



Magíster en Ciencias Odontológicas, Mención Periodontología

Facultad de Odontología. Universidad de Chile

**EFFECTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE NANOEMULSIÓN DE MINOCICLINA
OBTENIDA POR EMULSIFICACIÓN ESPONTÁNEA SOBRE *Porphyromonas
gingivalis***

Tesis presentada para optar al grado de Magíster en Ciencias Odontológicas
mención Periodontología

Alan Omar Palomino Calderón

Director de Tesis:

Dr. Mario Díaz-Dosque

ICOD

Facultad de Odontología. Universidad de Chile

Co-Directores de Tesis:

Dr. Cristián Tapia Villanueva

Departamento de Ciencias de los Alimentos
y Tecnología Química

Facultad de Ciencias Químicas y
Farmacéuticas.

Universidad de Chile

Dra. Patricia Palma Fluxá

Área de Microbiología. Departamento
de Patología y Medicina Oral

Facultad de Odontología
Universidad de Chile

Santiago, 2020

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE
ODONTOLOGÍA ESCUELA DE
GRADUADOS

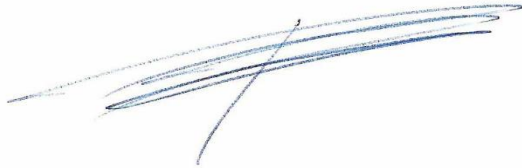
**INFORME DE APROBACIÓN DE TESIS DE MAGISTER EN CIENCIAS
ODONTOLÓGICAS MENCIÓN PERIODONTOLOGÍA**

Se informa al Consejo de Posgrado de la Facultad de Odontología de la
Universidad de Chile, que la Tesis de Magister en Ciencias
Odontológicas presentada por el candidato

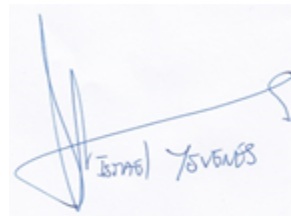
ALAN OMAR PALOMINO CALDERÓN

Ha sido aprobada por la Comisión Evaluadora de Tesis como requisito para
optar al grado de Magíster en Ciencias Odontológicas, mención
Periodontología en examen rendido el 11 de mayo de 2020.

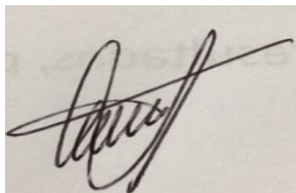
COMISIÓN INFORMANTE DE TESIS



Prof. Dr. Patricio Smith Ferrer



Prof. Dr. Ismael Yevenes López



Prof. Dra. Nora Silva Steffens

“Somos lo que hacemos día a día; de modo que la excelencia no es un acto, sino
un hábito”
Aristóteles

“Aquellos que tienen el privilegio de saber, tienen la obligación de actuar”
Albert Einstein

Dedicatoria

A mi familia

Por su presencia en la distancia,
por los cimientos y principios
atemporales, por la voluntad de la
continua mejora, por el soporte
inagotable.

Agradecimientos

A Dios, por todo.

A mi esposa y familia, por cada minuto y espacio dedicado, por su amor, paciencia, sacrificio.

A mi director de tesis: Mario Díaz-Dosque, por su permanente afable disposición, valiosas sugerencias, importantes contribuciones e inestimable guía.

A mi co-tutor de tesis: Cristian Tapia, por permitirme trabajar en su laboratorio, por cada orientación en innumerables reuniones, por la paciencia y por las edificantes charlas transicionales de filosofía al sólido soporte químico farmacéutico.

A mi co-tutora de tesis: Patricia Palma, por su tiempo, su invaluable conocimiento compartido y por posibilitarme realizar los ensayos antimicrobianos en el laboratorio de microbiología.

A Lilian Abugoch, por otorgarme acceso a su laboratorio y a los equipos necesarios, por hacerme parte del grupo.

A Leonor Salamanca y Arturo Intiquilla, compañeros del laboratorio de operaciones unitarias, por su constante aporte, por mostrarme múltiples estrategias prácticas experimentales.

A Alexander Gamboa y Nelson Caro, por su gran cooperación con materiales y equipos.

A Daniela Salinas y Darna Venegas, por todo el apoyo en el laboratorio de microbiología, por enseñarme las técnicas, transmitirme su experiencia y crear un excelente ambiente de trabajo.

A Edda Costa y Myriam Vergara, por facilitarnos el uso del espectrofotómetro y las inmediatas coordinaciones.

A Don Fernando, por la logística, dedicación y estar siempre pendiente.

A María Gabriela Villamizar, por su amabilidad y permitirnos utilizar el equipo DLS.

A Rocío Orellana, por las microfotografías y su voluntad para colaborar.

A Miguel Neira, por su disponibilidad y procesamiento de las muestras FTIR.

Índice

1.- Resumen	1
2.- Introducción	3
2.1.- <i>Porphyromonas gingivalis</i>	5
2.2.- Minociclina	6
2.3.- Aplicaciones locales de minociclina en terapia periodontal	8
2.4.- Sistemas nanoparticulados de liberación controlada aplicados en periodoncia	10
2.5.- Nanoemulsiones	13
2.5.1.- Emulsificación espontánea	13
2.6.- Antecedentes de nanoemulsión de minociclina	14
3.- Hipótesis y objetivos	15
3.1.- Hipótesis	15
3.2.- Objetivos	15
4.- Materiales y Métodos	16
4.1.- Materiales	16
4.2.- Fabricación de Nanoemulsión	17
4.2.1.- Método de emulsificación espontánea	17
4.3.- Caracterización de nanoemulsión de minociclina	17
4.3.1.- Determinación del tamaño, potencial Z e índice de polidispersidad de nanoemulsión de minociclina	17
4.3.2.- Caracterización fisicoquímica	18
4.3.3.- Microscopía de transmisión electrónica (TEM)	18
4.3.4.- Espectroscopia infrarroja transformada de Fourier (FTIR)	18

4.4.- Corroboración de incorporación de minociclina en nanoemulsión	19
4.4.1.- Análisis cuantitativo de minociclina en los vehículos por Espectroscopía UV	19
4.4.1.1.- Capacidad de carga y eficiencia de encapsulación	19
4.5.- Cuantificación de cinética de liberación de minociclina encapsulada en nanoemulsión	19
4.6.- Evaluación de la actividad antimicrobiana in vitro de nanoemulsión de minociclina sobre <i>Porphyromonas gingivalis</i>	20
4.6.1.- Cepas bacterianas de referencia	20
I) Siembra y Cultivo	20
4.6.2.- Determinación de la concentración bactericida mínima	20
4.6.3.- Determinación de inhibición del crecimiento por difusión	21
4.7.- Análisis estadístico	21
5.- Resultados y Discusión	22
5.1.- Desarrollo de nanoemulsión de minociclina mediante emulsificación espontánea	22
5.2.- Caracterización de nanoemulsión de minociclina	24
5.2.1.- Determinación del tamaño, potencial Z e índice de polidispersidad de nanoemulsiones de minociclina obtenidas por emulsificación espontánea	24

5.2.2.- Caracterización físico química de nanoemulsiones	27
5.2.3.- Microscopía de transmisión electrónica (TEM)	27
5.2.4.- Espectroscopia infrarroja transformada de Fourier (FTIR)	29
5.3.- Corroboración de incorporación de minociclina en nanoemulsión	30
5.3.1.- Cuantificación de minociclina en vehículos	30
5.4.- Cuantificación de cinética de liberación de minociclina encapsulada en nanoemulsión	31
5.5.- Evaluación de la actividad antimicrobiana <i>in vitro</i> de nanoemulsión de minociclina sobre <i>Porphyromonas gingivalis</i>	33
5.5.1.- Determinación de la concentración bactericida mínima	33
5.5.2.- Determinación de inhibición del crecimiento por difusión	38
6.- Conclusiones	44
7.- Referencias Bibliográficas	45

Índice de abreviaturas y símbolos

μL	Microlitros
μg	Microgramos
μm	Micrómetros
$^{\circ}\text{C}$	Grados Celsius
AM	Actividad antimicrobiana
ATCC	American Type Culture Collection
CC	Capacidad de carga
cm^2	Centímetro cuadrado
d	Días
dg	Diámetro de gota
EE	Emulsificación espontánea
EE%	Porcentaje de eficiencia de encapsulación
FO	Fase oleosa
FTIR	Espectroscopía infrarroja transformada de Fourier
g	Gravedad
gL^{-1}	Gramos/Litro
M	Molar
mg	Miligramos
Min	Minutos
mL	Mililitros
mM	Milimolar
mm	Milímetros
mm^2	Milímetro cuadrado
mV	Milivoltios

Ne	Nanoemulsión
nm	Nanómetros
NMc	Nanoemulsión de Minociclina
O/W	Aceite en agua
PDI	Índice de polidispersidad
<i>P. gingivalis</i>	<i>Porphyromonas gingivalis</i>
p/p	peso-peso
p/v	peso-volumen
rpm	Revoluciones por minuto
TEM	Microscopía de transmisión electrónica
UFC	unidad formadora de colonias
ZIC	Zona de inhibición de crecimiento
W/O	Agua en aceite

1.- RESUMEN

La periodontitis es una enfermedad crónica inflamatoria multifactorial que afecta a los tejidos de sostén del diente, mediada por la respuesta inmune inadecuada o desregulada por determinados factores como la acumulación de *biofilms* disbióticos subgingivales. Entre las principales bacterias asociadas con la etiología de la periodontitis está *Porphyromonas gingivalis*. La terapia periodontal busca detener la enfermedad, así como restablecer la salud de los tejidos periodontales mediante la remoción de los *biofilms* y sus productos por medios mecánicos como el pulido y alisado radicular. Adicionalmente se usa la administración sistémica de antibióticos para reducir la población bacteriana pero produce reacciones adversas y resistencia bacteriana, por tanto se ha planteado la administración local de estos fármacos para disminuir estas desventajas. Entre los antibióticos más usados están amoxicilina, metronidazol, doxiciclina y minociclina, ésta es principalmente administrada de forma local. Posee mayor capacidad de penetración tisular y tiempo de vida media, además posee propiedades antiinflamatorias, sin embargo, la administración local de antibióticos presenta leve difusión intracelular en las zonas afectadas, limitando la actividad antimicrobiana. Sistemas de encapsulamiento nanoparticulados de fármacos mejoran esa limitación; incrementando la entrada en los tejidos y aumentando las propiedades antimicrobianas. Entre los métodos para obtener estos sistemas se encuentra la emulsificación espontánea.

Este trabajo buscó determinar la efectividad antimicrobiana de nanoemulsión de minociclina obtenida por emulsificación espontánea sobre *Porphyromonas gingivalis in vitro*. Los resultados mostraron efectividad antimicrobiana de las nanoemulsiones de minociclina a menores concentraciones sobre *Porphyromonas gingivalis* comparado con minociclina sin encapsular. Se concluyó que es factible, por el método de emulsificación espontánea, encapsular minociclina en nanoemulsión como sistema de liberación controlado nanoparticulado y que existe aumento de la efectividad antimicrobiana de la nanoemulsión de minociclina sobre *Porphyromonas gingivalis* comparado con el antibiótico libre.

