	38
7.2. Objetivos específicos.....	38
8. MATERIAL Y MÉTODOS	39
8.1. Diseño del estudio	39
8.2. Población y muestra	39
8.3. Criterios de selección de la muestra.....	39
8.4. Variables.....	40
8.5. Concordancia y fiabilidad.....	42
8.6. Ubicación espacio-temporal	42
9. PROCEDIMIENTOS, TÉCNICAS Y FUENTES DE RECOLECCIÓN	43
9.1. Técnica de elaboración de las películas.....	43
9.2. Determinación de las propiedades y pruebas de caracterización	45
9.2.1. pH.....	45
9.2.2. Porosidad y distribución de poros	45
9.2.3. Hinchamiento o capacidad de absorción de agua	46
9.2.4. Espesor/Grosor	48
9.2.5. Espectroscopía Infrarroja con Transformadas de Fourier (FTIR)	48
9.2.6. Rugosidad	49
9.2.7. Microestructura	50
9.2.8. Liberación.....	51
10. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	55
11. RESULTADOS	56
11.1. pH	56
11.2. Microestructura	56
11.3. Hinchamiento.....	57
11.4. Grosor/espesor	58

11.5 Espectroscopía Infrarroja con Transformadas de Fourier (FTIR)	58
11.6 Rugosidad.....	60
11.7. Porosidad.....	61
11.8. Liberación	62
12. DISCUSIÓN	64
12.1. pH	64
12.2. Microestructura	65
12.3. Hinchamiento.....	67
12.4. Grosor/espesor	68
12.5. Espectroscopía Infrarroja con Transformadas de Fourier (FTIR)	70
12.6. Rugosidad.....	71
12.7. Porosidad.....	73
12.8. Liberación	75
13. CONCLUSIONES	78
14. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	80
15. ANEXOS	91
15.1. Bioética	91
15.2. Carta a CIFE.....	92
15.3. Espectros base para prueba FTIR.....	94

ÍNDICE DE TABLAS

Número	Tabla	Página
1	Mecanismos por los cuales se lleva a cabo la liberación de fármacos.	11
2	Grupos para las pruebas a realizar.	39
3	VARIABLES del estudio.	40
4	Mezclas de los reactivos para medir la absorbancia de L-Arginina para la prueba de liberación en Espectrofotómetro UV-Visible.	52
5	Mezclas de los reactivos para la prueba de cromatografía en capa fina (TLC).	53
6	Pruebas estadísticas a utilizar.	55
7	Promedio de la medición de pH de las 3 películas bajo varios intervalos de tiempo.	56
8	Cantidad en peso y porcentaje de hinchamiento de las películas.	57

ÍNDICE DE FIGURAS

Número	Figura	Página
1	Imagen modificada de un ejemplo de Sistemas de Liberación Controlada.	5
2	El artículo de 1964 en el que Judah Folkman propuso el concepto original de un dispositivo de administración de fármacos de reservorio de orden cero implantado.	7
3	Imagen modificada de un mecanismo de mucoadhesión: La mucoadhesión tiene lugar en dos etapas. (A) Etapa de contacto: Contacto íntimo entre un bioadhesivo y una membrana (fenómeno de humectación o hinchazón). (B) Etapa interactiva: Penetración del bioadhesivo en el tejido o en la superficie de la membrana mucosa (interpenetración).	12
4	Imagen modificada de la composición estructural y disposición de la quitina en el caparazón de crustáceos.	14
5	La comparación de unidades estructurales químicas: (A) quitina; y (B) quitosano formado siguiendo el proceso de desacetilación.	15
6	Estructura química de la carboximetilcelulosa (CMC, $R=CH_2COONa$).	16
7	Estructura química de L-Arginina.	18
8	Esquema de pasos a realizar para el procedimiento de las películas constituidas de quitosano, carboximetilcelulosa y L-Arginina. a) Reactivos pesados. b) Se solubilizó la carboximetilcelulosa en agua destilada. c) Carboximetilcelulosa solubilizada. d) Se le agregó quitosano a la mezcla de carboximetilcelulosa y agua. e) Se mezcló perfectamente hasta tener una mezcla homogénea. f) Se agregó a lo anterior L-Arginina. g) Nuevamente se obtuvo una mezcla homogénea. h) Vaciado con ayuda de una jeringa milimetrada en cajas Petri. i) y j) Películas homogéneas y secas. Fuente propia.	44
9	Las películas se cubrieron con 20 mL de saliva artificial, donde posteriormente el electrodo del medidor de pH se puso en contacto con la películas. Fuente propia.	45

10	Ejemplo de un Microscopio Electrónico de Barrido (SEM). Fuente tomada de la página del laboratorio CONAHCYT.	46
11	Saliva artificial, películas cortadas e instrumentos para elaboración de la prueba de hinchamiento. Fuente propia.	47
12	Películas inmersas en 5ml de saliva artificial a 37°C en la estufa de secado. Fuente propia.	47
13	Película colocada bajo el lente del microscopio óptico (Zeiss AXIO) Fuente propia.	48
14	Ejemplo de un espectrómetro FTIR. Fuente tomada de la página del laboratorio CONAHCYT.	49
15	Prueba de rugosidad en una de las películas con el rugosímetro Mitutoyo SURFTEST SJ-310. Fuente propia.	50
16	Microscopio electrónico de barrido (JSM-5800LV, JEOL, Tokyo, Japan) Fuente tomada de la página del Instituto Transdisciplinar de Investigación y Servicios - ITRANS.	50
17	Realización de la prueba de liberación mediante el ensayo de Bradford. Fuente propia.	51
18	Mezclas de los reactivos enfrascados para observar la absorbancia de L-Arginina. Fuente propia.	52
19	Introduciendo una de las muestras en la celda de cuarzo. Fuente propia.	53
20	Llevando la celda de cuarzo cargada con una muestra al espectrofotómetro UV-Visible. Fuente propia.	53
21	Celda de cuarzo con muestra en el espectrofotómetro UV-Visible. Fuente propia.	53
22	Colocación de la solución del frasco 1 con ayuda de un hisopo sobre la capa fina. Fuente propia.	54
23	Micrografías del SEM de las películas. a) superficie irregular con presencia de cavidades esféricas. b) superficie con ciertas irregularidades y sin grietas. c) se observa una superficie uniforme, lisa y relativamente plana. d) pocas irregularidades en la superficie, no muy lisa pero sin grietas.	57

24	Película antes de sumergirse en saliva artificial y a los 60 minutos después hincharse.	58
25	Espesor de las películas tomadas en el Microscópio Óptico (Zeiss AXIO). a) extremo derecho. b) centro. c) extremo izquierdo.	58
26	Espectros FTIR de las películas. Cada color indica una película diferente de Quitosano, Carboximetilcelulosa y L-Arginina.	59
27	Gráficas obtenidos de la máquina verificadora de rugosidad superficial Mitutoyo SURFTEST SJ-310 en donde se observan las crestas y valles en el eje de las x y y que determinan la cantidad de rugosidad de las 3 películas.	61
28	Micrografías del SEM de las películas. a), b), c) y d) superficies con ciertas irregularidades y sin presencia de poros, se observa incluso como se amplifica la misma imagen para observar a mayor detalle la irregularidad y y poder corroborar que no hay presencia de orificios microscópicos.	62
29	Gráfica de la mezcla de agua destilada, Bisfenol A y L-Arginina expuestas al espectrofotómetro UV-Visible.	63
30	Técnica de Cromatografía en capa fina (TLC) donde la L-Arginina fue revelada con ninhidrina.	63

ABREVIATURAS

ADN	Ácido Desoxirribonucleico
ADS	Vía De La Arginina Deiminasa
ATP	Adenosintrifosfato
ATR-FTIR	Espectroscopia Infrarrojo
BCA	Ácido Bicinchonínico
BH4	Tetrahidrobiopterina
BUAP	Benemérita Universidad Autónoma De Puebla
CDD	Administración Controlada De Medicamentos
DITCo	Dirección De Innovación Y Transferencia De Conocimiento
FAD	Mononucleótido De Flavina
FDA	Food And Drug Administration
FDC	Celdas De Difusión De Franz
FEBUAP	Facultad De Estomatología De La Benemérita Universidad Autónoma de Puebla
FTIR	Espectrometría Infrarroja Por Transformada De Fourier
GCF	Líquido Crevicular Gingival
HE	Hematoxilina-Eosina
HPLC	Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución
IGF-1	Factor De Crecimiento Semejante A La Insulina Tipo I
L-NAME	Inhibidor de óxido nítrico sintasa
LiCl	Cloruro De Litio
MA	Anhídrido maleico
NaCl	Solución Salina
NADPH	Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato
NLA	Nitro-L-Arginina
NO	Óxido nítrico
NOC-18	Donante de Óxido Nítrico e Acción Prolongada
NOS	Óxido nítrico Sintetas
NOSe	Óxido Nítrico Endotelial
NOSi	Óxido Nítrico Inducible
NOSn	Óxido Nítrico Neuronal

OTM	Movimiento de os Dientes de Ortodoncia
PAOO	Ortodoncia Osteogénica Acelerada Periodonticamente
PDL	Ligamento periodontal
pH	Potencial de Hidrógeno
PHBV	Polihidroxialcanoato
Ra	Rugosidad media aritmética
Rq	Rugosidad Media Cuadrática
Rz	Profundidad Total De La Rugosidad
<i>S. mutans</i>	<i>Streptococcus mutans</i>
SEM	Microscopio Electrónico de Barrido
SNC	Sistema Nervioso Central
TGA	Termogravimetría
TGF- β	Factor de Crecimiento Transformador-Beta
TLC	Cromatografía en capa fina
TNF α	Factor de Crecimiento Transformador-Alfa
TRAP	Fosfatasa ácida resistente al tartrato
Tyr	L-Tirosina
USFD	Administración de Drogas y Alimentos de los Estados Unidos

1. RESUMEN Y PALABRAS CLAVE

“CARACTERIZACIÓN DE PELÍCULAS MUCOADHESIVAS DE QUITOSANO PARA LA LIBERACIÓN DE L-ARGININA AL 15%”

Una de las principales interrogantes en la ortodoncia en la actualidad es encontrar un método poco invasivo y aceptado por el paciente para un tratamiento ortodóncico rápido. Por ello, este trabajo se centra en la preparación de películas mucoadhesivas cargadas de L-Arginina, las cuales se sugiere que al ser colocadas en la mucosa oral, permitirán una administración controlada de dicho fármaco y así propiciar el aceleramiento del movimiento dental. Los polímeros utilizados para la creación de las películas son el quitosano junto con la carboximetilcelulosa, obtenidos de los 2 biopolímeros naturales más abundantes en la Tierra (quitina y celulosa).

Para el estudio se llevó a cabo estadística descriptiva y la caracterización fisicoquímica y morfológica de las películas se realizó por triplicado mediante pruebas de hinchamiento o capacidad de absorción de agua, espectrometría infrarroja por transformada de Fourier, pH, porosidad y distribución de poros, microestructura, rugosidad, espesor/grosor y liberación. Las películas hinchadas presentaron un aspecto liso y homogéneo y con una capacidad de absorción de agua mayor al 100%, y en el caso del pH éste se mantuvo en condiciones ideales y compatibles para la cavidad oral (7.5 a 8.2). Con respecto a lo observado en el SEM, rugosímetro y microscopio óptico, se reportó que la estructura, superficie y espesor de las películas es lo suficientemente gruesa (50-60 μm), uniforme y con rugosidad similar al ser comparadas con otros estudios que tenían a fin también liberar medicamentos en la mucosa de cavidad oral. Por FTIR se identificaron las interacciones entre los grupos funcionales en las películas. Actualmente no existe ninguna película mucoadhesiva elaborada a base L-Arginina, quitosano y carboximetilcelulosa con el objetivo de ser aplicada a la ortodoncia acelerada, por lo que los resultados obtenidos al momento son prometedores.

Palabras clave

L-Arginina, Óxido Nítrico, Carboximetilcelulosa, Quitosano, Sistema de liberación de fármacos, Película, Ortodoncia acelerada.

2. INTRODUCCIÓN

La ortodoncia es una especialidad de la odontología que se encarga de estudiar, prevenir y corregir las alteraciones del desarrollo, las formas de las arcadas dentarias y la posición de los maxilares y estructuras dentarias, con el objetivo de restablecer el equilibrio morfológico y funcional de la boca y de la cara, al mejorar también la estética facial. Para conseguir estos objetivos, la base de la ortodoncia es el movimiento dental, el cual se produce por una serie de procesos físicos y biológicos donde el diente es sometido a una fuerza de presión y tensión, que genera un proceso inflamatorio que da como resultado la diferenciación celular seguida de una remodelación ósea mediada por osteoclastos para la reabsorción ósea y osteoblastos para formación de tejido óseo, con el fin de producir el movimiento dental. Para ello, los especialistas siempre están en la búsqueda constante de nuevas tecnologías que ayuden a aumentar la velocidad del movimiento dental puesto que es un factor importante que determina la duración del tratamiento de ortodoncia.

Entre los métodos estudiados y utilizados para el movimiento dental acelerado se encuentran los que incluyen la irradiación con láser de baja intensidad, corticotomías o microosteoperforaciones, ortodoncia osteogénica acelerada periodonticamente (PAOO), piezocisión, campos magnéticos, vibraciones de baja y alta frecuencia y el uso de la farmacología colocada en diversos vehículos que permiten que los principios activos de los medicamentos actúen a favor de la velocidad del movimiento dental.

Las técnicas para acelerar el movimiento de los dientes han sido un tema de interés en la ortodoncia durante la última década, debido a que el tiempo de tratamiento está relacionado con posibles efectos perjudiciales, como el aumento de la descalcificación, la caries dental, la reabsorción de las raíces y la inflamación gingival, así que la posibilidad de reducir el tiempo de tratamiento en ortodoncia puede proporcionar múltiples beneficios al paciente.

En los últimos 40 años, la mucoadhesión ha sido una alternativa para prolongar el tiempo de liberación de fármacos en las mucosas y mejorar la biodisponibilidad. La

principal ventaja de este sistema de administración de fármacos es que prolonga el tiempo de residencia de la forma de dosificación en el lugar de aplicación. Debido al alto suministro de sangre y la permeabilidad relativamente alta de la mucosa bucal, la cavidad bucal es la mejor opción para la administración local y sistémica de varios fármacos. El término bioadhesión se puede definir como un fenómeno de fuerzas de atracción moleculares interfaciales en la capa media de la superficie de una membrana biológica y los polímeros naturales o sintéticos, lo que permite que el polímero se adhiera a la superficie de esa película durante un período prolongado. Entre las formas de este tipo de dosificación se encuentran el uso de micro/nanopartículas, obleas, y pastillas bioadhesivas, geles y ungüentos bucales y de nuestro interés los parches o películas bioadhesivas.

La L-Arginina es un aminoácido semiesencial o condicionalmente esencial, constituyente de las proteínas del cuerpo humano, encontrándose también como un componente natural de la saliva humana que se secreta en forma libre a una concentración media de 50 nM y posee una carga positiva y un pH fisiológico de 6.5 - 7.5. Una de las funciones de la L-Arginina y de particular interés para este trabajo es servir como el precursor para la síntesis de óxido nítrico (NO), a ésta normalmente se le asocia con la vasodilatación, sin embargo, en el contexto de la ortodoncia, cuando sus valores aumentan durante el proceso de inflamación por la aplicación de fuerzas ortodóncicas, el NO bloquea la diferenciación de las células mesenquimales a osteoblastos y contribuye a la reabsorción ósea controlada, y por ende, al movimiento dental ortodóncico. La literatura ha reportado que la L-Arginina tiene efectos positivos en el remodelado óseo cuando es aplicada en modelos murinos de ortodoncia, sin embargo, a pesar de los resultados prometedores, aún no existen estudios en humanos, además, la aceleración del movimiento dental ortodóncico se ha realizado mediante inyecciones recurrentes de precursores del NO en el área de interés, y al ser una vía de administración invasiva no suele ser popular entre los ortodoncistas y los pacientes, por lo que el desarrollo de sistemas de liberación controlada de fármacos como las películas mucoadhesivas podría ser una alternativa efectiva y prometedora para su aplicación en ortodoncia acelerada.

La L-Arginina podría ser administrada por medio de un sistema de liberación prolongada como las películas mucoadhesivas de quitosano y representar un tratamiento

eficaz no invasivo y ambulatorio para la aceleración del movimiento dental, debido a que se ha comprobado que el Quitosano es un material potencial para aplicaciones biodentales debido a sus propiedades únicas como bioactividad, biocompatibilidad, propiedades antimicrobianas y compatibilidad para mezclarse con otros materiales.

El objetivo de este estudio fue elaborar una película mucoadhesiva de Quitosano con L-Arginina al 15% para su liberación prolongada, además de caracterizar las propiedades fisicoquímicas, con lo cual se busca sentar las bases para su futuro uso en la aceleración del tratamiento de ortodoncia.

3. ANTECEDENTES

3.1 Antecedentes generales

3.1.1 Sistemas de Liberación Controlada

Un sistema de administración de fármacos se define como una formulación o un dispositivo que permite la introducción de una sustancia terapéutica en el organismo y mejora su eficacia y seguridad mediante el control de la velocidad, el tiempo y el lugar de liberación de los fármacos en el organismo. Este proceso incluye la administración del producto terapéutico, la liberación de los principios activos por parte del producto y el posterior transporte de los principios activos a través de las membranas biológicas hasta el lugar de acción (1).

Los sistemas de administración de medicamentos de liberación sostenida o controlada logran la liberación lenta de un medicamento durante un período prolongado después de la administración de una sola dosis (2), además de mostrar la farmacocinética de orden cero con una sola dosis de administración de una formulación o dispositivo específico, manteniendo los niveles del medicamentos constantemente dentro de la ventana terapéutica, se observa un ejemplo de ello en la figura 1.

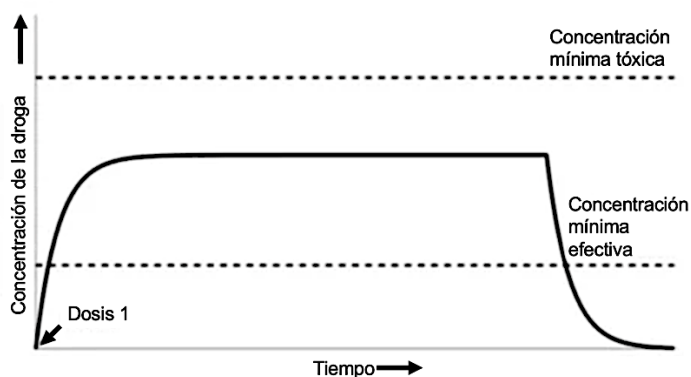


Figura 1. Imagen modificada de un ejemplo de Sistemas de Liberación Controlada (2)

El sistema de administración de medicamentos de liberación sostenida ayuda a reducir la dosis y la frecuencia de dosificación y mejora el cumplimiento del paciente, aunado a la menor exposición de los fármacos al entorno biológico reduciendo la toxicidad y los efectos adversos de los medicamentos (2).

Cualquier sistema de liberación controlada se encuentra constituido por dos componentes principales, una matriz polimérica y el agente bioactivo a liberar (3). La matriz polimérica a su vez puede actuar fundamentalmente de dos formas diferentes: como el agente transportador del principio activo, que se encuentra disperso en él (en todo su seno o en su superficie), o como el agente protector de la liberación de dicho principio activo, encapsulándolo y produciendo el intercambio entre el reservorio del mismo (core) y el medio externo, por fenómenos de difusión a través del polímero actuando como membrana semipermeable (4).

3.1.2. El origen de los Sistemas de Liberación Controlada

Antes de 1950 todas las drogas se convertían en formulaciones de píldoras o cápsulas que liberaban la droga cargada inmediatamente al entrar en contacto con el agua sin ninguna capacidad para controlar la cinética de liberación de la droga. En 1952, Beecham (5) introdujo la primera formulación de liberación sostenida que podía controlar la cinética de liberación del fármaco y lograr una eficacia de 12 horas, y la tecnología, conocida como tecnología Spansule, permitió el control de la cinética de liberación del fármaco a un ritmo predeterminado.

Por otro lado, a mediados de la década de 1960, cuando un biólogo, oncólogo y profesor universitario estadounidense llamado Folkman, en Harvard, estaba haciendo circular sangre de conejo dentro de una derivación arteriovenosa (6) Silastic (caucho de silicona) descubrió que si exponía el tubo a gases anestésicos en el exterior, los conejos se dormían. Propuso que se podrían implantar segmentos cortos y sellados de dicho tubo que contenían un fármaco, y si la silicona no cambiaba en dimensiones o composición, el implante se convertiría en un dispositivo de suministro de fármaco a velocidad constante, también mostró que la tasa disminuía a medida que aumentaba el grosor del tubo, lo cual es obvio hoy en día, pero en aquel entonces era la primera sugerencia de un implante de administración de fármacos controlado de orden cero *in vivo*. La portada del artículo publicado en 1964 por Judah Folkman que defiende todo lo anteriormente mencionado, se puede observar en la figura 2.

The Use of Silicone Rubber as a Carrier for Prolonged Drug Therapy



Folkman

JUDAH FOLKMAN, M.D., AND DAVID M. LONG, LCDR, MC, USNR, *National Naval Medical Center*

SUMMARY

A new method is presented for local or systemic drug therapy by incorporating the therapeutic agent in a Silastic capsule which is then implanted in the body.

J Surgical Research, 4, 139 (1964)

Figura 2. El artículo de 1964 en el que Judah Folkman propuso el concepto original de un dispositivo de administración de fármacos de reservorio de orden cero implantado (6).

Mientras tanto, en Palo Alto CA., Estados Unidos, Zaffaroni (6), un destacado químico y empresario de drogas sintéticas, había pensado en el concepto de entrega de pedido cero y dispositivos de entrega controlada, escuchó sobre el trabajo de Folkman y fue a Boston para aprender más sobre él. Estimulado por el trabajo de Folkman, así como por su propia visión, Zaffaroni fundó una empresa a fines de la década de 1960 centrada en el concepto de administración controlada de medicamentos (CDD).

En los primeros días, cuando comenzó la nueva tecnología de administración controlada de medicamentos, se introdujeron varios términos para describir las formulaciones más nuevas que tenían pequeñas diferencias entre sí. Las formulaciones de liberación controlada incluyeron aquellas con liberación sostenida, liberación programada, liberación prolongada y otras. Estos términos, sin embargo, se usan indistintamente hoy en día. Después de varias décadas de avances en las tecnologías de administración de fármacos, las pequeñas diferencias en las funciones que implican los nombres se han vuelto innecesarias (5). Así que tras años de evolución, aparece el concepto de liberación controlada, el cual surgió de la necesidad de administrar una sustancia de forma continua durante cierto periodo de tiempo para obtener el efecto buscado, basado en la idea de proveer la cantidad óptima del agente activo en el

momento preciso y en el lugar adecuado al controlar así su liberación para que ésta se realice de acuerdo con una cinética preestablecida y reproducible (7).

3.1.3. Rutas o vías de administración de fármacos

El fármaco puede introducirse en el cuerpo humano por varias vías anatómicas y pueden estar destinados a efectos sistémicos o dirigidos a diversos órganos y enfermedades. La elección de la vía de administración depende de la enfermedad, el efecto deseado y el producto disponible. Los fármacos pueden administrarse directamente al órgano afectado por la enfermedad o administrarse sistémicamente y dirigirse a la zona que se desea (1).

Clasificación de las rutas anatómicas para la administración sistémica de fármacos (1):

1. Sistema gastrointestinal
 - a. Oral
 - b. Rectal
2. Parenteral
 - a. Inyección subcutánea
 - b. Inyección intramuscular
 - c. Inyección intravenosa
 - d. Inyección intraarterial
3. Transnasal
4. Pulmonar: administración de fármacos por inhalación
5. Entrega transdérmica de fármacos
6. Infusión intraósea
7. Transmucoso: bucal y a través de la mucosa que recubre el resto del tracto gastrointestinal

Siendo el último de interés para nuestra investigación.

3.1.4. Sistema de liberación de fármacos mucoadhesivos en cavidad oral

Durante las últimas décadas se han realizado avances en las formulaciones de medicamentos y vías innovadoras de administración, al igual que nuestra comprensión del transporte de fármacos a través de los tejidos ha aumentado (8). El sistema de administración de fármacos mucoadhesivos se puede definir como sistemas de administración de fármacos que utilizan la propiedad de bioadhesión de ciertos polímeros solubles en agua que se vuelven adhesivos al hidratarse y, por lo tanto, pueden usarse para dirigir un fármaco a una región particular del cuerpo durante un periodo de tiempo prolongado (8).

Las formulaciones basadas en el sistema de administración de fármacos mucoadhesivos han mostrado una biodisponibilidad mejorada, y el uso de varios polímeros mucoadhesivos ha logrado un interés significativo en la formulación de formas de dosificación de liberación prolongada (9,10), teniendo en cuenta que entre las diversas mucosas absorbentes que incluyen nasal, pulmonar, rectal, vaginal, bucal y sublingual, la mucosa de la cavidad oral se considera un sitio conveniente y de fácil acceso para la administración de agentes terapéuticos (8).

