

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS



**EVALUACIÓN DEL PERFIL DE LIBERACIÓN *IN VITRO*
DE AMOXICILINA A PARTIR DE UN BIOPOLÍMERO
SEMISINTÉTICO A BASE DE QUITOSANO**

Por

QFB. BRAYAN ALEXANDER SALAZAR TREJO

**Como requisito parcial para obtener el Grado de
MAESTRÍA EN CIENCIAS con Orientación en Farmacia**

JUNIO, 2023

EVALUACIÓN DEL PERFIL DE LIBERACIÓN *IN VITRO*
DE AMOXICILINA A PARTIR DE UN BIOPOLÍMERO
SEMISINTÉTICO A BASE DE QUITOSANO

Aprobación de Tesis:

Dra. Lucía Guadalupe Cantú Cárdenas
Presidente

Dra. Patricia González Barranco
Secretaria

Dra. Myrna Laura Yeverino Gutiérrez
Vocal

Dra. María Elena Cantú Cárdenas
Sub-Directora de Estudios de Posgrado

EVALUACIÓN DEL PERFIL DE LIBERACIÓN *IN VITRO*
DE AMOXICILINA A PARTIR DE UN BIOPOLÍMERO
SEMISINTÉTICO A BASE DE QUITOSANO

Revisión de la Tesis:

Dra. Lucía Guadalupe Cantú Cárdenas
Directora

Dra. María del Rosario González González
Co-Directora

Dra. Patricia González Barranco
Comité Tutorial

Dra. Myrna Laura Yeverino Gutiérrez
Comité Tutorial

Dra. Patricia Cristina Esquivel Ferriño
Comité Tutorial

RESUMEN

Brayan Alexander Salazar Trejo

Fecha de graduación: Noviembre de 2022

Universidad Autónoma de Nuevo León

Facultad de Ciencias Químicas

Título del estudio: Evaluación del perfil de liberación *in vitro* de amoxicilina a partir de un biopolímero semisintético a base de quitosano.

Número de páginas: 72

Candidato para la obtención del grado de Maestría en Ciencias con Orientación en Farmacia

Área de estudio: Farmacia

Propósito y método de estudio: Debido a la alta prevalencia de las infecciones odontogénicas en el mundo, y al incremento de la resistencia bacteriana a los antibióticos más usuales, entre los que se encuentra la amoxicilina como fármaco de primera línea, la administración local de principios activos en la cavidad oral permite alcanzar altas concentraciones en el sitio de acción, reduciendo la absorción sistémica y las reacciones adversas asociadas. El empleo de formas de liberación prolongada permite mantener concentraciones efectivas del fármaco por más tiempo, requiriendo menor frecuencia de administración y proporcionando comodidad al paciente, en el caso de antibióticos, se reduce el riesgo de desarrollo de resistencia bacteriana. El quitosano presenta diversas propiedades que permiten su utilización como soporte para la incorporación y liberación prolongada de fármacos, tales como biocompatibilidad, biodegradabilidad y nula antigenicidad, además, al presentar actividad antibacteriana, antifúngica y hemostática lo hacen un buen candidato para el desarrollo de un sistema de liberación prolongada de antibióticos que pueda ser administrado localmente en la cavidad oral. El objetivo del presente estudio fue desarrollar una formulación de microesferas a base de quitosano conteniendo amoxicilina, que fueran capaces de liberar el principio activo durante al menos 72 horas. Se obtuvieron dos formulaciones mediante el método de gelación iónica y a través de secado por atomización, las cuales fueron caracterizadas por FTIR, DRX y DSC, se evaluó el perfil de liberación del fármaco, para lo cual se llevó a cabo la validación del método analítico para la cuantificación de amoxicilina de acuerdo con la NOM-177-SSA1-2013.

Contribuciones y conclusiones: Se elaboraron microesferas de quitosano conteniendo amoxicilina mediante el método de gelación iónica y a través de secado por atomización, las cuales presentaron una liberación del principio activo de 68.5 y 98.3% respectivamente a las 90 horas en medio saliva simulada a pH 6.75.

FIRMA DEL DIRECTOR DE TESIS
Dra. Lucía Guadalupe Cantú Cárdenas

AGRADECIMIENTOS

Gracias a Dios por darme salud y oportunidad de concluir este logro, uno de mis mayores propósitos. A mi amada familia por su gran apoyo incondicional.

A la Dra. Lucía G. Cantú Cárdenas por su compromiso y valioso apoyo durante este tiempo, gracias por ayudarme a prepararme y a mejorar día tras día, gracias por ayudarme a terminar este proyecto de investigación, así como a la Dra. María del Rosario González González, por sus sugerencias de gran valor.

A mi comité tutorial integrado por la Dra. Sandra Leticia Gracia Vásquez, la Dra. Patricia González Barranco, la Dra. Patricia Cristina Esquivel Ferriño y la Dra. Myrna Laura Yeverino Gutiérrez, quienes me ayudaron a mejorar con sus valiosas aportaciones y sugerencias, fortaleciendo el proyecto de investigación desde diferentes puntos de vista.

Al grupo de trabajo del Laboratorio de Biofarmacia, mi compañera QFB. Gabriela, quien me ayudó a sacar adelante este proyecto, sus consejos, sugerencias y su ayuda incondicional durante el trabajo en el Laboratorio.

A la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid y en especial a la Dra. Dolores Serrano por su total apoyo, aprendiendo de su valiosa experiencia, que me ayudó a reforzar este proyecto.

Al Dr. Juan Carlos Cárdenas, de la Universidad Autónoma de Coahuila, por la colaboración en el proyecto de investigación, el cual fue de gran ayuda para finalizar las actividades programadas y a la Maestra Hilda Garza Fernández, por su valioso apoyo en la realización de las pruebas microbiológicas, que permitieron enriquecer el proyecto.

Gracias a la Facultad de Ciencias Químicas, por aceptarme en el programa de Maestría en Ciencias con Orientación en Farmacia, de todo corazón, muchas gracias y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada durante mi estancia en la ciudad de Monterrey (No. Becario 882471).

DEDICATORIA

Dedico esta tesis a mi querida familia, por su amor y apoyo incondicional.

A mis padres que me creen capaz de todo y me apoyan siempre.

A mis hermanas quienes con su amor y paciencia me apoyan a lograr mis sueños.

A mi hermanos que creen en mí y por su hermosa compañía.

A Ciori, mi mejor amiga por siempre estar conmigo y ser parte importante en mi vida.

TABLA DE CONTENIDO

Capítulo	Página
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Infecciones de la cavidad oral	1
1.1.1 Etiología y tratamiento de las infecciones odontogénicas	2
1.1.2 Tratamiento farmacológico de las infecciones odontogénicas	3
1.2 Amoxicilina	4
1.2.1 Propiedades fisicoquímicas	4
1.2.2 Farmacodinamia	4
1.2.3 Farmacocinética	6
1.2.3.1 Absorción	6
1.2.3.2 Distribución	6
1.2.3.3 Metabolismo	6
1.2.3.4 Eliminación	6
1.2.3.5 Reacciones adversas	6
1.3 Resistencia bacteriana	7
1.4 Sistemas de liberación prolongada	8
1.4.1 Factores a considerar en la elaboración de un sistema de liberación prolongada	9
1.5 Polímeros	9
1.6 Quitosano	10
1.6.1 Propiedades fisicoquímicas	12
1.6.2 Propiedades biológicas	12
1.7 Métodos de obtención de microesferas de quitosano	13
1.7.1 Método por atomización	14
1.7.2 Gelación iónica	15
1.7.2.1 Liofilización	15
1.8 Diseño experimental	16
1.8.1 Diseño de superficie de respuesta	16
1.8.2 Diseño de Box-Behnken	17
1.9 Validación del método analítico para la cuantificación de amoxicilina en los perfiles de liberación con base en la NOM-177-SSA1-2013	17

1.9.1	Parámetros de validación del sistema	17
1.9.1.1	Linealidad	17
1.9.1.2	Precisión	18
1.9.2	Parámetros de validación del método.....	18
1.9.2.1	Linealidad	18
1.9.2.2	Exactitud.....	18
1.9.2.3	Precisión	18
1.9.2.3.1	Repetibilidad.	19
1.9.2.3.2	Reproducibilidad.	19
1.9.2.4	Selectividad	19
1.9.2.5	Estabilidad	20
1.10	Perfil de liberación <i>in vitro</i>	20
2.	ANTECEDENTES	21
2.1	JUSTIFICACIÓN.....	23
2.2	APORTACIÓN CIENTÍFICA	23
2.3	HIPÓTESIS	24
2.4	OBJETIVO GENERAL	24
2.4.1	Objetivos específicos	24
3.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	25
3.1	Materias primas	25
3.2	Reactivos	25
3.3	Equipos e instrumentos	26
3.4.	Métodos.....	26
3.4.1	Análisis de caracterización de principio activo y excipientes	26
3.4.1.1	Análisis por espectroscopía Infrarroja (FTIR-ATR)	26
3.4.1.2	Análisis calorimétrico diferencial de barrido (DSC).....	27
3.4.1.3	Difracción de rayos X (DRX)	27
3.5	Formulación de microsferas mediante diseño de experimentos Box Behnken ..	27
3.5.1	Diseño Box Behnken.....	27
3.5.2	Evaluación de respuesta	28
3.5.2.1	Tamaño de partícula	28
3.5.2.2	(%) Porcentaje de rendimiento	29

3.5.2.3 (%) Porcentaje de eficiencia de incorporación de amoxicilina	29
3.6 Análisis estadístico	29
3.7 Preparación de microesferas de quitosano	29
3.7.1 Método de obtención por gelación iónica	29
3.7.2 Método de obtención por atomización	30
3.8 Morfología por microscopía electrónica de barrido (SEM).....	30
3.9 Validación del método analítico para la cuantificación de amoxicilina.....	31
3.9.1 Condiciones cromatográficas	31
3.9.2 Validación del sistema.....	31
3.9.2.1 Linealidad.....	31
3.9.2.2 Precisión	32
3.9.3 Validación del método.....	32
3.9.3.1 Linealidad.....	32
3.9.3.2 Exactitud.....	32
3.9.3.3 Precisión	32
3.9.3.3.1 Repetibilidad y reproducibilidad	33
3.9.3.4 Selectividad	33
3.9.3.5 Estabilidad	33
3.10 Perfiles de liberación <i>in vitro</i>	33
3.10.1 Preparación del medio de disolución.....	34
3.10.2 Muestreo y análisis	34
3.11 Ensayo antimicrobiano (difusión en agar)	35
4. RESULTADOS Y DISCUSIONES	36
4.1 Análisis de caracterización de principio activo y excipientes	36
4.1.1 Espectrofotometría IR.....	36
4.1.2 Difracción de rayos X (DRX).....	38
4.1.3 Análisis calorimétrico diferencial de barrido (DSC).....	40
4.2 Optimización de las formulaciones para el método gelación iónica.....	41
4.2.1 Análisis de superficie de respuesta 3D.....	41
4.3 Microesferas obtenidas mediante secado por atomización	44
4.4 Morfología por microscopía electrónica de barrido (SEM).....	46
4.5 Validación del método analítico para la cuantificación de amoxicilina.....	48

4.5.1 Validación del sistema.....	48
4.5.1.1 Linealidad.....	48
4.5.1.2 Precisión.....	49
4.5.2 Validación del método.....	50
4.5.2.1 Linealidad.....	50
4.5.2.2 Exactitud.....	52
4.5.2.3 Precisión.....	52
4.5.2.3.1 Repetibilidad.....	52
4.5.2.3.2 Reproducibilidad.....	53
4.5.2.4 Selectividad.....	54
4.5.2.5 Estabilidad.....	54
4.5.3 Resumen de la validación del método analítico.....	55
4.6 Evaluación del perfil de liberación.....	56
4.7 Ensayo antimicrobiano (difusión en agar).....	58
5. CONCLUSIONES.....	62
6. BIBLIOGRAFÍA.....	64

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Página
1. Estructura química de la amoxicilina.....	4
2. Mecanismo de acción de antibióticos betalactámicos.....	5
3. Estructura quitina (A) celulosa (B).....	11
4. Estructura del quitosano.....	11
5. Representación esquemática del proceso de liberación desde una matriz hidrofílica.....	12
6. Representación esquemática de la preparación de sistemas de partículas de quitosano mediante el método de atomización.....	14
7. Representación esquemática del método de gelación iónica.....	15
8. Gráfica de análisis de superficie 3D.....	16
9. BUCHI Mini Spray-dryer B-191.....	30
10. HPLC Perkin Elmer Series 200 System con detector UV-Vis.....	35
11. Espectro FTIR para (A) tripolifosfato, (B) quitosano, (C) amoxicilina y (D) microesferas.....	37
12. Difractograma de la amoxicilina.....	38
13. Difractograma de (A) quitosano, (B) quitosano-TPP y (C) microesferas quitosano-TPP-amoxicilina.....	39
14. Análisis térmico de (A) quitosano, (B) amoxicilina, (C) microesferas conteniendo amoxicilina	40
15. Análisis de superficie de respuesta del rendimiento.....	42
16. Análisis de superficie de respuesta de la eficiencia de incorporación.....	42
17. Análisis de superficie de respuesta del tamaño de partícula.....	43
18. Distribución de tamaño de microesferas obtenidas por gelación iónica.....	44
19. Microesferas adheridas en la paredes de ciclón del equipo Mini Spray-dryer.....	45
20. Distribución de tamaño de microesferas obtenidas por secado por atomización.....	45
21. Micrografías SEM de (A) quitosano, (B) microesferas obtenidas por gelación iónica y (C) microesferas obtenidas mediante secado por atomización.....	47

22. Espectro de absorción ultravioleta de amoxicilina en solución buffer de fosfatos pH 6.75.....	48
23. Curva de regresión ajustada para la linealidad del sistema.....	49
24. Curva de regresión ajustada para la linealidad del método.....	51
25. Cromatograma de la solución estándar de amoxicilina (A) y de las microesferas incorporadas con amoxicilina (B).....	54
26. Estabilidad de espectros de absorción UV-Vis de amoxicilina a diferentes intervalos de tiempo.....	55
27. Gráfica de perfil de liberación de microesferas obtenidas por el método de secado por atomización y gelación iónica.....	57
28. Ensayo antimicrobiano en contra de <i>Staphylococcus aureus</i>	59
29. Ensayo antimicrobiano en contra de <i>Enterococcus faecalis</i>	60

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla	Página
1. Mecanismo de acción y dosis de antibióticos para infecciones odontogénicas.....	3
2. Reacciones adversas asociadas a penicilinas.....	7
3. Ventajas de los sistemas de liberación prolongada.....	8
4. Factores estudiados para la elaboración de microesferas por gelación iónica.....	28
5. Factores y respuestas evaluadas.....	41
6. Resumen de análisis de linealidad del sistema.....	49
7. Análisis de precisión del sistema.....	50
8. Resumen de análisis de precisión del sistema.....	50
9. Análisis de linealidad del método.....	51
10. Resumen de análisis de linealidad del método.....	52
11. Análisis de exactitud del método.....	52
12. Resumen del análisis de exactitud y repetibilidad del método.....	53
13. Análisis de reproducibilidad.....	53
14. Resumen de análisis de reproducibilidad.....	53
15. Resumen de la validación del método analítico.....	56
16. Tamaño de zona de inhibición en contra de <i>Staphylococcus aureus</i>	59
17. Tamaño zona de inhibición en contra de <i>Enterococcus faecalis</i>	60

NOMENCLATURA

ACS	American Chemical Society
AEMPS	Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios
ALT	Alanina aminotransferasa
AMR	Antimicrobial Resistance
ANOVA	Análisis de varianza
ATCC	American Type Culture Collection
AST	Aspartato transaminasa
°C	Grados Celsius
cm	Centímetro
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
CMI	Concentración Mínima Inhibitoria
CV	Coefficiente de Variación
D₅₀	Tamaño de partícula por debajo del cual está el 50% de la muestra
DEP	División de Estudios de Posgrado
DLS	Dispersión de Luz Dinámica
DOE	Diseño de Experimentos
DRX	Difracción de Rayos X
DS	Desviación Estándar
DSC	Calorimetría Diferencial de Barrido
Ec	Ecuación
FCQ	Facultad de Ciencias Químicas

FEUM	Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos
FDA	Food & Drug Administration
FTIR-ATR	Espectroscopía Infrarroja con Transformadas de Fourier por Reflexión total atenuada
g	Gramos
GBD	Global Burden of Disease
GRAS	Generally Recognized as Safe
h	Horas
HPLC	High Purity Liquid Chromatography
IMSS	Instituto Mexicano del Seguro Social
IR	Infrarrojo
Kg	Kilogramo
kDa	Kilodalton
Log P	Coeficiente de reparto
M	Muestra
mAU	Miliunidades de absorbancia
mm	Milímetro
mg	Miligramos
min	Minutos
mL	Mililitros
nm	Nanómetros
No	Número
NOM	Norma Oficial Mexicana
OMS	Organización Mundial de la Salud

PBP	Penicillin Binding Proteins
PBS	Solución buffer de fosfatos
pH	Potencial de hidrógeno
pKa	Potencial de disociación de ácido
rpm	Revoluciones por minuto
SEM	Scanning Electron Microscope
SIVEPAB	Sistema de Vigilancia Epidemiológica de Patologías Bucales
SSA	Secretaría de Salubridad y Asistencia
t ½	Vida media
TPP	Tripolifosfato
UANL	Universidad Autónoma de Nuevo León
µg	Microgramos
µL	Microlitro
µm	Micrómetros
UCM	Universidad Complutense de Madrid
USP	United States Pharmacopeia
UV-Vis	Ultravioleta-Visible

CAPÍTULO 1

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Infecciones de la cavidad oral

La cavidad oral es el primer segmento del aparato digestivo que comunica con el exterior, este hecho condiciona que no sea una cavidad aséptica, por el contrario, contiene una variada microbiota oral, que se encuentra en equilibrio con el huésped, que presenta condiciones de temperatura, humedad y aporte de nutrientes que facilitan la multiplicación bacteriana. En determinadas circunstancias la microbiota oral puede comportarse de manera oportunista, dando lugar a infecciones endógenas. Las infecciones de la cavidad oral, según la zona en la que se desarrollen, se clasifican en:

- No odontogénicas, cuando afectan a mucosas o estructuras extradentales (glándulas salivales, lengua, etc.).
- Odontogénicas, cuando afectan a estructuras que forman el diente y el periodonto; incluyen caries, pulpitis, absceso periapical, gingivitis, periodontitis y pericoronaritis, siendo estas infecciones las de mayor frecuencia (Robles *et al.*, 2017)¹.

Según un informe de la Organización Mundial de la Salud (OMS) nueve de cada diez personas en todo el mundo están en riesgo de tener algún tipo de enfermedad odontogénica, siendo las caries las de mayor prevalencia, con un estimado del 60–90% de escolares y casi 100% de adultos en todo el mundo, así mismo, se estimó una prevalencia mundial para la periodontitis entre el 5 y 20%, la cual se caracteriza por el desgaste e inflamación del tejido que rodea al diente, lo que puede terminar con la pérdida dentaria (OMS, 2012)².

Otra investigación determinó que las infecciones odontogénicas son una de las principales causas de consulta en la práctica odontológica y que las enfermedades bucales afectaron a casi 3,500 millones de personas en todo el mundo, siendo la caries de los dientes permanentes la más prevalente de todas las condiciones evaluadas, se calculó que esta enfermedad la padecieron 2,000 millones de personas (Global Burden of Disease Study, 2019)³. Mientras que la periodontitis grave ha presentado un aumento considerable en las últimas tres décadas, afectando a 1,100 millones de personas en todo el mundo (Chen *et al.*, 2021)⁴.

En México, un estudio publicado por el Sistema de Vigilancia Epidemiológica de Patologías Bucles (SIVEPAB, 2019)⁵ que incluyó a 312,625 pacientes de un rango de edades entre 0 y 99 años, determinó que las caries afectaron al 93.3% de la población, de la cual el 59.2% tenía algún signo de enfermedad periodontal y un 22% gingivitis. Estos resultados coinciden con un informe del Instituto Mexicano de Seguro Social (IMSS) en el que se indicó que a nivel nacional el 90% de los mexicanos están afectados por caries y el 70% por la enfermedad de las encías, mientras que de la población derechohabiente el 78% tiene caries y el 60% enfermedad periodontal, indicando que de los 4 millones 600 mil consultas que se otorgan anualmente en los consultorios dentales de las Unidades Médicas Familiares, 60% son por caries, 25% corresponden a enfermedad periodontal y 15% son urgencias dentales (IMSS, 2019)⁶.