Abstract

Periodontitis is a chronic multifactorial inflammatory disease that affects the supporting tissues of the tooth, mediated by inadequate or dysregulated immune response due to determined factors such as the accumulation of subgingival dysbiotic biofilms. Among the main bacteria associated with the etiology of periodontitis is *Porphyromonas gingivalis*. Periodontal therapy seeks to stop the disease, as well as restore the health of periodontal tissues by removing biofilms and their products by mechanical means such as polishing and root planning. Additionally, the systemic administration of antibiotics is used to reduce the bacterial population, but it produces adverse reactions and bacterial resistance, therefore, local administration of these drugs has been proposed to reduce these disadvantages. Among the most used antibiotics are amoxicillin, metronidazole, doxycycline and minocycline, this is mainly administered locally. It has greater capacity for tissue penetration and half-life, it also has anti-inflammatory properties, however, the local administration of antibiotics has a slight intracellular diffusion in the affected areas, limiting antimicrobial activity. Nanoparticulate drug encapsulation systems show improvement of that limitation, increasing tissue entry and increasing antimicrobial properties. Among the methods to obtain these systems is spontaneous emulsification.

This work had sought to determine the antimicrobial effectiveness of minocycline nanoemulsion obtained by spontaneous emulsification on *Porphyromonas gingivalis in vitro*. The results showed antimicrobial effectiveness of minocycline nanoemulsions at lower concentrations on *Porphyromonas gingivalis* compared to unencapsulated minocycline. It was concluded that it is achievable, by the spontaneous emulsification method, to encapsulate minocycline in nanoemulsion as a nanoparticulate controlled release system and that there is an increase in the antimicrobial effectiveness of the minocycline nanoemulsion on *Porphyromonas gingivalis* compared to the free antibiotic.

2.- INTRODUCCIÓN

La Periodontitis es una enfermedad crónica inflamatoria multifactorial que afecta a los tejidos de sostén del diente como la encía, hueso alveolar y ligamento periodontal, mediada por la respuesta inmune limitada o desregulada a consecuencia de diversos factores como la adhesión y acumulación de *biofilms* disbióticos subgingivales con sus productos, conllevando daño, destrucción tisular ^{1,2,3} y que se caracteriza principalmente por la pérdida de inserción periodontal ⁴.

El modelo actual etiológico de la periodontitis se basa en los cambios microbiológicos – disbióticos – del ecosistema oral, donde comunidades bacterianas patógenas proliferan y potencian sus capacidades virulentas por sobre las comunidades bacterianas asociadas a salud periodontal, alterando el equilibrio del ecosistema ⁵. Las principales bacterias asociadas con la etiología de la periodontitis son: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*, *Tannerella forsythia*, entre otras ^{6,7,8}.

Porphyromonas gingivalis posee múltiples factores de virulencia que implican diversos mecanismos fisiopatológicos como la capacidad de invadir intracelularmente células epiteliales y fibroblastos, logrando replicarse dentro de éstas y diseminarse posteriormente. También posee resistencia a los radicales libres del proceso de fagocitosis ejercido por células del sistema inmune innato como macrófagos y neutrófilos. Esto permite que *Porphyromonas gingivalis* pueda evadir y alterar el tipo de respuesta inmune, incrementándose así el proceso inflamatorio, conllevando a la cronicidad la destrucción de los tejidos de sostén del diente ^{9,10}.

El objetivo del tratamiento periodontal es detener la progresión de la enfermedad periodontal y devolver la condición compatible con salud a los tejidos periodontales, mediante la remoción de los *biofilms* bacterianos y sus productos por métodos mecánicos - pulido y alisado radicular - y adicionalmente adyuvantes como antibióticos ^{11,12}.

La utilización de antibióticos en conjunto con la terapia periodontal mecánica permite reducir y controlar la población bacteriana de los sitios afectados y de zonas que potencialmente pueden recolonizar los sitios tratados. Debido a que el tratamiento periodontal mecánico no alcanza todos los lugares, se emplea la administración sistémica de estos fármacos. Los más empleados son amoxicilina, metronidazol, azitromicina, doxiciclina, minociclina, solos o en específicas combinaciones como amoxicilina + metronidazol. Entre las ventajas de la administración sistémica tenemos que posibilita abarcar múltiples bolsas periodontales y difundirse en otras zonas de la cavidad oral, en donde pueden mantenerse reservorios de bacterias, sin embargo, tiene la desventaja de producir reacciones adversas y resistencia bacteriana. Por ello se ha planteado la administración local de antibióticos que permite mayor concentración del principio activo en el saco periodontal, menor riesgo de reacciones adversas o resistencia bacteriana ¹³. Pero tienen la desventaja que son lentas y existe mayor riesgo de recidiva ¹⁴.

Minociclina se aplica principalmente por vía local dentro de los sitios periodontales afectados demostrando efectividad contra bacterias periodontopatógenas ¹⁵, evita la recolonización bacteriana y presenta concentraciones altas locales en corto plazo ¹⁶. Posee actividad antiinflamatoria e inmunomoduladora ¹⁷, siendo esta característica similar en otras tetraciclinas como doxiciclina ¹⁸, sin embargo, la capacidad de penetración tisular de minociclina es mayor ¹⁹ aunque disminuida, así como el tiempo de acción o retención en el sitio aplicado ²⁰.

Sistemas de liberación lenta o controlada de fármacos (antibióticos) basados en nanopartículas, no solo entregan los compuestos activos encapsulados por tiempo prolongado como los sistemas de liberación particulados o microparticulados, además, mejoran la penetración de los fármacos en los tejidos y mejoran sus propiedades antimicrobianas ²¹.

2.1.- *Pophyromonas gingivalis*

Es una Bacteria Gram (-) asacarolítica, emplea compuestos nitrogenados como fuente energética. Posee múltiples factores de virulencia, entre los cuales destacan: La cápsula, de acción antifagocitaria y adherencia celular, lo que le permite unirse a la superficie de células del hospedero, inicialmente células epiteliales, con posterior internalización en estas. *P. gingivalis* puede sobrevivir en fagosomas, así como suprimir la apoptosis y adaptarse al estrés oxidativo ²².

El antígeno K o polisacárido capsular, está conformado por glucosa, glucosamina, galactosa, galactosamina, 2-acetamido-2-deoxy-D-glucosa, incluyendo ácidos como el manurónico, glucorónico, galacturónico y galactosaminurónico ²³. Este antígeno K, presenta 6 serotipos, que son K1, K2, K3, K4, K5, K6. La evidencia sugiere que, de todos los serotipos mencionados, K1 y K2, inducen mayores expresiones de citoquinas proinflamatorias tales como IL-1 β , IL-6, IL-12, IFN- γ , TNF- α y TNF- β ²⁴. Serotipos de *P. gingivalis* K1 y K2, han sido asociados con el incremento del ligando del receptor activador del factor nuclear k B (RANKL), el cual induce la osteoclastogénesis ²⁵.

La membrana externa, implicada en mecanismos de adhesión y coagregación bacteriana, formación de vesículas transportadoras de proteasas y endotoxinas, presenta como principal elemento al lipolisacárido (LPS), el cual está compuesto por tres dominios con enlace primario covalente entre sí, estos son: Lípido A, relacionado a la actividad endotóxica; el núcleo, estructura compuesta por un octil glucósido como el ácido 2-ceto-3-desoxioctulosónico; el antígeno O, polisacárido ubicado en la zona más externa del LPS, tiene 3 serotipos descritos (O1, O2, O3), representando variabilidad en su presencia por especie, además de inducir la producción de citoquinas proinflamatorias por células del sistema inmune ^{26,27}. Está descrito que el LPS es reconocido e interacciona con los receptores tipo Toll 2 y 4 de neutrófilos y monocitos, inhibiendo la apoptosis ^{28,29}.

Estructuras en forma de filamentos llamadas fimbrias, ubicadas en la superficie, le otorgan a *P. gingivalis* la capacidad de invasión tisular. Constan de dos

subunidades: Fimbrilina, cuyo gen es *fimA*; y Mfa, de gen *mfa*. Se describen 6 genotipos del gen *fimA*, los cuales son: I, Ib, II, III, IV, V. Los genotipos asociados principalmente a periodontitis crónica son el tipo II y IV. Hay evidencia que indica que el genotipo II, puede evitar la fagocitosis ejercida por macrófagos, así como aumentar la expresión de RANKL ²⁶.

Respecto a la producción de enzimas, *P. gingivalis* produce diversos tipos de enzimas, de las cuales, las proteasas, en mayor medida influyen en el proceso de destrucción del ligamento periodontal, tejido conectivo y reabsorción ósea, así como destrucción de proteínas reguladoras y permeabilidad vascular. Inducen producción de metaloproteasas, las cuales degradan la matriz extracelular ³⁰. Entre las más importantes están las gingipainas. A su vez, estas pueden ser gingipainas *RgpA* y *RgpB* con genes codificados como *rgpA* y *rgpB* respectivamente y gingipaina *Kgp* cuyo gen es *kgp*. Gingipaina *RgpB*, se encuentra asociada a la formación de edema por activación de la vía calicreína/quinina, Gingipaina *RgpA* asociada al infiltrado polimorfo nuclear inducido por la activación del sistema de complemento y Gingipaina *Kgp* asociada al sangrado gingival por degradación del fibrinógeno ³⁰.

2.2.- MINOCICLINA

La minociclina es un antibiótico semisintético de segunda generación, derivado de la tetraciclina. La nomenclatura IUPAC la define como una 7-dimetilamino-6-dimetil-6-desoxitetraciclina, modificada de la tetraciclina por la eliminación del grupo metilo y grupos hidroxilo (Carbono 6) y la adición de un grupo dimetilamino (Carbono 7). Este cambio le confiere a la minociclina un aumento de la vida media y la absorción oral, además la capacidad de evitar los mecanismos de resistencia presentados frente a las tetraciclinas. Es utilizada contra bacterias aerobias y anaerobias Gram (+) y Gram (-) ³¹.

La minociclina presenta propiedades lipofílicas, mostrando excelente biodisponibilidad. Presenta un coeficiente de partición mayor a pH neutros. Su peso molecular es 493.94 Da y su fórmula química es $C_{23}H_{27}N_3O_7$ ³².

El mecanismo de acción es mediante la inhibición de síntesis de proteínas bacterianas. Por difusión pasiva principalmente, a través de canales de porina presentes en la membrana externa bacteriana, alcanza el ribosoma y se une a la subunidad 30S, evitando la asociación de aminoacil-tRNA con el ribosoma bacteriano ³³.

Es de absorción rápida, el porcentaje de absorción oscila entre 95% a 100%, por vía oral. Presenta aumento de la concentración máxima 2 a 4 horas después de la administración oral. Posterior a una dosis de 200 mg, la concentración máxima oscila entre 2 $\mu\text{g/mL}$ a 4 $\mu\text{g/mL}$ ³⁴. Si se prosigue con una dosis de 100mg dos veces al día, luego de la dosis inicial de 200 mg, se mantienen concentraciones séricas entre 2.3 $\mu\text{g/mL}$ – 3.5 $\mu\text{g/mL}$ ³⁵. Se distribuye uniéndose 75% a proteínas. El volumen de distribución es 1.17L/kg. Existen al menos 6 metabolitos descritos, de los cuales el principal es 9-hidroxicimociclina ³⁶. Posee una vida media de 15 a 19 horas. La eliminación principal es por vía fecal que es del 20% a 35%.