Algunas de las ventajas de la administración del fármaco a través de sistemas mucoadhesivos es que proporciona una mayor absorción debido a la gran área de superficie y al mayor flujo sanguíneo en las cavidades mucosas, superando así el metabolismo de primer paso hepático, así como la degradación de fármacos por diversas enzimas gastrointestinales y la flora intestinal (10). Además, la administración de agentes terapéuticos a través de varias rutas transmucosas ha ganado una atención significativa debido a su metabolismo presistémico evitando la inestabilidad del ambiente ácido asociado con la administración oral (8). Otra de las ventajas es que el epitelio bucal tiene una fácil accesibilidad y altas tasas de cumplimiento en comparación con otros sitios de la mucosa para la administración de fármacos, además, el epitelio no queratinizado y su abundante suministro de sangre y bajo nivel de enzimas proteolíticas aumentan la biodisponibilidad sistémica de los fármacos tras la administración bucal. Sin embargo, los principales inconvenientes asociados con la administración bucal de medicamentos incluyen un alto recambio de saliva, sabor desagradable, masticación, microbioma bucal y área de contacto limitada (11). Así que mejorar el diseño en la forma de dosificación,

con la propiedad mucoadhesiva deseada y un buen conocimiento de los polímeros mucoadhesivos, ofrece un medio eficaz para eludir los problemas anteriores.

Las características ideales de los sistemas mucoadhesivos de liberación de drogas en cavidad oral son (8):

1. El polímero y sus productos de degradación deben ser atóxicos, no irritantes y libres de impurezas lixiviables.
2. Deben tener buenas propiedades de esparcimiento, humectación, hinchamiento y solubilidad y biodegradabilidad.
3. El pH debe ser biocompatible y debe tener buenas propiedades viscoelásticas.
4. Deben adherirse rápidamente a la mucosa bucal y deben poseer suficiente resistencia mecánica.
5. Deben poseer resistencias al pelado, tracción y cizallamiento en el rango de bioadhesivo.
6. El polímero debe estar fácilmente disponible y su costo no debe ser elevado.
7. Deben mostrar propiedades bioadhesivas tanto en estado seco como líquido.

Los principales obstáculos a los que se enfrentan los medicamentos cuando se administran a través de la vía bucal se derivan del área de absorción limitada y de las propiedades de barrera de la mucosa. Los mecanismos de eliminación fisiológica eficaces de la cavidad oral que alejan la formulación del sitio de absorción son los otros obstáculos que deben tenerse en cuenta. Las estrategias estudiadas para superar tales obstáculos incluyen el empleo de nuevos materiales que, posiblemente, combinan propiedades mucoadhesivas, inhibitorias enzimáticas y potenciadoras de la penetración y el diseño de sistemas innovadores de administración de medicamentos que, además de mejorar el cumplimiento del paciente, favorecen un contacto más íntimo del medicamento con la mucosa de absorción (12).

Desde las décadas de 1970 y 1980 se han diseñado numerosos dispositivos de administración de fármacos "controlada" para las inserciones mucosas a base de diversos materiales, tales como implantes (subcutáneos o intramusculares), cápsulas ingeribles (tracto G-I) y parches o películas tópicas (para mucosas, la piel), siendo aprobados para uso clínico para las décadas de 1980 y 1990 (6).

Las presentaciones para dosificación bucal mucoadhesiva mas estudiadas y relevantes son (8):

1. Sólidas: formulaciones secas que logran la bioadhesión a través de la deshidratación de la superficie mucosa local, tales como las tabletas bucales, micro/nanopartículas bioadhesivas, obleas y pastillas bioadhesivas.
2. Semisólidas: son los geles y ungüentos bucales, gomas de mascar medicinales y de interés para este trabajo los parches o películas.
3. Líquida: soluciones o suspensiones de fármacos en vehículos acuosos adecuados, por ejemplo; enjuagues bucales antibacterianos y ambientadores bucales disponibles comercialmente para este propósito.

Los mecanismos de liberación de una sustancia a partir de una matriz polimérica se pueden observar en la tabla 1 (9):

Tabla 1. Mecanismos por los cuales se lleva acabo la liberación de fármacos (9).

TIPO DE SISTEMA	MECANISMO DE LIBERACIÓN
Control por difusión 1. Dispositivos de reserva 2. Sistemas monolíticos	Difusión a través de una membrana Difusión a través de una masa de polímero
Control por contacto con un solvente 1. Por hinchamiento	Absorción del solvente y relajación de cadenas
Control químico 1. Por erosión 2. Rompimiento de enlaces	Degradación física y/o química de la matriz Hidrólisis de enlace polímero-agente activo

3.1.5 Mecanismo de Mucoadhesión

La mucoadhesión se puede definir como un fenómeno interfacial en el que los dos materiales, uno de los cuales puede ser artificial como el polímero mucoadhesivo y el otro puede ser la capa de mucina del tejido mucoso, se mantienen unidos por medio de fuerzas de atracción interfaciales. “Mucoadhesivo” se define como una sustancia artificial

que es capaz de interactuar con la membrana mucosa y retenerla o mantenerla unida durante un período prolongado (10). Durante el proceso de adhesión, generalmente se han identificado las dos etapas que se detallan a continuación. Estas etapas de mucoadhesión también se muestran en la figura 3.

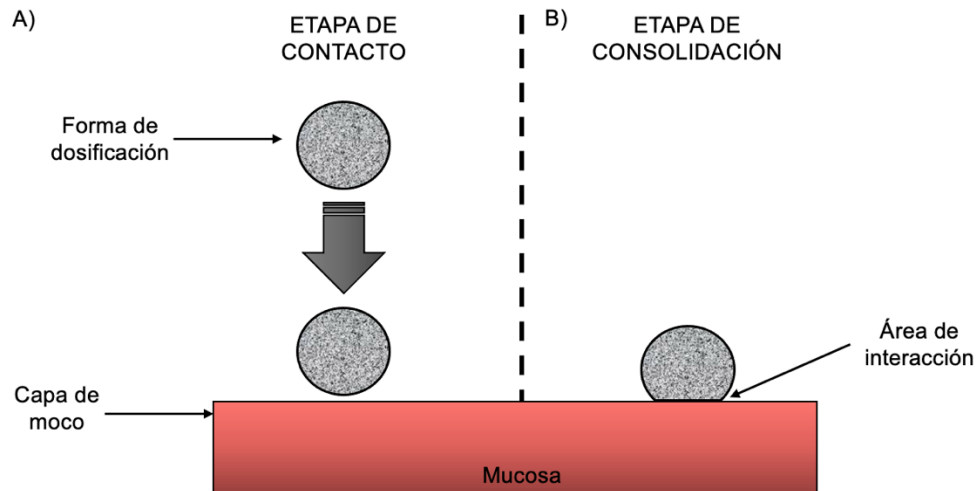


Figura 3. Imagen modificada de un mecanismo de mucoadhesión: La mucoadhesión tiene lugar en dos etapas. (A) Etapa de contacto: Contacto íntimo entre un bioadhesivo y una membrana (fenómeno de humectación o hinchazón). (B) Etapa interactiva: Penetración del bioadhesivo en el tejido o en la superficie de la membrana mucosa (interpenetración) (10).

Etapa de contacto: Durante esta etapa, cuando el material mucoadhesivo entra en contacto con la membrana mucosa, se produce una humectación íntima entre el mucoadhesivo y la membrana mucosa. Esta humectación del mucoadhesivo la realiza la mucosidad presente en la membrana mucosa (10).

Etapa de consolidación: Por medio de diferentes fuerzas de atracción fisicoquímicas el material mucoadhesivo se une a la membrana mucosa dando como resultado una mucoadhesión de larga duración (10). Después de estas dos etapas se completa el proceso de mucoadhesión.

3.1.6 Biopelículas / Parches

Son sistemas que pueden variar desde simples películas adhesivas erosionables y no erosionables hasta sistemas más sofisticados que pueden diseñarse para proporcionar una liberación unidireccional o multidireccional del fármaco (8). Pueden constar de una capa de respaldo impermeable, una capa de depósito que contiene el fármaco desde la cual se libera de manera controlada y una superficie bioadhesiva para la unión a la mucosa (8), o bien, el agente activo se puede encontrar uniformemente distribuido en toda la matriz polimérica para después ser liberado (9). El grosor del parche es una limitación que no puede controlar la liberación del fármaco durante un período de tiempo más prolongado. En el caso de la película que contiene fármaco se libera de forma controlada (8).

La FDA Por sus siglas en inglés: Food And Drug Administration, no tiene una definición clara sobre las películas, y utiliza el término “películas solubles” (13). La Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos las define como laminillas, una preparación sólida constituida generalmente de polímeros naturales o sintéticos, que contiene el o los fármacos aditivos, destinada a ser disuelta en la boca (14).

3.1.7. Materiales mucoadhesivos

Para la fuerza mucoadhesiva deseada de las formas de dosificación, se pueden usar varios polímeros. Estos polímeros son macromoléculas naturales o sintéticas que son capaces de adherirse a las superficies mucosas. Desde las últimas tres décadas, el uso de diversos polímeros mucoadhesivos ha despertado un gran interés en el campo de la tecnología farmacéutica. Hoy en día, el uso de polímeros mucoadhesivos se ha aceptado como una estrategia importante para prolongar el tiempo de residencia y mejorar los efectos localizados de los sistemas de administración de fármacos en varias membranas mucosas de un sistema biológico (10).

Actualmente, en la elaboración de sistemas de liberación controlada se utilizan un gran número de polímeros, entre los cuales existen (15):

1. Polímeros naturales, como el colágeno, la albúmina o el quitosano.
2. Polímeros sintéticos, entre los que se distinguen: Polímeros biodegradables, como los ácidos poliláctico y poliglicólico.

3. Polímeros no biodegradables, como los ácidos poliacrílicos.

3.1.8. Quitosano

Los biomateriales naturales son conocidos por una serie de propiedades biológicas como la biocompatibilidad y la biodegradación necesarias para aplicaciones biomédicas, y algunos ejemplos de ellos incluyen colágeno, fibrina, seda natural y quitosano. El quitosano se purifica principalmente a partir de quitina (16) considerada como el segundo polisacárido más abundante en la Tierra después de la celulosa, además, tienen una estructura química muy parecida ya que sólo difieren en el C₂ que es donde se encuentra un grupo amino o amida en lugar del grupo hidroxilo. El quitosano es descrito por primera vez por Henri Braconnot en 1811 y su estructura química está conformado por 2-amino-2-desoxi-D-glucopiranososa y 2-acetamido-2-desoxi-D-glucopiranososa unidos por enlace β. Aparece en la naturaleza como macrofibrillas ordenadas en el exoesqueleto de moluscos y crustáceos, así como en cutículas de hongos e insectos. Su abundancia natural permite obtener más de 1000 toneladas al año, de las cuales alrededor del 70% proviene de especies marinas (17). En la figura 4 se muestra a grandes rasgos el proceso para la obtención de la quitina.

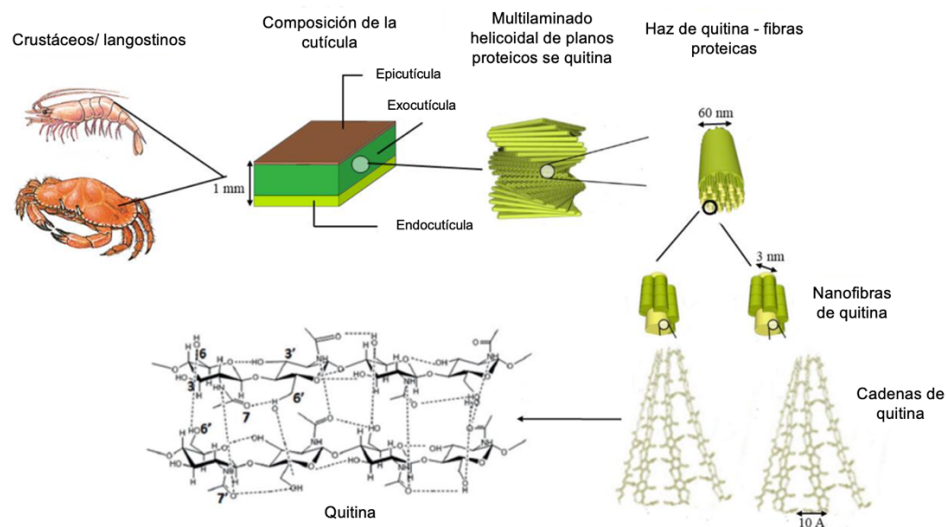


Figura 4. Imagen modificada de la composición estructural y disposición de la quitina en el caparazón de crustáceos (17).

Durante el proceso de desacetilación, la quitina insoluble en agua ($M_w > 1000$ kDa) cambia a quitosano ($M_w > 100$ kDa) que es poco soluble en agua. La hidrolización

enzimática adicional transforma el quitosano en oligosacárido de quitosano que tiene un peso molecular más bajo ($M_w < 2$ kDa) y es altamente soluble en agua. Químicamente el quitosano es un material polimérico compuesto por unidades de copolímero de N-acetilglucosamina y glucosamina (16), y su estructura química se puede observar en la figura 5.

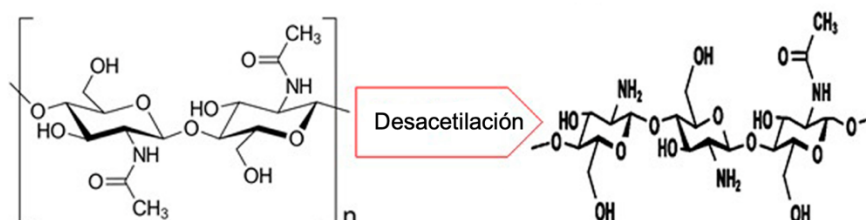


Figura 5. La comparación de unidades estructurales químicas: (A) quitina; y (B) quitosano formado siguiendo el proceso de desacetilación (16).

El quitosano tiene una variedad de propiedades favorables tales como biocompatibilidad; es decir, la capacidad que tiene para unirse a compuestos orgánicos; además, presenta susceptibilidad a hidrólisis por medio de lisozimas y quitinasas las cuales se encuentran en la saliva secretadas por las glándulas parótida, sublingual y submandibular (18). El quitosano presenta versatilidad a diferente pH, por ejemplo, en un $pH < 6$ (soluciones ácidas que son la mayoría de los solventes orgánicos) da como resultado un polímero polielectrolito catiónico soluble en agua debido a la presencia del grupo amino, lo que indica que el pH modificará el estado de la carga y las propiedades del quitosano donde los grupos amino son protonados otorgándoles propiedades hidrofílicas. Por otro lado, si el pH es > 6.5 , da como resultado la desprotonación haciendo al quitosano insoluble e hidrofóbico como lo es en el caso del pH salival (19). Otras características son; bioactividad, no es tóxico, es biodegradable, adsorbible, tiene actividad antimicrobiana (hongos, bacterianos, virus), es antiácido, antiulceroso y antitumoral, y posee propiedades anticoagulantes sanguíneas y actividad hipodérmica (17), además de que se puede combinar con varios materiales bioactivos para osteoconductividad.

Debido a su carácter catiónico y a sus propiedades gelificantes y filmogénicas, el quitosano ha sido estudiado en la industria farmacéutica por su potencial en el desarrollo de sistemas de liberación de fármacos (20). El quitosano es un polímero mucoadhesivo debido a su capacidad para formar interacciones iónicas dependientes del pH con la mucina y su capacidad para mejorar la penetración de moléculas grandes a través de la superficie de la mucosa, por lo tanto, es un buen candidato para el la liberación bucal (21, 22), y debido a todas esas características, el quitosano fue aprobado por la Administración de Drogas y Alimentos de los Estados Unidos (USFD) como un aditivo alimentario generalmente reconocido como seguro (GRAS) y como un sistema de administración al cuerpo humano, más específicamente como un sistema de administración oral (23).

3.1.9. Carboximetilcelulosa

La carboximetilcelulosa, es un polímero de naturaleza artificial derivado de la celulosa, la cual es el polímero natural más abundante en la tierra. La carboximetilcelulosa es un copolímero de dos unidades: β -d-glucosa y β -d-glucopyranosa 2-O-(carboximetil)-sal monosódica que se conectan a través de enlaces β -1,4-glicosídicos, la cual podemos observar en la figura 6.

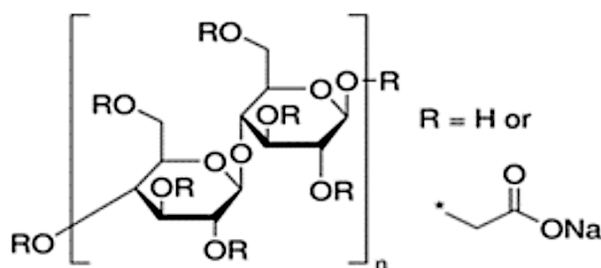


Figura 6. Estructura química de la carboximetilcelulosa ($\text{R}=\text{CH}_2\text{COONa}$) (24).

La sustitución de un grupo carboximetilo en lugar de los grupos hidroxilo es ligeramente predominante en la posición de glucosa C-2. La carboximetilcelulosa se prepara mediante la activación de la celulosa con un NaOH acuoso en la mezcla de un disolvente orgánico que reacciona con la celulosa y el ácido monocloroacético como agente eterificante. El primer paso en el proceso de carboximetilación es una alcalización

en la que los grupos hidroxilo de las cadenas de celulosa se estimulan y alteran en una forma alcalina más reactiva (24).

La carboximetilcelulosa es uno de los derivados de celulosa más importantes que es soluble en agua y tiene características de polielectrolitos, debido a la presencia de grupos ácidos débiles en cadenas lineales de glicanos unidos a β (1 \rightarrow 4) (24).

Las características de la carboximetilcelulosa dependen de tres parámetros: peso molecular, número promedio de unidades de carboxilo y distribución de sus sustituyentes a lo largo de la cadena de polímeros. Dicho compuesto es ampliamente utilizado en varias industrias, incluyendo alimentos, farmacéutica y no alimentarios como cementos, adhesivos, textiles, al utilizarse generalmente como espesante o modificador de viscosidad en diferentes campos, ya que, generalmente se reconoce como seguro (GRAS) para su aplicación en alimentos (24). La carboximetilcelulosa es un éter de celulosa que exhibe gelificación térmica y forma excelentes películas debido a su estructura polimérica y cadenas de alto peso molecular (25).

Las películas a base de carboximetilcelulosa tienen una resistencia moderada, transparencia, buena solubilidad en agua, resistencia al aceite y la grasa, y debido a la presencia de varios grupos hidroxilo y carboxílicos, tienen buenas características de sorción de humedad y unión al agua. Sin embargo, las propiedades de barrera de agua de las películas a base de hidrocoloides se pueden mejorar añadiendo compuestos hidrofóbicos como ceras, aceites vegetales, ácidos grasos, tensioactivos y resinas (26). También presenta excelentes propiedades de formación de película debido a su biocompatibilidad con sustancias como polisacáridos solubles en agua, proteínas, tensioactivos, plastificantes y polímeros, tal como lo es el quitosano, lo que se ha comprobado en múltiples estudios en donde combinan dichos biopolímeros con resultados favorables al formar fibras, nanopartículas, películas, esponjas, etc. Los plastificantes se utilizan particularmente para facilitar el procesamiento y mejorar la flexibilidad de las películas, siendo el glicerol y el sorbitol, los plastificantes más utilizados debido a su estabilidad, comestibilidad y naturaleza hidrofílica, por lo que son compatibles con las matrices hidrofílicas (27).

3.1.10. L-Arginina

La arginina es un aminoácido semiesencial o condicionalmente esencial que se encuentra en una variedad de alimentos, y también es producido naturalmente por el cuerpo humano y secretado en la saliva en forma libre o como péptidos salivales. Se caracteriza por tener un grupo guanidino ($\text{H-N}=(\text{NHR})\text{NH}_2$) el cual se puede observar en la figura 7, y por lo tanto cuando se ioniza tiene menor densidad de carga que otros aminoácidos como la lisina, y mayor que la histidina (28).

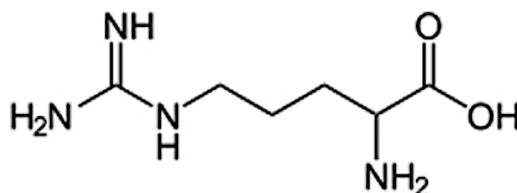


Figura 7. Estructura química de L-Arginina (29).

La arginina que entra en la boca puede ser metabolizada por ciertas bacterias orales a través de la vía de la arginina desde ADS para producir amoníaco, que neutraliza los ácidos glicolíticos y contribuye al aumento del pH de las biopelículas orales. La producción de amoníaco a través del ADS da como resultado un aumento del pH citoplasmático y ambiental y beneficia a las bacterias orales al: (i) protegerlas contra la muerte ácida, (ii) proporcionando ventajas bioenergéticas que incluyen el aumento de pH y la síntesis de ATP, y (iii) mantener un pH ambiental relativamente neutro que sea menos favorable para la proliferación de una microflora cariogénica. Además, se sugiere que la arginina también podría afectar a las propiedades de adhesión de *S. mutans* (28).

La L-Arginina es un precursor de la síntesis de óxido nítrico (NO) y el NO es un mediador ubicuo que está formado por una familia de enzimas llamadas NO sintasas (NOS). En el cerebro, el NO actúa como neurotransmisor; en el sistema inmunológico, actúa como mediador de la defensa del huésped; y en el sistema cardiovascular, media los efectos protectores del endotelio intacto, al actuar como vasodilatador y molécula antiaterogénica endógena. Aproximadamente 5 g de L-Arginina se ingieren cada día en una dieta occidental normal. Estudios recientes sugieren que la L-Arginina en la dieta pueden jugar un papel importante en el desarrollo, crecimiento y modelado de huesos

largos (29). La L-Arginina está involucrada tanto en la síntesis de sustratos implicados en la producción de colágeno como de hormona de crecimiento, factor de crecimiento similar a la insulina (IGF-1) y NO, además, está clínicamente sugerida para tratar alteraciones metabólicas en la absorción de calcio, crecimiento, defectos de dentición y osificación, raquitismo, osteomalacia, descalcificación y convalecencia (29).

3.1.11. Óxido Nítrico (NO)

El óxido nítrico (NO), la molécula de señalización más pequeña conocida, es producido por tres isoformas de la NO sintasa: sintasa del óxido nítrico endotelial, neuronal o inducible (NOS_e, NOS_n, NOS_i respectivamente) cada una de ellas con funciones específicas (30). Todos utilizan L-Arginina y oxígeno molecular como sustratos y requieren los cofactores de fosfato-nicotinamida-adenina-dinucleótido reducido (NADPH), dinucleótido de flavina y adenina (FAD), mononucleótido de flavina (FMN) y (6R-) 5,6,7, 8-tetrahidrobiopterina (BH₄). Sus funciones incluyen plasticidad sináptica en el sistema nervioso central (SNC), regulación central de la presión arterial, relajación del músculo liso (31) y es una fuerte molécula de señalización vasodilatadora y antiinflamatoria que desempeña diversas funciones en el mantenimiento de la homeostasis vascular a través de los nervios nitrérgicos periféricos (32), además, el óxido nítrico (NO) está involucrado en la remodelación ósea y se ha demostrado que juega un papel en la regulación de la velocidad del movimiento de los dientes de ortodoncia (OTM) (33).

3.1.12. L-Arginina y óxido nítrico en el movimiento dental

La oxidación de la L-Arginina por las NOS (cualquiera de ellas) produce L-citrulina y NO, siendo este último de interés en la presente investigación. La NOS_e, NOS_n y NOS_i, isomorfos de la NOS, son expresadas por los osteoblastos, osteocitos y osteoclastos, principales células que se encargan del metabolismo mineral del hueso y su presencia, funcionalidad, actividad y sobre todo, la producción de NO, dependen de estímulos tanto físicos como biológicos (30).

El movimiento dentario ortodóncico es un proceso en el que se reconstruye el tejido periodontal y el hueso alveolar por efecto de las fuerzas ortodóncicas y se logra a través

de la remodelación ósea, como resultado de la transducción secuencial de señales moleculares y mecánicas y cambios en los comportamientos celulares y la inflamación aséptica (34). El NO ejerce efectos bifásicos sobre la formación y función de los osteoclastos, promueve la osteoclastogénesis y la resorción ósea y media la fusión pre-osteoclastos a través de la regulación positiva de la remodelación del citoesqueleto de actina. Además, está ampliamente involucrado en la respuesta biomecánica del periodonto a las fuerzas de ortodoncia, ejerce efectos bifásicos dependientes de la dosis sobre el estado funcional y destino de los osteoblastos, osteoclastos, osteocitos y fibroblastos de PDL involucrados en el movimiento dental ortodóncico, y se ha demostrado que promueve la proliferación, diferenciación o inhibición de la supervivencia y función de estas células, además, se han encontrado variaciones en los niveles de expresión de NO sintasa (NOS) y la producción de NO en tejidos periodontales o líquido crevicular gingival (GCF) en los lados de tensión y compresión durante el movimiento dental tanto en modelos animales de ortodoncia como en pacientes (34).

3.1.13. Propiedades y características de las películas

3.1.14. Liberación

La liberación del fármaco de las películas preparadas es un requisito previo para la penetración a través del epitelio bucal. Los estudios de liberación determinan la liberación acumulada del fármaco de la formulación en un período de tiempo determinado. Aún no se ha desarrollado ningún método in vitro específico para los estudios de liberación de fármacos de películas bucales (35). Entre los métodos más comunes para observar la liberación de L-Arginina es la cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC), Espectroscopia Ultravioleta-Visible, Cromatografía en capa fina (TLC) (36) o métodos menos convencionales como el método de paleta sobre disco (similar al aparato 5 de la USP 23), el uso del aparato de disolución USP 24 tipo 1, el uso de vasos de precipitados de baja capacidad, celdas de difusión de Franz (FDC), sistemas de flujo continuo y muchos más (35).

No obstante, en la mayoría de los estudios se ha previsto que la liberación del fármaco se produzca por un único lado, además, la elección de los medios para los estudios de disolución varía entre los grupos de investigación. Sin embargo, para obtener

resultados significativos es necesario utilizar un medio de disolución que simule la saliva. No existe una composición exacta descrita para preparar saliva simulada, pero se ha utilizado: agua, tampón de fosfato (pH ~ 7), dihidrogenofosfato de potasio (12 mM), cloruro de sodio (40 mM) y cloruro de calcio (1,5 mM) y el pH se ha ajustado a 6,2 al usar hidróxido de sodio, siendo pocas investigaciones las que han utilizado la saliva artificial como medio de disolución (35).