Las infecciones odontogénicas pueden ser ocasionadas tanto por microorganismos aerobios como anaerobios, su presentación comprende diversos cuadros clínicos, que pueden mantenerse a nivel local o diseminarse sistémicamente y su tratamiento requiere del uso de diversos antibióticos con regímenes de administración específicos (Peedikayil *et al.*, 2016)⁷.

1.1.1 Etiología y tratamiento de las infecciones odontogénicas

En la cavidad bucal habitan alrededor de 700 especies de microorganismos, la mayoría se consideran comensales, pero un pequeño grupo de ellas se comportan como patógenos oportunistas, que incluso puede causar infecciones sistémicas.

Entre los microorganismos potencialmente patógenos se encuentra *Streptococcus mutans*, *Fusobacterium nucleatum*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, entre otros, estos podrían diseminarse desde la cavidad bucal al resto del organismo, produciendo infecciones odontogénicas y no odontogénicas (Sáez *et al.*, 2019; Zaatout *et al.*, 2021)^{8,9}.

El éxito terapéutico de las infecciones odontogénicas va desde la eliminación del foco infeccioso, ya sea mediante tratamiento quirúrgico que incluye la eliminación de tejido necrótico, la eliminación de la biopelícula dental, drenaje de abscesos e incluso extracciones dentales, su tratamiento antimicrobiano y la profilaxis antibiótica para disminuir la posibilidad de complicaciones pre, trans y postoperatorias (Esparza *et al.*, 2020)¹⁰.

1.1.2 Tratamiento farmacológico de las infecciones odontogénicas

Existen varios antibióticos, con diferentes mecanismos de acción, que están indicados en el tratamiento de las infecciones odontogénicas, los cuales se muestran en la tabla 1, siendo las penicilinas los fármacos de primera línea para estas infecciones (Peedikayil *et al.*, 2016)⁷. La amoxicilina, una penicilina semisintética, es el fármaco de elección para el tratamiento de infecciones dentales cuyo régimen de administración varía de 3 a 7 días (Esparza *et al.*, 2020)¹⁰.

Tabla 1. Mecanismo de acción y dosis de antibióticos para infecciones odontogénicas.

Antibiótico	Mecanismo de acción	Dosis, adultos	Dosis, niños
Amoxicilina	Inhibe la biosíntesis de la pared celular, que conduce a la muerte de las bacterias	250-500 mg c/8 h	20-40 mg/kg/día c/8 h
Metronidazol	Inhibe la síntesis de los ácidos nucleicos de las células microbianas	7.5 mg/kg c/6 h (máximo 4 g/día)	30 mg/kg/día c/6 h
Clindamicina	Inhibe la síntesis de proteínas bacterianas	150-450 mg c/6 h (máximo 1.8 g/día)	8-20 mg/kg/día c/6 h
Amoxicilina con ácido clavulánico	Inhibe la biosíntesis de la pared celular y a las enzimas betalactamasas, lo cual conduce a la muerte bacteriana	500 mg/125 mg 875 mg/125 mg c/12 h	25-45 mg/kg/día c/12 h

1.2 Amoxicilina

La amoxicilina (trihidrato), es un principio activo que posee un amplio espectro de actividad antibacteriana contra un gran grupo de microorganismos gram positivos y gram negativos.

1.2.1 Propiedades fisicoquímicas

La amoxicilina, cuyo nombre químico es ácido (2S,5R,6R)-6-[[[(2R)-2-amino-2-(4-hidroxifenil) acetil]amino]-3,3-dimetil-7-oxo-4-tia-1-azabicyclo [3.2.0] heptano-2-carboxílico trihidratado y su fórmula empírica es $C_{16}H_{19}N_3O_5S \cdot 3H_2O$, presenta la estructura que se ilustra en la figura 1 (FEUM, 2018)¹¹.

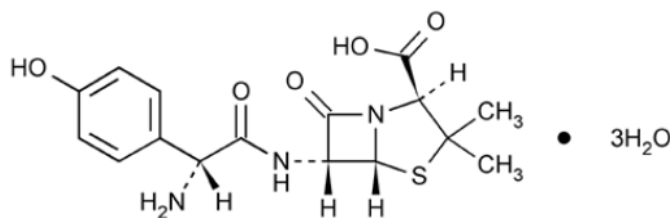


Figura 1. Estructura química de la amoxicilina.

La amoxicilina es una aminopenicilina semisintética del grupo de los antibióticos betalactámicos. Tiene una masa molecular de 419.46 g/mol. Es un polvo cristalino blanco, tiene tres valores de pKa de 2.6, 7.5 y 9.6, correspondientes al grupo carboxilo, al fenol y al amino, respectivamente. Presenta una solubilidad en agua de 3.4 mg/mL, es muy poco soluble en etanol y tiene un coeficiente de reparto (log P) de 0.87 (FEUM, 2018; Khataei *et al.*, 2022)^{11,12}.

1.2.2 Farmacodinamia

Los antibióticos betalactámicos como la amoxicilina son bactericidas, actúan inhibiendo el crecimiento bacteriano al interferir con la síntesis de la pared celular, la cual es una capa externa que rodea completamente la membrana citoplasmática, mantiene la integridad celular y previene la lisis celular de la presión osmótica. Esta pared celular está compuesta por un complejo polímero con enlace cruzado de polisacárido y péptidos conocido como peptidoglucano.

El peptidoglucano contiene aminoazúcares, *N*-acetilglucosamina y ácido *N*-acetilmurámico. La amoxicilina actúa inhibiendo la síntesis de la pared celular bacteriana uniéndose covalentemente a enzimas transpeptidasas denominadas proteínas fijadoras de penicilinas (PBP, del inglés Penicillin-Binding-Proteins) localizadas en la pared celular, deteniendo la síntesis de peptidoglucano y ocasionando la lisis de la bacteria y su muerte, como se describe en la figura 2 (Katzung, 2022)¹³.

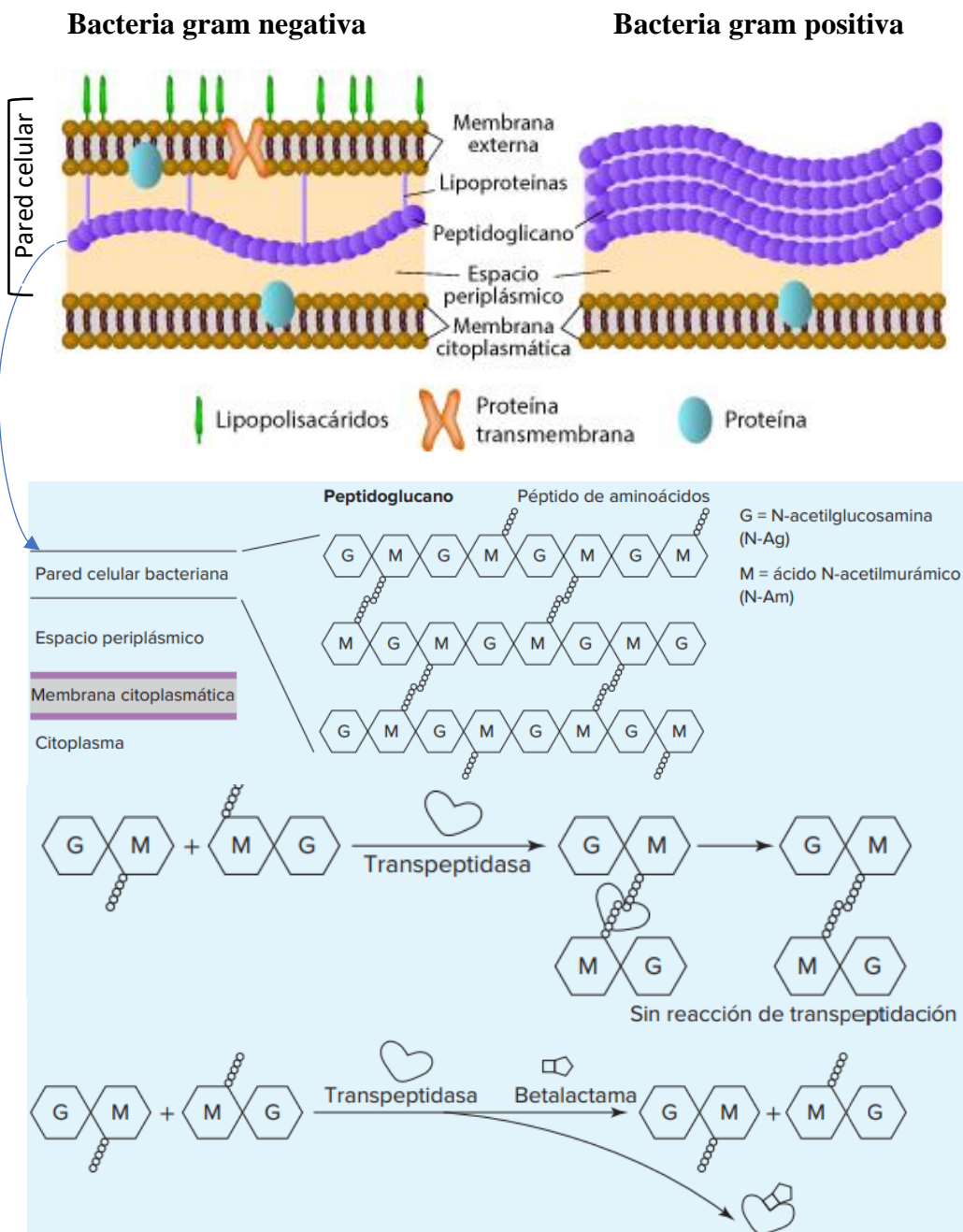


Figura 2. Mecanismo de acción de antibióticos betalactámicos (Adaptado de Katzung, 2022)¹³.

1.2.3 Farmacocinética

1.2.3.1 Absorción

La amoxicilina es estable en presencia de ácido gástrico y se absorbe rápidamente después de la administración oral. La máxima concentración plasmática de dosis de 250 y 500 mg administradas por vía oral se alcanza en 1 a 2 horas (de Velde *et al.*, 2016)¹⁴.

1.2.3.2 Distribución

Se difunde fácilmente en la mayoría de los tejidos y fluidos, con excepción del cerebro y el líquido cefalorraquídeo, salvo cuando las meninges están inflamadas, la unión a proteínas es de 20%.

1.2.3.3 Metabolismo

Es metabolizada por el hígado, sufriendo biotransformación a ácido peniciloico inactivo, en cantidades equivalentes al 10% a 25% de la dosis inicial.

1.2.3.4 Eliminación

La vida media de eliminación es de 1 hora. Aproximadamente el 60% de una dosis de amoxicilina posterior a su administración vía oral se excreta en la orina dentro de las 6 a 8 horas (Fournier *et al.*, 2018)¹⁵.

1.2.3.5 Reacciones adversas

Al igual que con otras penicilinas, se puede esperar que las reacciones adversas sean esencialmente limitadas a los fenómenos de sensibilidad. Es más probable que ocurran en individuos que hayan presentado previamente hipersensibilidad a las penicilinas y en aquellos con antecedentes de alergia, asma o urticaria. Se han reportado reacciones adversas por el uso de penicilinas, las cuales se muestran en la tabla 2 (AEMPS, 2017)¹⁶.

Tabla 2. Reacciones adversas asociadas a penicilinas.

Aparato o sistema/frecuencia	Manifestaciones
Gastrointestinales (1 de cada 10)	Diarrea o náuseas
Gastrointestinales (1 de cada 100)	Vómito
Piel (1 de cada 10,000)	Exantema, prurito o dermatitis
Hepatobiliar (1 de cada 10,000)	Aumento en los niveles de AST y/o ALT
Renal (1 de cada 10,000)	Nefritis

1.3 Resistencia bacteriana

La resistencia bacteriana a las penicilinas ocurre como resultado de la producción de enzimas beta-lactamasas por las bacterias (Peedikayil *et al.*, 2016)⁷. Como consecuencia de la farmacorresistencia, medicamentos antimicrobianos se vuelven ineficaces, por lo que las infecciones son cada vez más difíciles o imposibles de tratar.

Es alarmante la rápida propagación mundial de bacterias multirresistentes, la Organización Mundial de la Salud ha declarado a la resistencia a los antimicrobianos AMR (del inglés Antimicrobial Resistance), como una de las 10 principales amenazas de salud pública. En 2016 se estimó que en el 2050, podría resultar la pérdida mundial de hasta 10 millones de vidas por año, esta tendencia fue confirmada en 2019, por el estudio de la carga global de resistencia a los antimicrobianos, mostrando que la AMR es una de las principales causas de muerte en el mundo, particularmente en entornos de bajos recursos (European Antimicrobial Resistance Collaborators, 2022)¹⁷.

El uso racional de antibióticos es la estrategia más importante para evitar la resistencia microbiana, tanto para el tratamiento como para la profilaxis, la administración del antibiótico se debe recibir en dosis, vía y tiempo adecuado, como se describe en el Plan de Acción Mundial sobre la Resistencia a los Antimicrobianos (OMS, 2016)¹⁸. El éxito de la terapia está asociado directamente a la adherencia terapéutica, ya que la variabilidad de las concentraciones plasmáticas es un factor que favorece la resistencia a los antibióticos, este problema puede reducirse con el uso de formas de liberación prolongada (Gao *et al.*, 2011)¹⁹.

1.4 Sistemas de liberación prolongada

La Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos define la liberación prolongada como la condición en la que la formulación permite garantizar una liberación más lenta del o los fármacos por un tiempo determinado (FEUM, 2018)¹¹.

Estos sistemas permiten mantener la concentración efectiva por mayor tiempo, además de favorecer la adherencia al tratamiento. Existen macromoléculas como los biopolímeros que se han usado como excipientes en la formulación de medicamentos ofreciendo una liberación prolongada de su principio activo (Herdiana *et al.*, 2021)²⁰.

El diseño y la aplicación de dosificación prolongada de medicamentos es uno de los aspectos de mayor relevancia en el desarrollo de nuevas formas de dosificación. Se pueden encontrar diferentes formulaciones de medicamentos conteniendo antibióticos como sistemas de liberación prolongada utilizados en odontología, ya sea como geles, chips, fibras, micropartículas y nanopartículas (Rajeshwari *et al.*, 2019; Zhang *et al.*, 2021)^{21,22}.

El uso local de estos sistemas ha demostrado un mayor beneficio, presentando ventajas mencionadas en la Tabla 3 (Adepu *et al.*, 2021)²³.

Tabla 3. Ventajas de los sistemas de liberación prolongada.

Ventaja	Debido a
Reducción de las reacciones adversas asociadas	Se disminuye la concentración en sangre del principio activo
Reducción en las frecuencias de dosificaciones	Debido al efecto terapéutico prolongado
Reducción en los costos de tratamiento y mayor satisfacción del paciente	Se reduce la frecuencia de administración y se favorece la efectividad terapéutica
Mayor comodidad en el paciente	Con una menor frecuencia de administración es menos probable que el paciente olvide seguir el tratamiento
Administración local de medicamentos como sistemas de liberación prolongada (antibióticos)	Se disminuye el potencial de resistencia bacteriana ya que se alcanzan altas concentraciones del fármaco en el foco infeccioso.

1.4.1 Factores a considerar en la elaboración de un sistema de liberación prolongada

Para el diseño de un sistema de liberación prolongada se deben considerar factores biofarmacéuticos. Una característica para tomarse en cuenta es la vida media ($t_{1/2}$) del fármaco, siendo aquellos con tiempo cortos los candidatos (Wang *et al.*, 2020)²⁴.

Los fármacos deben mantener los niveles terapéuticos, en el caso de antibióticos, para eliminar el foco infeccioso y evitar causar resistencia bacteriana, lo cual es posible a través de un sistema de liberación prolongada para administración local (Gao *et al.*, 2011)¹⁹.

El uso de sistemas micro y nanoparticulados para la encapsulación de fármacos permite el transporte de éstos al lugar de acción y su liberación prolongada, manteniendo la concentración efectiva durante más tiempo. Estos sistemas están formados por una matriz polimérica de diversa naturaleza, para contener y posteriormente liberar al fármaco (Rajeshwari *et al.*, 2019; Lotfollah *et al.*, 2021)^{21,25}.

1.5 Polímeros

Los polímeros son un tipo de material formado por varias piezas más pequeñas conocidas como monómeros. Entre la clasificación existen los polímeros naturales (biopolímeros), polímeros sintéticos y semisintéticos. Los polímeros sintéticos son los que se producen *in vitro* por la unión de monómeros de cualquier origen, mientras que un biopolímero natural es aquel que se forma a partir de organismos vivos, pudiendo ser modificados químicamente dando lugar a los biopolímeros semisintéticos. Actualmente los biopolímeros han sido utilizados para sistemas de administración de fármacos y en productos sanitarios (Das *et al.*, 2022)²⁶.

Algunos polímeros, tanto de origen natural como sintético, reciben la denominación de “inteligentes” al ser capaces de liberar, en el momento y lugar de acción apropiados fármacos, bajo diferentes condiciones fisicoquímicas, bioquímicas y fisiológicas, evitando cambios en sus propiedades (López *et al.*, 2022)²⁷.

Los estímulos a los que responden los polímeros para liberar los fármacos pueden ser:

- Físicos: temperatura, fuerza iónica, solventes, campos eléctricos, estrés mecánico, presión, radiaciones sónicas y campos magnéticos.
- Químicos: pH, iones específicos y otros agentes.
- Bioquímicos: sustratos de enzimas, ligandos afines y otros agentes biológicos.

Las aplicaciones farmacéuticas de los biopolímeros constituyen actualmente uno de los campos de mayor interés para la protección de agentes terapéuticos inestables a las condiciones fisiológicas presentes en las vías de administración, proporcionando un sistema de transporte específico a un órgano, tejido o célula.

Estos biopolímeros deben cumplir con ciertas características tales como: biocompatibilidad, biodegradabilidad, resistencia mecánica y estabilidad química, entre otras. El quitosano es un biopolímero que cumple con estos requisitos, por lo que ha sido utilizado como excipiente en la industria farmacéutica (Kantak *et al.*, 2022)²⁸.

1.6 Quitosano

El quitosano, cuyo nombre sistemático es poli β -(1-4)-2-amino-2-desoxi-D-glucosa, es obtenido a partir de la quitina, la cual es el segundo polisacárido más abundante en la naturaleza y forma parte de la estructura de soporte de numerosos organismos vivos como los artrópodos (crustáceos e insectos), moluscos y hongos (Zhang *et al.*, 2021)²³.

La estructura de la quitina presenta similitud con la de la celulosa, la diferencia entre ellas se encuentra en que el carbono dos contiene un grupo hidroxilo en la celulosa y un grupo acetamida en la quitina como se muestra en la figura 3 (Kostag *et al.*, 2021)²⁹.

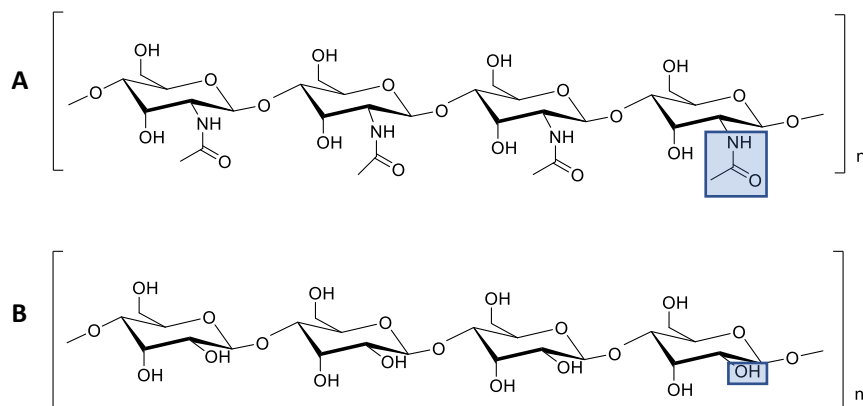


Figura 3. Estructura de quitina (A) y celulosa (B).

Cuando la quitina se somete a un medio alcalino muy concentrado y temperaturas superiores a 60 °C, se produce parcialmente la reacción de desacetilación. Esta reacción consiste en la pérdida del grupo acetilo de la amida del carbono dos y genera como producto quitosano (figura 4), el cual presenta propiedades significativamente diferentes a las de la quitina de partida (Sherin *et al.*, 2021)³⁰.