La disponibilidad de los datos sobre la farmacodinamia, se basan en una dosis de 200 mg al día o 100 mg 2 veces al día por una semana administrados oralmente o por vía intravenosa durante 30 a 60 min ³⁴. Generalmente es bien tolerada, los efectos adversos principales varían en su manifestación entre 11.7% a 83.3%, entre los más comunes son, mareos, vértigos, náuseas, vómitos ³⁷.

Por otro lado, la minociclina además de sus propiedades antimicrobianas presenta actividad antiinflamatoria, antiapoptótica, inhibición de la proteólisis y supresión de la angiogénesis ³⁸⁻⁴¹. Entre los mecanismos que podrían explicar las propiedades antiinflamatorias e inmunomoduladoras de la minociclina, están la inhibición de actividades enzimáticas ⁴², capacidad antioxidante ⁴³, inhibición de la vía de la caspasa 1 y activación de la vía de la caspasa 3 ⁴⁴, efecto antiapoptótico ⁴⁵, e inhibición de la poli (ADP Ribosa) polimerasa-1 ⁴⁶.

De acuerdo con la farmacopea de Estados Unidos, las presentaciones de administración de minociclina son en cápsulas, tabletas, suspensión oral e inyectable, siendo la base de estas el clorhidrato de minociclina, que contiene el equivalente de al menos 890 µg y no más de 950 µg por mg. Presenta un pH entre 3.5 y 4.5 por solución conteniendo el equivalente de 10 mg de minociclina por mL. La minociclina presenta solubilidad en agua (52mg/ml) y en solventes orgánicos como EtOH (10mg/ml) ⁴⁷.

2.3.- APLICACIONES LOCALES DE MINOCICLINA EN TERAPIA PERIODONTAL

La aplicación local coadyuvante de antibióticos en la terapia periodontal otorga altas concentraciones de los compuestos activos en los sitios afectados, menor resistencia bacteriana y disminución de reacciones adversas a corto plazo ¹⁴. En consecuencia, para mantener estas ventajas por mayor tiempo, sería necesaria la aplicación repetida de los activos o ejercer control sobre la velocidad de entrega del fármaco y el sitio de aplicación. Es así como surge el concepto de sistemas de liberación controlada de fármacos (SLC), los cuales permiten la entrega de una droga a velocidad y localización establecida por un periodo de tiempo específico en función de las características y requerimientos del lugar de aplicación. Así mismo, de acuerdo al tamaño, pueden ser SLC particulados, microparticulados y nanoparticulados ⁴⁸.

Distintos vehículos son empleados para encapsular los fármacos, que luego son liberados por diversos mecanismos, tales como difusión, erosión o procesos osmóticos ⁴⁹. Se plantea que el modelo de liberación ocurre en tres fases, la primera es la ráfaga, en donde se entrega el fármaco ubicado en la superficie de la estructura nanoparticulada, la segunda fase consta de un periodo lento de entrega, dependiendo del tipo de sistema de encapsulamiento o peso molecular del polímero utilizado y finalmente, la tercera fase, es la erosión o difusión acelerada de entrega ⁵⁰.

La vía de administración local de sistemas de liberación particulados y microparticulados de minociclina, presentan aumento de la actividad antimicrobiana dentro de la bolsa periodontal, con mayor concentración del antibiótico por algunos días en el sitio de aplicación e inhibición del desarrollo de especies resistentes y efectos adversos mínimos ⁵¹. Entre los SLC de aplicación local de minociclina para el tratamiento de la enfermedad periodontal se describe una película de etilcelulosa y polietilenglicol cargada al 30% de minociclina ⁵². Gel de Minociclina (2%), contiene vehículo de hidroxietilcelulosa, la concentración de minociclina base es de 2 mg ⁵². Microesféras cargadas con Minociclina en ácido poli (láctico-co-glicólico) inyectables. La concentración de minociclina base es 1 mg ⁵³. Ungüento de minociclina al 2% ⁵³. Tiras de minociclina (1,4mg) utilizando como vehículo policaprolactona ⁵⁴. Microcápsulas de alginato y quitosano cargadas con minociclina al 10% biodegradables ⁵⁵.

Existen varios estudios que evaluaron clínica y microbiológicamente, la administración local de minociclina como coadyuvante del tratamiento periodontal no quirúrgico principalmente. En ellos se determinó la eficacia de la minociclina en conjunto con el pulido y alisado radicular, encontrándose que la minociclina microencapsulada en ácido poli (láctico-co-glicólico) de 1 mg, redujo bacterias periodontopatógenas en sitios con bolsas periodontales mayores a 6 mm. Los niveles de concentración terapéuticos se mantuvieron mayores a 1 µg/mL por 14 días en el fluido crevicular gingival. También hubo decrecimiento de los parámetros como la profundidad de sondaje ⁵⁶. En recuentos bacterianos se demostró la efectividad en la reducción de *Porphyromonas gingivalis* posteriormente a 30 días del tratamiento, resultando en una diferencia significativa comparándolo con el pulido y alisado radicular solo ⁵⁵. La administración de gel de minociclina al 2% sin pulido y alisado radicular, resultó en la disminución de parámetros clínicos como la inflamación, sangrado y supuración en 7 días desde la aplicación ⁵⁷.

In vivo, la minociclina aplicada localmente en ungüento inhibe significativamente la inflamación gingival, sin embargo, al compararla con dosis de minociclina sub antimicrobianas administradas de forma sistémica, fue menos efectiva en cuanto

a la reducción de pérdida ósea. Además, la concentración del fármaco tanto en el ligamento periodontal y cresta ósea fue baja. Esto sugiere que el alcance de la administración tópica es limitado a las áreas externas del tejido gingival ⁵⁸.

Microcápsulas de alginato y quitosano cargadas con minociclina al 10%, inyectadas en surcos gingivales de pacientes, mantuvieron la concentración del fármaco en los sitios tratados durante una semana. Los resultados mostraron reducción microbiológica y estado periodontal compatible con salud mayor en comparación con los sitios tratados sólo con pulido y alisado radicular ⁵⁹. Del mismo modo, microesferas de PLGA cargadas con minociclina de 1 mg, liberaron el fármaco hasta dos semanas ⁶⁰ y redujeron la profundidad de sondaje después de 9 meses de terminado el tratamiento periodontal como coadyuvante del pulido y alisado radicular ⁶¹.

2.4.- SISTEMAS NANOPARTICULADOS DE LIBERACIÓN CONTROLADA APLICADOS A PERIODONCIA

A diferencia de los SLC particulados y microparticulados, la incorporación de tecnología a escala nanométrica en los SLC permite que los fármacos o materiales empleados presenten propiedades químicas y físicas significativamente diferentes a las propiedades de estos a macro escala ⁶². Aunque el concepto de nanopartículas implica partículas cuyo tamaño es menor a 100 nm, en la práctica, resulta inviable obtener homogéneamente esos diámetros, por lo tanto se acepta, en el caso de nanoemulsiones, los tamaños de las gotas menores a 200 nm ⁶³. Por otro lado, los sistemas de liberación controlada de fármacos particulados y microparticulados presentan limitaciones en sus mecanismos de acción. Las principales identificadas de la administración de antibióticos, tanto por vía sistémica y local, tenemos: Baja penetración o difusión intracelular, inactivación del antibiótico por el pH ácido lisosomal y el rápido mecanismo de entrada-salida intracelular ⁶⁴. A su vez, los SLC administrados localmente por vía oral, presentan pérdida rápida del fármaco desde el sitio de absorción por el barrido salival y estrés

mecánico, distribución irregular de las drogas en saliva, desagradable sabor y sensación en boca, permeabilidad relativa de la mucosa oral ⁶⁵.

La encía y paladar son considerados sitios útiles para liberación local de fármacos, debido a los niveles concentrados del compuesto activo liberado en el lugar de aplicación, mínima absorción sistémica, bajo efectos adversos e interacciones medicamentosas ⁶⁶. El epitelio de la mucosa oral contiene entre 40 a 50 capas de células de espesor aproximadamente, de acuerdo con el sitio. En el caso de la mucosa masticatoria (encía y paladar), el epitelio queratinizado presenta un espesor de 200 y 250 μm respectivamente ⁶⁷. Representando el 25 % de la superficie total de mucosa oral ⁶⁸. La función de barrera de la mucosa oral se centra en el complejo basal y en los espacios intercelulares de la capa epitelial superficial, específicamente en el tercio superior ⁶⁹. Determinados compuestos pueden ser transportados atravesando la membrana de la mucosa por mecanismos de difusión pasiva, transporte activo por portador y endocitosis, sin embargo, la difusión o penetración en el sitio de acción es limitada ⁷⁰.

Se han desarrollado SLC nanoparticulados de administración local en vehículos biocompatibles y biodegradables para el tratamiento de enfermedades periodontales ⁷¹. Estos sistemas pueden incorporarse a formulaciones orales como pastas o hidrogeles. También pueden aplicarse dentro de la bolsa periodontal, mejorando el efecto terapéutico ^{72,73}. La principal ventaja de los sistemas nanoparticulados, es la capacidad de difusión y penetración a zonas extracelulares e intracelulares ^{74,75,76}. Otras ventajas de los SLC nanoparticulados es que posibilitan manipular la mejora de la solubilidad o la velocidad de la liberación del fármaco a través de la variación del acople entre la hidrofobicidad o hidrofiliidad de la droga y el vehículo usado ⁷⁷, y según el enfoque de resistencia bacteriana, la efectividad de un fármaco puede ser restaurada frente a bacterias con genes de resistencia, empleando antibióticos cargados en nanopartículas, además de disminuir la toxicidad del fármaco ⁷⁸.

Las nanopartículas pueden penetrar el epitelio de unión del fondo del saco periodontal, liberar el fármaco, con una tasa fija y por un periodo de tiempo prolongado ⁷⁹. Presentan también mejor estabilidad en fluidos biológicos, a pesar de esto, no existen muchos estudios sobre la preparación de nanopartículas antibacterianas en la terapia periodontal ^{80,81}.

Entre los SLC nanoparticulados de aplicación periodontal se describen nanopartículas cargadas con triclosán de diámetro menor a 500 nm, para administración local intra saco periodontal *in vivo*. PLGA, PLA y acetato ftalato de celulosa fueron los polímeros utilizados para la preparación de estos sistemas. El porcentaje de liberación del triclosán fue del 9%. Las nanopartículas de triclosán disminuyeron significativamente la inflamación de los sitios experimentales después de 15 días en comparación con los sitios control ⁸². Extractos naturales como el de hoja de Harungana Madagascariensis (Nativa de África y Madagascar) han sido nanoencapsulados en matrices a base de PLGA. El tamaño de las nanopartículas fue menor a 300 nm y en evaluaciones *in vitro* frente a cepas bacterianas orales relacionadas a caries y gingivitis presentaron efecto antibacteriano aumentado comparado con el control ⁸³. Por otro lado, nanopartículas cargadas con minociclina en matriz de PLGA recubiertas, mostraron liberación del activo hasta dos semanas y la concentración mínima inhibitoria y concentración mínima bactericida fue dos veces inferior comparándolas con el fármaco libre *in vitro* ⁷⁹. También nanopartículas de quitosano encapsulando fluoruro de sodio o cloruro de cetilpiridinio se probaron, obteniendo tamaños entre 100 a 500 nm, alcanzando una liberación por 10 horas aproximadamente ⁸⁴.