3.1.15. Microestructura

Gracias a los diferentes tipos de microscopios que existen en el mercado se pueden realizar estudios de los aspectos microscópicamente morfológicos con imágenes de alta resolución (1mm). Así se puede conocer la morfología y micro estructura de diversos materiales, además de proporcionar información de la relación entre la estructura y el comportamiento funcional de los materiales; por ejemplo, si observamos una microestructura lisa y uniforme de las películas es un indicativo de que el material es homogéneo en cuanto sus componentes, mientras que si observamos crestas y valles en la sección transversal puede estar relacionado con un material más dúctil. Uno de los microscopios que funciona perfectamente para este estudio es el microscopio de barrido de electrones o SEM por sus siglas en inglés (Scanning Electron Microscopy) (37,38).

Varias propiedades de la superficie como la textura de la superficie (lisa/áspera), la distribución del fármaco (homogeneidad, agregada/dispersa), la literatura sugiere que la mayoría de los estudios se han basado en SEM para evaluar la morfología superficial de las películas (37).

3.1.16. Hinchamiento o capacidad de absorción de agua

El hinchamiento o la capacidad de absorción del agua es un parámetro determinante en los sistemas de liberación de un principio activo y la adhesión de la matriz polimérica en la mucosa oral. La capacidad de absorción de agua se define como la incorporación y retención de agua, es decir, la relación entre la masa total de la película seca y la masa total de la película hidratada; es decir, la ganancia de masa después de tener contacto con una solución acuosa, la cual está directamente relacionada con la expansión longitudinal de la película como resultado de la penetración de un solvente

dentro de la matriz polimérica (39). La penetración del solvente involucra mecanismos como la difusión de las moléculas del solvente a través de la matriz polimérica y la relajación de los segmentos poliméricos. Durante este proceso se produce la incorporación de líquido en el interior de la matriz provocando la dilatación de la misma, es decir, una expansión longitudinal en la película (39).

La capacidad de absorción de agua o capacidad de hinchamiento de la película bucal preparada es de suma importancia por dos razones. Principalmente, la absorción de agua por la película es esencial para proporcionar una mejor bioadhesión de la película con la mucosa bucal, que depende de la naturaleza de la matriz polimérica, y en segundo lugar, facilita la liberación del fármaco de las películas, que se produce principalmente por dos mecanismos (difusión y erosión). Después de la aplicación de la película sobre la mucosa bucal, se produce una secuencia de procesos como la difusión de moléculas de agua en el polímero, la hidratación, el hinchamiento, el desenredado y la erosión de los polímeros. La difusión de agua en la matriz produce una capa delgada que se disuelve en la superficie de la matriz. A medida que se produce la hidratación de la matriz, el fármaco se difunde. Cuanto mayor es la penetración de los medios acuosos en la matriz, más sale el fármaco de la matriz. Sin embargo, el comportamiento de hinchamiento de una película bucal depende en gran medida de la estructura y composición de la película. En general, se encuentra que el porcentaje de hidratación es significativamente bajo en el caso de películas preparadas usando polímeros hidrofóbicos (35).

3.1.17. pH

El pH que es la abreviatura de potencial de hidrógeno, es un parámetro que indica la concentración de iones de hidrogeno $[H]^+$ que existen en una solución, y es una medida del grado de acidez o alcalinidad de una sustancia o una solución, el cual se mide en una escala de 0 a 14. En esta escala, un valor pH de 7 es neutro, lo que significa que la sustancia o solución no es ácida ni alcalina. Un valor pH de menos de 7 significa que es más ácida, y un valor pH de más de 7 significa que es más alcalina. En el campo de la medicina, tener un pH apropiado en la sangre y otros líquidos del cuerpo es importante para el buen funcionamiento del cuerpo (8).

Una película con un pH demasiado ácido o básico afecta el área de aplicación y provoca daños en la mucosa oral que provocan molestias al paciente, y es probable que la naturaleza química del fármaco y de los excipientes influya en el pH de las películas preparadas (35). El pH de la interfase polímero-sustrato y el pH de la saliva como medio de disolución afectan el comportamiento del polímero. Según el caudal de saliva y el método de determinación, el pH de este medio se ha estimado entre 6,5 y 7,5. El pH del microambiente que rodea al polímero mucoadhesivo puede alterar el estado de ionización y, por tanto, las propiedades de adhesión de un polímero (8).

3.1.18. Espectroscopía de Infrarrojo con Transformada de Fourier (FTIR)

La Espectroscopia Infrarroja de Transformada de Fourier (FTIR) es una técnica ampliamente utilizada para identificar los grupos funcionales en los materiales (gas, líquido y sólido) mediante el uso del haz de radiaciones infrarrojas. Una espectroscopia infrarroja mide la absorción de radiación IR realizada por cada enlace en la molécula y, como resultado, da un espectro que comúnmente se designa como % de transmitancia frente al número de onda (cm^{-1}). Una amplia gama de materiales contienen la radiación electromagnética absorbida por el enlace covalente en la región IR. La región IR tiene una energía más baja y una longitud de onda más alta que la luz visible por los rayos UV y tiene una energía más alta o una longitud de onda más corta que las radiaciones de microondas (40).

Las longitudes de onda en un intervalo de 400-1500 cm^{-1} están relacionadas con los fenómenos inter moleculares específicos de cada material, es decir su huella dactilar, mientras que longitudes de onda de 1500-4000 cm^{-1} pueden mostrar grupos funcionales -OH, C=O, N=H y CH_3 . La compatibilidad entre los componentes de las películas puede verse afectada cuando dos o más sustancias se mezclan, las interacciones físicas y químicas se reflejan en cambios en los picos o bandas características de los espectros (41).

3.1.19. Espesor/grosor

El espesor de las películas generalmente se mide utilizando un micrómetro digital electrónico bien calibrado, micrómetro, vernier o mediante imágenes obtenidas del SEM

o del microscópio óptico. De hecho, la medición del espesor de la película es esencial para determinar la uniformidad del espesor de la película, ya que está directamente relacionada con la precisión de la dosis en la película. Además, es necesario un espesor óptimo para proporcionar una bioadhesión adecuada. La elección del o los polímeros es crítica ya que se sabe que ciertos polímeros (polivinilpirrolidona, eudragit, etc.) aumentan el espesor de la película. En general, una película bucal ideal debe presentar un espesor entre 50 y 1000 μm (35).

3.1.20. Rugosidad

Para medir la morfología de la superficie se utiliza un rugosímetro, el cual mide la topografía de la superficie con una alta precisión desde el subnómetro hasta un tamaño de 10 mm. La topografía de la superficie se cuantifica por los parámetros de rugosidad de la superficie. La rugosidad media (R_a) es el parámetro de altura media aritmética con una buena descripción general de las variaciones de altura. La rugosidad de la raíz cuadrada (R_q) representa la desviación estándar de la distribución de las alturas de la superficie. El parámetro de diferencia de pico a valle (R_t) se define como la distancia vertical entre el pico más alto y el valle más bajo a lo largo de la longitud de evaluación del perfil. El valor medio de rugosidad (R_z) representa el promedio aritmético de las desviaciones del plano central de la muestra. La topografía de la superficie se caracterizaba generalmente por histogramas de distribución de la altura. Los histogramas representan el número de puntos de datos presentes dentro de intervalos igualmente espaciados (bins) en cada altura de la superficie (42).

3.1.21. Porosidad y distribución de poros

Gracias a la microscopía, más específicamente en SEM, el cual trabaja a un voltaje de 15 kV, nos sirve para obtener imágenes y evaluar la nanoestructura de la membrana, permitiéndonos ver el tamaño del poro promedio, los cuales se miden mediante un programa de análisis de imágenes usando fotografías SEM (43).

La porosidad denota una cantidad de poros por unidad de área del material, cuanto mayor sea la porosidad, menor será la resistencia del material. También afecta las propiedades humectantes del material y tiene un efecto profundo en la penetración del ingrediente farmacéutico activo a través y desde él. La porosidad es además un fenómeno superficial y depende del tipo de secado y de la velocidad de secado. La resistencia al desgarro y la porosidad dependen también de la naturaleza del polímero, el tipo, el contenido y la composición de la película (35).

3.2. Antecedentes específicos

Como ya se ha mencionado, el óxido nítrico (NO) es un radical libre de vida corta que participa en la regulación del recambio óseo y la función de las células óseas el cual es generado por la óxido nítrico sintasa (NOS) a partir del oxígeno y el aminoácido L-Arginina. El papel exacto de cada isoforma NOS actualmente no está del todo claro, sin embargo, se ha demostrado que todas las isoformas de NOS están involucradas en el OTM con una mayor expresión en el lado de la tensión, siendo la nNOS la más involucrada en los primeros eventos de OTM (44). Algunos estudios en los que se ha realizado análisis inmunohistoquímico de secciones horizontales de los primeros molares superiores de ratas sometidas a 3 y 24 horas de OTM concluyen que todas las isoformas NOS están involucradas en el OTM en alguna forma, con diferentes patrones de expresión entre los lados de tensión y presión (45). Se ha detectado un aumento de osteocitos positivos para iNOS en el área de compresión 6h después de la aplicación de la fuerza, mientras que los osteocitos positivos para eNOS en el área de tensión aumentaron después de 24h (46). Como se indicó anteriormente, generalmente se acepta que iNOS domina la resorción ósea en el sitio de compresión mientras que eNOS media el efecto osteogénico en el área de tensión (46,47).

Desafortunadamente al momento de realizar la revisión de la literatura no hay estudios en donde se demuestre el uso de películas de quitosano para la liberación de L-Arginina para acelerar el movimiento dental ortodóncico en los cuales nos pudiéramos basar para determinar el porcentaje a usar en este estudio, pero si los hay con otro tipo de fármacos que muestran que el quitosano es un buen vehículo para los mismos y que con una correcta caracterización se pueden lograr los objetivos deseados. En cuanto a la L-Arginina al 15%, investigaciones concluyen que es óptima precursora del óxido nítrico y por ende promueve que exista un estímulo celular en las áreas a tratar (48,49). Al revisar otros vehículos para la entrega de L-Arginina, se encontró con que Sousa et al. en el 2016, evaluaron la efectividad de un hidrogel con L-Arginina para la reparación de heridas y la promoción de la cicatrización al 5, 10, 15 y 40%, se determinó que los porcentajes del 10 y 15% eran más efectivos (48). Encontraron una cantidad elevada de iNOS y TGF- β en la herida, lo que sugiere un proceso acelerado de sanación. Observaron una disminución de la infiltración de células polimorfonucleares, una marcada neovascularización, inflamación y una deposición desorganizada y difusa más intensa de

fibras de colágeno. El incremento de iNOS observado por Sousa et al. resulta importante una vez que se considera que, durante la aplicación de fuerzas ortodóncicas, la iNOS se ve elevada en el lado de presión y en ambos lados se ve elevada la TNF α (48).

Por su parte Barros et al., (49) en el 2017 examinaron la resistencia a la tracción, la histología y la inmunohistoquímica de la piel de ratones macho y hembras que recibieron diferentes concentraciones de L-Arginina aplicada tópicamente, con el fin de evaluar la posibilidad de usar L-Arginina como un ingrediente cosmético activo en el tratamiento antienviejamiento. Los resultados sugirieron que la aplicación de L-Arginina mejora la resistencia mecánica de la piel de ratones hembra mayores (20 semanas de edad) y promueve la formación de una mayor cantidad de colágeno y fibras elásticas en la piel cuando se aplica a una concentración del 15%.

Shirazi et al., (50) (2002) investigaron el papel del NO en el movimiento dental de ortodoncia, en donde dividieron 48 ratas del mismo modelo en cuatro grupos de estudio de 12 ratas cada uno. Un grupo recibió inyecciones subperiósticas de solución salina normal (50 μ L / kg), otro inyecciones de L-Arginina (precursor de NO) (200 mg / kg) y otro grupo (L-NAME) de éster metílico de N (G)-nitro-L-Arginina (inhibidor de la óxido nítrico sintasa) (10 mg / kg). Todas las inyecciones las administraron en la mucosa del primer molar superior derecho desde el primer hasta el undécimo día de aplicación de la fuerza a intervalos de 48 horas. Un grupo de control no recibió inyecciones. Desde el tercer día hasta el final del experimento, el grupo L-arg mostró un aumento significativo en los movimientos de los dientes, mientras que el grupo L-NAME mostró una disminución significativa en los movimientos de los dientes en comparación con el grupo de control y solución salina ($p < 0.001$). Los estudios histopatológicos revelaron que el número de osteoclastos fue significativamente mayor en los frotis del grupo L-Arginina, mientras que el número de osteoclastos en el grupo L-NAME fue significativamente menor en comparación con el grupo de control ($p < 0.001$).

Por otro lado Hayashi et al., (51) en el 2002 examinaron el papel del NO en el movimiento de los dientes de ortodoncia en ratas. Para ello usaron inhibidores específicos de las NO sintasas (NOS). Los primeros molares superiores de ratas Wistar macho de 9 semanas de edad se movieron bucalmente durante 21 días. Se realizó la

administración local de éster metílico de N(G)-nitro-L-Arginina HCl (L-NAME), un inhibidor general de la actividad NOS, y redujo significativamente el movimiento de los dientes. Por otro lado, N(6)-(1-iminoetil)-L-lisina, el 2HCl (L-NIL), un inhibidor selectivo de la isoforma inducible de NOS, no tuvo ningún efecto. Dicho estudio sugiere que el NO es un mediador bioquímico importante en la respuesta del tejido periodontal a la fuerza ortodóncica y se produce principalmente a través de la actividad de la NOS constitutiva.

Por su parte Akin et al., (52) en el 2004 evaluaron el papel del óxido nítrico (NO) en el movimiento dental de ortodoncia en ratas. Usaron éster metílico de nomega-nitro-L-Arginina (L-NAME) como inhibidor de la NO sintasa (NOS), y usaron nitro-L-Arginina (NLA) como precursor de la NOS. 54 ratas Sprague-Dawley las dividieron en 3 grupos iguales y cada grupo se dividió en 3 subgrupos. Administraron NLA en los primeros 3 subgrupos a 10 (-4), 10 (-5) y 10 (-6) mol / L (20 microL / 12 horas), respectivamente. L-NAME se administró en los siguientes 3 subgrupos con el mismo orden, cantidad y prescripción. Los últimos 3 subgrupos los evaluaron como grupos de control; en el séptimo subgrupo, le inyectaron NaCl (solución salina) al 0,9% (20 microL / 12 horas). Finalmente, obtuvieron como resultados que los osteoclastos multinucleares, las lagunas de Howship, la vascularización capilar y el movimiento de los dientes de ortodoncia aumentaron significativamente en los grupos NLA en comparación con los grupos L-NAME y control.

D'Attilio et al., (53) en el 2004, realizaron un estudio de diseño transversal para examinar los niveles de sintasa de óxido nítrico inducible y endotelial (eNOS e iNOS, respectivamente) del tejido gingival durante el tratamiento de ortodoncia. El estudio fue de 15 sujetos, 10 mujeres y 5 hombres (de 14,6 a 21,2 años; media de $17,4 \pm 1,8$ años), que necesitaban la extracción de los cuatro primeros premolares por motivos de ortodoncia y que tenían indicaciones de gingivectomía. Un canino sometido a tratamiento para el movimiento distal sirvió como diente de prueba, mientras que su canino contralateral se utilizó como diente de control. El diente control se incluyó con aparatos de ortodoncia pero no se sometió a la fuerza. Dos semanas después de la colocación de la aparatología de ortodoncia, de cada diente experimental se recogieron datos de presencia de placa supragingival, sangrado al sondaje y profundidad de sondaje y del tejido gingival de cada diente de prueba y diente control para inmunohistoquímica,

transcripción inversa del ARN mensajero por reacción en cadena de la polimerasa y análisis de transferencia Western para eNOS e iNOS. Tuvieron como resultados que tanto los niveles de eNOS como de iNOS y la expresión de los diente de prueba fueron significativamente mayores que los de los diente control, indicando un papel importante para la eNOS gingival y la iNOS durante las primeras fases del tratamiento de ortodoncia en humanos.

Nilforoushan et al., (45) en el 2009 tuvieron como objetivo investigar la expresión diferencial de las isoformas NOS en el ligamento periodontal (PDL) y el hueso en los lados de tensión y presión durante el movimiento dental de ortodoncia (OTM) al utilizar un modelo de rata. Para ello realizaron inmunohistoquímica con anticuerpos de isoforma NOS (iNOS, eNOS y nNOS) en cortes horizontales de los primeros molares superiores sometidos a 3 y 24 horas de OTM. Analizaron el PDL y los osteocitos adyacentes de la raíz distopalatina en las áreas de presión y tensión para determinar la expresión de estas proteínas. El molar contralateral sirvió de control. Finalmente, tuvieron como resultados que la expresión de todas las isoformas se incrementó en el lado de tensión. La expresión de iNOS y nNOS en el lado de presión con zona libre de células disminuyó pero en el lado de presión sin zona libre de células aumentó. El número de células positivas para eNOS no cambió, pero la intensidad de la tinción aumentó visiblemente en el lado de la tensión. La duración de OTM cambió solo el patrón de expresión de nNOS. La expresión de NOS de osteocitos no cambió significativamente en respuesta a OTM, lo que sugiere que las células PDL en lugar de los osteocitos son los mecanosensores en los primeros eventos de OTM con respecto a la señalización de NO.

Por otro lado, Mohammadi et al., (54) (2012) investigaron los efectos de la L-Arginina en la dieta como precursora del óxido nítrico (NO) en el movimiento dental ortodóncico en ratas. 36 ratas Wistar las dividieron aleatoriamente en un grupo experimental y de control. El grupo experimental recibió L-Arginina dietética al 2 % (p/p) en el agua potable para elevar su nivel en sangre. Al séptimo día, en ambos grupos, se movieron los incisivos superiores mediante la inserción de resortes y después seleccionaron aleatoriamente 12 y 6 ratas de ambos grupos para preparar cortes histológicos donde contaron osteoclastos bajo un microscopio óptico y examinaron el área superficial de las lagunas de resorción radicular bajo un microscopio electrónico de

barrido, respectivamente. La investigación tuvo como resultados que en el grupo de L-Arginina, el movimiento dental ortodóncico ($p < 0.001$) y el número de osteoclastos ($p < 0.05$) fueron significativamente mayores en comparación con el grupo control, sin embargo, no hubo diferencia significativa entre los dos grupos en términos del área superficial de las lagunas de reabsorción.

Shishido et al., (55) en el año 2012 investigaron si NOC-18 (donante de óxido nítrico de acción prolongada) facilitaba el movimiento dental experimental en ratones, y para ello utilizaron ratones machos. El movimiento dental experimental fue inducido por la inserción de un elástico de ortodoncia entre el primer molar superior izquierdo y el segundo molar. Justo después de la inserción del elástico, administraron NOC-18 por vía intraperitoneal. Para la detección de osteoclastos, realizaron tinciones HE, tinciones TRAP e inmunotinciones para catepsina K. Dicho estudio tuvo como resultados que una inyección intraperitoneal de NOC-18 aumentó significativamente la distancia del movimiento dental experimental. Además, el número y el área de los osteoclastos en el lado de compresión de la superficie del hueso alveolar fue significativamente mayor en el grupo NOC-18. Estos resultados sugieren que la administración sistémica de NOC-18 podría tener algún efecto para facilitar el movimiento dental experimental en ratones a través del aumento de la diferenciación de osteoclastos en el lado de compresión del hueso alveolar.

Ford et al., (33) en el 2014 midieron la concentración de NO en el líquido crevicular gingival (GCF) en pacientes sometidos a tratamiento de ortodoncia, en donde reclutaron trece participantes masculinos (de 11 a 18 años de edad) planificados para la terapia de ortodoncia fija sin extracción. Recolectaron muestras de GCF de cada incisivo central superior y del primer y segundo molar inmediatamente antes (T0), 1h después (T1) y 3-4 días después (T2) de la aplicación de fuerzas ortodóncicas ligeras. Los segundos molares superiores no los incluyeron en el tratamiento y sirvieron como controles. Los niveles totales de NO mostraron niveles de NO significativamente más altos ($p < 0.05$) en T1 en las superficies bucales de los incisivos centrales en comparación con los primeros y segundos molares. Los resultados indicaron un posible papel del NO en OTM en los sitios de presión de los incisivos en los primeros momentos de tratamiento.

Talebian et al., (56) (2021) investigaron el efecto inhibitorio establecido del éster metílico de N(omega)-nitro-L-Arginina (L-NAME) sobre el movimiento dental ortodóncico y el posible papel de la óxido nítrico sintasa en el mecanismo de acción del LiCl (cloruro de litio). Para ello, 70 ratas macho Sprague Dawley las dividieron aleatoriamente en siete grupos: grupo no tratado sin ninguna intervención (i) y los grupos de ortodoncia con movimiento dental que recibieron una inyección diaria de solución salina (ii), 300 (iii) y 600 mg/kg. (iv) de LiCl por vía oral, 10 mg/kg de L-NAME (v) y las combinaciones de 300 (vi) y 600 mg/kg de LiCl (vii) con L-NAME. El primer molar se movió hacia el incisivo con 60 g de fuerza de inclinación mesial aplicada por un resorte helicoidal fijo activado durante 2 semanas. Finalmente obtuvieron que ambas concentraciones de LiCl redujeron significativamente el movimiento de los dientes. Aunque L-NAME fue capaz de reducir el movimiento dental de ortodoncia, no se observaron efectos sinérgicos con LiCl. Además, L-NAME no tuvo impacto en el aumento robusto y significativo de la hormona estimulante de la tiroides (TSH) y la disminución de la triyodotironina (T3) y la tiroxina (T4) en las ratas tratadas con LiCl. Estos hallazgos sugieren que el LiCl disminuye significativamente el movimiento dental ortodóncico en ratas; sin embargo, esta capacidad no parece estar mediada principalmente por la óxido nítrico sintasa.

Es este tipo de investigaciones son las que que despiertan interés sobre el papel del NO y L-Arginina en el movimiento dental sometido a OTM, al igual que abren pautas para la detección de aquellos inhibidores del mismo al resaltar en sus resultados un óptimo o nulo movimiento dental ortodóncico, y ponen de manifiesto la importancia de extrapolar estas investigaciones a sujetos humanos.

También, se han realizado varios estudios para determinar el potencial del quitosano como portador de fármacos orales, al limitar como ya se mencionó anteriormente los efectos adversos de la administración sistémica. Los compuestos a base de quitosano se pueden usar para diseñar un sistema de administración local de fármacos robusto con las propiedades mecánicas requeridas, tiempo de contacto, un perfil de liberación sostenida, mientras se mantiene un contacto íntimo con la mucosa oral (16). Desafortunadamente no hay estudios en donde se demuestre el uso de membranas quitosano para la liberación de L-Arginina, pero si los hay con otro tipo de

fármacos que muestran que el quitosano es un buen vehículo para los mismos y que con adecuadas caracterizaciones se pueden lograr los objetivos deseados (57).

San Wu et al., (58) (2015) evaluaron la actividad antibacteriana y la biocompatibilidad de las membranas de polihidroxialcanoato (3-hidroxi-butarato-co-3-hidroxi-valerato) (PHBV), quitosano (PHBV) / (quitosano) y polihidroxialcanoato (PHBV-g-MA) injertado con anhídrido maleico (MA). Se sembraron fibroblastos de piel de cola de ratón en dos series de estas películas para evaluar la citocompatibilidad. Los análisis de colágeno y proliferación celular indicaron que PHBV, PHBV-g-MA y sus membranas compuestas fueron biocompatibles con respecto a la proliferación de fibroblastos. Sin embargo, la proliferación de fibroblastos, la producción de colágeno y el porcentaje de células normales que crecieron en las membranas de PHBV / quitosano fueron mayores que los de las membranas de PHBV-g-MA / quitosano. Los ensayos de ciclo celular y apoptosis por fibroblastos en las muestras de membrana de la serie PHBV no se vieron afectados por el contenido de ADN relacionado con el daño; es decir, no se observó una rápida apoptosis / necrosis, lo que demuestra el potencial de las membranas PHBV / quitosano o PHBV-g-MA / quitosano para aplicaciones de materiales biomédicos. Las membranas de PHBV-g-MA o PHBV que contienen polisacárido basado en quitosano tuvieron una mejor actividad antibacteriana.

Por su parte Carrero et al.,(59) en el 2019 realizaron la modificación química de quitosano proveniente de conchas de camarón (*Litopenaeus vannamei*) con aminoácidos: L-leucina y L-tirosina (Tyr), con el fin de variar algunas de sus propiedades físicas y químicas, y ampliar su uso en la fabricación de películas. Los derivados (quitosano-L-Leucina y quitosano-Tyr) fueron caracterizados mediante estudios de espectroscopia infrarrojo (ATR-FTIR) y las propiedades térmicas fueron analizadas mediante termogravimetría (TGA). Realizaron ensayos de solubilidad, donde observaron que los derivados obtenidos son solubles en disoluciones acuosas a valores de pH neutro y alcalino, a diferencia del quitosano que solo es soluble bajo condiciones de pH ácido. La citotoxicidad de los derivados fue analizada mediante ensayos de hemocompatibilidad con eritrocitos humanos. Posteriormente realizaron membranas a partir de los derivados de quitosano-L-Leucina y quitosano-Tyr, y determinaron el ángulo de contacto y el proceso de biodegradabilidad. Los andamios fueron preparados usando la técnica de

electrospinning y la morfología de las fibras fue estudiada mediante SEM. En general, los resultados obtenidos por FTIR, TGA y SEM sirvieron como herramientas para verificar la modificación realizada, al permitir ampliar las propiedades físicas y químicas del quitosano puro, principalmente en cuanto a su solubilidad, permitiendo que este novedoso biomaterial sea empleado en múltiples aplicaciones.