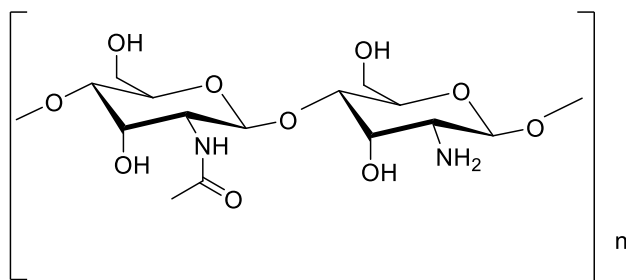


Figura 4. Estructura del quitosano.

La caracterización del quitosano radica básicamente en dos parámetros fundamentales, el grado de desacetilación y la masa molecular, la cual se encuentra relacionada con la viscosidad intrínseca. En cuanto al grado de desacetilación se ha establecido que la quitina con más de un 50% de desacetilación debe ser considerada quitosano, usualmente el grado de desacetilación se encuentra comprendido entre 50-99% (Sherin *et al.*, 2021)³⁰.

Con relación a la masa molecular, se puede encontrar quitosano de baja, mediana y alta masa molecular. El quitosano de mediana masa molecular tiene un rango de 190 a 300 kDa (Herdiana *et al.*, 2021)²⁰.

1.6.1 Propiedades fisicoquímicas

El quitosano se disuelve fácilmente en soluciones ácidas diluidas por debajo de pH 6.0, esto se debe a su naturaleza básica, al contar con grupos amino primarios con un valor de pKa de 6.3. La presencia de estos grupos permite modificar el grado de ionización y las propiedades del quitosano. A valores bajos de pH, los grupos amino se protonan y se cargan positivamente, haciendo al quitosano un polielectrolito catiónico hidrofílico (Herdiana *et al.*, 2021)²⁰.

La hidrofiliidad del quitosano y la viscosidad de sus soluciones, así como el comportamiento policationico permiten su obtención en forma de nano y microesferas, en las cuales pueden incorporarse fármacos, permitiendo su liberación prolongada en el sitio de acción. La liberación de principios activos generalmente ocurre por difusión a través de los poros del polímero como se representa en la figura 5 (Adepu *et al.*, 2021)²³.

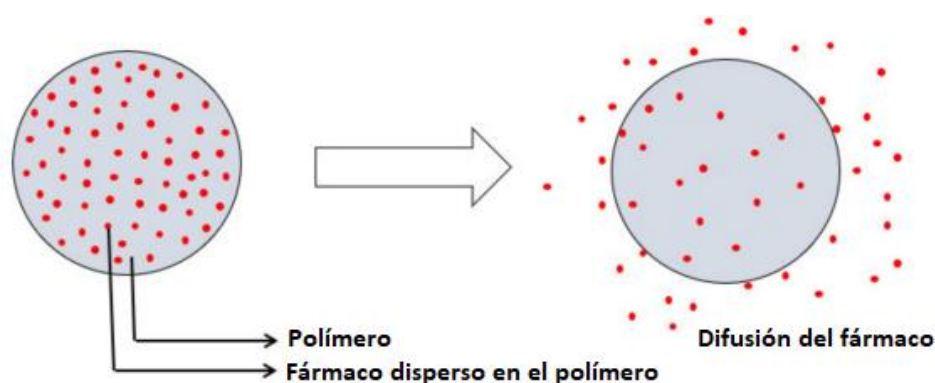


Figura 5. Representación esquemática del proceso de liberación desde una matriz hidrofílica (adaptado de Adepu *et al.*, 2021)²³.

1.6.2 Propiedades biológicas

El quitosano es considerado un polímero biológicamente compatible y biodegradable, la FDA (del inglés Food and Drug Administration) lo ha aprobado como apósito hemostático para heridas (Shangyong *et al.*, 2022; Frigaar *et al.*, 2022)^{31,32}.

La FDA ha aprobado algunos apósitos hemostáticos dentales a base de quitosano, entre ellos el producto Axiostat, desarrollado por la empresa Axio Biosolutions (Kantak *et al.*, 2022)²⁸. Además, el quitosano se ha utilizado como excipiente de formas farmacéuticas de administración subgingival (Rajeshwari *et al.*, 2019)²³.

Se han reportado propiedades antimicrobianas, antifúngicas y hemostáticas atribuidas al quitosano que son beneficiosas para curación de heridas (Mikušová *et al.*, 2021; Zhang *et al.*, 2021; Kantak *et al.*, 2022; Hamedi *et al.*, 2022)^{22,28,33,34}.

El quitosano puede ser utilizado para contener fármacos que se requieran liberar en alguna parte específica del organismo, como algún antibiótico en la cavidad oral, ya que es un sitio susceptible para presentar infecciones bacterianas (Rajeshwari *et al.*, 2019)²¹.

Recientemente algunas formas farmacéuticas como microesferas han sido desarrolladas para aplicación local en la vía oral, favoreciendo un efecto terapéutico prolongado. Las microesferas son estructuras poliméricas esféricas con un rango de diámetro de 1 a 1000 μm , diseñadas para contener fármacos, permitiendo su protección del medio externo. Estas microesferas pueden ser consideradas como sistemas eficaces de administración local de fármacos en periodoncia (Rajeshwari *et al.*, 2019; Costa *et al.*, 2021)^{22,35}.

1.7 Métodos de obtención de microesferas de quitosano

Entre los métodos para la preparación de microesferas de quitosano, el secado por atomización es ampliamente usado en las industrias farmacéutica y alimenticia (Zhang *et al.*, 2020)³⁶. De igual manera, el método de gelación iónica es utilizado frecuentemente para la elaboración de microesferas, ya que ofrece un proceso rápido y económico (Pedroso *et al.*, 2020)³⁷.

1.7.1 Método por atomización

El método de secado por atomización se basa en la adición del principio activo a la dispersión de un polímero generador de pared en un solvente, formando un sistema fluido, que luego es bombeado a una cámara de aspersión, donde el fluido es atomizado y por acción del aire en circulación, a una temperatura elevada, se produce la eliminación del solvente. En el caso del quitosano, este se disuelve en una solución acuosa de ácido acético, luego el fármaco se disuelve o dispersa en la solución. Esta solución o dispersión se atomiza en una corriente de aire caliente que conduce a la formación de pequeñas gotas, de las cuales el solvente se evapora instantáneamente, lo que lleva a la formación de partículas que fluyen libremente, como se muestra en la figura 6 (Al-Zoubi *et al.*, 2021)³⁸.

Esta técnica ofrece ventajas como la obtención de partículas esféricas de diferentes tamaños, ajustables mediante el control de parámetros del proceso como temperatura, flujo de líquido de alimentación y tamaño de boquilla, entre otros (Al-Zoubi *et al.*, 2021; Baumann *et al.*, 2021)^{38,39}.

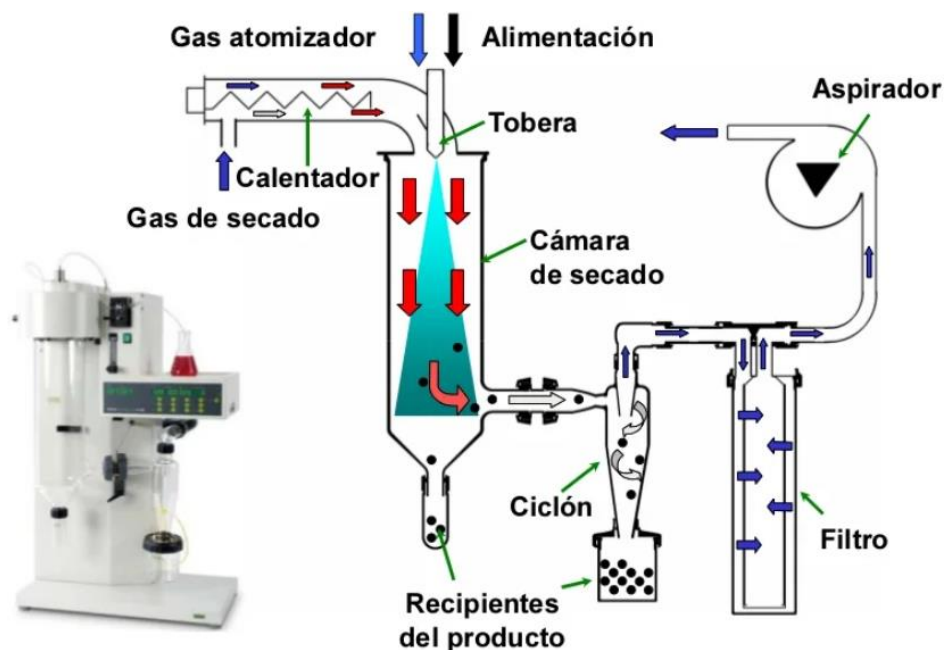


Figura 6. Representación esquemática de la preparación de sistemas de partículas de quitosano mediante el método de atomización (adaptado de Santos, 2014)⁴⁰.

1.7.2 Gelación iónica

Otro método para la obtención de microesferas es mediante gelación iónica, en la cual, el quitosano se disuelve en solución acuosa ácida que cuaterniza los grupos amino del polímero, luego se adiciona un polianión como el tripolifosfato (TPP), usualmente empleado en esta técnica, el cual interactúa electrostáticamente con el quitosano catiónico, la atracción entre cargas opuestas causa la gelación iónica y la precipitación en forma de partículas esféricas como se muestra en la figura 7 (Mikušová *et al.*, 2022)³⁴.

El tripolifosfato de sodio está clasificado por la FDA como una sustancia Generalmente Reconocida como Segura (GRAS del inglés Generally Recognized As Safe) (Moon *et al.*, 2019)⁴¹.

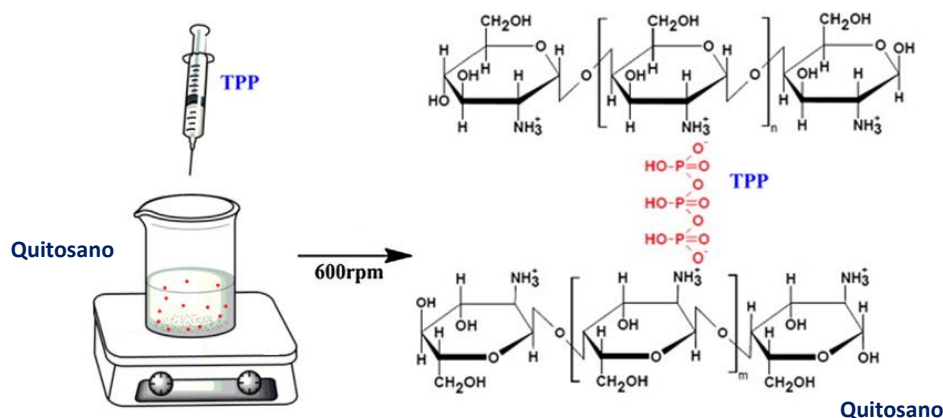


Figura 7. Representación esquemática del método de gelación iónica.

1.7.2.1 Liofilización

Para obtener microesferas mediante el método de gelación iónica es necesario la eliminación de los solventes utilizados, para ello se utiliza el secado por liofilización, el cual consiste en congelar el producto obtenido a muy bajas temperaturas de forma rápida, para evitar que se formen grandes cristales de hielo. Después se somete a un proceso de vacío, para que el agua se evapore sin pasar a estado líquido (sublimación), al no pasar el agua por un estado líquido, se mantienen todas las propiedades del producto (Abla *et al.*, 2022)⁴².

1.8 Diseño experimental

1.8.1 Diseño de superficie de respuesta

Un diseño de superficie de respuesta es un conjunto de técnicas avanzadas de diseño de experimentos (DoE) que ayudan a entender mejor un proceso y a optimizar la respuesta de este. La metodología del diseño de superficie de respuesta se utiliza con frecuencia para refinar los modelos, después de haber determinado los factores importantes que pueden afectar el proceso, lo que la hace útil para:

- Determinar los niveles de las variables que optimizan una respuesta.
- Seleccionar las condiciones operativas para cumplir con las especificaciones de un producto.

Esta herramienta ayuda a entender gráficamente si la respuesta de un proceso cambia de acuerdo con una variable. El efecto de las variables predictoras se muestra en las escalas X y Y, mientras que la variable de respuesta (Z) se representa mediante una superficie lisa (gráfica de superficie 3D) como se muestra en la figura 8 (Minitab, 2021)⁴³.



Figura 8. Gráfica de análisis de superficie 3D.

El efecto de la variable se observa con el grado de curvatura. Un diseño de Box-Behnken es un tipo de diseño de superficie de respuesta (Minitab, 2021)⁴³.

1.8.2 Diseño de Box-Behnken

Es un diseño de superficie de respuesta y tiene combinaciones de tratamiento que están en los puntos medios de los bordes del espacio experimental y requieren al menos tres factores, también aseguran que no se establezcan todos los factores en sus niveles altos al mismo tiempo. Este diseño puede ser aplicado para la optimización en el desarrollo de formulaciones farmacéuticas, siendo una herramienta eficiente que acorta el tiempo y minimiza los costos en la investigación (Usta *et al.*, 2022)⁴⁴.

1.9 Validación del método analítico para la cuantificación de amoxicilina en los perfiles de liberación con base en la NOM-177-SSA1-20132016

Para demostrar que el método analítico utilizado para la cuantificación de amoxicilina dará resultados confiables en las condiciones que será empleado se llevó a cabo la validación del método analítico, el cual debe cumplir con los siguientes parámetros.

1.9.1 Parámetros de validación del sistema

1.9.1.1 Linealidad

La linealidad se define como la capacidad de un método analítico, en un intervalo de trabajo, para obtener una respuesta proporcional a la concentración del compuesto en la muestra. La curva de regresión se determina sobre los puntos individuales sin promediar, por el método de los mínimos cuadrados. En el eje de las “x” aparecerá la concentración del analito y en el eje “y”, la respuesta analítica (absorbancia para métodos espectrofotométricos).

Para determinar que el sistema es lineal se debe demostrar que el coeficiente de correlación de la curva de calibración es ≥ 0.99 y el error relativo relacionado con la regresión debe ser \leq al 2% (FEUM, 2018)¹¹.

1.9.1.2 Precisión

La precisión es el grado de concordancia entre los resultados de la solución de referencia de una concentración o magnitud conocida.

El método se considera preciso cuando el coeficiente de variación (CV) del factor de respuesta es \leq al 2% (FEUM, 2018)¹¹.

1.9.2 Parámetros de validación del método

La validación del método es el proceso para confirmar que el procedimiento analítico utilizado para una prueba en concreto es adecuado para su uso previsto (FEUM, 2018)¹¹.

1.9.2.1 Linealidad

Se define como la capacidad del método analítico para proporcionar resultados que son directamente proporcionales a la concentración del analito dentro de un intervalo definido.

El criterio de aceptación para la linealidad del método se debe evaluar midiendo al menos cinco puntos de concentración, sin contar el cero y cada punto por triplicado. El coeficiente de regresión debe de ser \geq a 0.99 y el error relativo debido a la regresión debe de ser \leq al 3% (FEUM, 2018)¹¹.

1.9.2.2 Exactitud

Indica la capacidad del método analítico para obtener resultados más próximos entre el valor obtenido experimentalmente y el valor de referencia. El método se considera exacto cuando el promedio del porcentaje de recuperación de los datos de linealidad sea \leq al 3% respecto a la cantidad nominal en cada punto (FEUM, 2018)¹¹.

1.9.2.3 Precisión

La precisión refleja la medida en que los valores de una serie repetida de ensayos analíticos que se realizan sobre una muestra homogénea son semejantes entre sí.

La Norma Oficial Mexicana NOM-177-SSA-2013 divide la determinación de la precisión en repetibilidad y reproducibilidad.

1.9.2.3.1 Repetibilidad

Refleja la precisión de un método, cuando el ensayo se desarrolla bajo las mismas condiciones, utilizando la misma muestra, llevada a cabo por el mismo analista, en el mismo laboratorio, con los mismos equipos y reactivos y durante una misma sesión de trabajo en un período corto.

El criterio de aceptación para este parámetro indica que el CV del porcentaje cuantificado debe ser \leq al 3% (FEUM, 2018)¹¹.

1.9.2.3.2 Reproducibilidad

Es la medida de la precisión de los resultados de ensayos realizados sobre la misma muestra homogénea, pero ejecutados por diferentes analistas o días diferentes y se expresa con los mismos parámetros matemáticos empleados en repetibilidad.

El criterio de aceptación indica que el CV global del porcentaje cuantificado debe ser \leq 3% (FEUM, 2018)¹¹.

1.9.2.4 Selectividad

Se define como la capacidad de un método analítico para diferenciar y cuantificar el compuesto a analizar en presencia de otros compuestos en la muestra.

Para que el método se considere selectivo es necesario que cualquier interferencia que se pueda presentar no produzca un error mayor al aceptado en precisión y exactitud (FEUM, 2018)¹¹.

1.9.2.5 Estabilidad

Un fármaco puede degradarse por reacciones químicas, enzimáticas y fotoquímicas. Un estudio de las condiciones de conservación de las muestras representa una parte importante de la validación del método.

Criterio de aceptación: El coeficiente de variación entre el porcentaje de recuperación de las muestras en el tiempo inicial (tiempo cero) y final (después de 72 h), debe ser \leq al 3% (FEUM, 2018)¹¹.

1.10 Perfil de liberación *in vitro*

El ensayo de disolución es un método de análisis utilizado en el desarrollo de diversas formas farmacéuticas, en el control de calidad y de acuerdo con la NOM-177-SSA1-2013 consiste en la determinación experimental de la cantidad de fármaco disuelto a diferentes tiempos, en condiciones experimentales controladas, a partir de la forma farmacéutica.

Este método ha sido empleado para evaluar la liberación de principios activos de formulaciones sólidas de liberación prolongada. Una solución en buffer de fosfatos a pH 6.75 puede simular la saliva humana (Kilicarlan *et al.*, 2014)⁴⁵. La temperatura del medio debe ser de 37 ± 0.5 °C, simulando la temperatura del cuerpo humano.

El estudio de los perfiles de liberación *in vitro* permite calcular constantes que brinden información útil relacionada con el mecanismo y la cinética de liberación del fármaco, esto bajo condiciones experimentales controladas, con un enfoque racional para el desarrollo de productos farmacéuticos (D'Souza *et al.*, 2014)⁴⁶.

CAPÍTULO 2

ANTECEDENTES

El quitosano ha sido estudiado por su propiedad de encapsulamiento, protección y liberación controlada de fármacos, el cual puede emplearse solo o en combinación con otros polímeros, como matriz biopolimérica para contener y posteriormente liberar diversos fármacos.

En 2014, Kilicarslan y colaboradores prepararon, mediante el método de atomización, micropartículas a base de quitosano de mediana masa molecular conteniendo clindamicina, para su aplicación local periodontal. Evaluaron el perfil de liberación del fármaco a partir de sus formulaciones, obteniendo eficiencias de incorporación de más del 95%, partículas de $32.0 \pm 4.0 \mu\text{m}$ y el tiempo máximo de liberación del fármaco fue de 168 horas en medio saliva simulada a pH 6.75, con lo que concluyeron que el sistema clindamicina-quitosano puede ofrecer una liberación controlada del antibiótico hasta por 7 días (Kilicarslan *et al.*, 2014)⁴⁵.

En 2016, Dias y colaboradores desarrollaron un gel con microesferas conteniendo ornidazol, un antimicrobiano para el tratamiento de las enfermedades periodontales, usando el método de emulsificación y gelación ionotrópica y NaOH como agente gelificante. Con estas condiciones obtuvieron microesferas de $43 \pm 0.9 \mu\text{m}$, un rendimiento de eficiencia de incorporación del principio activo de $32.4 \pm 0.6\%$ y una liberación máxima en solución buffer fosfato (PBS) a pH 7.2 de 120 horas, concluyendo que la formulación desarrollada puede proponerse como un sistema de liberación prolongada para el suministro de ornidazol para un tratamiento local (Dias *et al.*, 2016)⁴⁷.

En 2017, Akyüz y colaboradores obtuvieron microesferas de quitosano de baja masa molecular con un diámetro de 5 a 10 μm conteniendo flurbiprofeno, un antiinflamatorio no esteroideo, mediante el método de secado por atomización en ausencia de agente reticulante. Determinaron una eficiencia de incorporación entre 63 y 81% y un tiempo de liberación del fármaco durante un período de 48 horas en solución buffer de fosfatos a pH 7.4. Concluyeron que la formulación desarrollada tiene potencial para el transporte de fármacos, entre ellos el flurbiprofeno, para el tratamiento de pacientes con artritis reumatoide (Akyüz *et al.*, 2017)⁴⁸.