2.5.- NANOEMULSIONES

Las emulsiones son resultado de la interacción de dos fases: una fase oleosa y otra fase acuosa, además de la acción de compuestos surfactantes, que permiten la formación de una capa entre ambas fases, aumentan la fuerza de repulsión entre las partículas presentes y estabilizan la emulsión. Las emulsiones pueden ser de tipo: aceite en agua (O/W) o agua en aceite (W/O). Se considera nanoemulsión cuando el tamaño de las gotas de la fase dispersa oscila entre 20 a 200 nm ⁶³. A pesar de ello, aún no existe consenso sobre el tamaño final alcanzado mediante esta técnica en comparación con el tamaño alcanzado de las partículas mediante emulsión convencional, las que presentan tamaños entre 20 a 500 nm ⁸⁵. Está demostrado que las nanoemulsiones encapsulan y liberan compuestos lipofílicos como fármacos, entre otros ⁸⁶. Existen métodos de alta o baja energía para elaborar las nanoemulsiones. Aquellos de alta energía, producen fuerzas por medio de equipos que rompen las fases establecidas de aceite y agua, generando gotas de aceite a escalas de tamaño significativamente menores. Por otra parte, los métodos de baja energía, como la emulsificación espontánea, provocan la formación de gotas de aceite incluidas en un sistema mixto de aceite, agua y surfactante, a través de la manipulación de las condiciones de la emulsión o del ambiente ⁸⁷.

2.5.1.- Emulsificación espontánea (EE)

Este método se fundamenta en el proceso de difusión de elementos constituyentes como surfactantes o co-surfactantes de la fase orgánica a la fase acuosa, logrando nanoemulsiones de tipo O/W, ocasionando un aumento significativo de la capa interfásica. El proceso de dilución con la fase continua se desarrolla a temperatura constante y sin alteraciones de la fase en la emulsificación ⁸⁵.

Para elaborar nanoemulsiones antimicrobianas estables, se describe en el método de EE, mezclas de carvacrol y TCM (Triglicéridos de cadena mediana) más la utilización de Tween (surfactante no iónico). Estos componentes fueron mezclados y luego incorporados lentamente en una fase acuosa con buffer citrato 5 mM, pH

3,5, con un flujo constante de 2 mL/min, a 500 rpm y 25°C. Se determinó que, según las concentraciones y cantidades de los elementos constituyentes de la fase oleosa, alteraron significativamente los parámetros de caracterización, como el diámetro de gota, estabilidad y actividad antimicrobiana. Por ejemplo, concentraciones altas de carvacrol, reducen la estabilidad de la nanoemulsión, mientras aumenta el diámetro de gota en condiciones de almacenamiento, sin embargo, la actividad antimicrobiana se incrementó ⁸⁸.

2.6.- Antecedentes de nanoemulsión de minociclina

La información disponible respecto a la formulación de SLC basados en nanoemulsión de minociclina es insuficiente, no obstante, de acuerdo a los antecedentes expuestos las formulaciones nanoparticuladas de minociclina aplicadas en terapia periodontal para administración *in situ* podrían aumentar la actividad antimicrobiana de la minociclina, mediante la internalización de las nanogotas en los sitios afectados a niveles más profundos donde los sistemas microparticulados o particulados no alcanzan, así como por la mayor afinidad a las membranas biológicas. Además, debido a su capacidad de transporte en uniones celulares y paracelulares, podrían disminuir la presencia intracelular de *Porphyromonas gingivalis* en células infectadas. La ejecución de estos procesos en conjunto con el raspado y alisado radicular implicaría la reducción de los valores en parámetros clínicos presentados en la periodontitis y la disminución de la recurrencia de la enfermedad.

Según los antecedentes revisados, la aplicación de sistemas nanoparticulados de minociclina en terapia periodontal es insuficiente, así como el desarrollo de estos sistemas por otros métodos como emulsificación espontánea, por tanto consideramos la necesidad de formular SLC nanoparticulados de minociclina por el método descrito y comparar su actividad antimicrobiana *in vitro* con minociclina sin encapsular.

3.- HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

3.1.- Hipótesis

Nanoemulsión de minociclina obtenida por emulsificación espontánea presenta efectividad antimicrobiana sobre *Porphyromonas gingivalis*

3.2.- Objetivos

3.2.1.- Objetivo General

Determinar la efectividad antimicrobiana de nanoemulsión de minociclina obtenida por emulsificación espontánea sobre *Porphyromonas gingivalis*

3.2.2.- Objetivo específico

- a) Desarrollar nanoemulsión de minociclina mediante el método de emulsificación espontánea a distintas concentraciones.
- b) Caracterizar la nanoemulsión de minociclina
- c) Corroborar la incorporación cuantitativa de minociclina en nanoemulsión
- d) Cuantificar la cinética de liberación de la minociclina encapsulada en nanoemulsión
- e) Evaluar la actividad antimicrobiana *in vitro* de nanoemulsión de minociclina sobre dos cepas de *Porphyromonas gingivalis*

4.- MATERIALES Y MÉTODOS

4.1.- Materiales

- Clorhidrato de Minociclina (Mc). (Bagó, Chile. C508056-1)
- Miglyol 812 (Mgl). (Sasol Germany GmbH. Witten, Alemania)
- Agua ultra purificada Milli-Q
- Tween 80[®]. (Chemix[®], C200408)
- Cepas bacterianas de colección de *Porphyromonas gingivalis*
 - Cepa encapsulada W 83
 - Cepa no encapsulada ATCC[®] 33277

4.2.- Fabricación de Nanoemulsión

4.2.1.- Método de emulsificación espontánea

El método descrito ⁸⁸ se aplicó con algunas modificaciones.

Se preparó la fase oleosa, mezclando una solución de clorhidrato de minociclina (50, 100, 200 mg individuales) en etanol absoluto (4,5 mL), con 5,5 mL de Miglyol[®] 812 a agitación constante por 15 min, luego se adicionó 10 mL del agente surfactante (Tween 80[®]) por 30 minutos a 500 rpm de agitación. Posteriormente se adicionó por goteo esta mezcla a la fase acuosa (agua ultrapura Milli-Q) por medio de una bomba de infusión (modelo KDS200, KD Scientific©) con un flujo de 0,5 mL/min en agitación constante y temperatura ambiente. Finalmente se dializaron las muestras y se almacenaron en refrigeración a 4°C. La razón surfactante-aceite (SOR) se ajustó a 1, considerando una proporcionalidad de 10% (v/v) de fase oleosa (Clorhidrato de minociclina + Miglyol[®] 812), 10% (v/v) de surfactante (Tween 80[®]) y 80% (v/v) de fase acuosa (agua ultrapura Milli-Q).

4.3.- Caracterización de nanoemulsión de minociclina

4.3.1.- Determinación del tamaño, potencial Z e índice de polidispersidad de nanoemulsión de minociclina

Se obtuvieron los valores de estos parámetros con la técnica de dispersión de luz dinámica (DLS), usando el equipo Zetasizer Nano ZS-90 (Malvern Instruments). Se diluyó la nanoemulsión en agua ultrapura Milli-Q a 1/10 de la concentración inicial, cargándola luego en celdas capilares plegadas (DTS1070) con 1mL. Las condiciones del análisis fueron a 25°C, dispersante: agua y láser 633nm. Se tomaron 4 mediciones en tiempos diferentes por triplicado: 1, 7, 15, 21 días después de elaboradas las nanoemulsiones.

4.3.2.- Caracterización fisicoquímica

De acuerdo con el método descrito en la literatura ⁸⁸, con algunas modificaciones, fueron evaluados los parámetros:

- Densidad: Alícuotas de 5 mL de la nanoemulsión se pesaron en una balanza analítica (Radwag, AS 220/C/2, Polonia)
- pH: se midió a través de un pH metro (Jenway, 370 pH Meter, China), a temperatura ambiente.

4.3.3.- Microscopía de transmisión electrónica (TEM)

Se observó la nanoemulsión de minociclina en suspensión por TEM (Microscopio Tecnai 12, Philips), sobre grillas de cobre cargadas negativamente, secadas con tiras de papel filtro y fijadas con acetato de uranilo. Adicionalmente se midieron los tamaños en un microscopio JEOL modo SEM/TEM (modelo JSM-IT300LV, Japón).

4.3.4.- Espectroscopia infrarroja transformada de Fourier (FTIR)

Se utilizó un espectrofotómetro infrarrojo *spectrum* 400 (Perkin Elmer. UK), con un accesorio atenuador de reflectancia (Perkin Elmer. UK). Las mediciones de las muestras se realizaron con registros de escaneos en regiones espectrales desde 650 cm⁻¹ hasta 4000 cm⁻¹ de resolución.

4.4.- Corroboración de incorporación de minociclina en nanoemulsión

4.4.1.- Análisis cuantitativo de minociclina en los vehículos por espectrofotometría UV.

4.4.1.1.- Capacidad de carga y eficiencia de encapsulación

Se identificó y cuantificó la carga de minociclina, así como la eficiencia de encapsulación de ésta en las muestras de nanoemulsión por UV utilizando un espectrofotómetro (Jenway 7305) a 280 nm de longitud de onda. Las nanoemulsiones de minociclina fueron dializadas en agua destilada utilizando una membrana de corte molecular de 12000 Da, determinándose la carga del activo por diferencia de concentración posterior a la diálisis, mediante una curva de calibración de minociclina. La eficiencia de encapsulación se estableció por la ecuación 1⁸⁸.

$$\text{(Ecuación 1): } EE\% = \frac{\text{Masa de minociclina cargada en nanoemulsión}}{\text{Masa inicial de minociclina agregada}} \times 100$$

4.5.- Cuantificación de cinética de liberación de minociclina encapsulada en nanoemulsión.

El método utilizado fue el sistema de celdas de Franz de flujo continuo, donde la minociclina liberada de las muestras difundió hacia un compartimiento receptor a través de una membrana (Durapore VMWP Millipore) de 0,05 µm de diámetro de poro, a una tasa de 20 µL/min de flujo y temperatura ambiente. Las mediciones se realizaron en 8 tiempos diferentes (0.5,1,3,7,11,15,19,24 horas). El medio utilizado fue buffer fosfato pH 7,4 (0,05 M). Las muestras extraídas se analizaron por espectrofotometría UV a 280 nm de longitud de onda y cuantificaron con curva de calibración del activo.

4.6.- Evaluación de la actividad antimicrobiana *in vitro* de nanoemulsión de minociclina sobre *Porphyromonas gingivalis*

4.6.1.- Cepas bacterianas de referencia

Porphyromonas gingivalis, cepas W83 y ATCC 33277 se encuentran disponibles en el laboratorio de microbiología oral de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile.