Di Martino et. al., (60) (2019) realizaron una película a base de colágeno y quitosano para la administración controlada de una combinación de anestésicos de corta duración. Los espesores de todas las películas preparadas las midieron con un micrómetro. Los resultados indicaron que la carga del fármaco no afecta el grosor total de la película. Se observó una variación mínima en el peso entre las membranas lo que indico una distribución uniforme de los componentes. Utilizaron FTIR ATR para detectar las interacciones entre quitosano y colágeno, así como los posibles cambios estructurales. Sus resultados mostraron que no se forman enlaces químicos entre el quitosano y el colágeno, sino solo interacciones por puentes de Hidrógeno. Debido a la naturaleza de los componentes (quitosano y colágeno), las películas preparadas demostraron un rápido hinchamiento y por otra parte, las propiedades mecánicas de las películas las evaluaron con un analizador de textura, y reportaron que la presencia de un solo fármaco o una combinación de ellos no afecta las propiedades mecánicas de las películas en términos de resistencia a la tracción y alargamiento a la rotura e indican que las películas quitosano-colágeno tienen una buena combinación de resistencia y flexibilidad, comparable con otras películas de polisacáridos como el ácido algínico y la carboximetilcelulosa.

Dodero et al., (61) (2020) sintetizaron membranas electrohiladas a base de quitosano, a las cuales les observaron los efectos de viscosidad de la solución, coagulante y reticulante y finalmente definieron que tipo de estructura era la ideal para fomentar la viabilidad celular. Tuvieron como resultados que las esferas iónicamente reticuladas representan una clase de productos biomédicos extremadamente prometedores, probablemente altamente biocompatibles y caracterizados por nanofibras delgadas y homogéneas con un diámetro de 200 nm, mostrando así la estructura ideal para fomentar la viabilidad celular.

Y finalmente, como un mayor acercamiento a las películas de interés de nuestro estudio, Wang et. al. (62) en el 2019, con fin de mejorar las propiedades térmicas y mecánicas de las películas de quitosano, prepararon y caracterizaron una película de mezcla ternaria de quitosano/curdlan/carboximetilcelulosa (quitosano/curdlan/carboximetilcelulosa), y observaron que, en comparación con el quitosano puro, las películas mezcladas quitosano/curdlan/ carboximetilcelulosa exhibían mejores propiedades mecánicas, permeabilidad y estabilidad térmica. Además, se mejoraron las propiedades de la luz visible de la película de mezcla ternaria. Los análisis de microscopio electrónico de barrido y espectroscopia de infrarrojo de transformada de Fourier indicaron una buena compatibilidad entre el quitosano, el curdlan y el carboximetilcelulosa, lo que llevó a una mejora correspondiente en las propiedades debido a las interacciones entre los tres componentes en el proceso de mezcla. Por lo tanto, establecieron un método eficaz para mezclar curdlan con quitosano y carboximetilcelulosa, y la película de mezcla tiene buenas propiedades térmicas y mecánicas.

Además, Kawasaki et. al. (63) (2015), depositaron una película de polímero compuesta por una mezcla de nanofibras de quitosano y carboximetilcelulosa en una superficie de vidrio. Ellos observaron que la película delgada de la mezcla Ch-carboximetilcelulosa obtenida era estable, y la adhesión de los fibroblastos a la película era más baja cuando la relación de peso de quitosano a carboximetilcelulosa era de 4:6. El potencial ζ y el ángulo de contacto de la película de la mezcla indicaron que se formó un complejo de poliiones de quitosano y carboximetilcelulosa. Concluyeron que la resistencia mecánica de la película compuesta de complejos de nanofibras Ch-carboximetilcelulosa fue mucho mayor que la de la película compuesta de complejos carboximetilcelulosa solubles en agua en quitosano (no nanofibra).

4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

Convencionalmente, un tratamiento de ortodoncia dura aproximadamente 2 años y el uso prolongado de aparatología fija (brackets) puede tener consecuencias para los pacientes, tales como reabsorción radicular, desmineralización, problemas gingivales y caries. Por tal motivo, una manera de reducir la duración del tratamiento ortodóncico es acelerar el movimiento dental. Se han probado múltiples métodos y técnicas para ayudar a la aceleración del movimiento dental, pero la mayoría de ellas son invasivas y pueden llegar a ser incómodas para el paciente, por lo que la terapia farmacológica es el futuro de los avances ortodóncicos en este tema.

La L-Arginina es un aminoácido semi-esencial, la cual también se puede metabolizar en el ciclo de la óxido nítrico sintasa y producir NO, siendo una de sus diversas funciones la contribución en el remodelado óseo. El NO se encuentra de manera basal y ha demostrado tener una actividad bifásica al aplicar fuerzas mecánicas controladas, a mayor expresión de NO, existe una mayor reabsorción ósea debido a una alta actividad osteoclástica, a bajas concentraciones se muestra una mayor actividad de los osteoblastos.

Actualmente, los sistemas de administración de fármacos mucoadhesivos como las películas, interactúan con la capa de moco que cubre la superficie epitelial de la mucosa y las moléculas de mucina, esto aumenta el tiempo de residencia de la forma de dosificación en el sitio de absorción y promueve una acción local. Por lo tanto, las formas de dosificación mucoadhesivas son ventajosas para aumentar las concentraciones del fármaco y también la actividad terapéutica.

Con base a lo anterior planteamos la siguiente pregunta de investigación:

Pregunta de investigación

¿Las películas mucoadhesivas de quitosano caracterizadas permiten la liberación de L-Arginina al 15%?

5. JUSTIFICACIÓN

El quitosano ha demostrado ser un biomaterial con una variedad de propiedades biológicas favorables y que se puede combinar con materiales bioactivos para servir como andamio de ellos; características que lo catapultan para ser un excelente biomaterial para la liberación prolongada de fármacos. Este biopolímero podría actuar como vehículo de la L-Arginina y permitir su liberación para promover la acción del NO en el contexto de la ortodoncia. Por su parte la L-Arginina ha probado ser un aminoácido prometedor en estudios de remodelado óseo en animales, sin embargo, se necesitan estudios experimentales que analicen una vía de administración menos invasiva como las películas mucoadhesivas y su posible aplicación clínica en la aceleración del movimiento dental.

Con base en lo anterior, es importante desarrollar, en primer lugar, un vehículo de entrega (películas de quitosano) que permita la liberación de L-Arginina, que sea seguro, de fácil colocación y ambulatorio, y para ello, también es importante caracterizar sus propiedades físico-químicas.

Aunque hay estudios que demuestran que las películas de quitosano tienen propiedades útiles como suavidad de la superficie, no toxicidad y una liberación rápida de las sustancias incorporadas, se requiere estudiar la naturaleza exacta del perfil de liberación de la combinación propuesta en este trabajo (quitosano/L-Arginina). Evaluar la liberación y las características fisicoquímicas de las películas de quitosano/L-Arginina abrirá camino a futuras investigaciones en ortodoncia acelerada y su eventual aplicación clínica.

6. HIPÓTESIS

- **Hipótesis científica (Hi):** Las películas mucoadesivas de Quitosano caracterizadas permiten la liberación de L-Arginina al 15%

- **Hipótesis nula (Ho):** Las películas mucoadesivas de Quitosano caracterizadas no permiten la liberación de L-Arginina al 15%

7. OBJETIVOS

7.1. Objetivo general

Caracterizar y evaluar la liberación de L-Arginina al 15% en películas mucoadhesivas de quitosano.

7.2. Objetivos específicos

- Cuantificar el pH con un potenciómetro.
- Identificar la porosidad y distribución de poros de las películas mucoadhesivas mediante las imágenes obtenidas en Microscopio Electrónico de Barrido (SEM).
- Determinar hinchamiento mediante la técnica de swelling con solución de saliva artificial.
- Determinar la morfología de espesor y grosor mediante las imágenes obtenidas del microscopio óptico.
- Medir e identificar las interacciones entre los grupos funcionales mediante los espectros FT-IR de las películas mucoadhesivas.
- Determinar la rugosidad de las películas usando un rugosímetro
- Identificar la microestructura de las películas mediante las imágenes obtenidas en Microscopio Electrónico de Barrido (SEM).
- Cuantificar la liberación de L-Arginina al 15% en películas mucoadhesivas de quitosano por medio de la Espectroscopia Ultravioleta-Visible.

\

8. MATERIAL Y MÉTODOS

8.1. Diseño del estudio

- Diseño: experimental.
- De acuerdo al número de las mediciones: longitudinal para las variables: pH, microestructura, hinchamiento, rugosidad, grosor/espesor, porosidad.
- De acuerdo a la medición del fenómeno: Prospectivo.
- De acuerdo con la interpretación del fenómeno: Descriptivo.
- Diseño: *in vitro*.

8.2. Población y muestra

Se realizaron las pruebas de caracterización de acuerdo a la metodología reportada para cada una, citadas en el apartado de procedimientos, técnicas y fuentes de recolección. Se utilizaron 3 películas de 1.6cm x 1.6cm para las pruebas de hinchamiento, otras 3 de 1cm x 2cm para medir el espesor y grosor, y finalmente 3 películas de 2.5cm de diámetro para cada una de las pruebas de pH, porosidad, microestructura, rugosidad, FTIR e hinchamiento, tal y como se muestra en la tabla 2.

Tabla 2. Grupos para las pruebas a realizar

Grupo	Clave
Película de 2.5cm de diámetro de Quitosano con L-Arginina al 15%	ChA15%
Película de 1.6cm x 1.6cm de Quitosano con L-Arginina al 15%	ChA15%
Película de 1cm x 2cm de Quitosano con L-Arginina al 15%	ChA15%

Aunque la metodología no sugiere una “n” nosotros nos basaremos en el resto de técnicas referidas utilizando 3 películas, es decir, pruebas por triplicado.

Tipo de muestreo: Muestreo no probabilístico por conveniencia

8.3. Criterios de selección de la muestra

- **Inclusión:** Películas que tengan el mismo grosor.
- **Exclusión:** Películas cuya mezcla no sea homogénea: que se observen dos fases.
- **Eliminación:** Películas que durante el proceso se rompan, películas contaminadas.

8.4. Variables

Tabla 3. Variables del estudio

VARIABLE	DEFINICIÓN CONCEPTUAL	DEFINICIÓN OPERACIONAL	ESCALA DE MEDICIÓN Y UNIDADES	CATEGORÍA
PELÍCULA DE QUITOSANO	Película de preparación sólida que contiene el o los fármacos aditivos, destinada a ser disuelta en la boca.	Mezcla de carboximetilcelulosa, quitosano y L-Arginina, en donde después de su secado se obtiene una película.	Ordinal, cuantitativa, razón, gramos.	INDEPENDIENTE
L-ARGININA	Bloque químico fundamental llamado "aminoácido". La L-Arginina es convertida en el cuerpo en una sustancia química llamada óxido nítrico.	Medición de dicho aminoácido contenido y liberado de la película por medio de UV visible.	Cuantitativa, razón, continua, numérica.	INDEPENDIENTE
pH	Coeficiente que indica el grado de acidez o basicidad de una solución acuosa.	Medición resultante del potenciómetro, donde los valores del pH varían en una escala que va de 0 hasta 14.	Cuantitativa, razón, continua Numérico.	DEPENDIENTE
POROSIDAD	La porosidad es la propiedad de un material vinculada a los espacios vacíos de los que dispone en su superficie o estructura. El concepto, que alude a la medida y el tamaño de sus huecos, aparece en múltiples ámbitos, como la ingeniería, la metalurgia y la farmacia.	Medición de cantidad de poros presentes en las películas.	Cuantitativa, razón, Continua, micras.	DEPENDIENTE
HINCHAMIENTO	Incremento de volumen debido a la retención de agua de una película.	Medición del peso de la película antes y después de ser sumergida en saliva artificial.	Cuantitativa, razón, continua, gramos.	DEPENDIENTE

ESPESOR/GROSOR	Dimensiones de un cuerpo de tres dimensiones.	Medición de dimensiones del borde de la película mediante las imágenes obtenidas del microscopio óptico en el Software AxioVision.	Cuantitativa, razón, continua, micras.	DEPENDIENTE
FTIR	Técnica que permite identificar los enlaces entre los componentes de una muestra mediante el estudio de la interacción de la radiación electromagnética, en el rango infrarrojo del espectro, con la materia. Permite determinar cualquier componente con enlaces covalentes, ya que los infrarrojos hacen que estos enlaces vibren y emitan energía.	Identificación de los componentes químicos, grupos funcionales, y orientación molecular de la película de Quitosano y L-Arginina mediante espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier.	Cuantitativa, razón, continua Numérico (cm ⁻¹)	DEPENDIENTE
RUGOSIDAD	Conjunto de irregularidades que posee una superficie.	Medición de la rugosidad superficial de las películas con un rugosímetro.	Cuantitativa, razón, continua, micras.	DEPENDIENTE
MICROESTRUCTURA	Los aspectos microscópicamente morfológicos con imágenes de alta resolución (1mm).	Identificación de la morfología y micro estructura de las películas, además de proporcionar información de la relación entre la estructura y el comportamiento funcional de los materiales mediante SEM.	Cuantitativa, razón, continua, micras.	DEPENDIENTE
LIBERACIÓN	La liberación del contenido del principio activo contenido en el vehículo.	Medición de la cinética de la L-Arginina contenida en las películas mediante UV visible.	Cuantitativa, razón, continua, nanómetros.	DEPENDIENTE

8.5. Concordancia y fiabilidad

Se capacitó al investigador por un experto para la síntesis de la película, así como para la medición de las demás variables del estudio. Todas las pruebas se realizaron por triplicado bajo la supervisión del experto en el área.

La tesista adquirió la capacitación en el manejo de todas las técnicas, en el caso de las pruebas del porcentaje de hinchamiento se utilizaron la prueba estadística CCI (coeficiente de correlación intraclase o coeficiente r^2 de Pearson), esto para determinar la confiabilidad, reproductibilidad y concordancia entre las mediciones (nivel de significancia 5% = 0.05). El gold standard fueron las medidas que registró el experto, quien tiene la mayor experiencia, destreza y habilidad. En el caso de las pruebas en SEM/FTIR, y uso del rugosímetro y potenciómetro se realizaron por la tesista e investigador a cargo del equipo. Los reactivos fueron de grado analítico y medidos con instrumentos de laboratorio precisos, calibrados y en buen estado. Se tomaron los valores promedios de las 3 pruebas para cada una de las mediciones.

8.6. Ubicación espacio-temporal

- Dirección de Innovación y Transferencia de Conocimiento (DITCo): para las pruebas de FTIR y el uso de SEM y microscopio óptico.
- Centro Avanzado de Pruebas Analíticas no Destructivas BUAP: para la prueba de liberación.
- Laboratorio Multidisciplinario FEBUAP: para la elaboración de las películas.
- Laboratorio de Biomateriales FEBUAP: para la prueba de hinchamiento y rugosidad.
- Laboratorio de Microbiología Oral FEBUAP: para la prueba de pH y liberación.

9. PROCEDIMIENTOS, TÉCNICAS Y FUENTES DE RECOLECCIÓN

9.1. Técnica de elaboración de las películas

Si bien, como ya explicó en el apartado de antecedentes específicos, no existe en la literatura reportada como tal el procedimiento ni la cantidad de los ingredientes necesarios, incluido el porcentaje de L-Arginina para la elaboración de las películas a base de quitosano, por lo que al reunir diversos datos de múltiples fuentes científicas se formuló una película de acuerdo a las necesidades del proyecto y posterior a ello se procedió a su caracterización para saber si cuentan o no con las características ideales necesarias para hacer una entrega del fármaco (L-Arginina) de manera mucoadhesiva (43, 62-67).

Se sintetizaron las películas de la siguiente manera:

1. En la balanza analítica se pesaron todos los reactivos a utilizar y se reservaron.
2. Se solubilizó 0.75g de carboximetilcelulosa (Sigma- Aldrich) 0.75% en 25ml de agua destilada a 25°C.
3. Una vez obtenida una mezcla homogénea se le agregó 1g de quitosano de bajo peso molecular (Sigma-Aldrich) manteniéndose en agitación de 350 rpm hasta observar una solución homogénea (aproximadamente 30min).
4. En seguida se aumentó la temperatura a 50°- 55°C para poder agregar 4.0125g de L-Arginina (Sigma- Aldrich) al 15%, manteniendo la agitación de 350 rpm hasta observar nuevamente una solución homogénea y en una sola fase (aproximadamente 3 horas).
5. Posterior a ello, se realizó un vaciado de 2 ml de la solución con ayuda de una jeringa milimetrada en cajas Petri (9 cm de diámetro), y se procedió a su secado a temperatura ambiente.
6. Finalmente luego de 14 días se notaron homogéneas y secas. Cada paso realizado se puede observar en la figura 8.

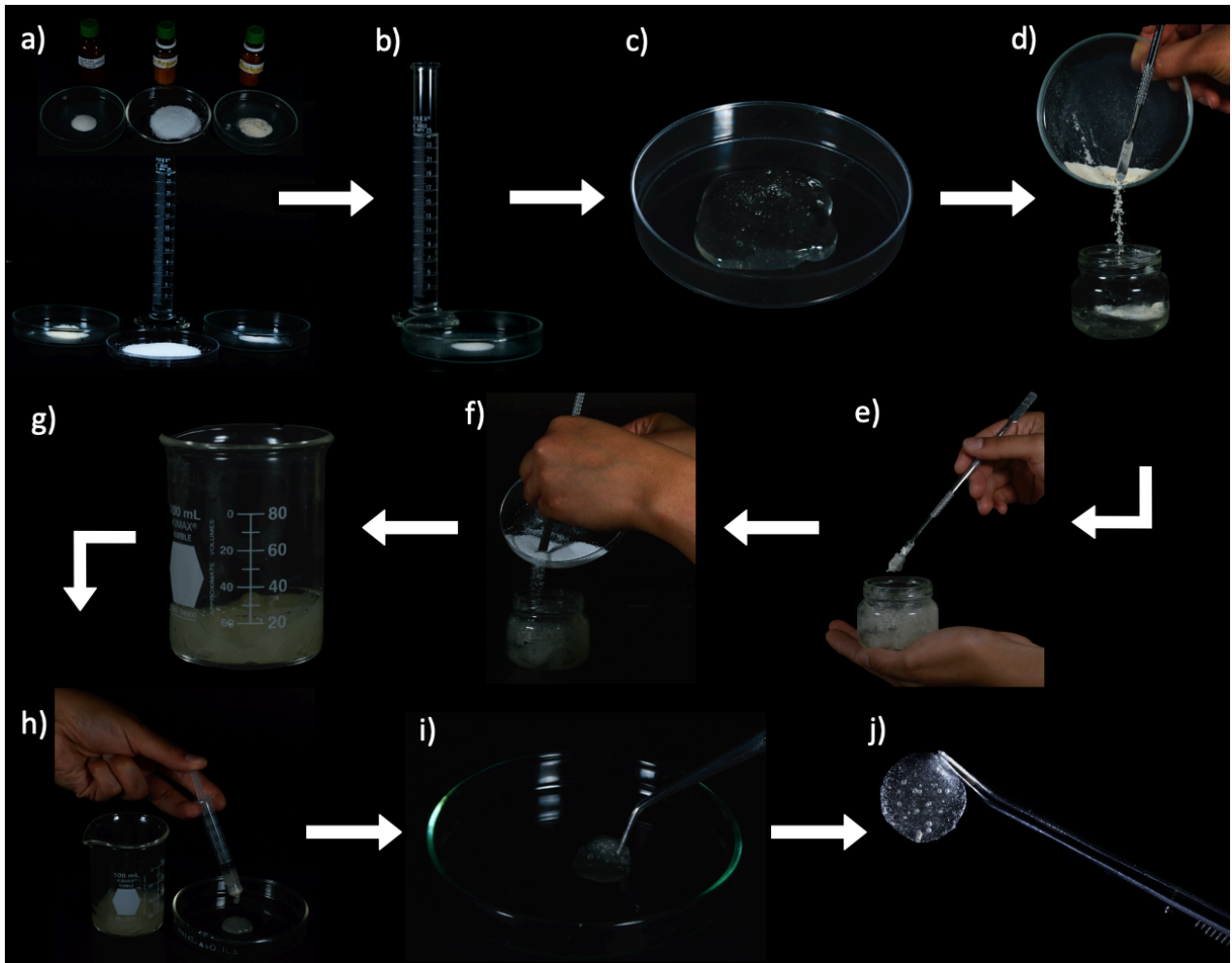


Figura 8. Esquema de pasos a realizar para el procedimiento de las películas constituidas de quitosano, carboximetilcelulosa y L-Arginina. a) Reactivos pesados. b) Se solubilizó la carboximetilcelulosa en agua destilada. c) Carboximetilcelulosa solubilizada. d) Se le agregó quitosano a la mezcla de carboximetilcelulosa y agua. e) Se mezcló perfectamente hasta tener una mezcla homogénea. f) Se agregó a lo anterior L-Arginina. g) Nuevamente se obtuvo una mezcla homogénea. h) Vaciado con ayuda de una jeringa milimetrada en cajas Petri. i) y j) Películas homogéneas y secas.

Fuente propia.

9.2. Determinación de las propiedades y pruebas de caracterización

9.2.1. pH

Durante la liberación de la L-Arginina se tomó el pH de la saliva artificial donde se encontraba la película. Las películas se cubrieron con 20 mL de saliva artificial y se dejaron hinchar durante 1h a 37°C para semejar el ambiente de la cavidad oral tal como se muestra en la figura 9.

El pH de la superficie de las películas se midió al poner el electrodo del medidor de pH en contacto con la superficie de la película y dejar que se equilibrara durante 1 min, se hicieron las mediciones al contacto y después de 30min, 1h, 2h, 5h y 12h en muestras por triplicado (8).

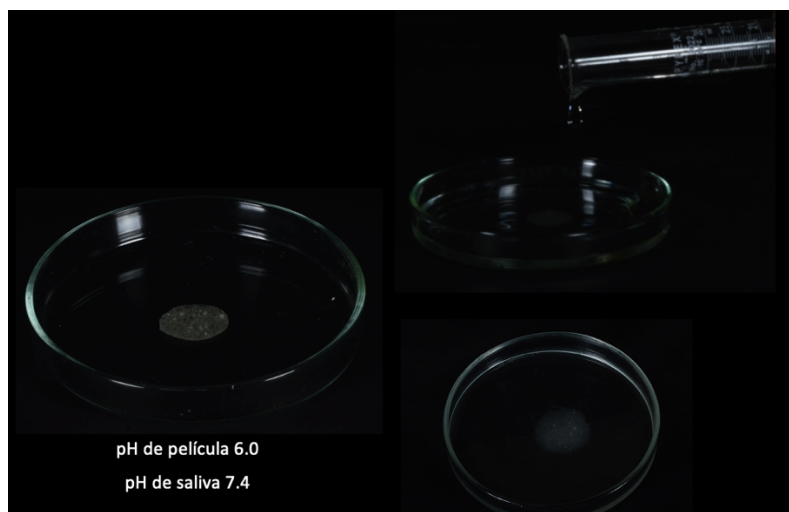


Figura 9. Las películas se cubrieron con 20 mL de saliva artificial, donde posteriormente el electrodo del medidor de pH se puso en contacto con la películas.

Fuente propia.

9.2.2. Porosidad y distribución de poros

Se utilizó un microscopio electrónico de barrido (JSM-5800LV, JEOL, Tokyo, Japan) que trabajaba a un voltaje de 15 kV para obtener imágenes y evaluar la nanoestructura de los andamios. La imagen de referencia del SEM se observa en la figura 10.

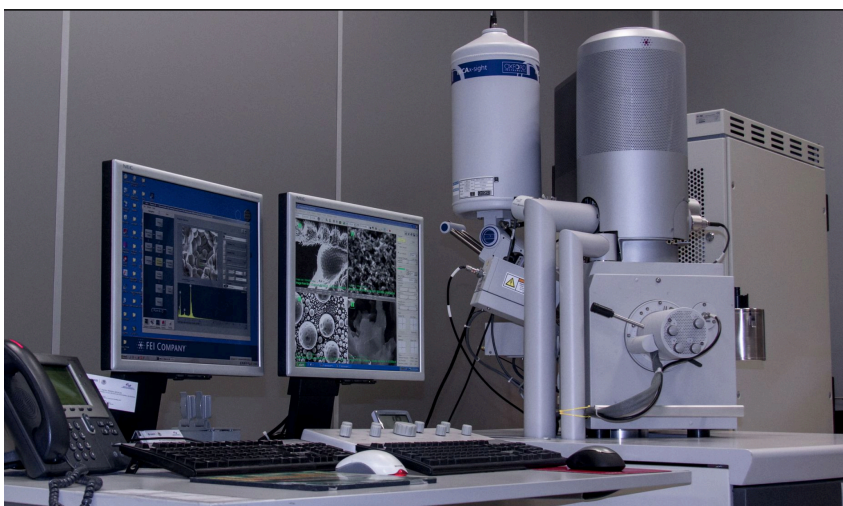


Figura 10. Ejemplo de un Microscopio Electrónico de Barrido (SEM). Fuente tomada de la página del laboratorio CONAHCYT.