En 2017, Sobhani y colaboradores desarrollaron y evaluaron la actividad antimicrobiana de nanopartículas a base quitosano de baja masa molecular por el método de gelación iónica, empleando tripolifosfato como agente reticulante, con lo que obtuvieron tamaños de alrededor de 72 nm de diámetro conteniendo clorhidrato de ciprofloxacino, así mismo, evaluaron el perfil de liberación, obteniendo tiempos prolongados de hasta 80 horas en condiciones de pH 7.4 en medio PBS. Demostraron que las nanopartículas de quitosano podrían potenciar la inhibición de microorganismos y ofrecer una liberación prolongada del fármaco (Sobhani *et al.*, 2017)⁴⁹.

En 2018, Helbling y colaboradores prepararon microesferas de quitosano conteniendo progesterona, empleando como agente reticulante TPP y Tween 80 para mejorar la redondez de partícula. Utilizaron el método de secado por atomización y obtuvieron una eficiencia de incorporación del 69 al 75%, con tamaños de partícula de 1 y 7 μm , en sus evaluaciones mantuvieron una liberación sostenida de hasta 5 a 8 días en medio a pH 7.4 (Helbling *et al.*, 2018)⁵⁰.

En 2018, Matshetshe y colaboradores desarrollaron nanopartículas a base de quitosano de mediana masa molecular, conteniendo aceite esencial de canela (*Cinnamomum zeylanicum*), un agente antibacterial para la aplicación en la mucosa ocular. En sus formulaciones obtuvieron una eficiencia de incorporación del $20.04 \pm 1.87\%$ y tamaños de partícula de 190 nm. La evaluación de la cinética, en solución buffer a pH 7 presentó una liberación prolongada hasta las 120 horas (Matshetshe *et al.*, 2018)⁵¹.

En 2019, Zang y colaboradores desarrollaron hidrogeles termosensibles a base de quitosano con un grado de desacetilación del 75 al 85%, conteniendo beta- glicerol fosfato y ornidazol como principio activo. En solución buffer a pH 7.4 observaron la liberación prolongada del fármaco en un tiempo máximo de 336 horas (Zang *et al.*, 2019)⁵².

En 2020, Yurtdas y colaboradores desarrollaron nanopartículas de quitosano conteniendo levocetirizina mediante el método de atomización, obteniendo una eficiencia de incorporación del $71.3\% \pm 1.32$ y tamaños de 538.4 ± 8.5 nm. En solución buffer a pH 6.8 observaron una liberación prolongada del fármaco hasta las 72 horas (Yurtdas *et al.*, 2020)⁵³.

2.1 JUSTIFICACIÓN

La prevalencia de infecciones odontogénicas en adultos es elevada, hasta 90% de dicha población presenta caries, 50% gingivitis y 30% periodontitis. El 10% de las prescripciones antibióticas están dirigidas al tratamiento de estas infecciones, siendo la amoxicilina el antibiótico más prescrito (Esparza *et al.*, 2020)¹⁰.

Debido a esto, y al incremento de la resistencia bacteriana a los antibióticos más usuales, la administración local de amoxicilina de liberación prolongada en la cavidad oral a partir de una matriz a base de quitosano representa una alternativa prometedora para el tratamiento de infecciones odontogénicas.

2.2 APORTACIÓN CIENTÍFICA

Obtención de microesferas a base de quitosano que permitan la liberación prolongada de amoxicilina en la cavidad oral, con el fin de reducir su absorción sistémica, mantener altas concentraciones en el sitio de acción, facilitar la adherencia terapéutica y contribuir a la reducción de la resistencia bacteriana.

2.3 HIPÓTESIS

La amoxicilina incorporada en una matriz biopolimérica a base de quitosano presentará una liberación prolongada al menos por 72 horas en medio saliva simulada.

2.4 OBJETIVO GENERAL

Desarrollar microesferas de quitosano conteniendo amoxicilina y evaluar su perfil de liberación en saliva simulada para su potencial aplicación en la cavidad oral.

2.4.1 Objetivos específicos

1. Obtener microesferas a base de quitosano utilizando diferentes condiciones de preparación.
2. Incorporar en las microesferas diferentes concentraciones de amoxicilina y evaluar la eficiencia de incorporación.
3. Caracterizar las microesferas mediante técnicas térmicas, espectrométricas y microscópicas.
4. Establecer y validar el método analítico para la cuantificación de amoxicilina.
5. Evaluar *in vitro* la cinética de liberación de amoxicilina a partir de los diferentes tipos de microesferas obtenidas.
6. Evaluar la conservación de la actividad del antibiótico, después de la preparación de las microesferas y la exposición a la prueba de liberación, mediante un ensayo antimicrobiano.

CAPÍTULO 3

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Materias primas

Excipientes

Quitosano de mediana masa molecular (75-85% desacetilado)

Proveedor: Sigma-Aldrich Lote: STBG8451

Tripolifosfato de sodio

Proveedor: Sigma-Aldrich Lote: 16529COV

Principio activo: amoxicilina (trihidrato)

Proveedor: Sigma-Aldrich Lote: 098M4779V

Fármaco de referencia: amoxicilina (trihidrato)

Proveedor: USP Lote: KOH332

3.2 Reactivos

Reactivos	Grado	Marca comercial
Ácido acético glacial CH_3COOH	ACS	EMSURE
Fosfato monobásico de potasio KH_2PO_4	ACS	JT BAKER
Acetonitrilo $\text{C}_2\text{H}_3\text{N}$	HPLC	JT BAKER
Metanol CH_4O	HPLC	JT BAKER
Hidróxido de sodio NaOH	ACS	JT BAKER

3.3 Equipos e instrumentos

Equipos	Ubicación
Difractómetro de Rayos X Bruker D2 Phaser	Laboratorio de Fotocatálisis DEP, FCQ
Microscopio electrónico de barrido JSM 670IF	Laboratorio de Microscopía, DEP, FCQ, UANL
Analizador térmico diferencial/termogravimétrico TA Instruments SDT 2960	Laboratorio de Materiales I, FCQ, UANL
Espectrómetro Infrarrojo Spectrum One Perkin Elmer FTIR	Laboratorio de Análisis Instrumental, FCQ, UANL
Agitador magnético Fisher Cientific Stirrer FB 15001	Facultad de Farmacia, UCM
BUCHI Mini Spray-dryer B-191	Facultad de Farmacia, UCM
Ultraturrax T25 homogenizer	Facultad de Farmacia, UCM
Sonicador Branson Analog Sonifier 250	Facultad de Farmacia, UCM
HPLC Perkin Elmer Series 200 System con detección UV-Vis	Laboratorio de Fotocatálisis DEP, FCQ
Analizador de tamaño de partícula Microtac S3500	Facultad de Farmacia, UCM
Liofilizador Telstar LyoQuest -55	Facultad de Farmacia, UCM
Espectrofotómetro UV-Vis Cary 50	Laboratorio de Biofarmacia, FCQ, UANL

3.4. Métodos

3.4.1 Análisis de caracterización de principio activo y excipientes

3.4.1.1 Análisis por espectroscopía Infrarroja (FTIR-ATR)

Se llevaron a cabo pruebas de compatibilidad entre el principio activo y los excipientes empleados en las formulaciones de las microesferas para determinar posibles interacciones entre ellos. Las pruebas se realizaron empleando espectroscopía de infrarrojo con transformada de Fourier por reflexión total atenuada (FTIR-ATR) para su evaluación en la región de 600 – 4000 cm^{-1} .

3.4.1.2 Análisis calorimétrico diferencial de barrido (DSC)

Se realizó el análisis térmico del principio activo, de los excipientes y de las microesferas obtenidas por el método de gelación iónica y secado por atomización. Para todas las muestras se pesaron cantidades de 10 mg, y se sometieron a calentamiento a una velocidad de 10 °C/min de 25 a 325 °C.

3.4.1.3 Difracción de Rayos X (DRX)

La cristalinidad de la amoxicilina, el quitosano y las microesferas obtenidas se realizó por difracción de rayos X en polvos. Los difractogramas se registraron en un rango de ángulos de 2θ de 0-70° en pasos de 0.05° con tiempos de 0.5 s. Las medidas se realizaron a temperatura ambiente utilizando radiación $K\alpha_1$ de Cu ($\lambda=1.5418 \text{ \AA}$).

3.5 Formulación de microesferas mediante diseño de experimentos Box Behnken

3.5.1 Diseño Box Behnken

Para la elaboración y optimización de las microesferas obtenidas por el método de gelación iónica se empleó un diseño de superficie de respuesta Box Behnken con la ayuda del Software Design Expert, utilizando un diseño factorial 3^3 .

Los factores evaluados fueron: tiempo de agitación, tipo de agitación (magnética, ultraturrax, sonicación) y la relación peso (mg) quitosano/TPP, obteniendo un total de 17 experimentos, los cuales se muestran en la tabla 4.

Tabla 4. Factores estudiados para la elaboración de microesferas por gelación iónica.

Experimento	Tiempo de agitación (min) /velocidad (rpm)	Tipo de agitación	Relación quitosano/ TPP (mg)
F1	60	Magnética	500/100
F2	180	Magnética	500/100
F3	1	Sonicación	500/100
F4	1	Sonicación	500/100
F5	2/13,500	Ultraturrax	430/170
F6	2/20,500	Ultraturrax	430/170
F7	2/13,500	Ultraturrax	550/50
F8	2/20,500	Ultraturrax	550/50
F9	120	Magnética	430/170
F10	120	Sonicación	430/170
F11	120	Magnética	550/50
F12	1	Sonicación	550/50
F13	2/9500	Ultraturrax	500/100
F14	2/9500	Ultraturrax	500/100
F15	2/9500	Ultraturrax	500/100
F16	2/9500	Ultraturrax	500/100
F17	2/9500	Ultraturrax	500/100

3.5.2 Evaluación de respuesta

Las variables respuesta fueron el tamaño de partícula, (%) porcentaje de rendimiento y (%) porcentaje de eficiencia de incorporación.

3.5.2.1 Tamaño de partícula

Se usó el equipo de dispersión de luz dinámica (DLS) Microtac S3500 para hallar el diámetro hidrodinámico y la distribución de tamaño por debajo del cual está el 10%, 50%, 90% y 100% de las microesferas, denominadas D_{10} , D_{50} , D_{90} y D_{100} respectivamente.

3.5.2.2 (%) Porcentaje de rendimiento

El % rendimiento fue calculado por la ecuación 1:

$$\% \text{ rendimiento} = \frac{\text{Peso final de las microesferas}}{\text{Peso inicial teórico}} \times 100 \text{ (Ec.1)}$$

3.5.2.3 (%) Porcentaje de eficiencia de incorporación de amoxicilina

Se utilizaron 100 mg de microesferas para la determinación del porcentaje de eficiencia de incorporación del principio activo, el cual se llevó a cabo por cromatografía líquida de alta resolución con detector UV-Vis a una longitud de onda de 230 nm, utilizando la ecuación 2:

$$\% \text{ de incorporación} = \frac{\text{mg de amoxicilina real incorporada}}{\text{mg de amoxicilina teórica incorporada}} \times 100 \text{ (Ec.2)}$$

3.6 Análisis estadístico

Se realizó el análisis estadístico de la respuesta y la evaluación fue realizada de acuerdo con el coeficiente de correlación (R^2), aplicando un análisis de varianza (ANOVA) considerando los coeficientes estadísticamente significativos ($p < 0.05$) y los diagramas de superficie de respuesta 3D.

3.7 Preparación de microesferas de quitosano

3.7.1 Método de obtención por gelación iónica

El método adoptado para la obtención de las microesferas de quitosano por gelación iónica fue realizado según lo reportado por Sobhani (Sobhani *et al.*, 2017)⁴⁹. El quitosano fue disuelto en una solución de ácido acético con una concentración del 1% v/v en agitación ultraturax a 13,500 rpm durante 3 minutos. Se prepararon 25 mL de solución de amoxicilina a concentración de 4 mg/mL, la cual fue incorporada manteniendo agitación magnética por 30 minutos a una velocidad de 1000 rpm.

Se prepararon 10 mL de solución de tripolifosfato de sodio al 1% p/v, la cual fue incorporada gota a gota, con la ayuda de una micropipeta de 100 μ L, a la solución de quitosano bajo agitación magnética a una velocidad de 1000 rpm, la cual se mantuvo durante 30 minutos. Finalmente, la suspensión fue centrifugada a 5000 rpm por 5 minutos, se eliminó el sobrenadante, se realizaron dos lavados con 10 mL de agua y el sedimento fue refrigerado a -55 $^{\circ}$ C para luego ser liofilizado.

3.7.2 Método de obtención por atomización

Para este método, 500 mg de quitosano fueron disueltos en 100 mL de ácido acético al 1%, la disolución se llevó a cabo en agitación por equipo ultraturrax a 13,500 rpm por 3 min. Posteriormente se añadieron 25 mL de solución de amoxicilina a concentración de 4 mg/mL y se mantuvo durante 30 minutos en agitación magnética a 1000 rpm, finalmente se llevó a sonicación durante 2 minutos. Esta mezcla fármaco-polímero se llevó al equipo de secado BUCHI Mini Spray-dryer B-191 (figura 9) con las siguientes condiciones: temperatura de entrada 110 $^{\circ}$ C y de salida 50 $^{\circ}$ C, velocidad de alimentación de 20 mL/min y tasa de aspiración de N_2 de 52 m^3/h (100%).



Figura 9. BUCHI Mini Spray-dryer B-191.

3.8 Morfología por microscopía electrónica de barrido (SEM)

La morfología de las microesferas obtenidas por ambos métodos se determinó por microscopía electrónica de barrido a un aumento de 5000x.

3.9 Validación del método analítico para la cuantificación de amoxicilina

El método analítico se validó en un rango de concentración de 2.5 a 160 µg/mL, según los criterios establecidos en la Norma Oficial Mexicana NOM-177-SSA1-2013. Para la determinación de la longitud de onda máxima de la amoxicilina en solución buffer de fosfatos pH 6.75, se realizó el espectro de absorción UV-Vis mediante un barrido de 200 a 380 nm.

3.9.1 Condiciones cromatográficas

Se empleó como fase móvil una mezcla de buffer de fosfatos:acetonitrilo (1:24) y se ajustó a pH 5 ± 0.1 con hidróxido de sodio 0.2 M, la fase móvil se preparó de acuerdo con lo especificado en la USP 41-NF 36⁵⁴. Los ensayos cromatográficos se realizaron empleando:

- Columna Hyperclone C-18 (250 x 4,6 mm) 5µm
- Flujo 1 mL/min
- Detector UV-Vis 230 nm
- Vol. de inyección 20 µL
- Tiempo 5 min

Los parámetros evaluados fueron los siguientes: linealidad y precisión del sistema y del método, exactitud, precisión como repetibilidad y reproducibilidad, estabilidad y selectividad.

3.9.2 Validación del sistema

3.9.2.1 Linealidad

Para la preparación de la solución de referencia se procedió a pesar 25 mg del estándar de referencia de amoxicilina y se colocaron en un matraz volumétrico de 25 mL, el cual se aforó con agua desionizada. Esta solución tenía una concentración de 1 mg/mL. A partir de la solución de referencia se prepararon por duplicado curvas de calibración de siete concentraciones de amoxicilina, la cuales fueron 2.5, 5, 10, 20, 40, 80 y 160 µg/mL.

Finalmente se procedió a realizar la medición por cromatografía de líquidos de alta resolución con detector de UV-Vis a una longitud de onda de 230 nm.

3.9.2.2 Precisión

Se calculó el coeficiente de variación (CV) del factor de respuesta en cada punto de concentración a partir de los datos obtenidos en linealidad.

3.9.3 Validación del método

3.9.3.1 Linealidad

Se determinó mediante la preparación de tres curvas de calibración construidas con siete concentraciones empleando la técnica de estándar adicionado.

Para la preparación de la solución problema se pesó una cantidad equivalente a 25 mg de amoxicilina y se colocaron en un matraz volumétrico de 25 mL, posteriormente se adicionó solución buffer de fosfatos pH 6.75, se sometió a sonicación por 10 minutos, y se aforó para obtener una concentración final de 1 mg/mL.

Las soluciones de trabajo se prepararon por duplicado, se realizaron diluciones a concentraciones de 2.5, 5, 10, 20, 40, 80, 160 $\mu\text{g/mL}$ del principio activo. Finalmente se procedió a lectura mediante cromatografía líquida de alta resolución con detector UV-Vis a una longitud de onda de 230 nm.

3.9.3.2 Exactitud

Se realizó empleando los datos obtenidos en la determinación de linealidad del método. Se calcularon los porcentajes recuperados, el promedio y la variación en porcentaje respecto a la cantidad nominal para cada nivel de concentración.

3.9.3.3 Precisión

La evaluación de la precisión del método se llevó a cabo mediante la determinación de la repetibilidad y la reproducibilidad del método.

3.9.3.3.1 Repetibilidad y reproducibilidad

Para analizar la precisión del método analítico se procedió a evaluar la variabilidad inter-día en un análisis por triplicado. Se preparó una solución de referencia a una concentración de 80 µg/mL. Finalmente, se realizó la lectura en un HPLC con detector UV-Vis a una longitud de onda de 230 nm.

Se evaluó el efecto de la variabilidad en la precisión del método analítico, por lo que la determinación fue dividida en día 1 y día 2. Se calcularon los promedios, desviación estándar y coeficientes de variación de cada día de prueba, así como el coeficiente de variación global.

3.9.3.4 Selectividad

Para comprobar que las señales propias de la matriz no presenten interferencia con la señal del principio activo se analizaron las microesferas mediante HPLC. La identificación de los compuestos en las muestras se realizó utilizando los tiempos de retención de los respectivos estándares.

3.9.3.5 Estabilidad

Se analizaron por separado la solución de referencia y la muestra problema, realizando un barrido de 200 a 380 nm en el espectrofotómetro UV-Vis en intervalos de tiempo de 24, 48 y 72 horas. La superposición de los barridos UV-Vis sugieren que el fármaco es estable durante 72 horas.

3.10 Perfiles de liberación *in vitro*

La metodología fue adaptada de acuerdo con lo reportado por Kilicarslan (Kilicarslan *et al.*, 2014)⁴⁵. En cada análisis se empleó una cantidad de 30 mg de microesferas, las cuales se colocaron en una membrana de diálisis de celulosa con dimensiones de 34 x 22 mm (12.4 kDa), conteniendo 10 mL de solución buffer de fosfatos, la cual fue sellada herméticamente con el uso de pinzas.

La membrana sellada se colocó en un vaso de precipitado de 100 mL y se adicionaron 50 mL de solución buffer de fosfatos. El vaso de precipitado fue cubierto con papel parafilm y sometido a agitación magnética manteniendo una temperatura de 37 °C.

3.10.1 Preparación del medio de disolución

El volumen total preparado fue de 500 mL de solución buffer de fosfatos pH 6.75 \pm 0.05. El buffer se preparó de acuerdo con las especificaciones de la Farmacopea de Estados Unidos (USP 37)⁵⁴ como se describe a continuación.

En un matraz volumétrico de 500 mL se mezclaron 125 mL de una solución de fosfato de potasio monobásico 0.2 M con 56 mL de solución de hidróxido de sodio 0.2 M y se llevó a volumen con agua desionizada.

Este medio de solución se filtró y se desgasificó en un equipo de ultrasonido durante 30 minutos, esto con el objetivo de eliminar las interferencias por gases disueltos. Finalmente se filtró utilizando una membrana de nylon 0.45 μ m.

3.10.2 Muestreo y análisis

Una cantidad de 30 mg de microesferas fue suspendida en 10 mL de solución dentro de una membrana de diálisis sellada, la cual se pasó a un vaso de precipitado de 100 mL conteniendo 50 mL de solución buffer.

El muestreo se realizó a las 0.5, 1, 2, 4, 6, 9, 12, 16, 20, 24, 36, 48, 60, 72, 80, 84 y 90 horas, tomando alícuotas de 3 mL del vaso de precipitado, se realizó la reposición del medio con solución buffer de fosfatos para mantener el volumen total.

El análisis de cuantificación se llevó a cabo por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) Perkin Elmer Series 200 System con detector UV-Vis (figura 10) a una longitud de onda de 230 nm.