I) Siembra y Cultivo

Se sembró en medio de cultivo agar sangre suplementada (5% sangre desfibrinada de caballo, 5 µg / mL de hemina, y 1 µg / mL menadiona). Incubándose a 37°C por 4 – 7 días, en condiciones anaerobias, utilizando un generador de anaerobiosis comercial (AnaeroGen™, Oxoid Ltd.)⁸⁹.

4.6.2.- Determinación de la concentración bactericida mínima (CBM)

Se sembró y cultivó en caldo nutritivo durante 24 horas a 37°C en condiciones anaerobias (cámara anaeróbica) con agitación a modo de saturar el cultivo. Se determinó la concentración de microorganismos comparándolo con el método estándar McFarland 0,5 y se diluyó hasta lograr una concentración de 1×10^5 UFC/mL. Después se agregaron las muestras de nanoemulsiones de minociclina a diferentes concentraciones en diluciones seriadas, así como nanoemulsión sin carga y posteriormente se incubaron a 37°C por 48 horas. Luego se tomaron 100 µL de cada tubo de las diluciones y se sembraron en placas con agar sangre suplementada (5% sangre desfibrinada de caballo, 5 µg / mL de hemina, y 1 µg / mL menadiona), para finalmente ser incubadas a 37°C por 4 a 7 días. Se estableció como la concentración mínima bactericida, la concentración mínima capaz de eliminar el 99,9% de las cepas bacterianas descritas de *Porphyromonas gingivalis*⁹⁰.

4.6.3.- Determinación de inhibición del crecimiento por difusión

Las cepas bacterianas de referencia de *Porphyromonas gingivalis* se sembraron en céspedes en placa agar-Sangre suplementado con 5 µg/mL de Hemina – 1 µg/mL Menadiona. y se inocularon 10 µL de las muestras de nanoemulsiones de minociclina en diluciones seriadas en discos de papel filtro estéril de 6mm². Posteriormente se incubaron a 37°C por 4 a 7 días; controlando el crecimiento bacteriano por control positivo y negativo con digluconato de clorhexidina 0,12% y PBS (tampón fosfato salino) respectivamente. Transcurrido el tiempo, se midió el diámetro total de las zonas de inhibición formados por cada disco y se estableció el valor de inhibición en mm⁹⁰. Se determinó como la concentración inhibitoria de crecimiento a aquella mínima concentración cuyo efecto inhibitorio resultara significativamente mayor entre las diluciones por formulación.

4.7.- Análisis estadístico

Se utilizaron el promedio y la desviación estándar como estadígrafos. El test de Shapiro Wilk se usó para analizar la distribución de datos. Luego se empleó el análisis de varianza (ANOVA) o el test de Kruskal Wallis, dependiendo de la distribución de los datos. Además, se requirió de las pruebas Post-Hoc de Tukey o Dunn (de acuerdo con el test paramétrico o no paramétrico seleccionado) para establecer diferencias significativas con un nivel de $P < 0,05$. El programa utilizado fue STATGRAPHICS Centurion XVI ®.

5.- Resultados y Discusión

5.1.- Desarrollo de nanoemulsión de minociclina mediante emulsificación espontánea

Se desarrollaron nanoemulsiones de minociclina por medio del método de emulsificación espontánea (EE) ⁸⁸ con algunas modificaciones, la formulación empleada fue 10% de fase oleosa (5,5mL de Miglyol 812; 4,5mL de solución de minociclina a concentraciones de 50, 100 y 200 mg), 10% de surfactante (10 mL de Tween 80) y 80% de fase acuosa (80 mL de agua ultra pura milli-Q). Dentro de los componentes de la formulación, como vehículo se utilizó el miglyol 812, que es un triglicérido de cadena media (TCM), está compuesto por 58,2% de ácido caprílico y 41,4% de ácido cáprico principalmente ⁹¹, en concordancia con otros trabajos donde se muestra que el uso de estos TCM otorga mayor estabilidad a las nanoemulsiones obtenidas por EE en comparación con los triglicéridos de cadena larga ^{88, 91, 92}.

La adición del Tween 80 (Polisorbato 80) como surfactante aporta reducción de tamaño de las nanogotas y tensión superficial según la razón surfactante a aceite (SOR) ^{93, 94} debido a que, a mayor nivel del surfactante, mayor es el grado de adsorción de éste en la interface entre la fase oleosa y la fase acuosa. A pesar de ello, se ha mostrado que a mayores valores SOR el índice de polidispersidad (PDI) aumenta ⁹⁴. La razón surfactante a aceite (SOR) empleada fue de 1, que se describe como la razón que proporciona tamaños ≤ 200 nm y $PDI \leq 0,2$ preservando la estabilidad de la nanoemulsión ⁹⁵.

En la Fig. 1 se muestra el proceso de elaboración de nanoemulsiones de minociclina mediante el método de emulsificación espontánea.

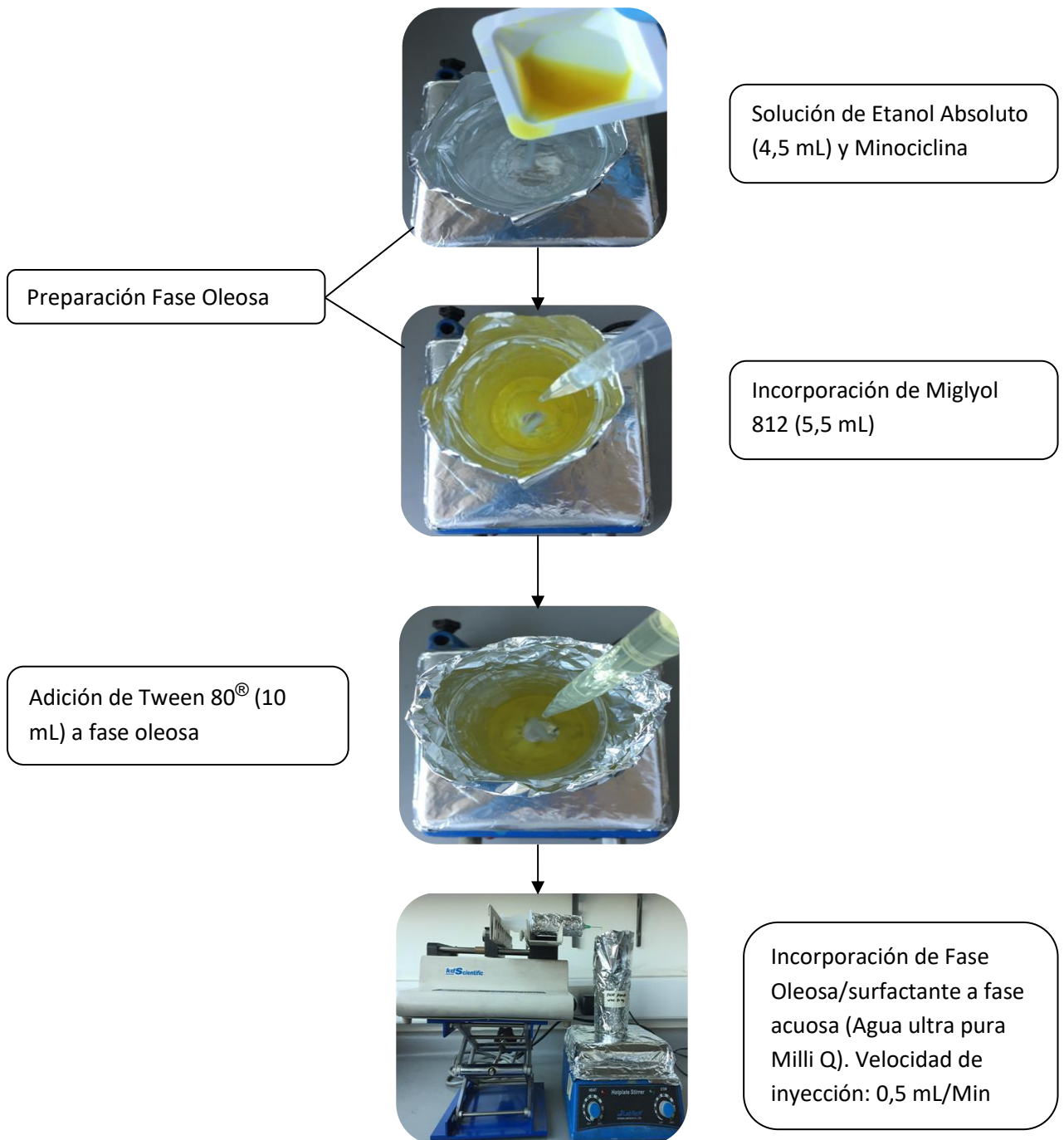


Fig. N°1. Proceso de elaboración de nanoemulsión de minociclina mediante el método de emulsificación espontánea.

5.2.- Caracterización de nanoemulsión de minociclina

5.2.1.- Determinación del tamaño, potencial Z e índice de polidispersidad de nanoemulsiones de minociclina obtenidas por emulsificación espontánea

En la tabla N°1 se detallan los resultados obtenidos de los parámetros descritos. Todas las formulaciones presentaron tamaños menores a 130 nm, índices de polidispersidad $\leq 0,2$ y potenciales Z negativos principalmente. Los valores obtenidos se encuentran dentro del rango señalado en la literatura para ser definidos como nanoemulsiones ($dg \leq 200$ nm) ⁶³ y con distribución reducida del diámetro de las gotas ($PDI \leq 0,2$) ⁹⁶.

Existieron diferencias significativas respecto al tamaño de las nanogotas en relación con la concentración de minociclina, observándose tales diferencias entre el grupo control a 50, 50 a 100 y 50 a 200. La formulación de 50 mg presentó significativamente menores tamaños en comparación con las demás concentraciones y el control. Está descrito que las reducciones de tamaño aplicando este método, podrían explicarse debido al SOR, donde a mayor concentración del surfactante, decrece el tamaño de las gotas ^{88,91,96} por aumento de la adsorción del surfactante en la interface de las fases oleosa y acuosa, disminuyendo la tensión entre éstas y permitiendo la conformación de gotas con menor tamaño ⁹⁴, sin embargo, las muestras formuladas presentan el mismo SOR, lo que sugeriría que una baja dosis de minociclina (50mg), influiría sobre la capa interfacial y sobre la conformación de las gotas, posiblemente por menor encapsulamiento de la concentración. No hubo diferencias significativas de los tamaños en las formulaciones con relación a los días.

Respecto al PDI, solo la formulación con 50 mg de minociclina presentó valores significativamente menores en cuanto a la distribución del tamaño de las gotas en comparación con las otras formulaciones. El PDI tiende a disminuir de acuerdo con la reducción de la razón surfactante a aceite (SOR), lo que le proporciona estabilidad ⁹⁷ sin embargo, como el valor SOR determinado fue 1 para todas las formulaciones, esta reducción de la muestra de 50mg de minociclina, podría

indicar también que bajas dosis de minociclina interactúan en la capa interfacial, aumentando la estabilidad de la nanoemulsión en base a la disminución del PDI.