Antes de comenzar el proceso de formación de imágenes, los andamios se recubrieron con oro usando un recubridor de pulverización catódica en un ciclo doble consecutivo con un intervalo de 30 segundos a 45 mA para producir una superficie conductora. Posteriormente, en cada sitio de las 3 películas se tomaron 4 imágenes para tratar de registrar y detectar si había la presencia de poros (cantidad de micras de cada poro y el número de los mismos), al igual que el registro de las superficies planas y donde se encontraban irregularidades (43).

9.2.3. Hinchamiento o capacidad de absorción de agua

Para determinar el hinchamiento o swelling, se compararon las películas antes y después de ser sumergidas en saliva artificial. Para ello se utilizó una cuchilla de corte de papel estándar para cortar las películas en forma cuadrangular de 1.6cm x 1.6cm y así poder hacerlas de un tamaño uniforme.

Primero se determinó el peso inicial de cada muestra de las películas colocadas en una caja petri con ayuda de una balanza analítica Ohaus PR124, posteriormente dichas muestras fueron inmersas en 5ml de saliva artificial (pH: 7.54) a una temperatura constante de 37°C con la ayuda de una estufa de laboratorio de secado para imitar las condiciones térmicas de la saliva en cavidad oral tal como se muestra en la figura 11 y 12.



Figura 11. Saliva artificial, películas cortadas e instrumentos para elaboración de la prueba de hinchamiento. Fuente propia.



Figura 12. Películas inmersas en 5ml de saliva artificial a 37°C en la estufa de secado. Fuente propia.

Para determinar el peso de las películas hinchadas se retiraron las muestras de la solución de saliva a los 5min y 60 min, se secó la saliva de la superficie con papel filtro para nuevamente ser pesadas en la balanza analítica y después se regresaron al contenedor con saliva del que fueron retiradas.

El hinchamiento de las muestras que representa la masa final hinchada con respecto a la masa inicial completamente seca se determinó aplicando la siguiente ecuación:

$$\text{Relación de Hinchamiento } H_i = (m_2 - m_1) / m_1 \times 100$$

Donde H_i es el porcentaje de líquido absorbido por la película, m_2 es el peso de la película húmeda a diferentes tiempos y m_1 el peso de la película inicial antes de ser sumergida en la saliva artificial (60, 68, 69).

9.2.4. Espesor/Grosor

Se utilizó una cuchilla de corte de papel estándar para cortar las películas a una longitud de 1cm x 2cm y se usó un microscopio óptico (Zeiss AXIO). Las muestras se colocaron sobre tiras adhesivas de doble cara para que las películas se mantuvieron estables.

El espesor se tomó en 3 películas en 5 posiciones diferentes, 4 ubicados a lo largo del borde incluyendo los extremos (1–4) y 1 en el centro del borde (5) utilizando el lente 5x/0.13HD tal como se muestra en la figura 13. Posteriormente se midió el espesor en las imágenes obtenidas en el Software AxioVision.

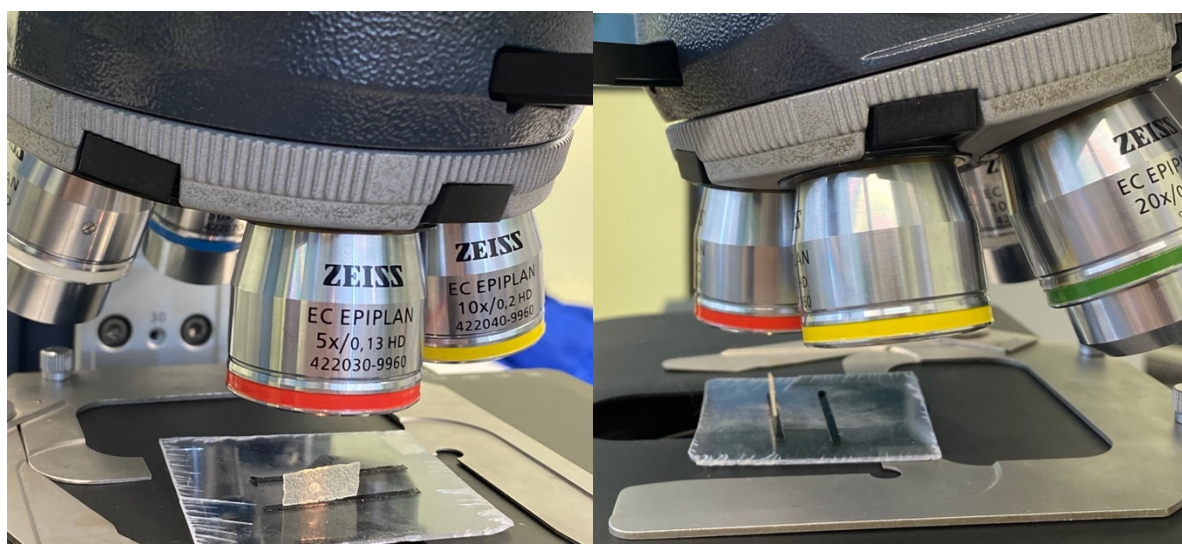


Figura 13. Película colocada bajo el lente del microscopio óptico (Zeiss AXIO)

Fuente propia.

Finalmente se calculó el valor promedio del grosor obtenido de todas las mediciones (60,70).

9.2.5. Espectroscopía Infrarroja con Transformadas de Fourier (FTIR)

Se realizó el análisis estructural mediante Espectroscopía Infrarroja (Vertex 70 Bruker Optics-Bruker Corporation, Billerica, Massachusetts, EE) para detectar las interacciones entre el quitosano, carboximetilcelulosa y L-Arginina, así como sus posibles cambios estructurales. Las pruebas fueron llevadas a cabo en la Dirección de

Innovación y Transferencia de Conocimiento de la BUAP, donde se analizaron en el espectroscopio de rayos infrarrojos para observar el espectro de cada película. El ejemplo del aparato utilizado se puede observar en la figura 14.

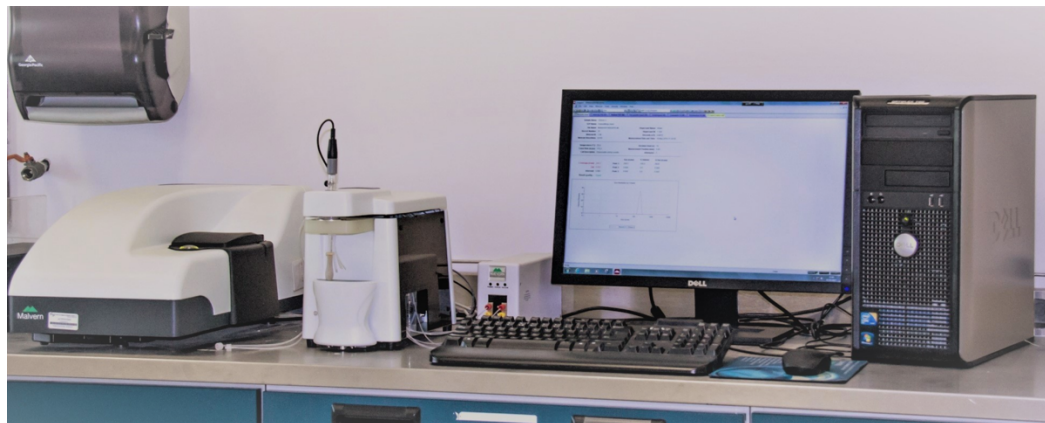


Figura 14. Ejemplo de un espectrómetro FTIR. Fuente tomada de la página del laboratorio CONAHCYT.

Se examinaron en cuatro diferentes zonas de tres muestras de 2.5cm de diámetro y se graficó un espectro por cada una. El espectro de cada muestra fue medido en -1 un rango longitud de onda en el rango de número de onda 400-4000 cm^{-1} a una resolución de 4 cm^{-1} y 32 barridos a temperatura ambiente (aproximadamente 26°C), y se identificaron los espectros las bandas de absorción de los grupos funcionales de cada componente (61, 71-74).

9.2.6. Rugosidad

Para medir la rugosidad y topografía de la superficie se utilizó una máquina verificadora de rugosidad superficial Mitutoyo SURFTEST SJ-310 (rugosímetro), la cual se observa en la imagen 20. El perfil tridimensional del valor la rugosidad media aritmética (R_a) se obtuvo utilizando el rugosímetro con interferometría de apantallamiento de fase, que es una técnica óptica común para la perfilometría de superficie sin contacto. El valor de la rugosidad se calculó mediante la siguiente ecuación:

$$R_a = \frac{\int |z(y)| dy}{L}$$

Donde L es la longitud del eje y, y z (y) representa la curva de rugosidad.

Además, los datos de profundidad total de la rugosidad (R_t) y rugosidad media cuadrática (R_q), al igual que la rugosidad media aritmética (R_a) se obtuvieron e imprimieron directamente del aparato (73, 75). En la figura 15 se puede apreciar el rugosímetro y su uso para observar la rugosidad de las películas.

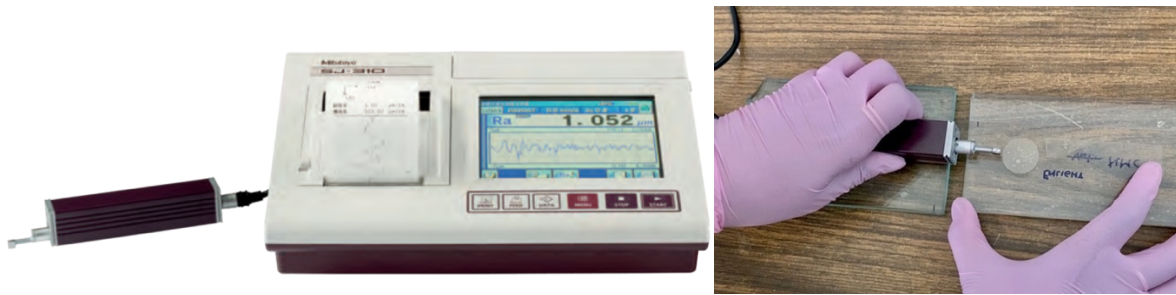


Figura 15. Prueba de rugosidad en una de las películas con el rugosímetro Mitutoyo SURFTEST SJ-310. Fuente propia.

9.2.7. Microestructura

Esta prueba se llevó a cabo montando las películas y recubriéndolas con oro en un ambiente inerte usando SEM, el cual trabajaba a un voltaje de 15 kV (JSM-5800LV, JEOL, Tokyo, Japan) para obtener imágenes ampliadas adecuadas y así poder observar la microestructura, ya fuese lisa y uniforme o rugosa (37,38). El ejemplo del equipo se encuentra en la figura 16.

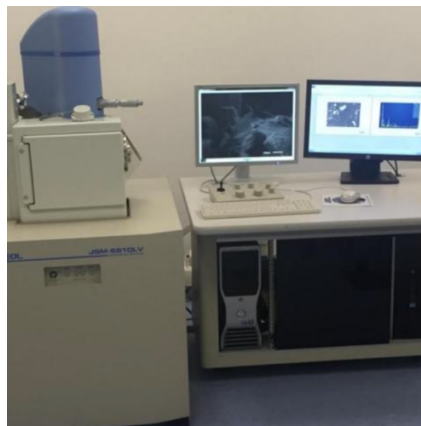


Figura 16. Microscopio electrónico de barrido (JSM-5800LV, JEOL, Tokyo, Japan)
Fuente tomada de la página del Instituto Transdisciplinar de Investigación y Servicios -
ITRANS

9.2.8. Liberación

Se acudió al laboratorio de microbiología de la FEBUAP en donde se realizó la prueba inicial de liberación con la ayuda del ensayo de Bradford el cual se basa en una reacción colorimétrica de proteínas con un tinte, Coomassie Azul Brillante G-250 (76). La prueba consistía primeramente en saber si se detectaba o no la L-Arginina con dicho ensayo y posteriormente poder evaluar su cinética. Para ello se disolvió 2.5gr de L-Arginina en 15ml de agua destilada y se tomaron muestras de 1ml de esta solución las cuales fueron colocadas en pocillos, posterior a ello se añadió a cada pocillo 200 μ l de Bradford (imagen 22), y se esperó a que se uniera a la L-Arginina que es la que se quería cuantificar. Se llevó dicha solución a celdas de cuarzo para observar en un Espectrofotómetro UV/Vis Ultrospec 1000, pero la prueba no fue lo suficientemente sensible para poder observar L-Arginina, puesto que Bradford es más específico para proteínas.

Debido a lo anterior, se optó para la realización de la prueba el uso de un espectrofotómetro UV-Visible LUS-B15 VELAB (VE-5100UV), el cual es un espectrofotómetro de doble haz de alta sensibilidad con una longitud de onda de 190 a 1100 nm para espectros de absorbancia de compuestos químicos y bioquímicos específico para aminoácidos como la L-Arginina (76). El experimento realizado se ejemplifica en la figura 17.



Figura 17. Realización de la prueba de liberación mediante el ensayo de Bradford.

Fuente propia.

Para el comienzo de la prueba de liberación con el uso de un espectrofotómetro UV-Visible LUS-B15, se dio a la tarea de primero investigar a que longitud de onda era visible la L-Arginina (77), por lo que para ello se realizaron varias soluciones, las cuales se muestran en la tabla 4 y figura 18.

Tabla 4. Mezclas de los reactivos para medir la absorbancia de L-Arginina para la prueba de liberación en Espectrofotómetro UV-Visible.

Frasco 1 A	19.5ml de agua destilada 0.5ml de etanol 0.005gr de BPA	Frasco 2 A	19.5ml de saliva 0.5ml de etanol 0.005gr de BPA
Frasco 1 B	19.5ml de agua destilada 0.5ml de etanol 0.005gr de BPA 0.005gr de L-Arg	Frasco 2 B	19.5ml de saliva 0.05ml de etanol 0.005gr de BPA 0.005gr de L-Arg
Frasco 1 C	19.5ml de agua destilada 0.5ml de etanol	Frasco 2C	19.5ml de saliva 0.05ml de etanol
Frasco 3A (blanco)	19.5ml agua destilada 0.5ml de etanol 0.005 gr de L-Arg	Frasco 3B (blanco)	19.5ml de saliva 0.5ml de etanol 0.005gr de BPA

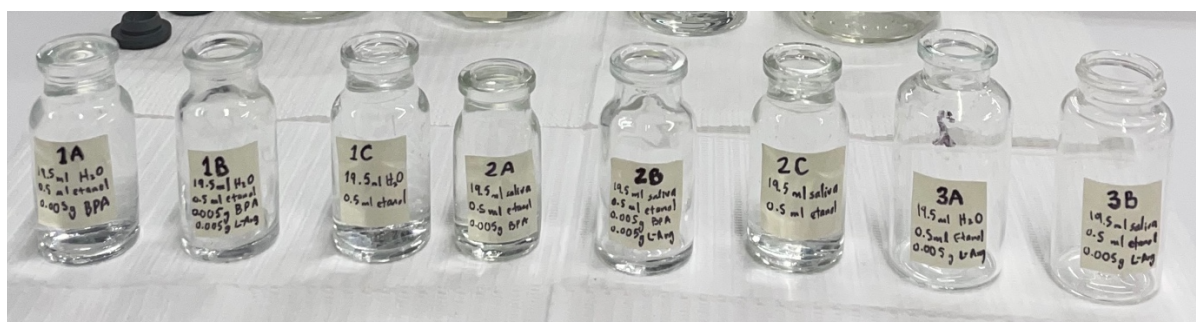


Figura 18. Mezclas de los reactivos enfrascados para observar la absorbancia de L-Arginina.

Fuente propia.

Posteriormente, tal y como se observa en la figura 19, 20 y 21, se procedió a introducir cada solución en celdas de cuarzo de 3.5ml para ser llevadas a observación en el espectrofotómetro UV-Visible LUS-B15 y así poder obtener los datos requeridos.



Figura 19. Muestras en la celda de cuarzo. Fuente propia.

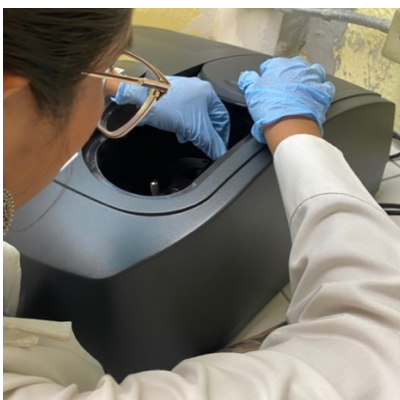


Figura 20. Celda de cuarzo cargada con una muestra al espectrofotómetro UV-Visible. Fuente propia.



Figura 21. Celda de cuarzo con muestra en el espectrofotómetro UV-Visible. Fuente propia.

Finalmente y como prueba adicional para la observación de la liberación de la L-Arginina también se optó por la técnica de cromatografía en capa fina (TLC), la cual consiste en separar mezclas de compuestos con base en diferencias de polaridad para un análisis cualitativo y cuantitativo de las muestras (36), tal como lo es para la L-Arginina. Para ello primero se hicieron una mezcla de varios reactivos, los cuales se muestran en la tabla 5.

Tabla 5. Mezclas de los reactivos para la prueba de cromatografía en capa fina (TLC).

FRASCO 1	0.05 ninhidrina 25 ml de agua
FRASCO 2	(concentración al 15% de Arginina) 25 ml de agua destilada 0.25 g de L-Arginina
FRASCO 3	0.05 BPA 25ml de agua

Después se colocaron unas gotas del Frasco 2 (L-Arginina) en la base de la capa fina y posteriormente con un hisopo embebido en la solución del Frasco 1 (ninhidrina) se usó como agente revelador para la L-Arginina esparciéndolo por toda la capa, y finalmente se procedió a hacer lo mismo en otra capa fina pero con el Frasco 3 (BPA) como solución reveladora, mostrándose dicho procedimiento en la figura 22.

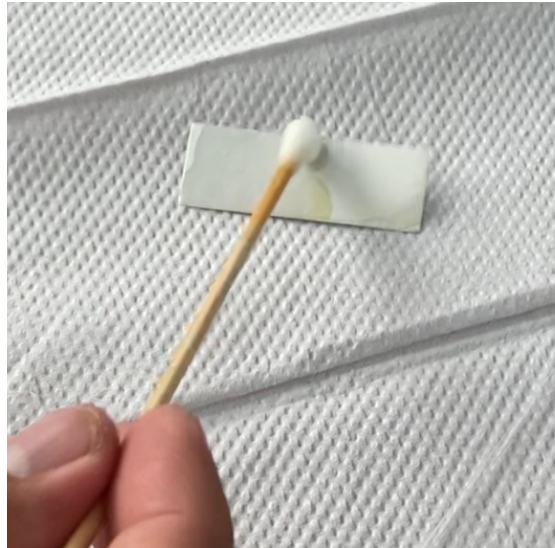


Figura 22. Colocación de la solución del frasco 1 con ayuda de un hisopo sobre la capa fina.

Fuente propia.

Una vez realizado ello, se colocó cada capa fina en etanol por 1h para ver si revelaba la presencia de L-Arginina contenida en el Frasco 2 previamente colocada.

10. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Por la naturaleza del estudio solo se llevó a cabo estadística descriptiva, así como también porcentajes y gráficos correspondientes, medidas de tendencia central, de dispersión, posición y de forma.

El resumen del análisis estadístico empleado se puede observar en la tabla 6.

Tabla 6. Pruebas estadísticas a utilizar.

Pruebas	Análisis estadístico
pH	Estadística descriptiva
Hinchamiento	Estadística descriptiva
Espesor y grosor	Estadística descriptiva
FTIR	Estadística descriptiva
Rugosidad	Estadística descriptiva
Microestructura	Estadística descriptiva
Porosidad	Estadística descriptiva
Liberación	Estadística descriptiva

11. RESULTADOS

11.1. pH

Con el objetivo de analizar la estabilidad y el nivel de pH de las películas se realizó un ensayo de pH al contacto con saliva artificial. Los resultados se expresaron como la media y fueron obtenidos a partir de un experimento realizado por triplicado, los cuales se pueden observar en la tabla 7.

Tabla 7. Promedio de la medición de pH de las 3 películas bajo varios intervalos de tiempo.

Intervalo	pH	Hora de toma de prueba
Antes de contacto con saliva	6.0	7:50
Contacto con saliva	7.5	8:00
30 min	8.0	8:30
60min	8.2	9:00
2hrs	8.3	10:00
5hrs	8.5	13:00
12hrs	8.7	20:00

11.2. Microestructura

La figura 23 muestra micrografías del SEM de las películas compuestas de quitosano, carboximetilcelulosa y L-Arginina, en donde se puso gran atención al observar las microfotografías tomando en cuenta lo descrito en la literatura (78, 79).

A una amplificación de x100, x500, x2500 y x5000, se pudieron observar en todos los casos una estructura lisa, uniforme y con presencia de irregularidades en algunas partes de las películas, además de no presentar algún tipo de grietas. Durante los estudios sobre la morfología de las películas también se encontró que tenía una superficie densa y morfología asimétrica, con existencia de ciertas cavidades irregularmente esféricas.

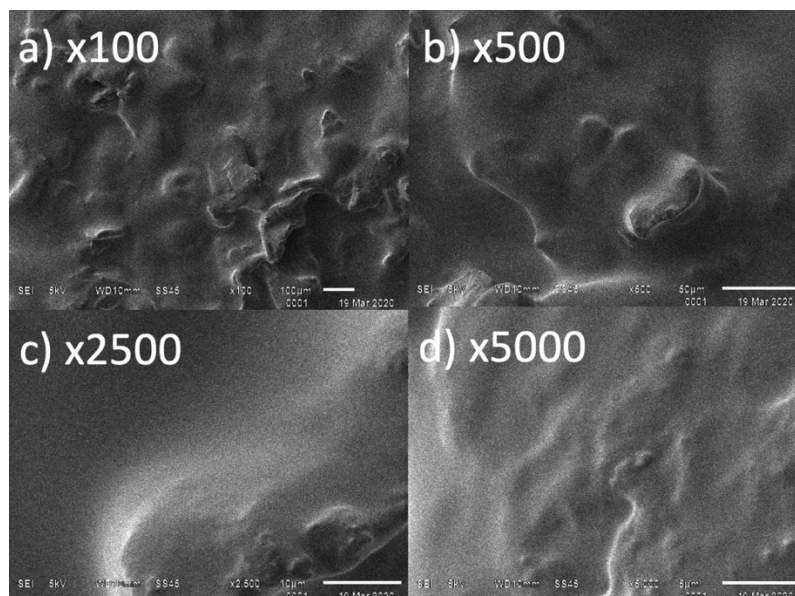


Figura 23. Micrografías del SEM de las películas. a) superficie irregular con presencia de cavidades esféricas. b) superficie con ciertas irregularidades y sin grietas. c) se observa una superficie uniforme, lisa y relativamente plana. d) pocas irregularidades en la superficie, no muy lisa pero sin grietas.

11.3. Hinchamiento

La tabla 8 muestra la cantidad de hinchamiento en peso y porcentaje de las películas sumergidas en saliva artificial a los 5 minutos y a los 60 minutos. Se observó que el comportamiento de las tres películas fue muy similar y se tuvieron valores de diferencia muy parecidos entre ellos. Se puede observar que el valor máximo de hinchamiento a la hora fue de 325.65%.

Tabla 8. Cantidad en peso y porcentaje de hinchamiento de las películas.

	Peso inicial	Peso a los 5 min	% de absorción de saliva	Peso a los 60min	% de absorción de saliva
Película 1	0.1405	0.3790	169.75%	0.5917	321.13%
Película 2	0.1407	0.3874	175.33%	0.5989	325.65%
Película 3	0.1407	0.3829	172.13%	0.5980	325.01%

Las películas hinchadas presentaron flexibilidad, textura suave, buena hidratación y recuperaron su color inicial (antes de someterse el secado) tal como se observa en la figura 24.



Figura 24. Película antes de sumergirse en saliva artificial y a los 60 minutos después hincharse.

11.4. Grosor/espesor

En la figura 25 se muestra que las películas presentaron un espesor promedio que varía de los $50\mu\text{m}$ — $62\mu\text{m}$ según las imágenes obtenidas del microscopio óptico (Zeiss AXIO). Se puede lograr observar que tanto en los extremos de la película como a la mitad se mantiene constante el grosor.

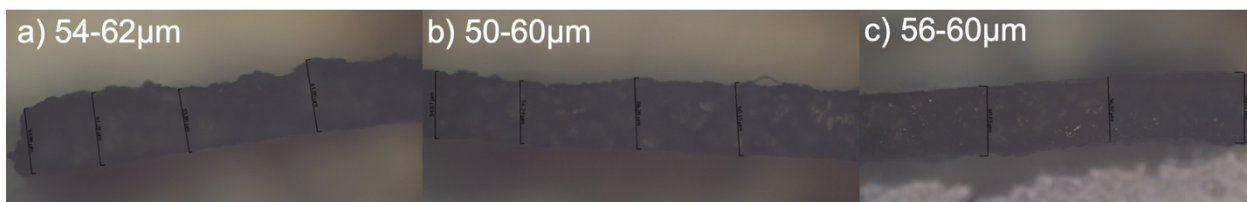


Figura 25. Espesor de las películas tomadas en el Microscopio Óptico (Zeiss AXIO). a) extremo derecho. b) centro. c) extremo izquierdo.