Figura 10. HPLC Perkin Elmer Series 200 System con detector UV-Vis.

3.11 Ensayo antimicrobiano (difusión en agar)

La sensibilidad bacteriana de los antimicrobianos se puede determinar mediante diferentes métodos. Siendo el método estándar el de difusión en agar sobre cajas Petri o antibiograma para bacterias de crecimiento aeróbico, el cual puede realizarse utilizando cepas ATCC (del inglés American Type Culture Collection).

Para confirmar la liberación y la estabilidad de la amoxicilina, se evaluó la actividad antibacteriana de las diferentes microesferas obtenidas. Las microesferas fueron evaluadas en contra de *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) y *Enterococcus faecalis* (ATCC 19433).

El ensayo se llevó a cabo de acuerdo con las guías del CLSI (del inglés Clinical and Laboratory Standards Institute)⁵⁵ utilizando placas de agar Müeller-Hinton inoculadas con una suspensión equivalente a la escala de 0.5 McFarland.

Se pesaron 1.5 mg de microesferas y se suspendieron en 25 mL de solución salina, esto para tener una concentración de microesferas de 60 $\mu\text{g/mL}$, equivalente a 8 $\mu\text{g/mL}$ de amoxicilina, con el fin de igualar la CMI (Concentración Mínima Inhibitoria) reportada (CLSI, 2018)⁵⁵, se agitó en vórtex y se agregó 1 mL en el penicilindro. Las placas se incubaron a 37 °C durante 72 horas, finalmente se midieron los diámetros de la zona de inhibición.

CAPÍTULO 4

RESULTADOS Y DISCUSIONES

4.1 Análisis de caracterización de principio activo y excipientes

4.1.1 Espectrofotometría IR

En la figura 11 se observa el espectro (A) del tripolifosfato, en donde se muestran bandas características, siendo la de 1138 cm^{-1} que corresponden al grupo P=O (estiramiento) y a 887 cm^{-1} debido al estiramiento asimétrico P-O-P. Estos resultados concuerdan por lo reportado por Samrot y colaboradores, quienes desarrollaron micropartículas a base de quitosano, carboximetilcelulosa y TPP conteniendo curcumina para su liberación sostenida (Samrot *et al.*, 2016)⁵⁶.

El espectro del quitosano (B) mostró una banda característica a 3298 cm^{-1} correspondiente a las vibraciones de estiramiento del enlace O-H y N-H, lo cual coincide con el rango reportado por Fernandes y colaboradores ($3291\text{--}3361\text{ cm}^{-1}$) para el estiramiento de ambos enlaces que forman puentes de hidrógeno intramoleculares (Fernandes *et al.*, 2015)⁵⁷. Además, se observa una banda a 2925 cm^{-1} , que corresponde a la vibración de estiramiento simétrico C-H y otra a 1654 cm^{-1} debida a la vibración de tensión del C=O de la amida, adicionalmente, a un valor de 1560 cm^{-1} se muestra la señal correspondiente a la vibración de flexión del enlace N-H y la banda de estiramiento simétrico del enlace C-O que aparece a 1024 cm^{-1} .

Estos resultados concuerdan con lo reportado por Kumar y colaboradores, quienes desarrollaron perlas de bionanocompuestos a base de quitosano y óxido de grafeno para la liberación prolongada de metronidazol (Kumar *et al.*, 2021)⁵⁸.

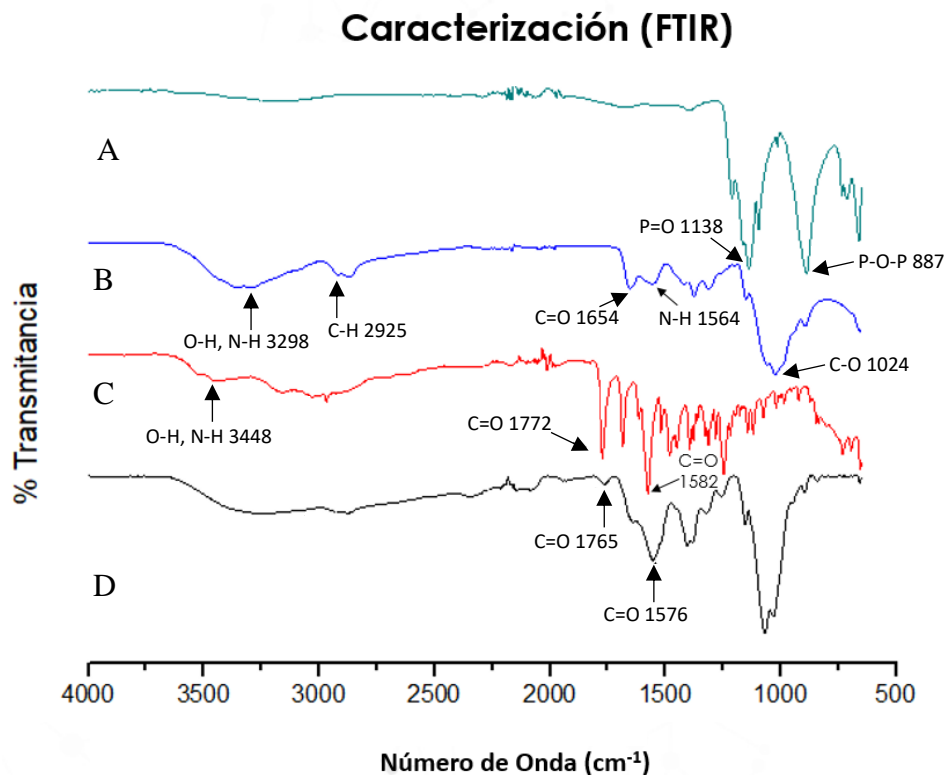


Figura 11. Espectro FTIR para (A) tripolifosfato, (B) quitosano, (C) amoxicilina y (D) microesferas conteniendo amoxicilina.

El espectro de la amoxicilina (C) mostró una banda a 3448 cm^{-1} correspondiente a las vibraciones de estiramiento del enlace O-H y del N-H, a 1772 cm^{-1} se observa la señal propia de la vibración de tensión del enlace C=O del grupo amida (β -lactama) y a 1582 cm^{-1} la vibración de tensión asimétrica del carboxilo, estos resultados coinciden con lo reportado por Maswadeh, quien estudió la compatibilidad de la amoxicilina en combinación con otros antibióticos y con paracetamol, encontrando que la posición de las bandas de sus grupos funcionales se conserva (Maswadeh, 2017)⁵⁹.

En el espectro (D) de las microesferas obtenidas mediante secado por atomización conteniendo amoxicilina, se conservan las bandas características del principio activo, a 1765 cm^{-1} la vibración de tensión C=O del grupo amida (β -lactama) con cierta ampliación de la banda y reducción de su intensidad, debido a la presencia del biopolímero, que forma puentes de hidrógeno, mientras que a 1576 cm^{-1} se observa la señal correspondiente a la vibración asimétrica del carboxilo.

Trabajos realizados por Songsurang y colaboradores, quienes formularon tabletas de amoxicilina de liberación sostenida, corroboraron nula interacción entre la amoxicilina y algunos excipientes, entre ellos el quitosano, mostrada a través de la conservación de las bandas características de los grupos carbonilo del principio activo, tanto la de 1765 cm^{-1} (del grupo β -lactama), como la de 1576 (del grupo carboxilo) (Songsurang *et al.*, 2011)⁶⁰.

4.1.2 Difracción de Rayos X (DRX)

En la figura 12 se presenta el difractograma propio de la amoxicilina pura, mostrando reflexiones características debido a su estado cristalino ortorrómbico, siendo las señales más intensas las que se observan a valores de 2θ de 12.1° , 17.9° , 19.2° , 26.6° y 28.6° , las cuales concuerdan con lo reportado por Güncüm y colaboradores, quienes formularon nanopartículas de amoxicilina contenidas en un copolímero de alcohol polivinílico y alginato de sodio (Güncüm *et al.*, 2018)⁶¹.

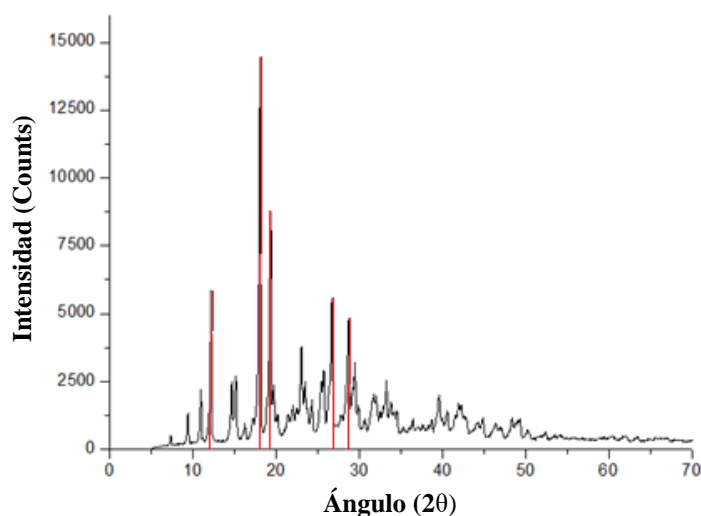


Figura 12. Difractograma de la amoxicilina.

En la figura 13 se observa el patrón de rayos X del polvo de quitosano, el cual muestra dos reflexiones características ubicadas en 2θ de 10° y 20° , que son indicativas de un alto grado de cristalinidad, lo cual concuerda con lo reportado por Vijayalakshmi y colaboradores, quienes formularon biopelículas a base de quitosano, alginato de sodio, celulosa y TPP con potencial antimicrobiano, atribuyendo la alta cristalinidad a la presencia de grupos $-\text{OH}$ y $-\text{NH}_2$ en la estructura del quitosano, debido a la formación de puentes de hidrógeno inter e intramoleculares (Vijayalakshmi *et al.*, 2016)⁶².

La disminución de la cristalinidad en la formulación quitosano/TPP indica el entrecruzamiento entre el polímero y el agente reticulante, debido a la formación de puentes de hidrógeno entre el grupo amino del quitosano y los átomos de oxígeno del grupo fosfato, así como la disminución de puentes de hidrógeno entre los grupos funcionales de la molécula del quitosano. Con lo anterior, se pone en evidencia que la cristalinidad del quitosano disminuye después de la reticulación con tripolifosfato, dando como resultado la formación de una estructura amorfa (Vijayalakshmi *et al.*, 2016)⁶².

Las microesferas presentaron reducción de las reflexiones características de sus componentes, lo cual se atribuye a la reducción de su cristalinidad debido a la presencia de la mezcla, sin embargo, se observa, aunque con baja intensidad, una de las reflexiones características de la amoxicilina, ubicada en 2θ de 26.6° (Güncüm *et al.*, 2018)⁶¹, con lo que se pone en evidencia la presencia del principio activo, esta disminución de cristalinidad fue observada por Narkar y colaboradores, quienes formularon perlas a base de quitosano y cloruro de calcio para la liberación sostenida de amoxicilina (Narkar *et al.*, 2010)⁶³.

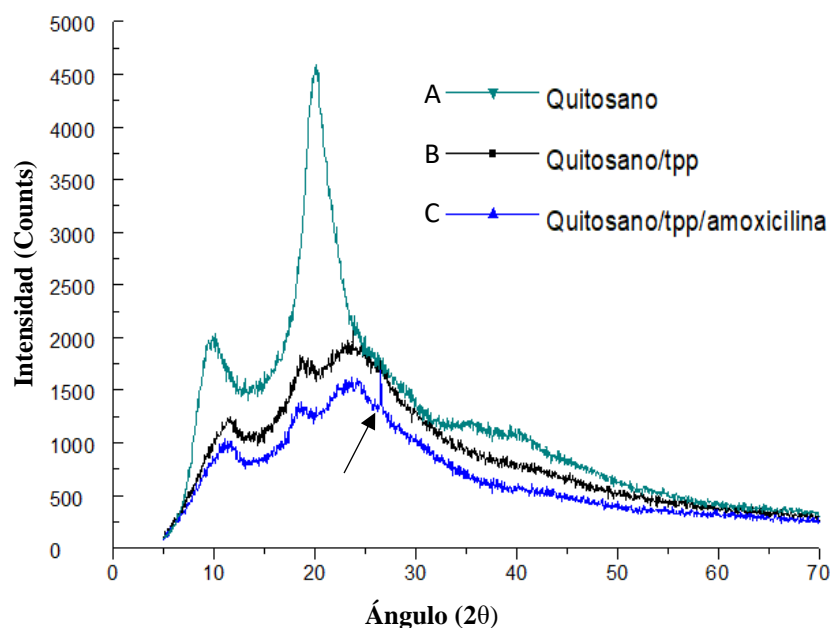


Figura 13. Difractograma de (A) quitosano, (B) quitosano-TPP y (C) microesferas quitosano-TPP-amoxicilina.

4.1.3 Análisis calorimétrico diferencial de barrido (DSC)

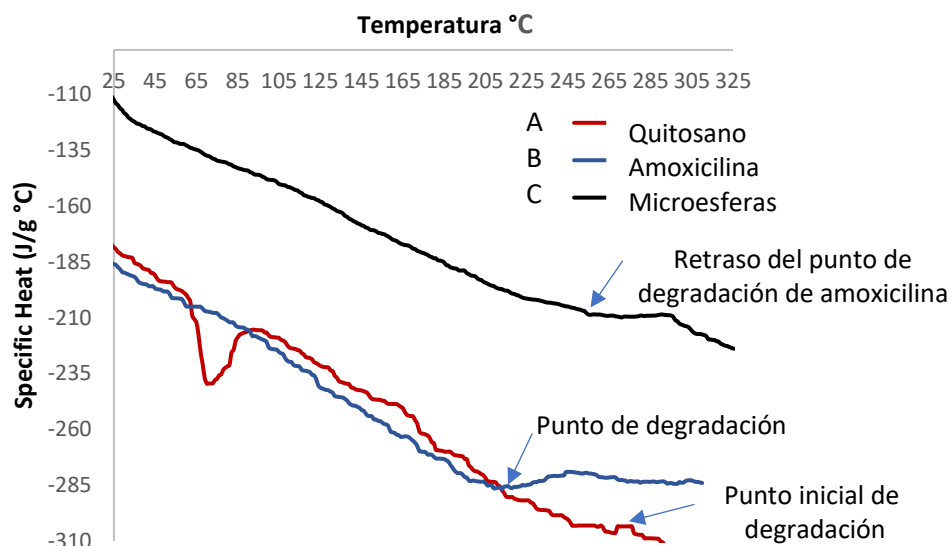


Figura 14. Análisis térmico de (A) quitosano, (B) amoxicilina y (C) microesferas conteniendo amoxicilina.

El comportamiento térmico del quitosano, la amoxicilina y las microesferas obtenidas por ambos métodos se muestran en la figura 14. El termograma (A) del quitosano muestra un pico endotérmico entre 68 °C y 92 °C, que corresponde a la deshidratación del polímero y un pico exotérmico, aproximadamente a 270 °C, atribuido a su punto inicial de degradación (Acosta *et al.*, 2020)⁶⁴. El termograma (B) propio de la amoxicilina muestra un pico exotérmico a 222 °C, correspondiente a su punto de degradación (Maswadeh, 2017)⁵⁹. El termograma (C) de las microesferas de quitosano que contienen amoxicilina muestran un retraso en el inicio de la degradación del fármaco, el cual inició aproximadamente a 258 °C.

Este resultado indica un efecto protector del quitosano sobre la amoxicilina, retrasando la degradación térmica y extendiendo su estabilidad después de la incorporación en la matriz. El efecto protector térmico del quitosano ha sido observado en la encapsulación de fármacos como lo reporta Helbling y colaboradores, quienes desarrollaron micropartículas a base de quitosano para la liberación sostenida de ceftiofur (Helbling *et al.*, 2020)⁶⁵.

4.2 Optimización de las formulaciones para el método gelación iónica

Se elaboraron microesferas a base de quitosano conteniendo 100 mg de amoxicilina con un peso total de 700 mg, tanto por el método de gelación iónica, como por el método de secado por atomización. Así mismo se elaboraron microesferas a base de quitosano mediante la técnica de secado por atomización.

En la tabla 5 se muestran los resultados de los 17 experimentos (E) realizados variando los factores (F) y evaluando las respuestas (R).

Tabla 5. Factores y respuestas evaluadas.

E	F 1 Tipo de agitación	F 2 Tiempo de agitación (min) /velocidad (rpm)	F 3 Quitosano /TPP (mg)	R 1 % de Eficiencia de incorporación	R2 % de Rendimiento	R 3 Tamaño de microesfera (μm) / D50)
1	Magnética	60/1200	500/100	63.1	78.6	76.7
2	Magnética	180/1200	500/100	70.0	80.0	76.6
3	Sonicación	0.5 min	500/100	79.2	80.8	316.0
4	Sonicación	0.5 min	500/100	77.9	81.2	565.5
5	Ultraturrax	1/13500	430/170	88.1	92.9	91.4
6	Ultraturrax	1/20300	430/170	89.5	94.1	146.4
7	Ultraturrax	1/13500	550/50	63.0	41.4	416.0
8	Ultraturrax	1/20300	550/50	63.0	42.9	87.7
9	Magnética	1/1200	430/170	86.4	91.9	655.0
10	Sonicación	0.5 min	430/170	87.1	92.4	204.4
11	Magnética	120/1200	550/50	63.7	40.0	437.2
12	Sonicación	1/9500	550/50	62.3	40.4	560.4
13	Ultraturrax	1/9500	500/100	75.4	79.3	10.1
14	Ultraturrax	1/9500	500/100	74.8	80.0	32.2
15	Ultraturrax	1/9500	500/100	71.9	79.8	15.1
16	Ultraturrax	1/9500	500/100	76.1	79.2	8.0
17	Ultraturrax	1/9500	500/100	74.5	78.9	25.9

4.2.1 Análisis de superficie de respuesta 3D

Los resultados de las respuestas que evalúan el efecto del tipo y tiempo de agitación (A), la proporción de quitosano/TPP y el tiempo de agitación (B) y el tipo de agitación y la proporción quitosano/TPP (C) fueron analizados considerando el análisis

de varianza (ANOVA) ($p < 0,05$), presentando un adecuado coeficiente de correlación ($R^2 = 0.98$).

Los valores p y las respuestas: porcentaje de rendimiento, porcentaje de eficiencia de incorporación de amoxicilina y tamaño de partícula, se muestran en las figuras 15, 16 y 17 respectivamente.

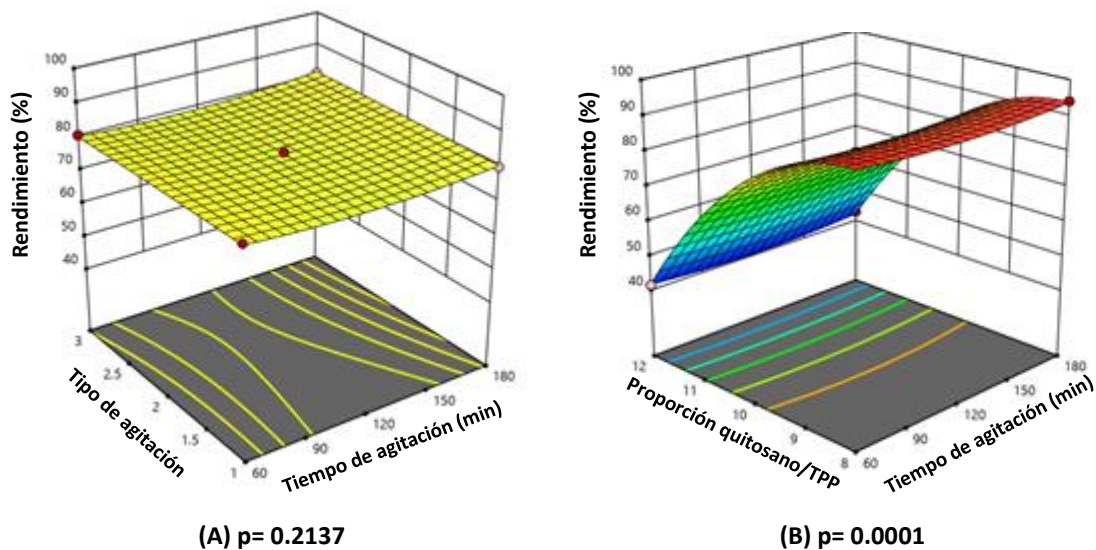


Figura 15. Análisis de superficie de respuesta del rendimiento.