En cuanto al potencial Z, existieron diferencias significativas ($P < 0.05$) en las formulaciones respecto a la concentración de minociclina y el tiempo. Los valores mostraron que a mayor concentración de minociclina y días transcurridos aumenta el potencial Z, obteniéndose valores de $-5,0 \pm 0,4$ a $-2,2 \pm 0,1$ (control); $-2,9 \pm 0,1$ a $-1,5 \pm 0,2$ (NMc50); $-1,5 \pm 0,5$ a $0,0 \pm 0,1$ (NMc100); $0,7 \pm 0,4$ a $-0,7 \pm 0,0$ (NMc200). Las diferencias se presentaron en los días 1 a 14, 1 a 21, 7 a 14, 7 a 21, y entre las concentraciones de 0 a 50, 0 a 100, 50 a 100 y 50 a 200. Posiblemente estas diferencias se deban al comportamiento ácido de la minociclina, puesto que tiene un PKa de 5,0 en medios ácidos ⁹⁸, y está descrito que si el pH es mayor al PKa, la carga molecular tiende a ser negativa ⁹⁹, sin embargo, los valores del pH de las nanoemulsiones de minociclina fueron: $4,23 \pm 0,0$ (NMc50), $4,10 \pm 0,0$ (NMc100), $4,04 \pm 0,0$ (NMc200), (Tabla N° 2), por tanto al ser el pH menor que el PKa, la minociclina se encuentra menos ionizada que en su estructura inicial, en consecuencia, la carga es menos negativa a mayor concentración del activo, ocasionando aumento del potencial Z.

Tabla N°1. Z-average, PDI y potencial Z de nanoemulsiones de minociclina obtenidas por emulsificación espontánea

Formulación	Día	Z-Average (Nm)	PDI	Potencial Z (mV)
Ne	1	128,3 ± 1,2 ^a	0,25 ± 0,0 ^a	-5,0 ± 0,4 ^{ab}
	7	124,4 ± 0,7 ^a	0,22 ± 0,0 ^{ab}	-6,6 ± 0,7 ^b
	14	124,6 ± 1,9 ^a	0,23 ± 0,0 ^{ab}	-4,2 ± 1,5 ^{ab}
	21	123,5 ± 0,5 ^a	0,21 ± 0,0 ^b	-2,2 ± 0,1 ^{ac}
NMc50	1	103,0 ± 2,3 ^a	0,22 ± 0,0 ^a	-2,9 ± 0,1 ^a
	7	106,5 ± 1,6 ^a	0,20 ± 0,0 ^{ab}	-2,7 ± 0,2 ^a
	14	106,5 ± 1,6 ^a	0,19 ± 0,0 ^{ab}	0,1 ± 0,0 ^b
	21	107,8 ± 1,6 ^a	0,18 ± 0,0 ^b	-1,5 ± 0,2 ^c
NMc100	1	124,2 ± 4,3 ^a	0,24 ± 0,0 ^a	-1,5 ± 0,5 ^a
	7	125,1 ± 3,6 ^a	0,22 ± 0,0 ^a	0,0 ± 0,3 ^b
	14	127,2 ± 2,0 ^a	0,21 ± 0,0 ^a	0,2 ± 0,3 ^b
	21	125,1 ± 2,7 ^a	0,22 ± 0,0 ^a	0,0 ± 0,1 ^b
NMc200	1	123,7 ± 1,6 ^a	0,25 ± 0,0 ^a	0,7 ± 0,4 ^{ab}
	7	123,5 ± 2,1 ^a	0,23 ± 0,0 ^a	-0,08 ± 0,3 ^{bc}
	14	123,5 ± 1,1 ^a	0,22 ± 0,0 ^a	0,4 ± 0,0 ^{bc}
	21	124,0 ± 2,4 ^a	0,21 ± 0,0 ^a	-0,7 ± 0,0 ^c

Letras diferentes indican diferencias significativas intragrupos (p<0.05)

5.2.2- Caracterización físico química de nanoemulsiones

Tabla N°2. Caracterización físico química de nanoemulsiones

	pH	Densidad (g/mL)
Ne	5,04 ± 0,05	1,0059 ± 0,004
NMc50	4,23 ± 0,01	0,9976 ± 0,002
NMc100	4,10 ± 0,02	1,0009 ± 0,000
NMc200	4,04 ± 0,01	1,0023 ± 0,000

5.2.3.- Microscopía de transmisión electrónica (TEM)

Se observaron las nanoemulsiones cargadas con minociclina mediante TEM (Microscopio Tecnai 12, Phillips), utilizando la técnica de tinción negativa con acetato de uranilo fijado sobre grillas de cobre conteniendo las muestras. Las figuras N° 2 a N° 5 muestran las microfotografías de nanoemulsiones sin carga y cargadas con minociclina a concentraciones de 50, 100 y 200 mg. En todas las microfotografías se observa morfología esférica y patrones de aglomeración, concordante con patrones similares reportados para metodologías de obtención de sistemas nanoparticulados como EE¹⁰⁰. Adicionalmente se determinó el tamaño obtenido de las nanogotas en las muestras por medio de un microscopio JEOL (modelo JSM-IT300LV, Japón), mostrando tamaños menores en comparación con los obtenidos por el equipo Zetasizer Nano ZS-90 (Tabla N° 4), estas diferencias ocurren debido a que la medición del tamaño por TEM se realiza directamente sobre la nanogota mientras que el Zetasizer mide el tamaño relacionado al movimiento de éstas en una solución, estableciendo el diámetro hidrodinámico⁸⁶.

Fig. N°2 – N°5. Microfotografías TEM de nanoemulsión de minociclina

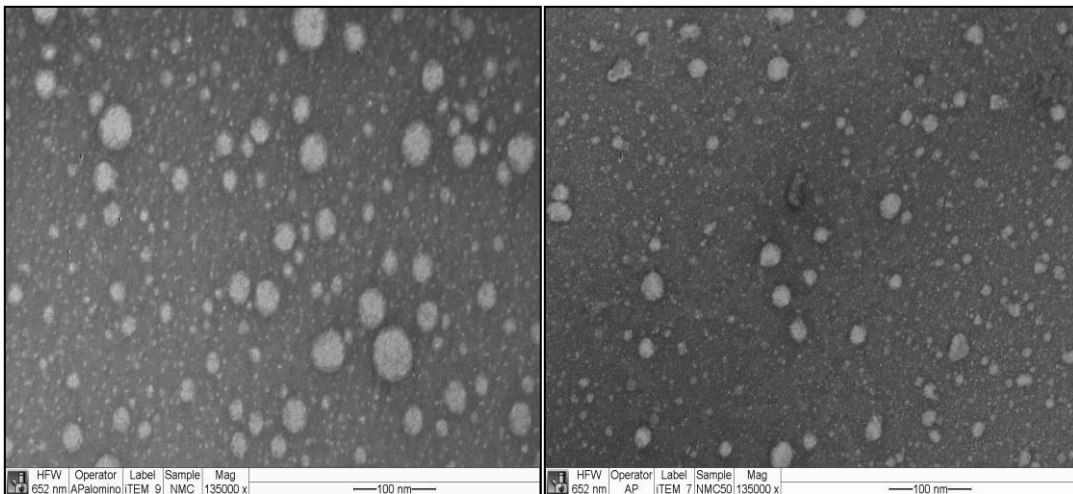


Fig. N° 2. TEM – Nanoemulsión (Control)

Fig. N° 3. TEM – Nanoemulsión de minociclina 50 mg

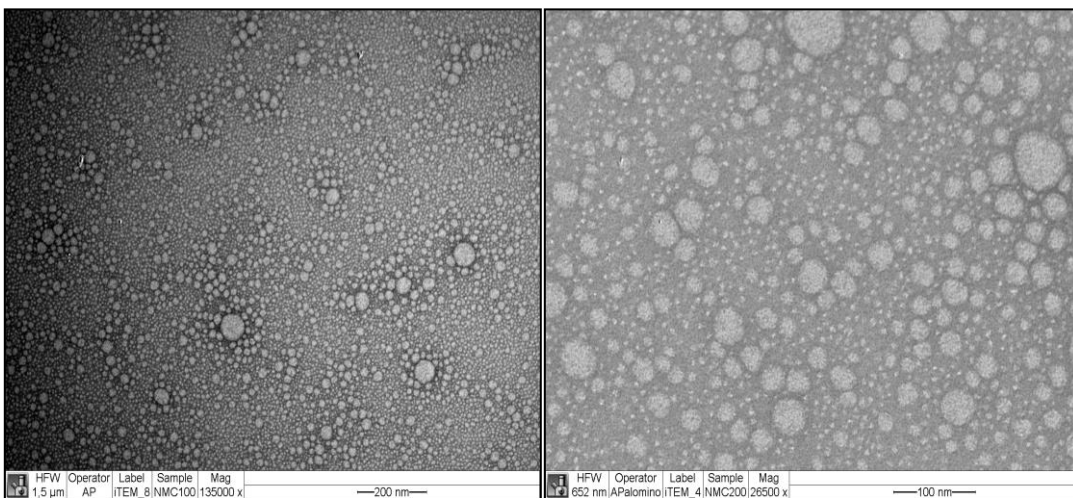


Fig. N° 4. TEM – Nanoemulsión de minociclina 100 mg

Fig. N° 5. TEM – Nanoemulsión de minociclina 200 mg

Tabla N° 3. Tamaño de nanogotas en nanoemulsiones cargadas con Minociclina observadas por TEM

Muestras	Tamaño (nm)
Ne	104,92 ± 30,33
NMc50	133,88 ± 66,23
NMc100	120,64 ± 44,28
NMc200	75,16 ± 25,62

5.2.4.- Espectroscopia infrarroja transformada de Fourier (FTIR)

Se realizaron espectroscopias infrarrojas de las muestras de las nanoemulsiones de minociclina y clorhidrato de minociclina para controlar los grupos funcionales con interacción según la muestra analizada. En la figura N° 6 se presentan los espectros correspondientes a las nanoemulsiones de minociclina, su control sin carga y clorhidrato de minociclina, se observaron espectros similares entre las muestras, encontrándose corrimiento de banda tal como en 1146 cm^{-1} presente en la nanoemulsión control hacia 1152 cm^{-1} en la nanoemulsión cargada con 200 mg, además se muestran señales de bandas intensificados a medida que aumenta la concentración del activo en las muestras, tales como 1649 cm^{-1} y 1746 cm^{-1} presentes principalmente en la muestra de 200mg. Según la referencia del espectro del antibiótico estas señales corresponden a grupos funcionales de tipo amida (1632 cm^{-1})¹⁰¹ y grupo cetona (1742 cm^{-1}) que indican que cuanto mayor sea la concentración del activo, aumentará la intensidad de la señal. Por otro lado, al comparar los espectros de las muestras con carga, existe una señal que no presenta la nanoemulsión control y la nanoemulsión con 50mg de minociclina (1152 cm^{-1}), que correspondería a una enlace C-O-C (éter). Esto plantea que es factible una asociación entre los componentes de la nanoemulsión y la minociclina.