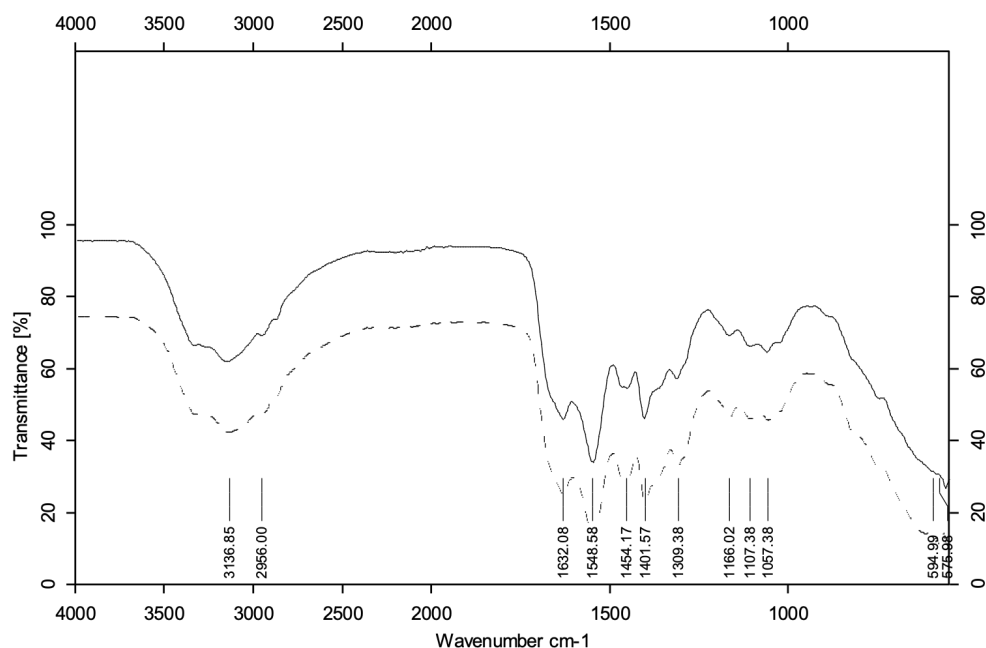
11.5 Espectroscopía Infrarroja con Transformadas de Fourier (FTIR)

Las interacciones entre los componentes de las películas de mezcla y los tipos de enlaces químicos analizados mediante espectroscopia infrarroja los podemos ver en la figura 26, se marcaron las bandas en las imágenes tal y como se reporta en la literatura (80, 81, 82), se tomó en cuenta además los espectros FTIR de L-Arginina, quitosano y

carboximetilcelulosa obtenidos de la casa comercial Sigma Aldrich, mismos que fueron los utilizados para este estudio y los cuales se encuentran en el apartado de Anexos.

Para el quitosano, la banda ancha de 3300–3500 cm^{-1} se observó a las vibraciones de estiramiento –NH– y –OH, y también mostraron dos picos a 1632 y 1548 cm^{-1} , que se atribuyen a las amidas I y las amidas II, respectivamente. La interacción entre la celulosa y el quitosano también se identificó por la banda del grupo hidroxilo presente en el rango de 3300 a 3500 cm^{-1} .

La banda a 1454 cm^{-1} está asociada a la atracción intermolecular del hidrógeno en el C6 del grupo del anillo aromático. Las bandas de 1166 y 1107 cm^{-1} se deben al estiramiento de C-O-C y al estiramiento asimétrico del anillo, el espectro exhibió una banda ancha entre 3450 y 3100 cm^{-1} , asociada a estiramientos de O-H y N-H. La banda a 1549 cm^{-1} corresponde a un estiramiento asimétrico del enlace C=O. La banda de 1454 cm^{-1} está asociada a la vibración del estiramiento del grupo CH₃. Además, la banda a 1310 cm^{-1} se debe al estiramiento simétrico del grupo CO₂. A 1088 cm^{-1} se detecta la banda correspondiente a la torsión del grupo CH_n. Finalmente, la banda a 955 cm^{-1} está relacionada con el estiramiento de C-N. Todo lo anterior mencionado se muestra en la figura 26.



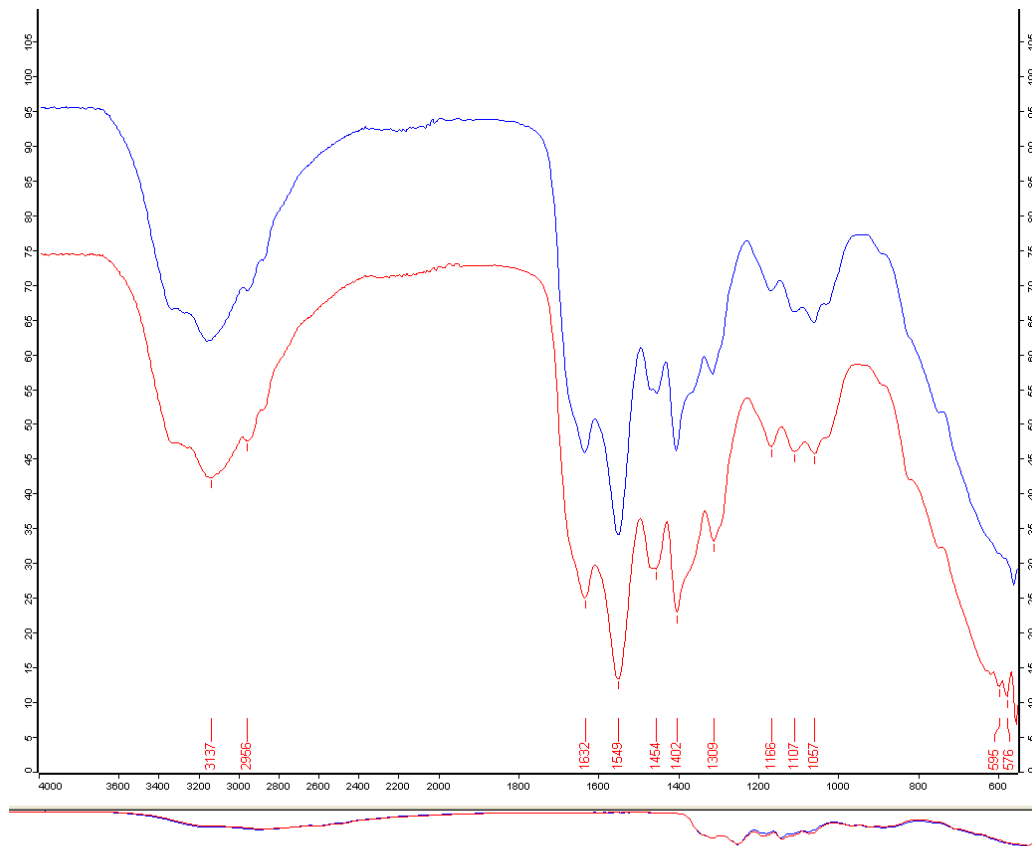


Figura 26. Espectros FTIR de las películas. Cada color indica una película diferente de Quitosano, Carboxilmetilcelulosa y L-Arginina

11.6 Rugosidad

Los datos de la rugosidad media aritmética (R_a), profundidad total de la rugosidad (R_z) y rugosidad media cuadrática (R_q) se obtuvieron e imprimieron directamente de la máquina verificadora de rugosidad superficial Mitutoyo SURFTEST SJ-310 (42, 73, 75), los cuales se muestran en la tabla 9 en donde se demuestran los valores en micras. La lectura de las medidas graficadas que se observaron en la pantalla de la máquina verificadora de rugosidad (rugosímetro) se imprimieron en un documento gráfico, los cuales se pueden observar en la figura 27.

Tabla 9. Datos obtenidos de la máquina verificadora de rugosidad superficial Mitutoyo SURFTEST SJ-310

	PELÍCULA 1	PELÍCULA 2	PELÍCULA 3
Ra	11.95 μm	12.75 μm	11.00 μm
Rz	58.65 μm	66.20 μm	47.38 μm
Rq	14.85 μm	16.07 μm	12.73 μm



Figura 27. Gráficas obtenidos de la máquina verificadora de rugosidad superficial Mitutoyo SURFTEST SJ-310 en donde se observan las crestas y valles en el eje de las x y y que determinan la cantidad de rugosidad de las 3 películas

Como resultados se obtuvo una media para cada valor promedio el cual fue:

- Valor promedio de Ra: 11.9 μm
- Valor promedio de Rz: 57.37 μm
- Valor promedio de Rq: 14.55 μm

11.7. Porosidad

En las micrografías tomadas con el SEM las cuales se muestran en la figura 28, a una ampliación de x50, x100, x250 y x1000, se puede notar una distribución homogénea, incluso sin la presencia de micro o macroporos y sin interconectividad porosa visible presente en las películas.

Por otro lado, la mezcla de quitosano con carboximetilcelulosa y L-Arginina, produjeron ciertas irregularidades en la superficie de las películas, sin presentar poros de ningún tipo.

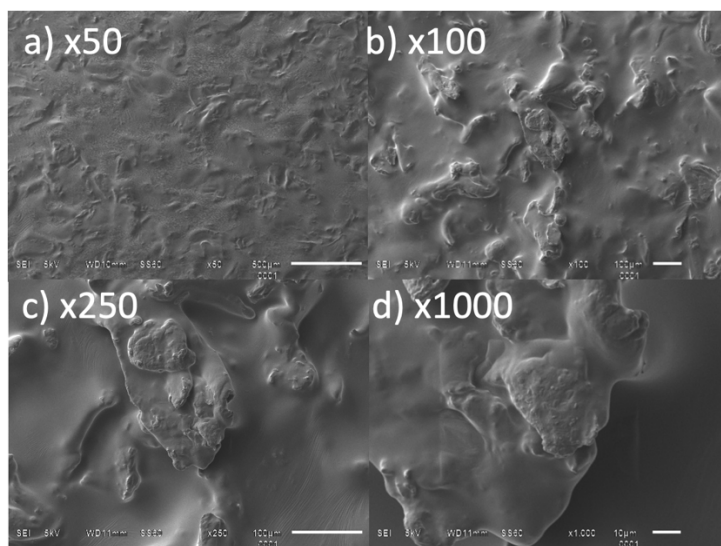


Figura 28. Micrografías del SEM de las películas. a), b), c) y d) superficies con ciertas irregularidades y sin presencia de poros, se observa incluso como se amplifica la misma imagen para observar a mayor detalle la irregularidad y poder corroborar que no hay presencia de orificios microscópicos.

11.8. Liberación

Los resultados obtenidos con la técnica de Bradford no fueron favorables, pues la L-Arginina no fue sensible para poder observarse con tal técnica, pero si se logró saber y conocer que dicho método es preciso para únicamente proteínas.

De acuerdo a la prueba realizada en el espectrofotómetro UV-Visible LUS-B15 VELAB para lograr observar la absorbancia de L-Arginina, se obtuvo que el mayor pico fue a los 282nm, número indicativo donde se presume se lee dicho aminoácido (77). Tales resultados se pueden observar en la imagen 25, en donde se graficó una de las lecturas de los frascos de las mezclas con L-Arginina, Bisfenol A (BPA) y agua destilada, la cual se encuentra en la figura 29.

12. DISCUSIÓN

El objetivo de este trabajo fue sintetizar películas mucoadhesivas de quitosano reforzadas con carboximetilcelulosa cargadas de L-Arginina al 15%, las cuales al someterse a diferentes pruebas de caracterización se observaron resultados que fueron contrastados con la literatura. Dichas pruebas discutidas son pH, microestructura, liberación, porosidad, FTIR, hinchamiento, grosor/espesor y rugosidad respectivamente y se presentan a continuación.

12.1. pH

El pH (potencial de Hidrógeno) salival es en promedio de 6.5 y 7.5, así que teniendo en cuenta lo anterior, una película con un pH demasiado ácido o básico puede afectar el área de aplicación y provoca daños en la mucosa oral que causan molestias al paciente que van desde leves a severos, además de incluir también en el pH de las películas preparadas (35), de ahí la importancia de tener un control del mismo, puesto que de ello depende una parte de la biocompatibilidad de las mismas con las mucosas del paciente.

Las películas sintetizadas en el presente proyecto se encuentran en el rango aceptado de pH oral las cuales fueron de 7.5 – 8.7, con lo cual se esperaría que no provoquen daños en los tejidos circundantes ni efectos adversos para los pacientes. Por ello, es importante conocer y saber el tipo de reactivos utilizados para la síntesis de las películas, pues de eso depende en gran medida su comportamiento de pH en cavidad oral. Por ejemplo, Patel et al. (83) describieron que al aumentar el contenido de polivinilpirrolidona (polímero sintético de monómeros de vinilpirrolidona), disminuyó proporcionalmente el pH de la película que prepararon en su estudio, donde resaltaron que resultados muy ácidos no son del todo favorables para las mucosas. Por otra parte, Mahajan et al., (84) explican que el pH influye en la superficie tanto de las mucosas como la de los polímeros, además reportan que la mucoadhesión es óptima en condiciones de pH bajo (<6), pero a valores de pH más altos (>8) se produce un cambio en la conformación en una estructura similar a una barra que los hace más disponibles para la interdifusión y la interpenetración. A valores de pH muy elevados, los polímeros cargados positivamente como el quitosano forman complejos de polielectrolitos con moco y exhiben altas fuerzas mucoadhesivas (84), lo cual con respecto a esta investigación y teniendo

en cuenta que se observa un pH de 7.5 y alcanzando el pH máximo a las 12 hrs de 8.7, indicaría una gran capacidad de adhesión, interdifusión e interpenetración. También, en el estudio de Dattatraya et al., (8) en el 2012 describieron que el pH de la interfase polímero-sustrato y el pH de la saliva como medio de disolución afectan el comportamiento del polímero y que el pH del microambiente que rodea al polímero mucoadhesivo puede alterar el estado de ionización y, por tanto, sus propiedades de adhesión, por ejemplo, los polímeros que presentan aniones carboxilato, a pH más altos las cadenas se expanden por completo debido a la repulsión electrostática de estos aniones permitiendo así la adhesión. Una vez mencionado lo anterior, se tiene en cuenta que aún falta por realizar pruebas de mucoadhesión a las películas sintetizadas pero se esperaría que esta sea lo bastante favorable debido al pH de 7.5 - 8.7 obtenido, y a la interacción presente entre los polímeros y sus grupos carboxilos.

Por otro lado, el pH de las películas no siempre tiene que ser ácido o básico, depende del objetivo que se desee alcanzar, en ese sentido Shanmugapriya et al., (67) refieren que el pH que se necesita para una película que se aplique en heridas debe ser ligeramente ácido en la superficie (4.0 y 6.8), debido a que no solo facilita el control de la infección en la superficie de la herida, sino que también acelera y mejora la proliferación celular y la formación de fibroblastos (67), pero el cual no es el objetivo de esta investigación.

12.2. Microestructura

Varias propiedades superficiales de las películas como la textura (lisa/áspera), la distribución del fármaco (homogeneidad, agregada/dispersa), el espesor, entre otras, se pueden determinar mediante SEM, el cual, es uno de los métodos más precisos para dichas pruebas, además, la literatura coincide en que estos análisis se debe evaluar así por la naturaleza de la morfología superficial de las películas, por lo que en esta investigación se dió a la tarea de ver la microestructura con dicha prueba (35). En este sentido, en las películas del presente estudio se llega a observar una estructura definida y uniforme y con ciertas zonas planas, lo que nos permite hacer un comparativo con las películas formuladas por Wang et al., (62) en el 2019, quienes observaron las superficies de las películas mucoadhesivas realizadas a base de quitosano, quitosano/curdlan y quitosano/curdlan/carboximetilcelulosa, en donde describen como éstas se llegan a

mostrar lisas con estructuras compactas, siendo un indicativo de compatibilidad para así formar una compleja estructura de red (62).

Por otro lado, algo que fue notorio en las películas elaboradas en esta investigación fue que conforme pasaron los días durante el proceso de secado, la película se iba viendo mejor integrada, algo que también mencionan Pinotti et al., (85) en el 2007, donde mostraron que después de que las películas se secan, la microestructura de la superficie se relaciona principalmente con la disposición de los diferentes componentes de la película, además de que si varios polímeros tienen una buena compatibilidad, sugiere que la formación de la película es homogénea y densa, pero, por razones termodinámicas, las moléculas pueden separarse, lo cual lo confirman Limpa et al., (86) en el 2012, en donde en su estudio explican que la incorporación de ciertos polímeros en películas puede provocar cambios en la estructura de la película tanto a nivel molecular como morfológico, reduciendo o aumentando su rigidez. Así que es posible que al momento de colocar las películas mucoadhesivas de este proyecto en cavidad oral, las características de microestructura cambien, aunque no de manera desfavorable, debido a que las interacciones entre la mucosa y el polímero provocarían cambios morfológicos debido a la adhesión y a su posterior degradación, lo cual sería factible haciéndoles pruebas de adhesión, degradación y rigidez en un futuro.

También en las películas también se observó la presencia de cavidades esféricas cuya presencia puede explicarse según lo reportado por Kong et al., (78) en donde reportan que por las interacciones electrostáticas entre las moléculas de los polímeros, por la formación de grandes agregados, la acción de la superficie y la fuerza de agitación al momento de realizar las películas se llegan a formar estas cavidades, las cuales, se llenan de agua libre y se vacían después de la evaporación durante el proceso de secado.

Finalmente, la rugosidad observada en las micrografías SEM probablemente esté relacionada con los fuertes enlaces de hidrógeno intermoleculares entre la carboximetilcelulosa y el quitosano, lo cual lo explican Cai et al., (79) en su estudio donde también sintetizaron películas a base de carboximetilcelulosa y quitosano, haciendo referencia a que los enlaces obtenidos entre ambos polímeros podrían dar lugar a un estado de gel caótico en la solución que conduce a una superficie rugosa.

12.3. Hinchamiento

Uno de los principales reportes que nos sirvieron como referencia para la síntesis de las películas en este proyecto de investigación fue el realizado por Biswal et al., (87) quienes mostraron que la carboximetilcelulosa, uno de los principales componentes utilizados en la síntesis de biopelículas en este trabajo, es un agente espesante único que contribuye a la estabilidad de la suspensión, la adherencia y de importancia para la prueba de hinchamiento, ya que su presencia aumenta las propiedades de retención de agua, y por lo tanto, es ampliamente utilizado en la industria de alimentos, productos farmacéuticos, aceites y productos químicos diarios (87). Al momento de que se solubilizó la carboximetilcelulosa para realizar las películas de esta investigación, y se le agregaron los demás compuestos, se observó una mezcla bastante espesa que al ser combinada con el quitosano se mostró una interacción rápida y homogénea, lo cual no ocurría si solo se colocaba quitosano, por lo que fue de total ventaja la adición de la carboximetilcelulosa, además de que una vez que las películas fueron secadas y colocadas en saliva artificial, mostraron un excelente hinchamiento a raíz de la mezcla de estos biopolímeros.

Por otro lado, Oliveira et al., (88) en el 2015, también hacen referencia a que las películas puras de carboximetilcelulosa se disuelven fácilmente en agua destilada y que tiene mucha capacidad de absorción de la misma, de modo que la carboximetilcelulosa necesita ser mezclada con otros materiales para la mayoría de las aplicaciones, razón por la cual, en este proyecto se reforzó con la adición de quitosano, ya que este suele aumentar las propiedades mecánicas cuando es combinado con otros componentes, así como impedir que la película se solubilizara en menor tiempo del esperado para los objetivos de esta investigación.

Si bien, la liberación del principio activo se da a la par de la disolución de la película, este proceso debe coincidir con el tiempo apropiado de acuerdo al objetivo de aplicación de esta, Guo et al., (89) desde 1994 propuso un alto grado de correlación entre la disolución del fármaco y la absorción de agua, referencia que después de la aplicación de la película sobre la mucosa bucal, se produce una secuencia de procesos como la difusión de moléculas de agua en el polímero, la hidratación, el hinchamiento, el desenredado y la erosión de los polímeros, características que se comprobaron al

momento de someter las películas de este proyecto en saliva artificial, pues desde los cinco minutos comenzaron a hincharse más del 100% de su peso inicial, así mismo hubo un aumento de erosión en relación al tiempo, pero no se obtuvieron los datos de degradación, por lo que se sugiere realizar dicha prueba mas adelante y así poder comprobar lo sugerido. Por su parte Nair et al., (35) y Peh et al., (90) reportaron que la difusión de agua en las películas produce una capa delgada que se disuelve en la superficie de la matriz y que a medida que se produce la hidratación, el fármaco se difunde, y que cuanto mayor sea la penetración de los medios acuosos, más se liberará el fármaco, así que con dichas aseveraciones, lo que se esperaría en las películas de este estudio es la liberación de la L-Arginina sea favorable, debido a su alta capacidad de hinchamiento, puesto que se sugiere que el grado de hidratación de la película puede incrementar la movilidad de las cadenas poliméricas locales y provocar una mayor difusión del fármaco contenido. Además, Senel et al., (91) mostraron que el comportamiento de hinchamiento de una película bucal depende en gran medida de la estructura y composición de la misma y que hay una relación directa entre la tasa de hidratación y la bioadhesión o retención gracias a la presencia de quitosano en las películas. Por su parte nuevamente Biswal et al., (87) hacen referencia que el porcentaje de hidratación es significativamente bajo con el uso polímeros hidrofóbicos, por lo que la combinación de quitosano/carboximetilcelulosa con buenas propiedades hidrofílicas, favoreció el hinchamiento de las películas y permitió un tiempo apropiado de liberación del principio activo.

Es importante resaltar que la hidratación del polímero es esencial para la relajación y la interpenetración de las cadenas poliméricas, pero el exceso de hidratación generalmente conduce a una disminución de la mucoadhesión y/o retención debido a la formación de mucílago resbaladizo. En ese sentido, se espera que el quitosano con excelentes propiedades mucoadhesivas favorezca la retención de la película para su futura aplicación en la mucosa bucal (35).

12.4. Grosor/espesor

La medición del espesor de la película es esencial para determinar la uniformidad del grosor y la elección del polímero es crítica ya que se sabe que ciertos polímeros (polivinilpirrolidona, polímeros acrílicos, etc.) aumentan el espesor de la película tal de

acuerdo a su concentración (35). Tomando en cuenta lo anterior, Shanmugapriya et al., (67) hicieron el análisis de los espesores de películas de quitosano-polivinilpirrolidona-bentonita, y ellos observaron un incremento en el espesor de todas las películas que sintetizaron, lo cual dependiente del contenido de quitosano en la solución formadora, lo que podría deberse a la viscosidad de este polímero (67), por lo que a manera de comparación, en las películas de esta investigación el polímero que más abunda es el quitosano, al cual es posible atribuirle el grosor en las películas sintetizadas (50 a 60 μm), sin dejar de lado la presencia de la carboximetilcelulosa. Gracias al grosor obtenido, se esperaría que las películas permitan tanto un adecuada liberación del fármaco contenido, como una buena adhesión de las mismas, pero para ello se necesitan estudios de liberación y de adhesión para así poder comprobarlo.

El grosor de las películas de la presente investigación van en promedio de 50 a 60 μm , las cuales se encuentran dentro de los rangos aceptables descritos en la literatura, puesto que Nair et al., (35) reportan que en general, una película bucal ideal debe presentar un espesor inicial entre 50 y 1000 μm , siendo la medición del espesor esencial para determinar la uniformidad del grosor de la película, ya que está directamente relacionada con la precisión de la dosis en la película y con una bioadhesión adecuada. Además, también describen tal y como Shanmugapriya et al., (67) que la elección del polímero es crítica, aunado que espesor de las películas está principalmente influenciado por el total de sólidos en la solución filmogénica, es decir, entre mayor es la concentración de sólidos mayor será el espesor de la película, además de que la incorporación de un plastificante en la formulación también puede influir en el espesor de la película (35). Más adelante se pretende mejorar las películas de este estudio agregando algún plastificante tal como lo propone Nair et al., y así aumentar el espesor, que si bien se obtuvo dentro de los rangos aceptables (50 a 60 μm), puede mejorar haciéndola más gruesa, siempre y cuando se encuentre entre las 50 y 1000 μm . También, por otro lado Joshi et al., (92) observaron que las películas que van dirigidas a la cavidad oral no deben de exceder de un grosor inicial mayor a 400 μm para que no produzcan incomodidad al paciente cuando la tenga colocada en boca. Comparado lo anterior, las películas elaboradas en este proyecto están dentro de los parámetros reportados tanto por Joshi et al., (35) y Nair et al. (92).

En la literatura se encuentran múltiples investigaciones en donde se reporta un espesor similar al obtenido en las películas de este proyecto (50-60 μm) hechas a base de quitosano / carboximetilcelulosa / L-Arginina, tal como lo muestra García et al., (93) en su estudio, en donde reportan un espesor de 52.3 μm en una película de quitosano al 1% con almidón de maíz el 5% y glicerol, adjudicando dicho espesor comparado al de este proyecto por el uso de los biopolímeros quitosano y carboximetilcelulosa.

12.5. Espectroscopía Infrarroja con Transformadas de Fourier (FTIR)

A fin de identificar los grupos funcionales y enlaces químicos presentes en las películas sintetizadas, se usó la Espectroscopía Infrarroja de Transformada de Fourier (FTIR), siendo específico este aparato para medir los espectros, ya que cada uno representa absorciones características a diferentes longitudes de onda, los cuales nos indican si efectivamente hay la presencia de los polímeros utilizados y como interactuaron químicamente estos entre sí.

En el presente estudio se identificó la banda de 3300–3500 cm^{-1} donde se presumen las vibraciones de estiramiento –NH– y –OH, mismas reconocidas por Ibitoye et al., (94), donde explican que la banda más ancha presente en el rango de 3000-3600 cm^{-1} , está asociada con vibraciones de estiramiento N-H de grupos amino libres y vibraciones de estiramiento O-H, describiendo que su ensanchamiento puede explicarse como resultado de vibraciones de agua e hidroxilos, así como enlaces de hidrógeno intramoleculares. Por su parte Rath et al., (95) también concluyeron en su estudio que la banda O-H en quitosano mostró un pico a 3556 cm^{-1} , siendo comparativo con el de las películas de esta investigación y el de Wang et al., (62) que reportan que el pico de 3308 cm^{-1} se atribuyó a la existencia del enlace O-H.