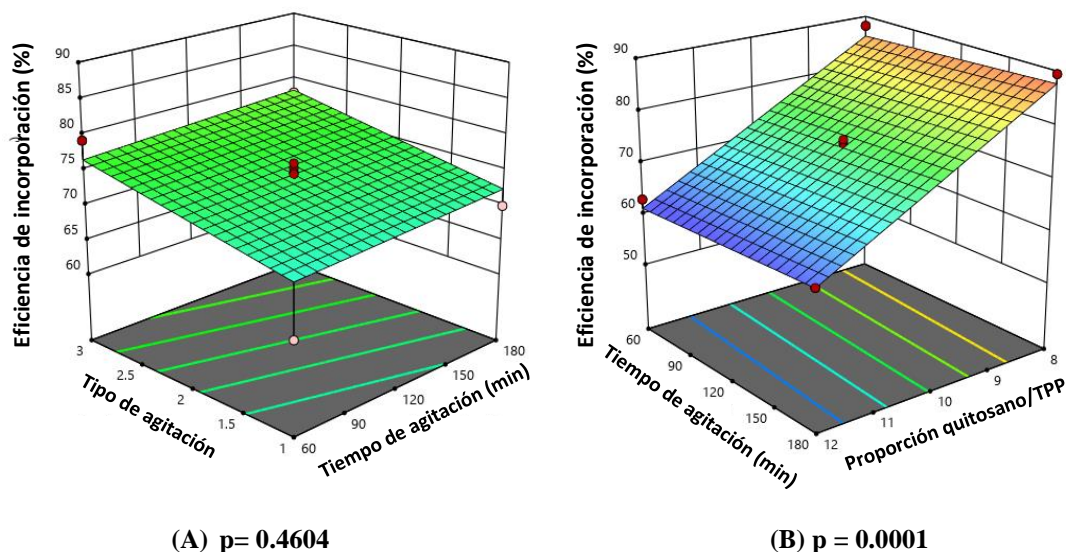


Figura 16. Análisis de superficie de respuesta de la eficiencia de incorporación.

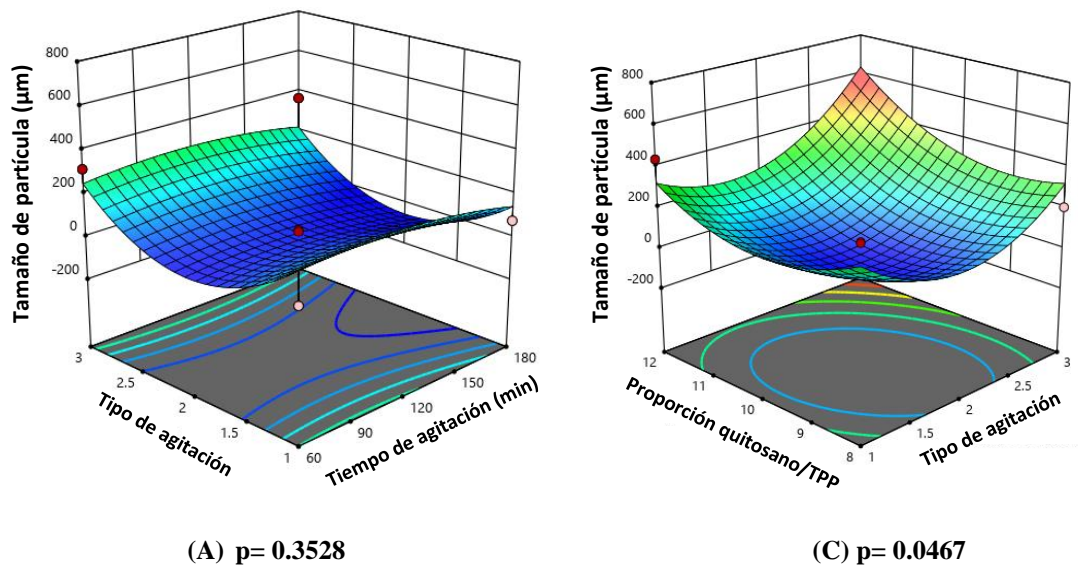


Figura 17. Análisis de superficie de respuesta del tamaño de partícula.

Se pudo observar que tanto el tipo como el tiempo de agitación no tuvieron un efecto significativo en el rendimiento, la eficiencia de incorporación, ni en el tamaño de partícula.

Se observó que la proporción de quitosano y tripolifosfato tiene un efecto significativo en las tres respuestas analizadas: rendimiento, eficiencia de incorporación y tamaño de partícula, encontrando que al utilizar la mayor cantidad de TPP (170 mg) se logró mejorar las respuestas.

Con estos resultados y con la ayuda del software Desing Expert se estandarizó el proceso de formulación mediante el método de gelación iónica, en donde se determinó que las condiciones óptimas fueron agitación ultraturrax a 13,500 rpm por 3 minutos y la proporción de 430/170 mg quitosano/TPP.

Las microesferas obtenidas por gelación iónica a las condiciones óptimas (M5) presentaron un 92.4% de rendimiento, 90.5% de eficiencia de incorporación y un rango de distribución de tamaño de 19.8 a 64.4 μm , las distribuciones D_{10} , D_{50} , D_{90} y D_{100} (μm) obtenidas se muestran en la figura 18.

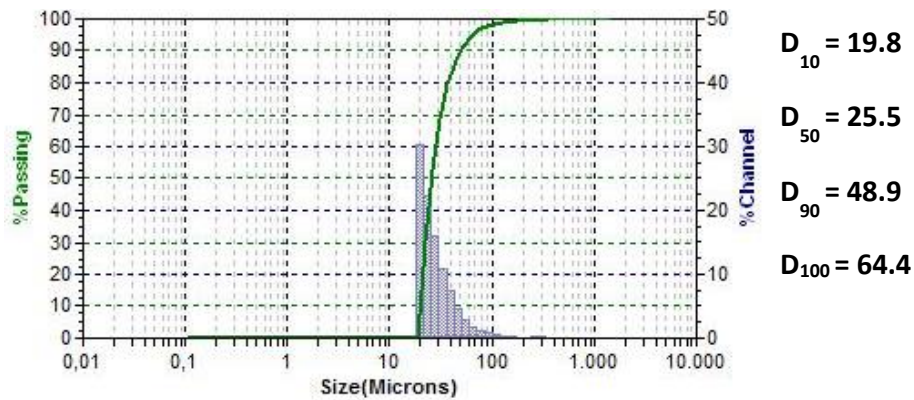


Figura 18. Distribución de tamaño de microesferas obtenidas por gelación iónica.

El TPP, al ser un compuesto aniónico, establece interacciones iónicas con la amoxicilina y el quitosano, ayudando a incorporar más principio activo y proporcionando mayor capacidad de aglomeración del polímero, lo que repercute en el tamaño de la microesfera y la cantidad de producto obtenido, estos resultados coinciden con lo reportado por Shi y colaboradores, quienes formularon nanopartículas a base de quitosano para la liberación sostenida de ácido acetilsalicílico, evaluando el efecto de la concentración de TPP en sus formulaciones (Shi *et al.*, 2014)⁶⁶.

4.3 Microesferas obtenidas mediante secado por atomización

Las microesferas obtenidas mediante secado por atomización presentaron un 27% de rendimiento, un valor bajo comparado con el obtenido por el método de gelación iónica, esto se atribuye a dos factores, los cuales fueron el uso de cantidades totales bajas de principio activo y excipiente (700 mg) en la formulación y la proporción que queda adherida en el ciclón del equipo (figura 19), debido a la baja temperatura de transición vítrea del quitosano (61 °C) (Ergin *et al.*, 2019)⁶⁷, la cual es muy cercana a la temperatura de salida en el proceso de atomización (50 °C), favoreciendo el cambio de estado físico de cristalino a uno más blando o gomoso. Una revisión realizada por Lechanteur y colaboradores, muestra el efecto de la baja temperatura de transición vítrea de otros azúcares como la glucosa y galactosa, en las conclusiones se establece que al obtener partículas mediante el método de secado por atomización, su baja temperatura de transición vítrea favorece un estado gomoso, adhiriéndose en las paredes y dificultando el flujo dentro del equipo (Lechanteur *et al.*, 2020)⁶⁸.



Figura 19. Microesferas adheridas en la paredes de ciclón del equipo Mini Spray-dryer.

Las microesferas obtenidas mediante secado por atomización presentaron un 96.9% de eficiencia de incorporación y una distribución de tamaño de 8.9 a 44.5 μ m, las distribuciones D_{10} , D_{50} , D_{90} y D_{100} (μ m) obtenidas se muestran en la figura 20.

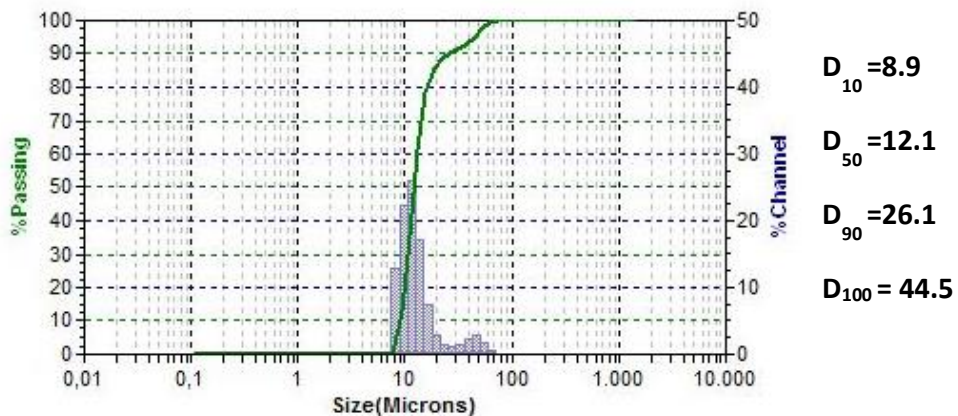


Figura 20. Distribución de tamaño de microesferas obtenidas por secado por atomización.

Cada uno de los métodos de obtención de las microesferas presenta un patrón característico, siendo las obtenidas mediante secado por atomización las que presentaron un menor tamaño, así como una mayor uniformidad, las cuales son características propias de este método (Al-Zoubi *et al.*, 2021)³⁶

4.4 Morfología por microscopía electrónica de barrido (SEM)

La morfología de las microesferas fue determinada por microscopía electrónica de barrido con aumento de 5000x. Se evaluaron tres tipos de muestras, (quitosano, microesferas obtenidas por gelación iónica y las obtenidas por atomización), las cuales se muestran en la figura 21.

El quitosano presentó una forma irregular y tamaño heterogéneo, la cual es una característica común entre la quitina y el quitosano. Estos resultados coinciden con lo reportado por de la Paz y colaboradores, quienes obtuvieron quitosano derivado de quitina de langosta, y describieron este polímero con estructura porosa y con regiones cristalinas y amorfas (de la Paz *et al.*, 2012)⁶⁹.

Las microesferas obtenidas por gelación iónica muestran una forma irregular, además se observa que se agrupan en aglomerados, presentando una morfología semi redonda. Trabajos realizados por Mudassir y colaboradores, quienes formularon micropartículas a base de quitosano y TPP para la liberación sostenida de hidroclorotiazida, observaron esta aglomeración atribuyendo el efecto a las fuerzas intermoleculares (puentes de hidrógeno) entre el quitosano y el principio activo (Mudassir *et al.*, 2020)⁷⁰.

Los resultados de microscopía electrónica de barrido muestran que las microesferas obtenidas por secado por atomización presentan una forma esférica con una superficie rugosa sobre depresiones marcadas, esta morfología coincide con lo reportado por Wang-Zhan y colaboradores, quienes obtuvieron microesferas a base de quitosano para la liberación sostenida de benzidamina, describiendo dicha morfología como “pelotas de golf” con superficies rugosas (Wang-Zhan *et al.*, 2017)⁷¹. Además, la presencia de poros y de superficies rugosas se debe a la evaporación del solvente como se establece en la literatura, esta morfología puede presentarse cuando se utilizan altas temperaturas de entrada, lo que induce una tasa de evaporación del solvente más rápida, obteniéndose microesferas con estas características (Lechanteur *et al.*, 2020)⁶⁸.

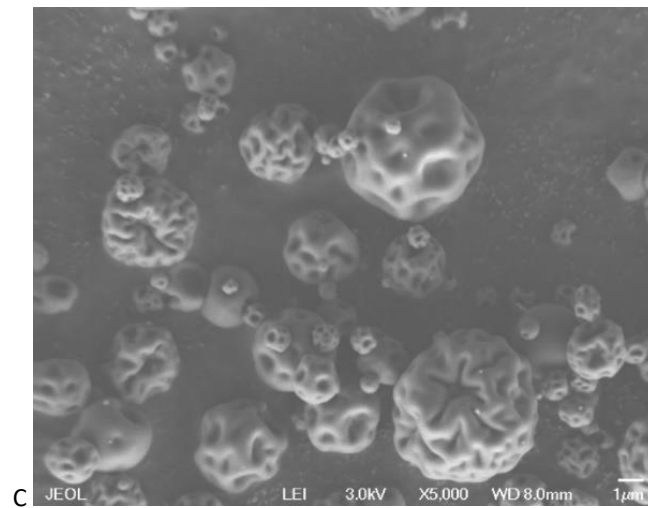
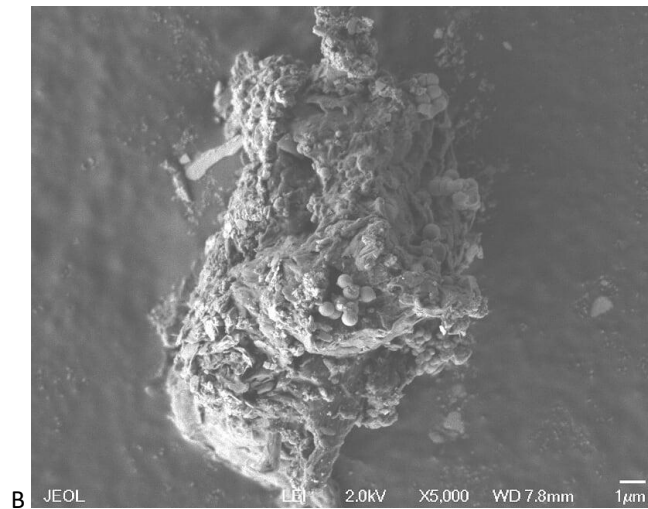
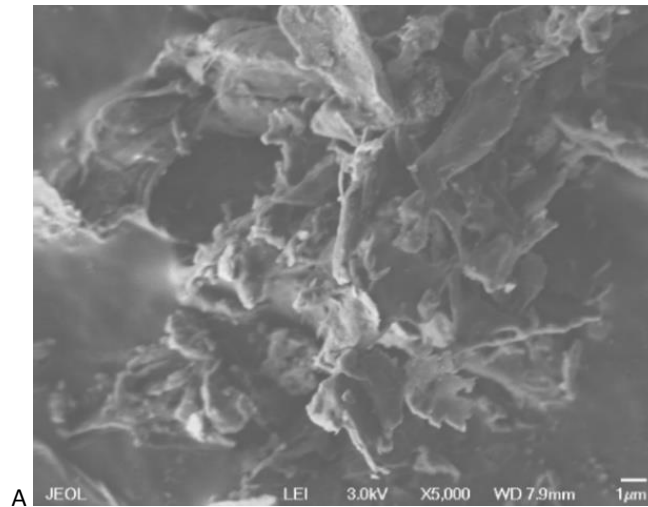


Figura 21. Micrografías SEM de (A) quitosano, (B) microesferas obtenidas por gelación iónica y (C) microesferas obtenidas mediante secado por atomización.

4.5 Validación del método analítico para la cuantificación de amoxicilina

La validación del sistema y del método analítico para la cuantificación de la amoxicilina se realizó conforme a lo establecido en la Norma Oficial Mexicana NOM177-SSA1-2013.

El rango de concentraciones de amoxicilina que se emplearon para el desarrollo de la validación del método analítico fue desde 2.5 hasta 160 $\mu\text{g/mL}$, la longitud de onda para el análisis se determinó mediante un barrido espectral de 200 a 380 nm de la solución de referencia, en el cual se observa la longitud de onda máxima a 230 nm como se muestra en la figura 22.

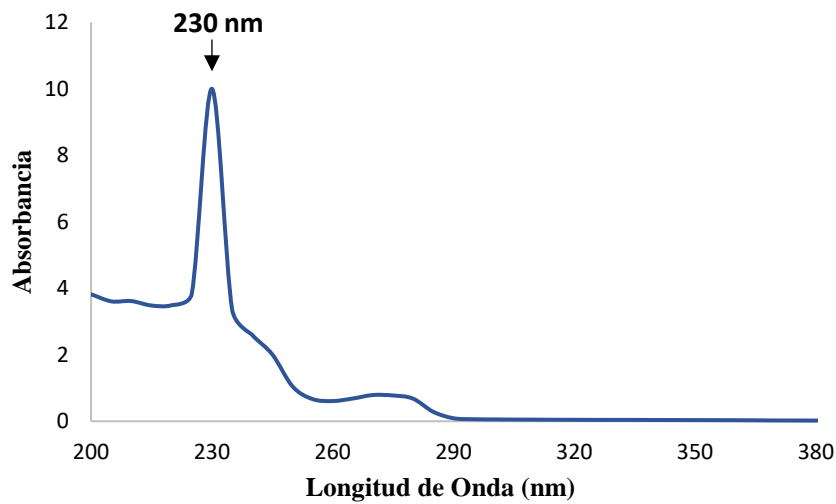


Figura 22. Espectro de absorción ultravioleta de amoxicilina en solución buffer de fosfatos pH 6.75.

4.5.1 Validación del sistema

4.5.1.1 Linealidad

En la figura 23 se muestra la gráfica correspondiente a la curva de la regresión ajustada para la linealidad del sistema, la ecuación de la recta y el coeficiente de regresión.

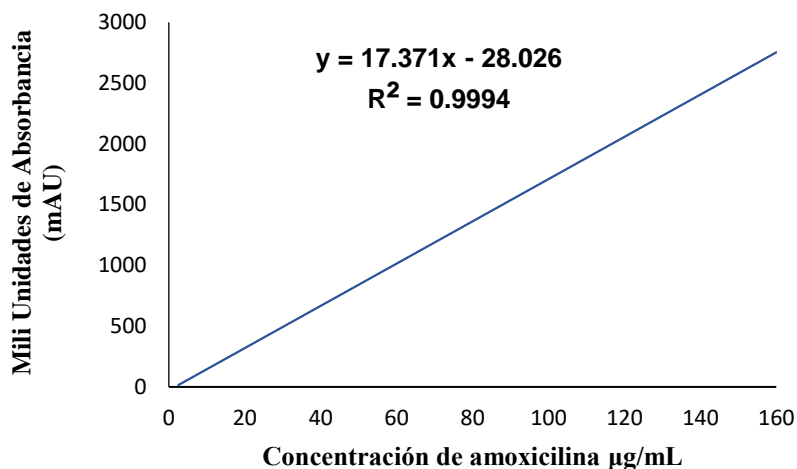


Figura 23. Curva de regresión ajustada para la linealidad del sistema.

A partir de los datos obtenidos en la curva anterior, se realizaron los cálculos para la obtención de los datos estadísticos que se muestran en la tabla 6.

Tabla 6. Resumen de análisis de linealidad del sistema.

Dato estadístico	Resultado	Criterio de aceptación NOM-177-SSA1-2013	Resultado
Coefficiente de regresión (R^2)	0.999	≥ 0.99	Cumple
Error relativo debido a la regresión	0.05%	$\leq 2\%$	Cumple
Coefficiente de variación (%)	0.81%	$\leq 2\%$	Cumple

4.5.1.2 Precisión

La tabla 7 presenta las miliunidades de absorbancias (mAU) obtenidas de la curva de calibración mediante cromatografía líquida con detector UV-Vis a 230 nm. Se calculó el factor de respuesta para cada nivel de concentración, para esta determinación se emplearon los datos obtenidos para la linealidad del sistema.

Tabla 7. Análisis de precisión del sistema.