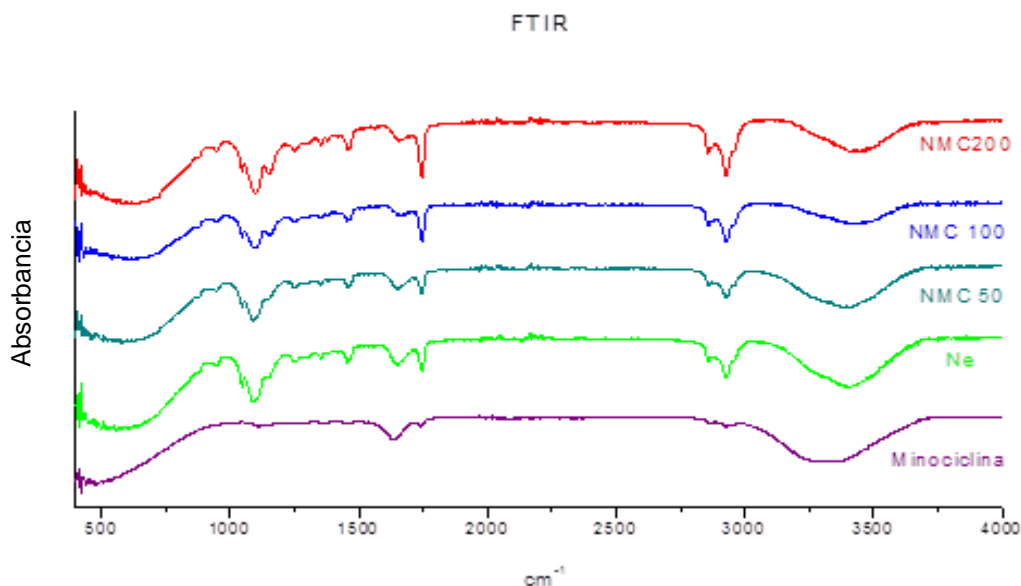


Fig. N° 6. Espectros FTIR de nanoemulsiones de minociclina, nanoemulsión control (Ne) y clorhidrato de minociclina.

5.3.- Corroboración de incorporación de minociclina en nanoemulsión

5.3.1.- Cuantificación de minociclina en vehículos

Se realizó la identificación y cuantificación de minociclina en las muestras de nanoemulsión mediante espectrofotometría UV a 280 nm de longitud de onda, determinándose el porcentaje de capacidad de carga (CC) por concentración, y porcentaje de eficiencia de encapsulación (EE%). En la tabla N°4 se observan los resultados de los parámetros mencionados de las nanoemulsiones de minociclina, observándose que la NMc50 presentó $0,59 \pm 0,1$ mg/mL de CC; $89,0 \pm 0,5\%$ de EE%; la NMc100 tuvo $1,22 \pm 0,3$ mg/mL de CC, $91,4 \pm 0,4\%$ de EE%; la NMc200 obtuvo $2,41 \pm 0,8$ mg/mL y $90,5 \pm 0,3\%$ de EE%. Existieron diferencias significativas entre todos los grupos respecto a la capacidad de carga, mostrando mayores concentraciones cuanto mayor fue la incorporación del agente activo. Por otro lado, sobre la eficiencia de encapsulación, los resultados mostraron solo

diferencias significativas entre la muestra NMc50 y NMc100 ($P < 0.05$). Estos resultados son similares a los reportados para la técnica de emulsificación espontánea, describiéndose valores altos en capacidad de carga y porcentaje de eficiencia de encapsulación de componentes activos ^{102,103}. No obstante, no existe información sobre encapsulamiento de minociclina en nanoemulsión.

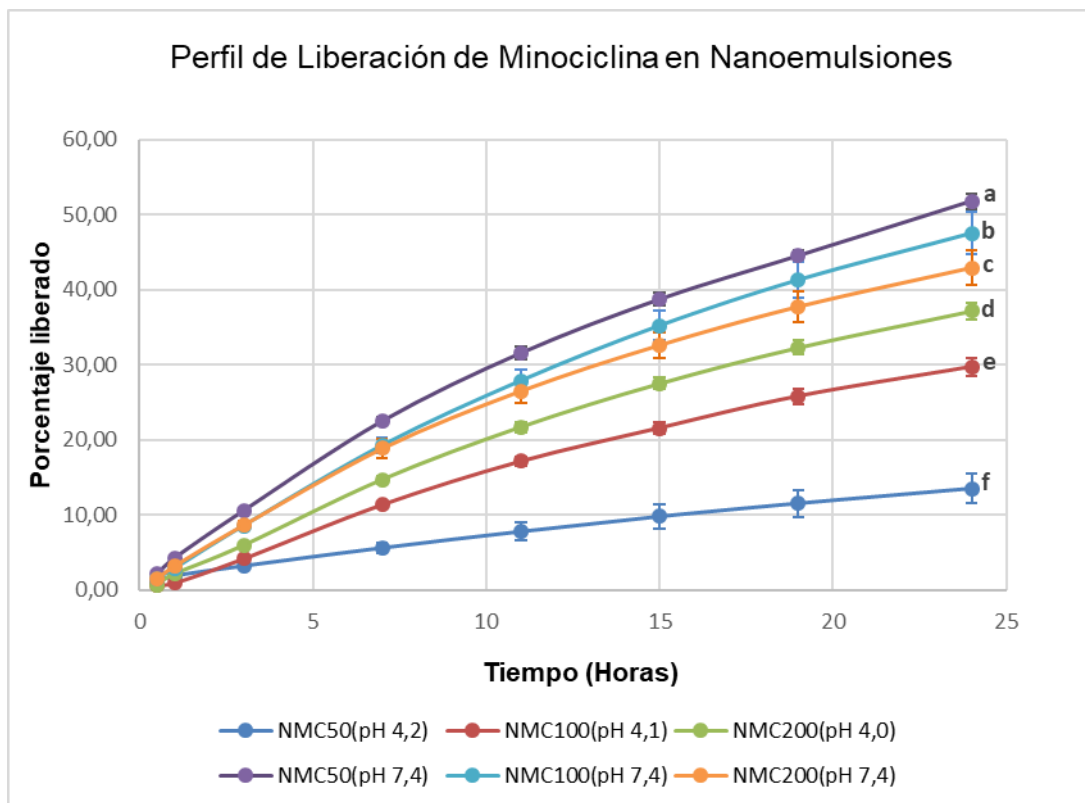
Tabla N°4. Capacidad de carga y eficiencia de encapsulación de nanoemulsiones de minociclina.

Muestra	CC (mg/mL)	EE%
NMc50	$0,59 \pm 0,1^a$	$89,0 \pm 0,5^a$
NMc100	$1,22 \pm 0,3^b$	$91,4 \pm 0,4^{bc}$
NMc200	$2,41 \pm 0,8^c$	$90,5 \pm 0,3^{ac}$

Letras diferentes indican diferencias significativas intragrupos ($p < 0.05$)

5.4.- Cuantificación de cinética de liberación de minociclina encapsulada en nanoemulsión.

La cuantificación se efectuó por el sistema de celdas de Franz a un flujo continuo de 20 $\mu\text{l}/\text{min}$, utilizando una membrana Durapore VMWP, Millipore de 0,05 μm de diámetro de poro y buffer fosfato pH 7,4 (0,05 M) como medio. Se determinó el porcentaje de la minociclina liberada desde las nanoemulsiones de pH 4, además de nanoemulsiones ajustadas a pH 7,4 con la misma formulación, a fin de comparar el comportamiento del perfil de liberación en relación con el pH. La minociclina liberada fue recolectada en tiempos diferentes hasta por 24 horas y luego se cuantificó por UV a 280 nm. En la figura N.º 7 se muestran los perfiles de liberación de las nanoemulsiones de pH 4 y pH 7,4.



Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$)

Figura N° 7. Perfiles de liberación de minociclina desde nanoemulsiones (NMc50, NMc100, NMc200 - pH 4 / NMc50, NMc100, NMc200 - pH 7,4) en buffer fosfato pH 7,4 (0,05 M).

Los resultados mostraron diferencias significativas ($p < 0,05$) de los perfiles de liberación entre y dentro de los grupos de pH 4 y pH 7,4. Liberándose de NMc50(pH 4,2): $13,52 \pm 2,0\%$; de NMc100(pH 4,1): $29,72 \pm 1,13\%$; de NMc200(pH 4,0): $37,21 \pm 1,12\%$ de minociclina respectivamente. A su vez, NMc50(pH 7,4) liberó $51,78 \pm 1,06\%$; NMc100(pH 7,4): $47,52 \pm 2,80\%$; y NMc200(pH 7,4): $42,94 \pm 2,29\%$ de minociclina. Estos datos sugieren que la encapsulación y liberación del componente activo es pH dependiente, así mismo indica que al aumentar el pH, el comportamiento del perfil de las nanoemulsiones tiende a acrecentar la liberación del fármaco, alcanzando valores cercanos al 50% del total encapsulado en 24 horas de las nanoemulsiones ajustadas a pH 7,4, comparándolo con las muestras a pH 4, que presentaron valores significativamente menores.

Estas diferencias podrían explicarse por el aumento de la solubilidad de la minociclina, debido a su PKa en función del pH en la encapsulación. La minociclina posee un valor de 5,0 de PKa ¹⁰⁴ y al aumentar el valor del pH de 4 a 7,4 en la fabricación, los grupos amino presentes en la minociclina podrían interactuar con el medio, aumentando la ionización de la estructura del agente activo, obteniéndose el incremento de la solubilidad y consecuentemente, mayor atrapamiento de la minociclina en las nanoemulsiones. Sin embargo, si bien los valores de encapsulación y liberación en las nanoemulsiones a pH 7,4 son significativamente mayores que los obtenidos por las nanoemulsiones de pH 4, las anteriores presentaron cambios físicos observables a los 21 días aproximadamente, como cambio de coloración, aunque sin separación de fases. Esto indicaría posiblemente inestabilidad¹⁰⁵ en estas formulaciones; cambio que no sucedió en las nanoemulsiones de pH 4.