También explican Ibitoye et al., (94) que las vibraciones de estiramiento C=O de los grupos amino acetilados (amida I) aparecen a 1651 y 1640 cm^{-1} siendo de igual manera semejante a los resultados del presente proyecto, al igual que las bandas 1059 cm^{-1} corresponden a la vibración de estiramiento C-O de la estructura del sacárido del anillo, pues las reportadas en las películas de quitosano/carboximetilcelulosa y L-Arginina también mostraron picos a 1632 y 1548 cm^{-1} , que se atribuyen a las amidas I y las amidas II, respectivamente, además de la interacción entre la celulosa y el quitosano también se identificó por la banda del grupo hidroxilo presente en el rango de 3300 a

3500 cm^{-1} . En uno de los reportes realizados por Wu et al., (96) describieron en su estudio las bandas que fueron de las vibraciones de estiramiento para el grupo carbonilo amida formado en alrededor de 1725 cm^{-1} y el éster en alrededor de 1791 cm^{-1} , las cuales no fue posible identificar en los de este proyecto, pero si la banda de 1549 cm^{-1} que corresponde a un estiramiento asimétrico del enlace C=O (grupo carbonilo), al igual que las bandas de 1166 y 1107 cm^{-1} que se debieron al estiramiento de C=O y al estiramiento asimétrico del anillo.

Otro de los componentes principales observados en las películas sintetizadas es la L-Arginina, en donde también se puede citar a Obando et al., (97) pudieron observar en su investigación dos bandas correspondientes al estiramiento del enlace NH de las aminas primarias en 3316 y 3250 cm^{-1} , y una banda en 3399 cm^{-1} correspondiente al estiramiento del mismo enlace, pero de las aminas secundarias presente en la estructura, bandas que de igual manera y como ya se citó anteriormente, muestra similitud en el FTIR reportado en este estudio que fue de de 3300–3500 cm^{-1} .

Otra banda identificada fue la de 1454 cm^{-1} la cual está asociada a la vibración del estiramiento del grupo CH₃, tal y como Guang et al., (41) que citan que longitudes de onda de 1500-4000 cm^{-1} pueden mostrar grupos funcionales -OH, C=O, N=H y CH₃.

Todo lo anterior indica que la técnica FTIR pudo detectar fácilmente los grupos funcionales presentes tanto en la L-Arginina, quitosano y carboximetilcelulosa y se pudo ver la compatibilidad del fármaco con los excipientes escaneando la película con este instrumento. En general, los espectros de las muestras registradas fueron similares a las presentadas en la literatura de esta discusión.

12.6. Rugosidad

La rugosidad de las películas, a manera de entender que es la huella digital física de cualquier pieza, son irregularidades provocadas por los polímeros utilizados en su proceso de producción, corte, arranque y fatiga superficial (35). Dicha propiedad fue de importancia estudiarla puesto que nos permitió conocer la presencia o ausencia de valles y crestas en las películas.

La rugosidad de las películas de este estudio con respecto a Ra fue de un rango de $11.95\mu\text{m}$ - $11.95\mu\text{m}$, Rz de $47.38\mu\text{m}$ – $66.20\mu\text{m}$ y Rq de $12.73\mu\text{m}$ - $16.07\mu\text{m}$, lo que afirma que si hay presencia de valles y crestas que confirman que lisa no es la superficie, lo cual podría ser un indicativo de que posiblemente no sean lo suficientemente rugosas como para provocar incomodidad al paciente para su uso, pero para ello se necesitarían hacer más estudios.

Para saber a qué puede estar relacionada la rugosidad, Cai et al., (79) explican que probablemente esté asociada con los fuertes enlaces de hidrógeno intermoleculares entre la carboximetilcelulosa y el quitosano, lo que podría dar lugar a un estado de gel caótico en la solución que conduce a una superficie rugosa. Por su parte Wiącek et al., (42) realizaron películas de almidón con quitosano, donde vieron que al agregar este último reactivo, se observó aumento de todos los parámetros de rugosidad de la superficie del almidón. Los valores de Ra y Rq aumentaron casi cuatro veces y Rz y Rt aumentan casi ocho veces, lo que reveló la tendencia opuesta de cambios en la humectabilidad y cambios en el carácter hidrofóbico/hidrofílico de dicha superficie después de la modificación con quitosano, lo cual es posible que también ocurra en este estudio y de que los resultados obtenidos de Ra, Rz y Rq fueron gracias a la adición de dicho polímero. También hacen referencia Wiącek et al., (42) que algunos otros factores influyen en los parámetros de la superficie, como la presencia de enlaces insaturados en las moléculas y el estado de fase en el que existen estas películas, además, que también se pueden encontrar algunas correlaciones entre los cambios en la rugosidad de la superficie y los valores de los ángulos de contacto medidos en la superficie del almidón nativo y modificado y, en consecuencia, su energía libre superficial. Todo lo podría indicar que la rugosidad que presentan las películas de quitosano con carboximetilcelulosa y L-Arginina son aceptables para no causar comodidad al paciente y que no se desgarren fácilmente, pero para ello obliga a realizar estudios de tensión-deformación, adhesión y biocompatibilidad, e incluso hacer comparativo de películas en donde únicamente presenten carboximetilcelulosa o quitosano, y así poder adjudicar a qué presencia polimérica se deben dichos resultados para así tener conclusiones veraces.

Por otro lado, la teoría mecánica reportada por Singh et al., (10) considera que el efecto de la rugosidad de la superficie favorece la adhesión debido a una mayor área de contacto, haciendo referencia a que la contribución de los efectos de la teoría mecánica en la mucoadhesión se convierte en más importante para materiales rugosos y porosos, y si bien como ya se explicó con anterioridad, la falta de poros sugiere que no podría ser un impedimento para lograr esta propiedad mucoadhesiva, pero para ello sería necesario más estudios de esta prueba.

No hay suficientes estudios de películas mucoadhesivas donde evalúan la rugosidad con un rugosímetro si no mas bien lo hacen con un microscopio de fuerza atómica (AFM por sus siglas en inglés Atomic Force Microscope), por lo que podría resultar favorable para futuros estudios el uso de ésta técnica y así poder hacer mayores contrastes con la literatura, además de obtener resultados más específicos. Sin embargo Torino et al., (98) llegan a hacer un reporte en donde desarrollaron una membrana a base de alginato-quitosano, obteniendo como valores de Ra una oscilación entre -1 y 1 μm , teniendo en cuenta de que las membranas eran planas y con una superficie lisa, además de no tener ninguna concavidad o convexidad con respecto al plano frontal, lo cual hace contrastarlas con las de esta investigación, pues al si presentar ciertas rugosidades y con un Ra de 11.00 μm a 12.75 μm las hace tener mayor área superficial de contacto y podría llegar a sugerirse que la bioadhesión sería adecuada, pero para ello como ya se mencionó, es necesario hacer pruebas a futuro. Finalmente, también menciona Torino et al., (98) que según la literatura el rango de profundidad para una bioadhesión eficiente es de alrededor de 0,2 - 0,5 μm , así que tomando en cuenta estos valores es posible que con los obtenidos en esta investigación serían más que suficientes para su bio adhesión, dejar de lado el que que obliga a realizar tal prueba mas adelante.

12.7. Porosidad

Una vez obtenidos los resultados de las microfotografías del SEM, se pudo reportar la nula cantidad de poros por unidad de área de las películas de quitosano con carboximetilcelulosa y L-Arginina. Con base a ello, se puede explicar que la presencia de poros no siempre tiene que ser beneficiosa para las películas, si no mas bien depende del objetivo que se desee alcanzar, en ese sentido Aidun A et al., (43) resaltaron que es importante mencionar que la existencia de una estructura altamente porosa

tridimensional con buena interconexión entre los poros, y con porosidades que exceden el 70% en la estructura polimérica es crucial para la adecuada proliferación celular, la cual no es el objetivo de esta investigación, pero si el saber cómo afectaría o no la presencia de poros en la resistencia y adhesión de la película, al igual que la liberación del fármaco contenido (L-Arginina) y cómo los polímeros presentes en dichas películas actúan en su estructura y si tienen la capacidad de formar o no poros. Y para ello sería complementario el realizar más estudios que permitan obtener dichos resultados.

Expresado lo anterior, y por su parte, Lima, et al., (99) confirmaron que la adición de nanopartículas a matrices poliméricas compuestas puede tener un efecto en la arquitectura porosa de los andamios, por ejemplo el disminuir el tamaño de los poros, pero Teimouri, A. et al., (100) contrastan al decir que puede no tener ningún efecto la adición de nanopartículas en las dimensiones de los poros pero sí en su interconexión. Por lo que se piensa que al estar trabajando con biopolímeros como el quitosano y la carboximetilcelulosa en este trabajo, es lo que hace que eliminen la presencia de poros, aseverando lo mencionado por Teimouri, A. et al., (100).

Por otro lado, y para evaluar como los poros afectan la resistencia de los materiales, en los estudios de Nair et al., (35) mencionaron que cuanto mayor sea la porosidad, menor será la resistencia del material, lo cual no podemos contrastar con la película sintetizada, debido a que aunque no se hicieron pruebas de resistencia a la tensión-deformación, pero se puede llegar a esperar que debido a la uniformidad de las películas sin presencia de poros se obtendrá una excelente resistencia, lo cual es conveniente para una película mucoadhesiva, así que por lo mismo es conveniente hacer dicha prueba (tensión-deformación) y así poder tener resultados concretos de lo que se sugiere. También Nair et al., (35) hacen mención de que la resistencia al desgarro y la porosidad dependen de igual manera de la naturaleza del polímero, el tipo, el contenido y la composición de la película y quien confirma dicho reporte es Boateng et al., (101) quienes en su estudio prepararon películas de alginato de sodio y carboximetilcelulosa donde evaluaron la resistencia al desgarro y la porosidad utilizando un analizador de textura y SEM, respectivamente. Ellos observaron que la resistencia al desgarro aumentaba con el incremento de la concentración de polímero. Además, la forma de los

poros en las películas variaba con los polímeros, como se observa en el caso de películas de alginato (poros alargados) y obleas de carboximetilcelulosa de sodio (poros esféricos).

Nair et al., (35) también mencionan que el grado de porosidad afecta las propiedades humectantes del material y que tiene un efecto profundo en la penetración del ingrediente farmacéutico activo a través y desde él, lo cual podría llegar a afectar a la película de esta investigación, puesto que lo que se necesita es que se libere la L-Arginina, pero como se demostró en el apartado de hinchamiento, esta propiedad con excelentes resultados puede llegar a suplir la falta de poros, pero esto se debe de comprobar con la técnica de liberación.

12.8. Liberación

La liberación de la L-Arginina como objetivo final de las películas mucoadhesivas sintetizadas en este proyecto se trató de observar mediante múltiples pruebas las cuales ya se describieron en el apartado de procedimientos, técnicas y fuentes de recolección. Se puede resaltar que con respecto a las pruebas iniciales con el ensayo de Bradford para poder medir la liberación de la L-Arginina, se logró comprobar que tal como lo explican Brady et al. (76) en su artículo, los ensayos de proteínas colorimétricas, como los ensayos de unión al tinte azul G-250 de Coomassie (Bradford) y ácido bicinchonínico (BCA), se utilizan comúnmente para cuantificar la concentración de proteínas y que la precisión de estos ensayos depende de la composición de los aminoácidos. Lo anterior explica el por qué la prueba no fue lo suficientemente sensible para el objetivo de este estudio, debido a que la L-Arginina es únicamente un aminoácido y no algo más complejo como las proteínas. Esta prueba se realizó en tesis anteriores pertenecientes a la línea de investigación de este proyecto, y en donde usaron L-Arginina al 40% teniendo resultados donde pudieron observar su liberación, pero en este estudio se usó una menor cantidad (15%) de dicho aminoácido, pudiéndosele posiblemente atribuir a este motivo para no tener éxito con esta técnica y no observar la L-Arginina.

Por el motivo anterior se dio a la tarea de investigar otro método para ver la liberación de L-Arginina, y en donde uno de los principales reportes que sirvieron como referencia para este estudio fue el de Liu et al., (36) donde al usar la técnica en placa de TLC para aminoácidos, explican que la L-Arginina es una sustancia incolora y que no se

puede observar ninguna mancha de la muestra separada en la placa de TLC de banda estrecha. Por ello mismo, en esta investigación para revelar la distribución de las manchas de L-Arginina en la placa de TLC de banda estrecha, se usaron dos sustancias reveladoras, las cuales fueron el Bisfenol A (BPA) y la ninhidrina, y en donde según Michałowicz et al., (102) el BPA al pertenecer a un grupo de fenoles, que tienen residuos de hidroxilo directamente unidos al anillo aromático determina su buena reactividad, es decir, su capacidad para reaccionar en presencia de otras sustancias químicas o reactivos, además de tener una excelente afinidad a la L-Arginina. Si comparamos esta sustancia reveladora con otra que es la ninhidrina, Vázquez et al., (103) nos dice que todas aquellas sustancias que presentan al menos un grupo amino y uno carboxilo libre, reaccionan con la ninhidrina. La positividad se manifiesta por la aparición de un color violáceo o amarillo, y debido a que las proteínas y los aminoácidos poseen esta característica, la reacción sirve para identificarlos tal como a la L-Arginina. Con ambas sustancias reveladoras se demostró la presencia del de L-Arginina, dando una colorimetría violácea más intensa cuando se expuso al BPA debido a sus características químicas de dos anillos aromáticos, y no 1 como la ninhidrina, siendo mas sensible a ser expuesta al BPA. En esta prueba idealmente se utiliza según Liu, J. et al., (36) un microscopio FTIR con técnica de mapeo, midiendo el espectro de puntos separados y el espectro de referencia del material estándar correspondiente en las mismas condiciones del experimento es muy importante para obtener resultados confiables, siendo además una técnica meramente cualitativa, por lo que por lo mismo se pretendió diseñar un experimento en el que pudiera observarse la cinética de la liberación de la L-Arginina.

Por lo anterior, se procedió con la prueba realizada con espectroscopia UV-Visible, dando un resultado para la absorbancia de la L-Arginina de 282nm, así que comparado con los resultados de Ramya et al., (104) en donde concluye en su estudio sobre el crecimiento y la caracterización del cristal de dihidrato de maleato de L-Arginina, que el espectro de absorción tiene una longitud de onda es de aproximadamente 238 nm. Así mismo por su parte Terpugov et al., (77) lograron observar espectros de absorción electrónica de las soluciones acuosas de L-Lisina- ácido clorhídrico y L-Arginina-ácido clorhídrico en la región de 220-400 nm, siendo un comparativo muy similar a los resultados obtenidos en la prueba que se realizaron en esta investigación.

Una vez obtenidos los resultados del método de liberación con ayuda de la espectroscopia UV-Visible, lo que se plantea es proceder a realizar una curva de calibración y observar en espectrofotómetro UV-Visible la cinética de la liberación de la L-Arginina contenida en las películas de quitosano y carboximetilcelulosa, y así poder definir y concluir si el aminoácido L-Arginina se difunde a través de la película para su posterior aplicación en estudios *in vitro* e *in vivo*.

13. CONCLUSIONES

En este estudio se lograron sintetizar películas mucoadhesivas de quitosano reforzadas con carboximetilcelulosa para la liberación de L-Arginina al 15% con la finalidad de ser un sistema efectivo para la ortodoncia acelerada, esperando que a futuro este método sea lo suficientemente exitoso, biocompatible y noble para investigaciones *in vitro* e *in vivo* y finalmente poder ser probado directamente en pacientes. Pasando por pruebas futuras como la evaluación de las propiedades mecánicas (resistencia a la tracción, el módulo de Young, el porcentaje de elongación y la resistencia al desgarro), antimicrobianas, de degradación, contenido de humedad, la cristalinidad, el análisis térmico y la interacción entre fármacos y polímeros para garantizar la seguridad y la eficiencia de las películas, sin dejar de lado su propiedad mucoadhesiva.

Se obtuvo una película con ausencia de porosidad, una estructura uniforme y definida con presencia de algunas irregularidades a causa de las características de los polímeros naturales contenidos para la formación de las mismas, las cuales también se pudieron observar en la prueba de rugosidad con presencia de valles y crestas con un valor promedio de Ra de 11.9 μ m, Rz: 57.37 μ m y Rq: 14.55 μ m.

El grosor/espesor de la película de 50-60 μ m se encuentra dentro de los rangos aceptables para que posiblemente permita tanto la buena liberación del fármaco como que no provoque molestias al paciente.

La capacidad de hinchamiento fue de más del 100% en los primeros 5 minutos, lo cual sugiere que se permitiría una mayor adhesión a la mucosa al igual que podría provocar una mayor difusión del fármaco a liberar.

Se espera que las películas fabricadas no causarán daños en los tejidos orales puesto que el pH se mantuvo en un rango de 7.5 a 8.2, el cual es bastante similar al de la cavidad oral (6.5-7).

El análisis de FTIR permitió comprobar la presencia de los grupos funcionales de la L-Arginina, carboximetilcelulosa y quitosano y sus interacciones con una óptima interrelación entre ellos.

Los resultados preliminares obtenidos de la prueba de liberación parecen indicar que con dicho método se puede ver la cinética del aminoácido L-Arginina al 15% en las películas elaboradas, por lo que se continuará con su estudio y así poder tener resultados para dicho ensayo.

A la fecha no existe ninguna película mucoadhesiva elaborada a base L-Arginina, quitosano y carboximetilcelulosa con el objetivo de ser aplicada en la ortodoncia acelerada, y los resultados al momento son prometedores, pues se observó que se obtuvo una película dentro de los estándares reportados de las películas mucoadhesivas para la entrega de fármacos en la cavidad oral.

14. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Jain KK. An Overview of Drug Delivery Systems. *Methods Mol Biol.* 2020; 2059:1-54. Doi: 10.1007/978-1-4939-9798-5_1. PMID: 31435914.
2. Adepu S., Ramakrishna S. Controlled Drug Delivery Systems: Current Status and Future Directions. *Molecules.* 2021 Sep 29;26(19):5905. Doi: 10.3390/molecules26195905. PMID: 34641447; PMCID: PMC8512302.
3. Langer RS, Peppas NA. Present and future applications of biomaterials in controlled drug delivery systems. *Biomaterials.* 1981 Oct;2(4):201-14.
4. Luginbuehl V., Meinel L., Merkle HP, Gander B. Localized delivery of growth factors for bone repair. *Eur J Pharm Biopharm.* 2004 Sep;58(2):197-208. Doi: 10.1016/j.ejpb.2004.03.004. PMID: 15296949.
5. Yun YH., Lee BK., Park, K. Controlled Drug Delivery: Historical perspective for the next generation. *Journal of Controlled Release,* 2015 219, 2–7. Doi:10.1016/j.jconrel
6. Hoffman AS. The origins and evolution of “controlled” drug delivery systems. *Journal of Controlled Release,* 2008, 132(3), 153–163. Doi:10.1016/j.jconrel.2008.08.
7. Speight JG. A review of: “Polymeric Delivery Systems, Properties and Applications” Edited by Magda A. El-Nokaly, David M. Piatt, and Bonnie A. Charpentier American Chemical Society Symposium Series 520 American.
8. Shinkar DM., Dhake AS., Setty CM., Drug delivery from the oral cavity: a focus on mucoadhesive buccal drug delivery systems. *PDA J Pharm Sci Technol.* 2012 Sep-Oct;66(5):466-500. Doi: 10.5731/pdajpst.2012.00877. PMID: 23035030.
9. Richard LD., Raphael MO. Polymeric drugs and drug delivery systems. American Chemical Society, ACS Symp. Series No. 469: Washington DC, 1991, pp 11-23.
10. Singh R., Sharma D., Garg R. Review on Mucoadhesive Drug Delivery System with Special Emphasis on Buccal Route: An Important Tool in Designing of Novel Controlled Drug Delivery System for the Effective Delivery of Pharmaceuticals. *J Dev Drugs.* March 2017 6: 169. Doi:10.4172/2329-6631.1000169
11. Kumar A., Naik PK., Pradhan D., Ghosh G., Rath G. Mucoadhesive formulations: innovations, merits, drawbacks, and future outlook. *Pharm Dev Technol.* 2020 Sep;25(7):797-814.

12. Rossi S., Sandri G., Caramella CM. Buccal drug delivery: A challenge already won? *Drug Discov Today Technol.* 2005 Spring;2(1):59-65. Doi: 10.1016/j.ddtec.2005.05.018. PMID: 24981756.
13. Montenegro NM., Morales JO. Overview and Future Potential of Buccal Mucoadhesive Films as Drug Delivery Systems for Biologics. *AAPS PharmSciTech.* 2017 Jan 1;18(1):3-14. Doi: 10.1208/s12249-016-0525-z. Epub 2016 Apr 15. PMID: 27084567.
14. Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos. México: Secretaría de salud, Comisión Permanente de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos. 2011, 10 Ed, tomo 1; pp. 9310.
15. Ding X., Alani AWG., Robinson JR. Extended-release and targeted drug delivery system, in: D.B. Troy (Ed.), *The Science and Practice of Pharmacy*, 2002, pp. 939-964.
16. Husain S., Al-Samadani KH., Najeeb S., Zafar MS., Khurshid Z., Zohaib S., Qasim SB. Chitosan Biomaterials for Current and Potential Dental Applications. *Materials (Basel).* 2017 May 31;10(6):602. Doi: 10.3390/ma10060602. PMID: 28772963; PMCID: PMC5553419.
17. Jiménez GCP., Cecilia JA. Chitosan: A Natural Biopolymer with a Wide and Varied Range of Applications. *Molecules.* 2020 Sep 1;25(17):3981. Doi: 10.3390/molecules25173981. PMID: 32882899; PMCID: PMC7504732.
18. Onishi H., Machida Y. Biodegradation and distribution of water-soluble chitosan in mice. *Biomaterials.* 1999 Jan;20(2):175-82. Doi: 10.1016/s0142-9612(98)00159-8. PMID: 10022787.
19. Dash M., Chiellini F., Ottenbrite RM, Chiellini E. Chitosan-A versatile semi-synthetic polymer in biomedical applications. *Prog Polym Sci.* 2011; 36(8), 981-1014.
20. Shu XZ., Zhu KJ. A novel approach to prepare tripolyphosphate/chitosan complex beads for controlled release drug delivery. *Int J Pharm.* 2000 May 15;201(1):51-8. Doi: 10.1016/s0378-5173(00)00403-8. PMID: 10867264..
21. Caetano LA., Almeida AJ., Gonçalves LM. Effect of Experimental Parameters on Alginate/Chitosan Microparticles for BCG Encapsulation. *Mar Drugs.* 2016 May 11;14(5):90. Doi: 10.3390/md14050090. PMID: 27187418; PMCID: PMC4882564.
22. Verma S., Kumar N., Sharma PK. Buccal film: An advance technology for oral drug delivery. *Adv. Biol. Res.* 2014, 8, 260–267.

23. FDA, Food and Drug Administration. GRAS Notice Inventory. (accessed on 17 January 2023)
24. Rachtanapun P., Luangkamin S., Tanprasert K., Suriyatem R. Carboxymethyl cellulose film from durian rind. *LWT — Food Science and Technology*, 2012, 48(1), 52–58. doi:10.1016/j.lwt.2012.02.029
25. Ghanbarzadeh B., Almasi H., Entezami AA. Physical properties of edible modified starch/carboxymethyl cellulose films. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 2010, 11(4), 697–702. doi:10.1016/j.ifset.2010.06.001
26. Vidal OL., Tsukui A., Garrett R., Rocha-Leão, MHM., Carvalho CWP., Freitas, SP., Ferreira MSL. Production of bioactive films of carboxymethyl cellulose enriched with green coffee oil and its residues. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2019, 10.123. doi:10.1016/j.ijbiomac.2019.10.123
27. Ballesteros LF., Cerqueira MA., Teixeira JA., Mussatto, SI. Production and physicochemical properties of carboxymethyl cellulose films enriched with spent coffee grounds polysaccharides. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2018, 106, 647–655. Doi:10.1016/j.ijbiomac.2017.08.
28. Geraldeli S., Soares EF., Alvarez AJ., Farivar T., Shields RC., Sinhoreti MAC., Nascimento MM. A new arginine-based dental adhesive system: formulation, mechanical and anti-caries properties. *J Dent*. 2017 Aug;63:72-80. Doi: 10.1016/j.jdent.2017.05.024. Epub 2017 Jun 3. PMID: 28587978; PMCID: PMC5568561.
29. Seaborn CD., Nielsen FH. Silicon deprivation decreases collagen formation in wounds and bone, and ornithine transaminase enzyme activity in liver. *Biol Trace Elem Res*. 2002 Dec;89(3):251-61. Doi: 10.1385/bter:89:3:251. PMID: 12462748.
30. Valdez MR., Franco BRE., Quintana AA. Importance of nitric oxide synthases in bone metabolism. *Rev Med UV*. 2012;12(1):37-44.
31. Förstermann U., Sessa WC. Nitric oxide synthases: regulation and function. *Eur Heart J*. 2012 Apr;33(7):829-37, 837a-837d. doi: 10.1093/eurheartj/ehs04. Epub 2011 Sep 1. PMID: 21890489; PMCID: PMC3345541.
32. Cyr AR., Huckaby LV., Shiva SS., Zuckerbraun BS. Nitric Oxide and Endothelial Dysfunction. *Crit Care Clin*. 2020 Apr;36(2):307-321. Doi: 10.1016/j.ccc.2019.12.009. PMID: 32172815; PMCID: PMC9015729.