Concentración de amoxicilina $\mu\text{g/mL}$ (x)	Absorbancia (y)	Factor de respuesta (f)
2.5	34	13.6
2.5	35	14.0
5	74	14.8
5	73	14.4
10	151	15.1
10	151	15.1
20	307	15.3
20	307	15.3
40	616	15.4
40	618	15.4
80	1383	17.3
80	1381	17.3
160	2755	17.2
160	2753	17.2

Posteriormente se realizaron los cálculos pertinentes para la obtención de los datos estadísticos. En la tabla 8 se muestra el resumen del análisis de precisión del sistema. Se observa como la precisión del sistema cumple con el criterio de aceptación de acuerdo con la NOM-177-SSA1-2013.

Tabla 8. Resumen de análisis de precisión del sistema.

Dato estadístico	Resultado	Criterio de aceptación NOM-177-SSA1-2013	Resultado
CV del factor de respuesta (%)	1.2%	$\leq 2\%$	Cumple

4.5.2 Validación del método

4.5.2.1 Linealidad

En la tabla 9 se muestran las concentraciones utilizadas para la curva de calibración obtenida por triplicado, de igual manera las absorbancias obtenidas por cromatografía líquida de alta resolución con detector UV-Vis a 230 nm.

Tabla 9. Análisis de linealidad del método.

Concentración de amoxicilina $\mu\text{g/mL}$ (x)	Absorbancia (y)	Factor de respuesta (f)
2.5	34	13.6
2.5	35	14.0
2.5	34	13.6
5	74	14.8
5	74	14.8
5	74	14.8
10	152	15.2
10	151	15.1
10	151	15.1
20	307	15.4
20	307	15.3
20	306	15.3
40	616	15.4
40	617	15.4
40	616	15.4
80	1383	17.9
80	1382	17.3
80	1382	17.3
160	2755	17.2
160	2753	17.2
160	2755	17.3

De acuerdo con los datos anteriores, se procedió al cálculo de los datos estadísticos, los cuales se muestran en la tabla 10. Además, en la figura 24 se muestra el gráfico que corresponde a la curva de regresión ajustada para la linealidad del método, así como la ecuación de la recta y el coeficiente de regresión correspondiente.

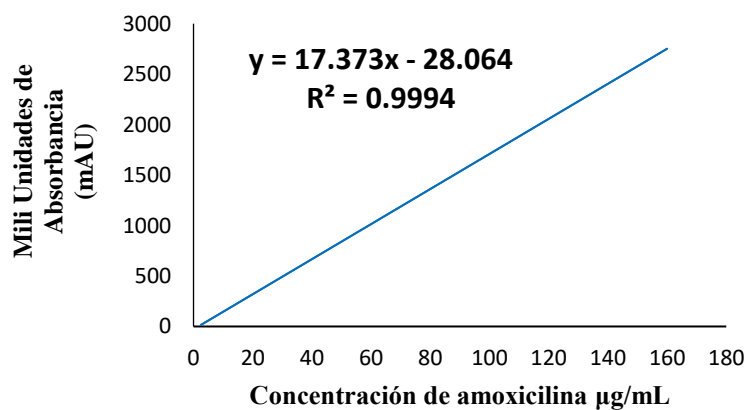


Figura 24. Curva de regresión ajustada para la linealidad del método.

Tabla 10. Resumen de análisis de linealidad del método.

Dato estadístico	Resultado	Criterio de aceptación NOM-177-SSA1-2013	Resultado
Coeficiente de la regresión	0.999	≥ 0.99	Cumple
Error relativo debido a la regresión	0.67	$\leq 3\%$	Cumple

4.5.2.2 Exactitud

A partir de la linealidad del método se obtuvieron las concentraciones y porcentajes de recuperación, variación y promedio respecto a la cantidad nominal de cada nivel de concentración, los cuales se muestran en la tabla 11.

Tabla 11. Análisis de exactitud del método.

Concentración de amoxicilina $\mu\text{g/mL}$ (x)	Promedio de las absorbancias de las tres curvas	Concentración recuperada $\mu\text{g/mL}$	% Recuperación (r)	% Variación
2.5	34.3	2.5	100.4	0.4
5	74.0	5.1	101.0	1.0
10	151.7	10.0	100.2	0.2
20	306.7	20.0	100.1	0.1
40	616.7	39.9	99.9	0.1
80	1382.3	80.1	101.5	1.5
160	2754.3	160.2	100.1	0.1

4.5.2.3 Precisión

4.5.2.3.1 Repetibilidad

El coeficiente de variación global se calculó partiendo del promedio y desviación estándar de los porcentajes de recuperación calculados para la determinación de la exactitud del método.

En la tabla 12 se muestran los datos estadísticos obtenidos para la exactitud y repetibilidad del método, igualmente se muestran los criterios de aceptación correspondientes declarados en la NOM-177-SSA1-2013.

Tabla 12. Resumen del análisis de exactitud y repetibilidad del método.

Dato estadístico	Resultado	Criterio de aceptación NOM-177-SSA1-2013	Resultado
Promedio de % de variación en cada punto	0.5-1%	$\leq 3\%$	Cumple
CV global del % de recuperación	0.45%	$\leq 3\%$	Cumple

4.5.2.3.2 Reproducibilidad

En la tabla 13 se muestran las absorbancias obtenidas, las concentraciones recuperadas, así como los porcentajes de recuperación para cada uno de los días del análisis

Tabla 13. Análisis de reproducibilidad.

Concentración de amoxicilina $\mu\text{g/mL}$	Mili Unidades de Absorbancia (mAU) a 230 nm	Concentración recuperada $\mu\text{g/mL}$	% Recuperación
Día uno			
80	1380	81.1	101.3
80	1379	81.0	101.2
80	1380	81.1	101.3
Día dos			
80	1379	81.0	101.2
80	1380	81.1	101.3
80	1382	81.2	101.5

De acuerdo con los resultados anteriores se procedió al cálculo de los datos estadísticos. En la tabla 14 se observan los resultados para el análisis de reproducibilidad y el criterio de aceptación.

Tabla 14. Resumen de análisis de reproducibilidad.

Dato estadístico	Resultado	Criterio de aceptación NOM-177-SSA1-2013	Resultado
CV global del % de recuperación	0.72%	$\leq 3\%$	Cumple

4.5.2.4 Selectividad

Los análisis cromatográficos permitieron determinar el tiempo de retención de la amoxicilina (4.1 minutos) y la ausencia de otras señales interferentes durante 10 minutos. La identificación del analito en las microesferas se llevó a cabo por la comparación con el estándar de referencia (figura 25).

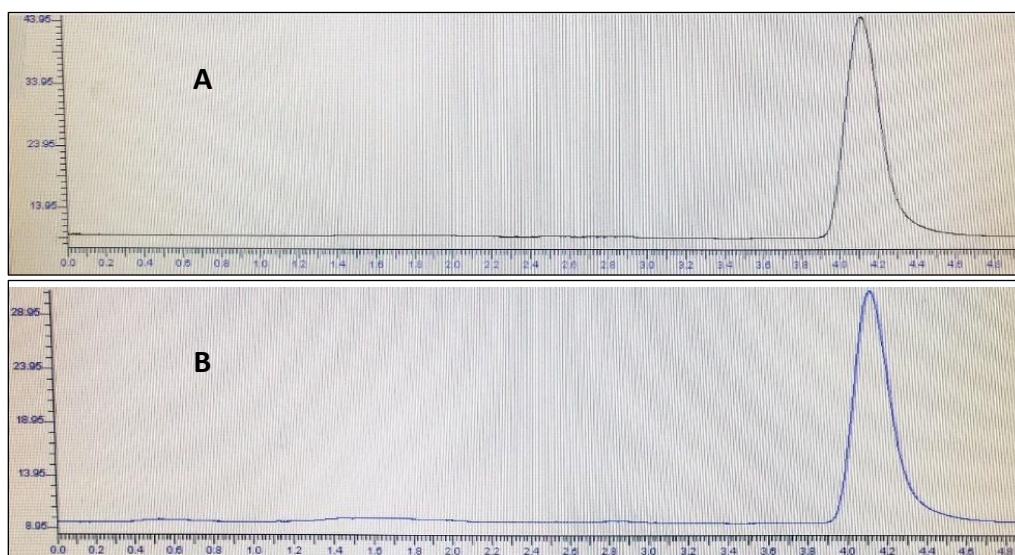


Figura 25. Cromatograma de la solución estándar de amoxicilina (A) y de las microesferas incorporadas con amoxicilina (B).

4.5.2.5 Estabilidad

Los resultados del estudio de estabilidad de las muestras permiten afirmar que estas permanecen estables durante 72 h a temperatura ambiente. La superposición de los barridos UV-Vis sugieren que no se presentaron cambios en el fármaco (figura 26).

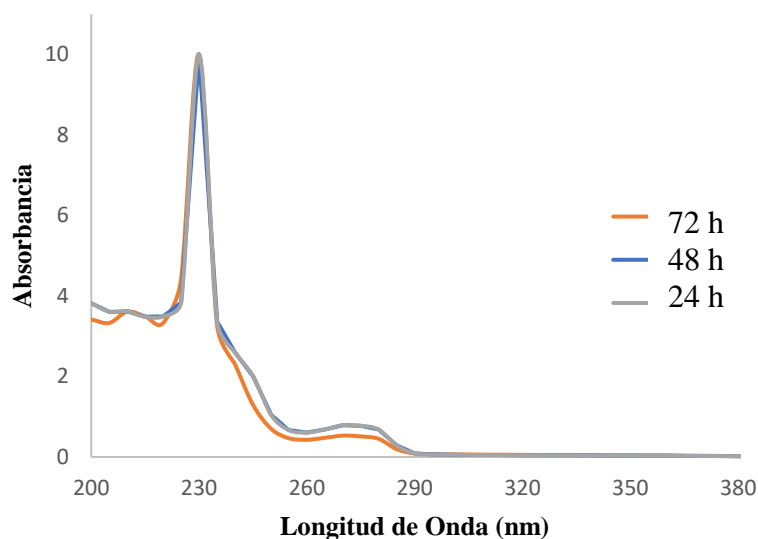


Figura 26. Estabilidad de espectros de absorción UV-Vis de amoxicilina a diferentes intervalos de tiempo.

4.5.3 Resumen de la validación del método analítico

A continuación, en la tabla 15, se presenta el resumen de los datos obtenidos en cada una de las evaluaciones para la validación del sistema y del método analítico, así como los criterios de aceptación para cada parámetro.

Los resultados obtenidos para la validación del método analítico para la cuantificación de amoxicilina demostraron linealidad y precisión para el sistema, así como para el método, además de repetibilidad, reproducibilidad, exactitud, selectividad y estabilidad, cumpliendo así con lo especificado en la NOM-177-SSA1-2013.

Tabla 15. Resumen de la validación del método analítico.

	Parámetros	Criterio de aceptación (NOM-177-SSA-2013)	Resultado
Validación del sistema	Linealidad	Coefficiente de regresión mayor o igual a 0.99 Error relativo debido a la regresión menor al 2%	Cumple
	Precisión	% Coeficiente de variación menor al 2%	Cumple
Validación del método	Linealidad	Coefficiente de regresión mayor o igual a 0.99 Error relativo debido a la regresión menor al 3%	Cumple
	Exactitud	% Coeficiente de variación menor al 3%	Cumple
	Precisión (Repetibilidad)	% Coeficiente de variación menor al 3%	Cumple
	Precisión (Reproducibilidad)	% Coeficiente de variación menor al 3%	Cumple
	Selectividad	No debe presentar los mismos tiempos de retención en alguna muestra y la solución de referencia.	Cumple

4.6 Evaluación del perfil de liberación

La figura 27 presenta los resultados de la evaluación de los perfiles de liberación de amoxicilina a partir de las microesferas obtenidas por gelación iónica y mediante secado por atomización, en la gráfica se pueden observar dos patrones diferentes de liberación del fármaco.

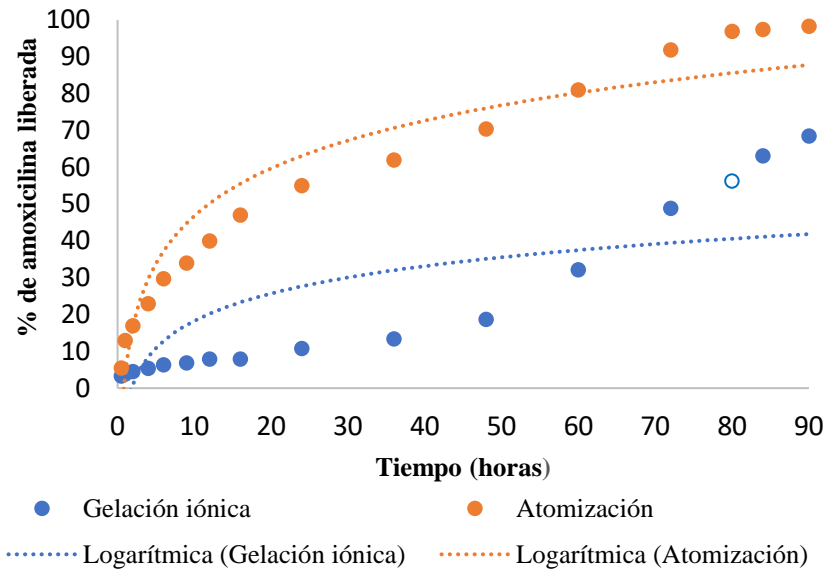


Figura 27. Gráfica del perfil de liberación de microesferas obtenidas por el método de secado por atomización y gelación iónica.

Las microesferas obtenidas por atomización presentaron mayor porcentaje de liberación del fármaco en un período de 90 horas, alcanzando valores del 98%, mientras que las obtenidas por gelación iónica lograron liberar el 68% de amoxicilina en ese mismo tiempo.

Los dos tipos de microesferas de quitosano conteniendo amoxicilina presentan un perfil de liberación prolongado por un período mayor a 72 horas, lo cual respalda el potencial para ser empleado en la preparación de sistemas de liberación prolongada.

Los resultados del perfil de liberación de ambos tipos de microesferas mostraron una liberación prolongada de la amoxicilina, así como una liberación inicial rápida del fármaco, conocida como “efecto burst”, debido a la rápida disolución del fármaco adherido a la superficie y una fase posterior de liberación lenta, durante la cual el fármaco presente en el núcleo de las microesferas se difunde, este efecto fue observado por Patel y colaboradores, quienes obtuvieron microesferas a base de quitosano para la liberación sostenida de nicorandil (Patel *et al.*, 2014)⁷².

Las microesferas obtenidas por gelación iónica retuvieron por más tiempo el principio activo, esto se atribuye a las interacciones iónicas entre el tripolifosfato y el grupo amino protonado de la amoxicilina, además de los puentes de hidrógeno entre las moléculas, ya que a un pH 6.75 (medio de disolución) se favorece la ionización del grupo amino del principio activo (pKa 9.6), este efecto fue observado por Mudassir y colaboradores quienes formularon micropartículas a base de quitosano y TPP para la liberación sostenida de hidroclorotiazida, observando que si el pH del medio favorece la ionización catiónica se permite un mayor entrecruzamiento con el TPP, lo que repercute en una liberación más lenta del principio activo (Mudassir *et al.*, 2020)⁷⁰.

Las microesferas obtenidas mediante el método de atomización presentaron una liberación más rápida del principio activo, lo cual puede deberse a factores como la ausencia de un agente reticulante, como es el TPP, y al tamaño de partícula, el cual tiene un efecto importante en el proceso de disolución.

Una revisión publicada por Khadka y colaboradores describe que la disminución en el tamaño y el correspondiente aumento en el área superficial de las partículas aumenta la velocidad de disolución de principios activos, debido a la mayor interacción con el disolvente (Khadka *et al.*, 2014)⁷³.

4.7 Ensayo antimicrobiano (difusión en agar)

En la tabla 16 se presenta la nomenclatura de las muestras analizadas de acuerdo con su contenido, así como el tamaño de las zonas de inhibición contra *Staphylococcus aureus* a las 72 horas de incubación, mientras que en la figura 28 se observan los halos de inhibición para cada muestra, presentando actividad antimicrobiana en las muestras que contienen el principio activo, la cual es menor en las microesferas obtenidas con mayor cantidad de agente entrecruzante TPP, lo que sugiere que la cinética de liberación de la amoxicilina es más lenta en esta muestra, coincidiendo con las pruebas del perfil de liberación.

Tabla 16. Tamaño de zona de inhibición en contra de *Staphylococcus aureus*.

	Microesferas/composición	72 horas (mm)
M1	Tripolisfosfato (TPP)	(-)
M2	Microesferas quitosano/TPP	(-)
M3	Microesferas por atomización con amoxicilina	22
C+	Control positivo-amoxicilina - 8µg/mL	32
M4	Microesferas quitosano-atomización	(-)
M5	Microesferas por gelación iónica con amoxicilina (170 mg -TPP) estandarizada	14
M6	Microesferas por gelación iónica con amoxicilina (100 mg TPP)	20
C+	Control positivo-amoxicilina - 8µg/mL	37



Figura 28. Ensayo antimicrobiano en contra de *Staphylococcus aureus*.

En la tabla 17 se presenta el tamaño de las zonas de inhibición contra *Enterococcus faecalis* a las 72 horas de incubación. La actividad de la amoxicilina para esta bacteria fue menor que la presentada contra *Staphylococcus aureus*, tanto en el control positivo como en las diferentes muestras analizadas (figura 29), se observa además que el halo de inhibición es menor en las microesferas obtenidas por gelación iónica, indicando mayor retención del principio activo, lo cual también coincide con los resultados de las pruebas de liberación *in vitro*.

Tabla 17. Tamaño zona de inhibición en contra de *Enterococcus faecalis*.

	Microesferas/composición	72 horas (mm)
M1	Tripolisfosfato (TPP)	(-)
M2	Microesferas quitosano/TPP	(-)
M3	Microesferas por atomización con amoxicilina	19
C+	Control positivo-amoxicilina - 8µg/mL	27
M4	Microesferas quitosano-atomización	(-)
M5	Microesferas por gelación iónica con amoxicilina (170 mg -TPP) estandarizada	6
M6	Microesferas por gelación iónica con amoxicilina (100 mg TPP)	8
C+	Control positivo-amoxicilina - 8µg/mL	26

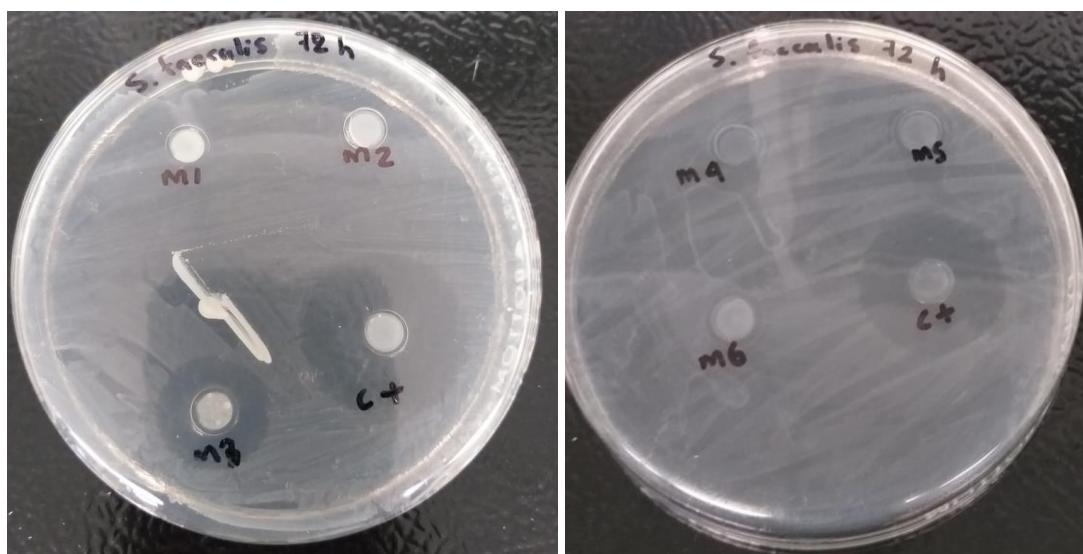


Figura 29. Ensayo antimicrobiano en contra de *Enterococcus faecalis*.

Los resultados indican que el TPP y el quitosano, solos o en combinación, no presentan actividad antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus* ni *Enterococcus faecalis*, esto se puede atribuir, para el caso del quitosano, que se esperaba actividad antimicrobiana intrínseca, a la baja solubilidad del polímero en el agar.

Cabe mencionar que el pH del agar fue de 7.3 ± 0.1 , superior al pKa del quitosano, lo que disminuye su ionización en forma catiónica y su solubilidad y por lo tanto dificulta su difusión en el medio.