33. Ford H., Suri S., Nilforoushan D., Manolson M., Gong SG. Nitric oxide in human gingival crevicular fluid after orthodontic force application. *Arch Oral Biol.* 2014 Nov;59(11):1211-6. Doi: 10.1016/j.archoralbio.2014.07.015. Epub 2014 Aug 9. PMID: 25108338.
34. Yan T., Xie Y., He H., Fan W., Huang F. Role of nitric oxide in orthodontic tooth movement (Review). *Int J Mol Med.* 2021 Sep;48(3):168. Doi: 10.3892/ijmm.2021.5001. Epub 2021 Jul 19. PMID: 34278439; PMCID: PMC8285047.
35. Nair AB., Kumria AB., Harsha R., Attimarad S., Al-Dhubiab M., Alhaider IA. In vitro techniques to evaluate buccal films. *Journal of Controlled Release*, 2013, 166(1), 10–21. Doi:10.1016/j.jconrel.2012.11.
36. Liu J., Zhou F., Guo R., Jiang Y., Fan X., He, A., Wu J. Analysis of an Alanine/Arginine Mixture by Using TLC/FTIR Technique. *Journal of Spectroscopy*, 2014, 1–4. Doi:10.1155/2014/925705
37. Sohail SS., Wang B., Biswas MA., Oh JH. Physical, morphological, and barrer properties of edible casein films with wax applications. *J Food Sci.* 2006, 71 (4): C255-C259
38. Ogale AA., Cunningham P., Dawson PL. Acton JC. Viscoelastic, thermal, and microstructural characterization of soy protein isolate films. *J Food Sci.* 2000, 65(4): 672-679
39. Mansuri S., Kesharwani P., Jain K., Tekade RK., Jain NK,. Mucoadhesion: A promising approach in drug delivery system. *Reactive and Funct Polym.* 2016, 1000, 151-172
40. Khan SA., Khan SB., Khan LU., Farooq A., Akhtar K., Asiri, AM. Fourier Transform Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Application in Functional Groups and Nanomaterials Characterization. *Handbook of Materials Characterization*, 2018, 317–344. doi:10.1007/978-3-319-92955-2_9
41. Guan Y., Liu X., Zhang Y., Yao K. Study of phase behavior on chitosan/viscose rayon blend film. *J Appl Polym Sci*, 1998. 67(12): 1965-1972
42. Wiącek, AE. Effect of surface modification on starch biopolymer wettability. *Food Hydrocolloids*, 2015, 48, 228–237. doi:10.1016/j.foodhyd.2015.02.0
43. Aidun A., Safaei FA., Moharrami M., Ahmadi A., Haghighipour N., Bonakdar S., Faghihi S. Graphene oxide incorporated polycaprolactone/chitosan/collagen electrospun scaffold: Enhanced osteogenic properties for bone tissue engineering.

- Artif Organs. 2019 Oct;43(10):E264-E281. Doi: 10.1111/aor.13474. Epub 2019 Jun 17. PMID: 31013365.
44. Yoo SK., Warita H., Soma K. Duration of orthodontic force affecting initial response of nitric oxide synthase in rat periodontal ligaments. *J Med Dent Sci.* 2004 Mar;51(1):83-8. PMID: 15137469.
45. Nilforoushan D., Manolson MF. Expression of nitric oxide synthases in orthodontic tooth movement. *Angle Orthod.* 2009 May;79(3):502-8. Doi: 10.2319/050808-252.1. PMID: 19413393.
46. Tan SD., Xie R., Klein-Nulend J., V Rheden RE., Bronckers AL., Kuijpers-Jagtman AM., Von den Hoff JW., Maltha JC.. Orthodontic force stimulates eNOS and iNOS in rat osteocytes. *J Dent Res.* 2009 Mar;88(3):255-60. Doi: 10.1177/0022034508330861. PMID: 19329460.
47. Baloul SS. Osteoclastogenesis and Osteogenesis during Tooth Movement. *Front Oral Biol.* 2016;18:75-9. Doi: 10.1159/000351901. Epub 2015 Nov 24. PMID: 26599120.
48. Jerônimo MS., Barros AD., Morital VE., Alves EO., Souza NL., Almeida RM., Nóbrega YK., Cavalcanti FFN., Amorin R., Borin MF., Bocca AL. Oral or topical administration of L-arginine changes the expression of TGF and iNOS and results in early wounds healing. *Acta Cir Bras.* 2016 Sep;31(9):586-596. Doi: 10.1590/S0102-865020160090000003. PMID: 27737343.
49. Souza Á do PB., Oliveira MMR., Andrade RR., Amorim RFB., Bocca AL., Borin MF. The in vivo effect of L-arginine on skin elasticity in mice. *Braz J Pharm Sci [Internet].* 2017;53(3). <http://dx.doi.org/10.1590/s2175-97902017000300045>
50. Shirazi M., Nilforoushan D., Alghasi H., Dehpour AR. The role of nitric oxide in orthodontic tooth movement in rats. *Angle Orthod.* 2002 Jun;72(3):211-5. Doi: 10.1043/0003-3219(2002)072<0211:TRONOI>2.0.CO;2. PMID: 12071604.
51. Hayashi K., Igarashi K., Miyoshi K., Shinoda H., Mitani H. Involvement of nitric oxide in orthodontic tooth movement in rats. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2002 Sep;122(3):306-9. Doi: 10.1067/mod.2002.126151. PMID: 12226613.
52. Akin E., Gurton AU., Olmez H. Effects of nitric oxide in orthodontic tooth movement in rats. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2004 Nov;126(5):608-14. Doi: 10.1016/S0889540604004494. PMID: 15520694.
53. D'Attilio M., Di Maio F., D'Arcangela C., Filippi MR., Felaco M., Lohinai Z., Festa F., Perinetti G. Gingival endothelial and inducible nitric oxide synthase levels during

- orthodontic treatment: a cross-sectional study. *Angle Orthod.* 2004 Dec;74(6):851-8. Doi: 10.1043/0003-3219(2004)074<0851:GEAINO>2.0.CO;2. PMID: 15673150.
54. Amir M., Ramin A. Effects of dietary L-arginine on orthodontic tooth movement in rats. *African Journal of Biotechnology.* 2002 Vol. 11(1), pp. 191-197, 3
55. Mika S., Hirofumi S., Kaoru I., Yuko K., Naoyuki M., Facilitation of experimental tooth movement by NOC-18, a long-acting nitric oxide donor, *Orthodontic Waves.* 2013, 72:2, 43-48
56. Reza T., Farhad J., Ahmad Reza D., Reingard G. Effects of Lithium Chloride and Nitric Oxide Inhibitor on Orthodontic Tooth Movement in the Rat. *Appl. Sci.* 2021, 11,3607.
57. Miguel SP., Moreira AF., Correia IJ. Chitosan based-asymmetric membranes for wound healing: A review. *Int J Biol Macromol.* 2019 Apr 15;127:460-475. Doi: 10.1016/j.ijbiomac.2019.01.072. Epub 2019 Jan 17. PMID: 30660567.
58. Wu CS., Hsu YC., Liao HT., Cai YX. Antibacterial activity and in vitro evaluation of the biocompatibility of chitosan-based polysaccharide/polyester membranes. *Carbohydr Polym.* 2015 Dec 10;134:438-47. Doi: 10.1016/j.carbpol.2015.08.021. Epub 2015 Aug 13. PMID: 26428145.
59. Carrero M., Barbosa R., Fook M., Et Al. Synthesis and characterization of a novel biomaterial based on chitosan modified with amino acids. *Revista materia,* 2019 v. 24, n. 3.
60. Di Martino A., Drannikov A., Surgutskaia NS., Ozaltin K., Postnikov PS., Marina TE., Sedlarik V. Chitosan-collagen based film for controlled delivery of a combination of short life anesthetics. *Int J Biol Macromol.* 2019 Nov 1;140:1183-1193. Doi: 10.1016/j.ijbiomac.2019.08.228. Epub 2019 Aug 28. PMID: 31472209.
61. Doderio A., Brunengo E., Alloisio M., Sionkowska A., Vicini S., Castellano M.. Chitosan-based electrospun membranes: Effects of solution viscosity, coagulant and crosslinker. *Carbohydr Polym.* 2020 May 1;235:115976. Doi: 10.1016/j.carbpol.2020.115976. Epub 2020 Feb 11. PMID: 32122507.
62. Wang K., Du L., Zhang C., Lu Z., Lu F., Zhao H. Preparation of chitosan/curdlan/carboxymethyl cellulose blended film and its characterization. *J Food Sci Technol.* 2019 Dec;56(12):5396-5404. Doi: 10.1007/s13197-019-04010-2. Epub 2019 Aug 12. PMID: 31749487; PMCID: PMC6838288.
63. Kawasaki T., Nakaji-Hirabayashi T., Masuyama K., Fujita S., Kitano H. Complex film of chitosan and carboxymethyl cellulose nanofibers. *Colloids Surf B Biointerfaces.*

- 2016 Mar 1;139:95-9. Doi: 10.1016/j.colsurfb.2015.11.056. Epub 2015 Dec 4. PMID: 26700238.
64. Silva SS., Popa EG., Gomes ME., Cerqueira M., Marques AP., Caridade SG., Teixeira P., Sousa C., Mano JF., Reis RL. An investigation of the potential application of chitosan/aloe-based membranes for regenerative medicine. *Acta Biomater.* 2013 Jun;9(6):6790-7. Doi: 10.1016/j.actbio.2013.02.027. Epub 2013 Feb 24. PMID: 23462554.
65. Azzaoui K., Mejdoubi E., Lamhamdi A., Jodeh S., Hamed O., Berrabah M., Jerdioui S., Salghi R., Akartasse N., Errich A., Ríos Á, Zougagh M. Preparation and characterization of biodegradable nanocomposites derived from carboxymethyl cellulose and hydroxyapatite. *Carbohydr Polym.* 2017 Jul 1;167:59-69. Doi: 10.1016/j.carbpol.2017.02.092. Epub 2017 Feb 27. PMID: 28433178.
66. Poonguzhali R., Khaleel BS., Sugantha KV. Fabrication of asymmetric nanostarch reinforced Chitosan/PVP membrane and its evaluation as an antibacterial patch for in vivo wound healing application. *Int J Biol Macromol.* 2018 Jul 15;114:204-213. Doi: 10.1016/j.ijbiomac.2018.03.092. Epub 2018 Mar 20. PMID: 29572145.
67. Shanmugapriya K., Kim H., Saravana PS., Chun BS., Kang HW. Fabrication of multifunctional chitosan-based nanocomposite film with rapid healing and antibacterial effect for wound management. *Int J Biol Macromol.* 2018 Oct 15;118(Pt B):1713-1725. Doi: 10.1016/j.ijbiomac.2018.07.018. Epub 2018 Jul 8. PMID: 29997044.
68. Zhou T., Sui B., Mo X., Sun J. Multifunctional and biomimetic fish collagen/bioactive glass nanofibers: fabrication, antibacterial activity and inducing skin regeneration in vitro and in vivo. *Int J Nanomedicine.* 2017 May 2;12:3495-3507. Doi: 10.2147/IJN.S132459. PMID: 28496325; PMCID: PMC5422559.
69. Ben SE., Sadok S. Collagen from Cartilaginous Fish By-Products for a Potential Application in Bioactive Film Composite. *Mar Drugs.* 2018 Jun 15;16(6):211. Doi: 10.3390/md16060211. PMID: 29914092; PMCID: PMC6024974.
70. Manjubala I., Basu P., Narendrakumar U. In situ synthesis of hydroxyapatite/carboxymethyl cellulose composites for bone regeneration applications. *Colloid and Polymer Science.* 2018 Aug; 296(10): 1729-1737.
71. Shanmugapriya K., Kim H., Saravana PS., Chun BS., Kang HW. Fabrication of multifunctional chitosan-based nanocomposite film with rapid healing and antibacterial

- effect for wound management. *Int J Biol Macromol.* 2018 Oct 15;118(Pt B):1713-1725. Doi: 10.1016/j.ijbiomac.2018.07.018. Epub 2018 Jul 8. PMID: 29997044.
72. Unagolla JM., Alahmadi TE., Jayasuriya AC. Chitosan microparticles based polyelectrolyte complex scaffolds for bone tissue engineering in vitro and effect of calcium phosphate. *Carbohydr Polym.* 2018 Nov 1; 199:426-436. Doi: 10.1016/j.carbpol.2018.07.044. Epub 2018 Jul 19. PMID: 30143148; PMCID: PMC7433903.
73. Kim Y., Kim G. Collagen/alginate scaffolds comprising core (PCL)-shell (collagen/alginate) struts for hard tissue regeneration: fabrication, Characterization, and cellular activities. *J Mater Chem B.* 2013 Jul 7;1(25):3185-3194. Doi: 10.1039/c3tb20485e. Epub 2013 May 24. PMID: 32260919.
74. Zhu J., Han H., Ye TT., Li FX., Wang XL., Yu JY., Wu DQ. Biodegradable and pH Sensitive Peptide Based Hydrogel as Controlled Release System for Antibacterial Wound Dressing Application. *Molecules.* 2018 Dec 19;23(12):3383. Doi: 10.3390/molecules23123383. Erratum in: *Molecules.* 2022 Oct 08;27(19): PMID: 30572689; PMCID: PMC6321375.
75. Norma Din 4768. Determinación de los valores de rugosidad con aparatos eléctricos de palpado.
76. Brady PN., Macnaughtan MA. Evaluation of colorimetric assays for analyzing reductively methylated proteins: Biases and mechanistic insights. *Anal Biochem.* 2015 Dec 15;491:43-51. Doi: 10.1016/j.ab.2015.08.027. Epub 2015 Sep 3. PMID: 26342307; PMCID: PMC4631703.
77. Terpugov EL., Udaltsov SN., Degtyareva OV. Estudio de las características espectrales de la L-lisina y la L-Arginina utilizando espectroscopia UV-VIS y espectroscopia de fluorescencia síncrona y de estado estacionario. *BIOFÍSICA* 66, 726-732 (2021).
78. Kong Q., Wang X., Lou T. Preparation of millimeter-sized chitosan/carboxymethyl cellulose hollow capsule and its dye adsorption properties. *Carbohydr. Polym.* 244, 116481 (2020).
79. Cai B. Preparation, characterization and in vitro release study of drug-loaded sodium carboxy-methylcellulose/chitosan composite sponge. *PloS One* 13, e0206275 (2018).
80. Dahmash EZ., Ali DK., Alyami HS., AbdulKarim H., Alyami MH., Aodah AH. Novel Thymoquinone Nanoparticles Using Poly (ester amide) Based on L-Arginine-Targeting

- Pulmonary Drug Delivery. *Polymers (Basel)*. 2022 Mar 8;14(6):1082. Doi: 10.3390/polym14061082. PMID: 35335412; PMCID: PMC8956027.
81. Gwen L., Imelda K., Barry D. Interactions between alginate and chitosan biopolymers characterized using FTIR and XPS. *Biomacromolecules*. 2007;8(8):2533–2541. Doi: 10.1021/bm070014y
 82. Zhong Y., Song X., Li Y. Antimicrobial, physical and mechanical properties of kudzu starch-chitosan composite films as a function of acid solvent types. *Carbohydr Polym*. 2011; 84 (1): 335 – 342. doi: 10.1016/j.carbpol.2010.11.041
 83. Patel M., Prajapati BG., Pate MM. Effect of hydrophilic polymers on buccoadhesive eudragit patches of propranolol hydrochloride using factorial design, *AAPS Pharm. Sci. Technol.* 8 (2007) E119–E126.
 84. Amanpreet K. “Mucoadhesive Drug Delivery System: A Review” *Int. J. Drug Dev. & Res.*, 2013, 5(1): 11-20.
 85. Pinotti A, GarcíA M, Martino M, Zaritzky N. Study on microstructure and physical properties of composite films based on chitosan and methylcellulose. *Food Hydrocoll.* 2007;21(1):66–72. doi: 10.1016/j.foodhyd.2006.02.001
 86. Limpan N., Prodpran T., Benjakul S., Prasarpran S. Influences of degree of hydrolysis and molecular weight of poly(vinyl alcohol) (PVA) on properties of fish myofibrillar protein/pva blend films. *Food Hydrocoll.* 2012;29(1):226–233.
 87. Biswal D., Singh R. Characterisation of carboxymethyl cellulose and polyacrylamide graft copolymer. *Carbohydr Polym*. 2004;57(4):379–387. Doi: 10.1016/j.carbpol.2004.04.020
 88. Oliveira R., Barud H., Salvi D., Perotti G., Ribeiro S., Constantino V. Transparent organic–inorganic nanocomposites membranes based on carboxymethyl cellulose and synthetic clay. *Ind Crops Prod*. 2015; 69:415–423. Doi: 10.1016/j.indcrop.2015.02.015.
 89. Guo JH. Bioadhesive polymer buccal patches for buprenorphine controlled delivery: formulation, in vitro adhesion and release properties, *Drug Dev. Ind. Pharm.* 20 (1994) 2809–2821.
 90. Peh KK., Wong CF. Polymeric films as vehicle for buccal delivery: swelling, mechanical, and bioadhesive properties. *J Pharm Pharm Sci*. 1999. 2(2): 53-61

91. Senel S., İkinci G., Kaş S., Yousefi-Rad A., Sargon MF., Hincal A.A. Chitosan films and hydrogels of chlorhexidine gluconate for oral mucosal delivery, *Int. J. Pharm.* 2000, 193 197–203.
92. Joshi D., Garg T., Goyal AK., Rath G. Advanced drug delivery approaches against periodontitis. *Drug Deliv.* 2016. 23(2): 363-377.
93. Garcia MA., Pinotti A., Zaritzky ME., Physicochemical, water vapor barrer and mechanical properties of corn starch and chitosan composite films. *Starch-Stärke.* 2006, 58(9): 453-463
94. Ibitoye EB., Lokman IH, Hezmee MNM., Goh YM., Zuki ABZ., Jimoh AA. Extraction and physicochemical characterization of chitin and chitosan isolated from house cricket. *Biomed Mater.* 2018 Jan 30;13(2):025009.
95. Rath G., Hussain T., Chauhan G., Garg T., Goyal AK. Collagen nanofiber containing silver nanoparticles for improved wound-healing applications. *J. Drug Target.* 24(6) (2016) 520-529.
96. Wu J., Yamanouchi D., Liu B., Chu C.C. Biodegradable Arginine-Based Poly(ether ester amide)s as a Non-Viral DNA Delivery Vector and Their Structure-Function Study. *J. Mater. Chem.* 2012;22:18983–18991. Doi: 10.1039/c2jm33753c.
97. Obando F., Braulio I., Yates B. Aplicación de la espectroscopia de infrarrojo al análisis orgánico cualitativo. In *Análisis organico clasico y espectral.* 1999. 94– 147
98. Torino PD., Tentor F., Nonni AM.). Development of an Alginate-Chitosan Based Membrane as a Novel Intravaginal Drug Delivery System. 2018
99. Lima PAL., Resende CX., Almeida SGD., Anselme K., Almeida LE. Preparation, characterization and biological test of 3D-scaffolds based on chitosan, fibroin and hydroxyapatite for bone tissue engineering. *Materials Science and Engineering: 2013, C 33(6), 3389-3395.*
100. Teimouri A., Ebrahimi R., Emadi R., Beni BH., Chermahini AN. Nano -composite of silk fibroin–chitosan/Nano ZrO₂ for tissue engineering applications: Fabrication and morphology. *International journal of biological macromolecules,* 2015, 76, 292-302.
101. Boateng S., Auffret AD., Matthews KH., Humphrey MJ., Stevens HN., Eccleston GM. Characterisation of freeze-dried wafers and solvent evaporated films as potential drug delivery systems to mucosal surfaces, *Int. J. Pharm.* 2010, 389 24–31.

102. Michałowicz J. Bisphenol A—sources, toxicity and biotransformation. *Environ Toxicol Pharmacol.* 2014 Mar;37(2):738-58. Doi: 10.1016/j.etap.2014.02.003. Epub 2014 Feb 8. PMID: 24632011.
103. Jorge VIY., Molina GDL., Quintana TIJF., Ramírez AMJ., Fernando BLR., Jorge VDY. Physical-Chemistry Characterization and Protein Content of Fluids Extracts of the Mangrove Oyster (*Crassostrea rizophorae*). *Revista Cubana De Química*, 2015, 26(1), 66–74.
104. Ramya K., Raja, CR. Studies on the Growth and Characterization of L-Arginine Maleate Dihydrate Crystal Grown from Liquid Diffusion Technique. *JMMCE*, 2016 4, 143-153.

15. ANEXOS

15.1. Bioética

Este proyecto se realizó con base en los lineamientos del comité de investigación de la Facultad de Estomatología de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. De acuerdo con las pautas para las regulaciones sobre nanotecnologías para impulsar la competitividad y proteger el medio ambiente, la salud y la seguridad de los consumidores. De acuerdo con los lineamientos en el punto 4 al 8 NOM-018-STPS-2000. Sistemas para la identificación y comunicación de peligros y riesgos por sustancias químicas peligrosas en los centros de trabajo.

15.2. Carta a CIFE

Puebla, Puebla, a 9 de mayo del 2023

A quien corresponda:

Por medio de la presente quiero informar que el proyecto de investigación titulado “CARACTERIZACIÓN DE PELÍCULAS MUCOADHESIVAS DE QUITOSANO PARA LA LIBERACIÓN DE L-ARGININA AL 15%” con número de registro 2023192, presentó inconvenientes al realizar las pruebas mencionadas en el protocolo, por lo que 2 de las pruebas que se mencionan no se realizaron (reología y degradación) y 1 quedó incompleta (liberación).

Las dificultades que hicieron que dichos experimentos quedaran inconclusos fueron a raíz de la pandemia SARS-CoV-2, debido a que entramos en modo presencial en noviembre de 2021, accedando a los laboratorios para hacer pruebas piloto en el periodo de Enero-Junio 2022 con reactivos prestados del protocolo de Hidrogeles de la misma línea de investigación. En Agosto de 2022 es cuando llegaron los reactivos del proyecto en mención y es cuando se comienza a realizar pruebas para la síntesis de las membranas. En Octubre-Noviembre ya con las membranas sintetizadas, se comienzan a realizar pruebas de liberación en las instalaciones de la Facultad de Estomatología de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla pero no se logró el objetivo esperado, así que en Enero de 2023 se buscaron nuevas colaboraciones en Ciencias Químicas de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla obteniendo respuesta positiva en Febrero del 2022. A partir de ahí se ha trabajado en buscar métodos para lograr ver la liberación de la L-Arginina pero desafortunadamente aún no llegamos al cometido, aunado a la interrupción de labores por las vacaciones de Semana Santa y múltiples días feriados, pues únicamente tenemos acceso al laboratorio donde realizamos la colaboración los días martes y viernes. Respecto a las pruebas de degradación y reología hubo falta de material para más síntesis de membranas, el cual si el pedido se realizaba llegaba en aproximadamente 45 días y no tendríamos el tiempo necesario para sintetizar más membranas y realizar las pruebas, pues las membranas tardan de 14-21 días en estar secas para poder caracterizarse.

Por todos estos motivos solicito poder presentar resultados preliminares, los cuales consisten en la síntesis de la membrana de Quitosano con L-Arginina, además de las pruebas de caracterización:

- Hinchamiento o capacidad de absorción de agua
- Microestructura
- pH
- Espectroscopía de infrarrojo con transformada de Fourier (FTIR)
- Espesor y grosor
- Rugosidad
- Porosidad y distribución de poros

Quedando pendientes como ya mencioné:

- Reología
- Degradación

Y teniendo resultados preliminares de:

- Liberación

Cabe mencionar que esta variación en la forma de presentar resultados de mi proyecto de investigación quedó consensuado con el Director de Tesis del presente proyecto, a fin de que pueda presentar mi defensa de grado en tiempo y forma.

Sin otro asunto que atender, agradezco su atención y comprensión.



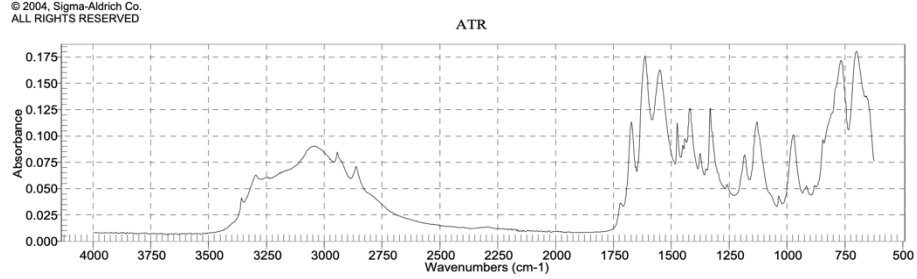
Ana Karen Rocha Balderas
Nombre y firma de la estudiante



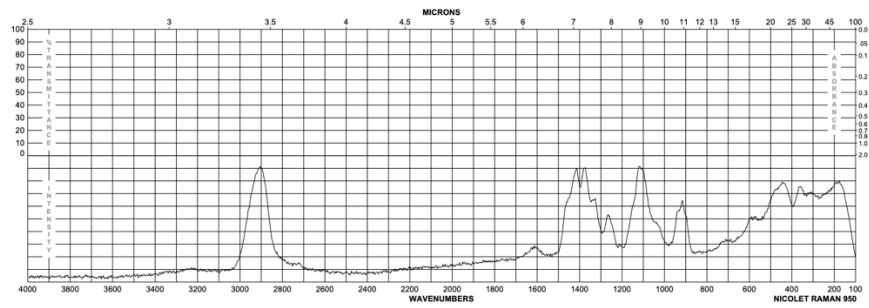
D.C. Miguel Ángel Casilla Santana
Nombre y firma del director de tesis

15.3. Espectros base para prueba FTIR

Espectros FTIR de L-Arginina A8094 obtenidos de la casa comercial Sigma Aldrich



Espectros FTIR de la carboximetilcelulosa 419338 obtenidos de la casa comercial
Sigma Aldrich



Espectros FTIR de Quitosano 448869 obtenidos de la casa comercial Sigma
Aldrich