Trabajos realizados por Pérez y colaboradores describieron propiedades antimicrobianas del quitosano contra *Enterococcus faecalis*, mediante el método de difusión en disco, en el que evaluaron al quitosano disuelto en ácido acético y concluyeron que su actividad antimicrobiana depende significativamente de sus cargas y su solubilidad (Pérez *et al.*, 2014)⁷⁴.

Esta propiedad es descrita también por Ardean y colaboradores quienes atribuyen la actividad antimicrobiana del quitosano a la ionización, solubilidad y otros múltiples factores tales como el peso molecular, la concentración y el grado de desacetilación (Ardean *et al.*, 2021)⁷⁵. Los resultados de estos trabajos muestran la necesidad de ionización del quitosano para su actividad antimicrobiana, lo cual no ocurrió en los estudios con las microesferas, debido al pH del medio.

La actividad antimicrobiana presentada por las microesferas conteniendo amoxicilina confirma la conservación de la actividad del fármaco durante la obtención de las microesferas y las pruebas de liberación *in vitro* después de 72 horas. La menor actividad de las microesferas obtenidas por gelación iónica se explica por la interacción de la amoxicilina con el tripolifosfato como lo describe Sacco y colaboradores indicando que este compuesto es utilizado en la encapsulación de fármacos, donde quedan atrapados los iones dentro de la red física en las microesferas (Sacco *et al.*, 2021)⁷⁶.

CAPÍTULO 5

CONCLUSIONES

Se obtuvieron dos tipos de microesferas a base de quitosano conteniendo amoxicilina, mediante los métodos de gelación iónica y secado por atomización.

Se encontraron las condiciones óptimas para la obtención de microesferas por el método de gelación iónica, las cuales fueron determinadas por diseño de experimentos Box Behnken, y consistieron en utilizar agitación con equipo ultraturrax para disolver el quitosano con la proporción de 430/170 mg quitosano/TPP.

El método de gelación iónica presentó mayor rendimiento (92.4%), que el obtenido mediante secado por atomización (27.0%).

Las microesferas obtenidas mediante por secado por atomización presentaron morfología semi redonda, una superficie rugosa, mayor homogeneidad y menor tamaño, con valores de 8.9 a 44.5 μm ., comparados con los de gelación iónica, cuyo tamaño fue de 19.8 a 64.4 μm con morfología irregular y formación de agregados.

Se realizó la validación del método analítico para la cuantificación de amoxicilina obteniendo resultados que cumplen con la NOM-177-SSA1-2013, lo cual permite garantizar la confiabilidad de los resultados del perfil de liberación del fármaco.

Se llevó a cabo la caracterización del principio activo y los excipientes mediante FTIR con reflectancia total atenuada, para la evaluación de posibles interacciones entre el principio activo y los excipientes utilizados en el desarrollo de las microesferas a base de quitosano, encontrando compatibilidad entre ellos.

El perfil de liberación de la amoxicilina a partir de las diferentes microesferas mostró que las obtenidas por gelación iónica liberaron el 68% del fármaco en un periodo de 72 horas, mientras que las obtenidas por atomización presentaron una liberación del 98% en el mismo periodo.

Los dos tipos de microesferas presentaron una liberación continua del fármaco durante 90 horas, lo cual respalda el potencial del quitosano para ser empleado en la preparación de sistemas de liberación prolongada de amoxicilina.

Se realizó el ensayo antimicrobiano de las diferentes microesferas obtenidas mediante la técnica de difusión en agar, en donde se observó inhibición contra *Staphylococcus aureus* y *Enterococcus faecalis*, lo que indica la conservación de la actividad del principio activo durante la elaboración de las microesferas y las pruebas del perfil de liberación *in vitro*.

CAPÍTULO 6

BIBLIOGRAFÍA

1. Robles Raya, P., Javierre Miranda A. P., Moreno Millán N., et al. Manejo de las infecciones odontogénicas en las consultas de atención primaria: ¿antibiótico?. *Atención Primaria*, 49:10, 611-618. (2017).
2. Salud bucodental. Nota informativa No. 318. Abril de 2012. En: Organización Mundial de la Salud [Internet]. Consultado 30 de Agosto de 2018. Disponible en <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs318/es>.
3. Global Burden of Disease Collaborative Network. Global Burden of Disease Study 2019. Seattle: Institute of Health Metrics and Evaluation (IHME). (2020).
4. Chen, M. X., Zhong, Y. J., et al. “Global, regional, and national burden of severe periodontitis, 1990-2019: An analysis of the Global Burden of Disease Study 2019.” *Journal of Clinical Periodontology*, 48:9, 1165-1188. (2021).
5. Dirección General de Epidemiología. Resultados del Sistema de Vigilancia Epidemiológica de Patologías Bucales SIVEPAB. (2019). Ciudad de México: Secretaría de Salud, Centro Nacional de Programas Preventivos y Control de Enfermedades. Disponible en: <https://www.gob.mx/salud/documentos/informes-sivepab-2019>.
6. Prevención, clave en salud bucal: IMSS. Nota informativa No. 268. Agosto de 2019. En Instituto Mexicano del Seguro Social [Internet]. Consultado 27 de Septiembre de 2019. Disponible en <http://www.imss.gob.mx/prensa/archivo/201908/268>.
7. Peedikayil, F. C. Antibiotics in Odontogenic Infections - An Update. *Journal of Antimicrobial Agents*, 2,117. (2016).

8. Sáez, M., Carreño A., et al. Abordaje de las infecciones odontogénicas por el Médico de Familia. *Revista Clínica de Medicina de Familia*, 12:2, 82-86. (2019).
9. Zaatout, N. Presence of non-oral bacteria in the oral cavity. *Archives of Microbiology*, 203, 2747-2760. (2021).
10. Esparza LSB, Aranda RMS, Noyoloa FMÁ. et al. Principios fundamentales para el diagnóstico, manejo y tratamiento de las infecciones odontogénicas. Revisión de la literatura. *Revista Odontológica Mexicana*, 24:1, 9-19. (2020).
11. Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos (FEUM). 12a edición. Secretaría de Salud. Ciudad de México. (2018).
12. Khataei, M. M., Epi, S., Lood, R., Spégel, P., Yamini, Y., & Turner, C. A review of green solvent extraction techniques and their use in antibiotic residue analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 209, 114487. (2022).
13. Katzung G. B. Betalactámicos y otros antibióticos activos en la pared celular y en la membrana. *Farmacología básica y clínica*. 15a edición. México: McGraw-Hill Education. (2022).
14. De Velde, F., de Winter, B. C., et al. "Non-linear absorption pharmacokinetics of amoxicillin: consequences for dosing regimens and clinical breakpoints." *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 71:10, 2909-2917. (2016).
15. Fournier, A., Goutelle S., Que Y-A., et al. Population pharmacokinetic study of amoxicillin-treated burn patients hospitalized at a Swiss tertiary-care center. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 62:9, e00505-18. (2018).
16. Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPS). [Internet]. Consultado el 20 de Octubre de 2022. Centro de Información online de Medicamentos Autorizados (CIMA) de la AEMPS. Disponible en: https://cima.aemps.es/cima/dohtml/ft/64388/FichaTecnica_64388.htm#10.

17. European Antimicrobial Resistance Collaborators. The burden of bacterial antimicrobial resistance in the WHO European region in 2019: a cross-country systematic analysis. *Lancet Public Health*, 7:11, 897-913 (2022).
18. World Health Organization. Antimicrobial resistance. Draft global action plan on antimicrobial resistance. World Health Organization, Geneva, Switzerland. (2016).
19. Gao, P., Nie, X., Zou, M., Shi, Y., et al. Recent advances in materials for extended-release antibiotic delivery system. *The Journal of Antibiotics*, 64:9, 625–634. (2011).
20. Herdiana Y., Wathoni N. et al. Drug release study of the chitosan-based nanoparticles. *Heliyon*, 8:1, e08674 (2021).
21. Rajeshwari, H. R., Dhamecha, D., Jagwani, S., Rao, M., et al. Local drug delivery systems in the management of periodontitis: A scientific review. *Journal of Controlled Release*, 307, 393-409. (2019).
22. Zhang, C., Hui D. et al. Preparation and application of chitosan biomaterials in dentistry. *International Journal of Biological Macromolecules*, 167, 1198–1210. (2021).
23. Adepu, S., Ramakrishna S. Controlled Drug Delivery Systems: Current Status and Future Directions. *Molecules*, 26:19, 5905. (2021).
24. Wang, S., Liu, R., Fu, Y., & Kao, W. J. Release mechanisms and applications of drug delivery systems for extended-release. *Expert Opinion on Drug Delivery*, 17:9, 1289–1304. (2020).
25. Lotfollah, K. H., Mohsen Y., Mostafa A. et al. "Biocompatible and Biomaterials Application in Drug Delivery System in Oral Cavity". *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, eCAM* 2021. (2021).

26. Das, A., Ringu, T., Ghosh, S. et al. A comprehensive review on recent advances in preparation, physicochemical characterization, and bioengineering applications of biopolymers. *Polymer Bulletin*, 1-66. (2022).
27. López, A., Ramirez, A., & McEnnis, K. “Single and Multiple Stimuli-Responsive Polymer Particles for Controlled Drug Delivery.” *Pharmaceutics*, 14:2, 421. (2022).
28. Kantak, M. N., Bharate S.S. Analysis of clinical trials on biomaterial and therapeutic applications of chitosan: A review. *Carbohydrate Polymers*, 278, 118999. (2022).
29. Kostag, M., El Seoud O. A. Sustainable biomaterials based on cellulose, chitin and chitosan composites - A review. *Carbohydrate Polymer Technologies and Applications*, 2, 100079. (2021).
30. Sherin, M. J., Srinivasan K. R., et al. A review on source-specific chemistry, functionality, and applications of chitin and chitosan. *Carbohydrate Polymer Technologies and Applications*, 2, 100036. (2021).
31. Shangyong, L., Hui Z. et al. “Application of chitosan/alginate nanoparticle in oral drug delivery systems: prospects and challenges”. *Drug Delivery*, 29:1, 1142-1149. (2022).
32. Frigaard, J., Jensen J.L., Galtung H. K., Hiorth M. The Potential of Chitosan in Nanomedicine: An Overview of the Cytotoxicity of Chitosan Based Nanoparticles. *Frontiers in Pharmacology*, 13, 880377. (2022).
33. Hamed, H., Moradi, S., Hudson, S. M., Tonelli, A. E., & King, M. W. Chitosan based bioadhesives for biomedical applications: A review. *Carbohydrate Polymers*, 282, 119100. (2022).
34. Mikušová, V., Mikuš P. Advances in Chitosan-Based Nanoparticles for Drug Delivery. *International Journal of Molecular Sciences*, 22:17, 9652. (2021).

35. Costa, J. V., Portugal, J., Neves, C. B., & Bettencourt, A. "Should local drug delivery systems be used in dentistry?". *Drug Delivery and Translational Research*, 12:6, 1395-1407. (2021).
36. Zhang, Z. L., Li, L. J., Sun, D., et al. Preparation and properties of chitosan-based microspheres by spray drying. *Food Science & Nutrition*, 8:4, 1933-1941. (2020).
37. Pedroso, S. & Fleitas N. Ionotropic gelation method in the synthesis of nanoparticles/microparticles for biomedical purposes. *Polymer International*, 69, 443-447. (2020).
38. Al-Zoubi, N., Gharaibeh S., Aljaberi A. & Nikolakakis I. Spray drying for Direct Compression of Pharmaceuticals. *Processes*, 9:2, 267. (2021).
39. Baumann, J. M., Adam, M. S., & Wood, J. D. Engineering Advances in Spray Drying for Pharmaceuticals. *Annual Review of Chemical and Biomolecular Engineering*, 12, 217–240. (2021).
40. Santos, M. G. Secado por aspersión y micro-encapsulación con aplicación en investigación e industrias de alimentos, química y farmacéutica. Seminario Spray Drying. Lima, Perú. (2014).
41. Moon, J.H., et al. Effects of Sodium Tripolyphosphate on Oral Commensal and Pathogenic Bacteria. *Polish Journal of Microbiology*, 68:2, 263–268. (2019).
42. Abla, K. K. & Mehanna, M. M. Freeze-drying: A flourishing strategy to fabricate stable pharmaceutical and biological products. *International Journal of Pharmaceutics*, 628, 122233. (2022).
43. Minitab. ¿Qué son los diseños de superficie de respuesta, los diseños centrales compuestos y los diseños de Box-Behnken?. (2021). [Internet]. Consultado 25 Enero de 2021. Disponible en <https://support.minitab.com/es-mx/minitab/21/help-and-how-to/statistical-modeling/doe/supporting-topics/response-surface-designs/response-surface-central-composite-and-box-behnken-designs>.

44. Usta, D., Timur, B., & Teksin, Z. S. Formulation development, optimization by Box-Behnken design, characterization, *in vitro*, *ex-vivo*, and *in vivo* evaluation of bosentan-loaded self-nanoemulsifying drug delivery system: A novel alternative dosage form for pulmonary arterial hypertension treatment. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 174, 106159. (2022).
45. Kilicarslan, M., Mehemet G. & Sulhiye Y. Preparation and Characterization of Chitosan-Based Spray-dried Microparticles for the Delivery of Clindamycin Phosphate to Periodontal Pockets. *Current Drug Delivery*, 11:1, 98-111. (2014).
46. D'Souza, S. "A Review of *In Vitro* Drug Release Test Methods for Nano-Sized Dosage Forms". *Advances in Pharmaceutics*, 2014, 1-12. (2014).
47. Dias, R., Havaldar V. D., Ghorpade V. S., Mali K. K., Gaikwad V. K & Kumbhar D. M. Development and evaluation of in-situ gel containing ornidazole loaded microspheres for treatment of periodontitis. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 6:10, 200–209. (2016).
48. Akyüz, L., Duman F. & Kaya M. Encapsulation of Flurbiprofen by Chitosan Using a Spray-drying Method with In Vitro Drug Releasing and Molecular Docking. *Turkish Journal of Pharmaceutical Sciences*, 14:1, 34–9. (2017).
49. Sobhani, Z., Samani S. M., Montaseri H. & Khezri E. Nanoparticles of chitosan loaded ciprofloxacin: Fabrication and antimicrobial activity. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*, 7:3, 427–432. (2017).
50. Helbling, I. M., Busatto, C. A., et al. Preparation of TPP-crosslinked chitosan microparticles by spray drying for the controlled delivery of progesterone intended for estrus synchronization in cattle. *Pharmaceutical Research*, 3:3, 66. (2018).
51. Matshetshe, K. I., Parani S., Manki S. M. & Oluwafemi O. S. Preparation, characterization and in vitro release study of β -cyclodextrin/chitosan nanoparticles loaded *Cinnamomum zeylanicum* essential oil. *International Journal of Biological Macromolecules*, 118, 676-682. (2018).

52. Zang, S., Mu .R, Chen F., et al. Injectable chitosan/ β -glycerophosphate hydrogels with sustained release of BMP-7 and ornidazole in periodontal wound healing of class III furcation defects. *Materials Science & Engineering: C*, 99, 919–928. (2019).
53. Yurtdaş Kırımlioğlu, G., & Öztürk, A. A. Levocetirizine Dihydrochloride-Loaded Chitosan Nanoparticles: Formulation and *In Vitro* Evaluation. *Turkish Journal Of Pharmaceutical Sciences*, 17:1, 27-35. (2020).
54. The United States Pharmacopeia: USP 41; The national formulary: NF 36. (2018).
55. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). *Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard—13 th Edition*. CLSI document Wayne, Pennsylvania, USA. (2018).
56. Samrot, A.V., Akanksha, J. T. et al. Chelators influenced synthesis of chitosan–carboxymethyl cellulose microparticles for controlled drug delivery. *Applied Nanoscience*, 6, 1219–1231 (2016).
57. Fernandes, Queiroz M., Melo K. R., et al. Does the use of chitosan contribute to oxalate kidney stone formation?. *Marine Drugs*, 13:1, 141-158. (2015).
58. Kumar, G., Chaudhary, K., Mogha, N. K., Kant, A., & Masram, D. T. Extended Release of Metronidazole Drug Using Chitosan/Graphene Oxide Bionanocomposite Beads as the Drug Carrier. *ACS Omega*, 6:31, 20433–20444. (2021).
59. Maswadeh, H. Incompatibility of Paracetamol with Pediatric Suspensions Containing Amoxicillin, Azithromycin and Cefuroxime Axetil. *Pharmacology & Pharmacy*, 8:11, 355-368. (2017).
60. Songsurang, K., Pakdeebumrung J., Praphairaksit N. & Muangsin N. Sustained release of amoxicillin from ethyl cellulose-coated amoxicillin/chitosan-cyclodextrin-based tablets. *AAPS PharmSciTech*, 12:1, 35-45. (2011).

61. Güncüm, N., Ceren I., Nilgün A., et al. Development and characterization of polymeric-based nanoparticles for sustained release of amoxicillin – an antimicrobial drug. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, 46:2, 964-973. (2018).
62. Vijayalakshmi, K., Devi, B. M., Sudha, P. N., Venkatesan, J., et al. Characterization and Applications of Nanochitosan/SodiumAlginate/Microcrystalline Cellulose Film. *Journal of Nanomedicine & Nanotechnology*, 7, 1-11. (2016).
63. Narkar, M., Sher P. et al. Stomach-Specific Controlled Release Gellan Beads of Acid-Soluble Drug Prepared by Iontropic Gelation Method. *AAPS PharmSciTech*, 11:1, 267-277. (2010).
64. Acosta Ferreira S., Castillo O., Madera-Santana T., et al. Production and physicochemical characterization of chitosan for the harvesting of wild microalgae consortia. *Biotechnology Reports*, 28, (2020).
65. Helbling, I., Busatto C., Karp F., et al. An analysis of the microencapsulation of ceftiofur in chitosan particles using the spray drying technology. *Carbohydrate Polymers*, 234. (2020).
66. Shi, Y., Wan, A., Shi, Y., Zhang, Y. & Chen, Y. "Experimental and Mathematical Studies on the Drug Release Properties of Aspirin Loaded Chitosan Nanoparticles". *BioMed Research International*, 2014: 613-619. (2014).
67. Ergin, A. D, Sezgin-Bayındir, Z., Yüksel, N. Characterization and optimization of colon targeted S-adenosyl-L-methionine loaded chitosan nanoparticles. *Journal of Research in Pharmacy*, 23:5, 914-926. (2019).
68. Lechanteur, A. & Evrard, B. Influence of Composition and Spray-Drying Process Parameters on Carrier-Free DPI Properties and Behaviors in the Lung: A review. *Pharmaceutics*, 12:1, 55. (2020).

69. De la Paz, N., Fernández M. et al. Optimización del proceso de obtención de quitosano derivada de la quitina de langosta. *Revista Iberoamericana de Polímeros*, 13:3, 103-106. (2012).
70. Mudassir, J., Sherwani A. et al. Formulation, Optimization and Characterization of Chitosan Monodisperse Microparticles for Sustained Delivery of Hydrochlorothiazide HC. *Pharmaceutical Sciences*, 26:3, 306-313. (2020).
71. Wang-Zhan J., Yang C., Hao-Ying L. Chitosan-based spray-dried mucoadhesive microspheres for sustained oromucosal drug delivery. *Powder Technology*, 312, 124-132. (2017).
72. Patel, K. S. & Patel, M. B. "Preparation and evaluation of chitosan microspheres containing nicorandil." *International Journal Pharmaceutical Investigation*, 4:1, 32-37. (2014).
73. Khadka, P., Ro J., Kim H., et al. Pharmaceutical particle technologies: An approach to improve drug solubility, dissolution and bioavailability. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 9:6, 304-316. (2014).
74. Pérez Cordero, A. Rojas Sierra, J. Rodríguez Ruiz, J., Arrieta Álvarez, et al. Actividad antibacteriana de soluciones ácidas de quitosano obtenido de exoesqueleto de camarón. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 16:1, 104-110. (2014).
75. Ardean, C., Davidescu, C. M., Nemeş, N. S., Negrea, A., et al. Factors Influencing the Antibacterial Activity of Chitosan and Chitosan Modified by Functionalization. *International Journal of Molecular Sciences*, 22:14, 7449. (2021).
76. Sacco, P., Pedroso S., Kumar Y., Joly N., Martin P. & Bocchetta P. Iontropic Gelation of Chitosan Flat Structures and Potential Applications. *Molecules*, 26:3, 660. (2021).