5.5.- Evaluación de la actividad antimicrobiana *in vitro* de nanoemulsión de minociclina sobre *Porphyromonas gingivalis*

5.5.1.- Determinación de la concentración bactericida mínima (CMB)

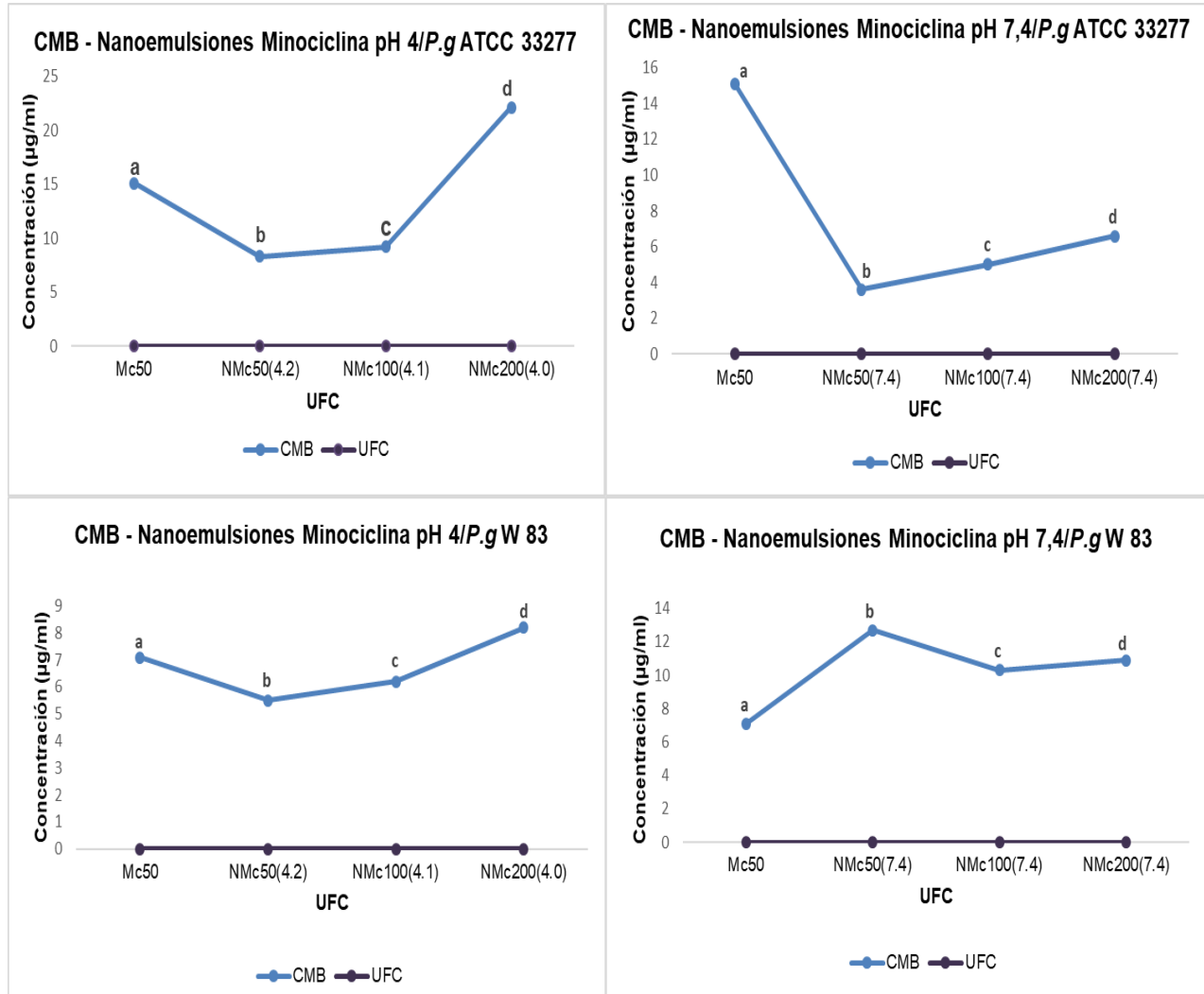
Los resultados obtenidos de la determinación de la CMB se muestran en la tabla N° 5 y en la figura N° 8, donde se detallan las concentraciones mínimas bactericidas de nanoemulsiones de minociclina a 50, 100, 200 mg de pH 4 y 7,4, así como clorhidrato de minociclina 50 mg, sobre las cepas ATCC 33277 y W83 de *Porphyromonas gingivalis*. Las nanoemulsiones control sin carga del activo a pH 4 y 7,4, no presentaron actividad antimicrobiana.

Tabla N° 5. Concentración mínima bactericida de clorhidrato de minociclina 50 mg (Mc50) y nanoemulsiones de minociclina de 50, 100, 200 mg (NMc50, NMc100, NMc200) a pH 4 y 7,4 sobre *P. gingivalis* cepas ATCC 33277 y W83.

Muestras	ATCC 33277	W83
	CMB (µg/mL)	CMB (µg/mL)
Mc50	15,1 ^a	7,1 ^h
NMc50 (pH 4.2)	8,3 ^b	5,5 ⁱ
NMc100 (pH 4.1)	9,2 ^c	6,2 ^j
NMc200 (pH 4.0)	22,1 ^d	8,2 ^k
NMc50 (pH 7.4)	3,6 ^e	12,7 ^l
NMc100 (pH 7.4)	5,0 ^f	10,3 ^m
NMc200 (pH 7.4)	6,6 ^g	10,9 ⁿ

Letras diferentes indican diferencias significativas intragrupos ($p < 0,05$)

Figura N°9. Concentración mínima bactericida de clorhidrato de minociclina 50 mg (Mc50) y nanoemulsiones de minociclina de 50, 100, 200 mg (NMc50, NMc100, NMc200) a pH 4 y 7,4 sobre *P. gingivalis* (*P.g*) cepas ATCC 33277 y W83.



Letras diferentes indican diferencias significativas intragrupos ($p < 0.05$)

Diferencias significativas ($p < 0,05$) fueron encontradas entre todas las CMB de nanoemulsiones de pH 4 y pH 7,4 sobre la cepa ATCC 33277 de *Porphyromonas gingivalis*. Las muestras de NMc50 (pH 4,2) y NMc100 (pH 4,1) presentaron concentraciones bactericidas significativamente menores comparandolas con la muestra control (Clorhidrato de minociclina 50 mg) y la muestra NMc200 (pH 4,0). A su vez, todas las CMB de nanoemulsiones de pH 7,4, presentaron

concentraciones bactericidas significativamente menores comparándolas con la muestra control (Clorhidrato de minociclina 50mg). (figura N°9).

Por otro lado, Diferencias significativas ($p < 0,05$) se presentaron entre todas las CMB de nanoemulsiones de pH 4 y pH 7,4 respecto a la cepa W 83 de *Porphyromonas gingivalis*. Las CMB de las muestras NMc50 (pH 4,2) y NMc100 (pH 4,1) resultaron significativamente menores comparándolas con la muestra control de clorhidrato de minociclina 50 mg y NMc200 (pH 4,0). Sin embargo, las CMB de las formulaciones a pH 7,4 fueron significativamente mayores que el control. (figura N°9).

Estos resultados sugieren mayor actividad antimicrobiana de las nanoemulsiones a menores concentraciones y carga del activo comparando con el control y mayores concentraciones o cargas de minociclina, exceptuando las CMB a pH 7,4 sobre la cepa W 83.

El efecto expuesto, relacionado a la efectividad antimicrobiana a menores concentraciones de las muestras, podría explicarse en primer lugar por el aumento de la solubilidad máxima de la minociclina en el medio de suspensión con bacterias, debido a que la minociclina posee una solubilidad en agua de 52 mg/ml⁴⁷ y las CMB de las muestras fueron significativamente menores en volúmenes mayores (5 mL) sobre las cepas de *P. gingivalis*, lo que indicaría que el activo presentaría aumento de su solubilidad, acrecentando la concentración efectiva. En segundo lugar, al tener un aumento de ésta, ocurriría la saturación del medio de acuerdo con la carga de minociclina en la nanoemulsión, por consiguiente, si tenemos mayores cargas del activo, obtendríamos sobresaturación del medio, limitando la solubilidad del fármaco. Finalmente, en cuanto a la mejora de la actividad antimicrobiana del antibiótico encapsulado en las nanoemulsiones comparándolo con el control, sugerimos que estos resultados se producirían por la mayor afinidad lipofílica del activo encapsulado debido a su concentración micelar¹⁰⁶. Las micelas son agregados moleculares formados por saturación del tensioactivo en el sistema, que tienen afinidad por las membranas biológicas y favorecen el transporte del activo por migración de un medio oleoso (Fase oleosa de la nanoemulsión) a un medio lipofílico (Lipopolisacáridos de membrana externa bacteriana)¹⁰⁷ ligando más efectivamente comparado con el activo sin encapsular, pues éste depende de su

dispersión molecular en el medio para alcanzar la superficie bacteriana (barrera hidrofóbica) y generar su mecanismo de acción ³³, acción restringida por el coeficiente de permeabilidad de membrana, mecanismos de resistencia bacterianos, entre otros, resultando en la baja penetración o difusión del fármaco ¹⁰⁸. A pesar de ello, el valor determinado para la CMB del control sobre la cepa ATCC 33277, fue similar a los reportados ¹⁰⁹, aunque no existe información disponible de ensayos de CMB de tetraciclinas sobre la cepa W 83.

Por otro lado, al analizar los resultados de las CMBs a pH 7,4 en la cepa W 83, donde las CMBs fueron significativamente mayores que el control, podríamos sugerir que la influencia del pH neutro de las formulaciones en la cepa mencionada, permitió una mayor resistencia de ésta frente al activo, dado que la bacteria no fue sometida a condiciones de estrés de pH, las que en medios ácidos o básicos, estimulan a la cepa W 83 a modificar el pH del medio a través de la generación de amoníaco por medio de degradación de aminoácidos y ácidos débiles tales como el ácido propiónico o acético, entre otros ^{110,111}. En contraste con las formulaciones a pH 4, las cuales además del mecanismo planteado relacionado al efecto del activo, se vieron posiblemente potenciadas en su actividad por la respuesta de las bacterias a la condición ácida.

5.5.2.- Determinación de inhibición del crecimiento por difusión

La determinación de inhibición del crecimiento por difusión de las formulaciones a pH 4 y 7.4, así como clorhidrato de minociclina 50mg sobre las cepas ATCC 33277 y W 83, se detalla en la tabla N° 6; figura N° 10 y tabla N° 7; figura N° 11 respectivamente. Las nanoemulsiones sin carga a pH 5,0 y 7,4, no presentaron efecto inhibitorio.

Se realizaron controles positivos y negativos (figura N° 12a y N°12b) con digluconato de clorhexidina 0,12% y PBS (tampón fosfato salino) respectivamente, para comprobar la viabilidad de los sembrados y cultivos bacterianos.

Tabla N° 6. Inhibición de crecimiento por difusión de clorhidrato de minociclina 50 mg (Mc50) y nanoemulsiones de minociclina de 50, 100, 200 mg (NMc50, NMc100, NMc200) a pH 4/7,4 sobre *Porphyromonas gingivalis* cepa ATCC 33277.

Muestras	ATCC 33277	
	Concentración ($\mu\text{g/mL}$)	Inhibición (mm)
Mc50	15,1	24,3 \pm 3,2 ^a
NMc50 (pH 4.2)	10,4	28,0 \pm 1,0 ^a
NMc100 (pH 4.1)	12,4	28,7 \pm 0,6 ^a
NMc200 (pH 4.0)	22,1	31,3 \pm 1,5 ^a
NMc50 (pH 7.4)	19,0	25,7 \pm 0,6 ^a
NMc100 (pH 7.4)	20,7	31,7 \pm 6,7 ^a
NMc200 (pH 7.4)	24,6	31,0 \pm 7,5 ^a

Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$)

Figura N° 10. Fotografías de Inhibición de crecimiento por difusión de clorhidrato de minociclina 50 mg (Mc50) y nanoemulsiones de minociclina de 50, 100, 200 mg (NMc50, NMc100, NMc200) a pH 4/7,4 sobre *Porphyromonas gingivalis* cepa ATCC 33277.

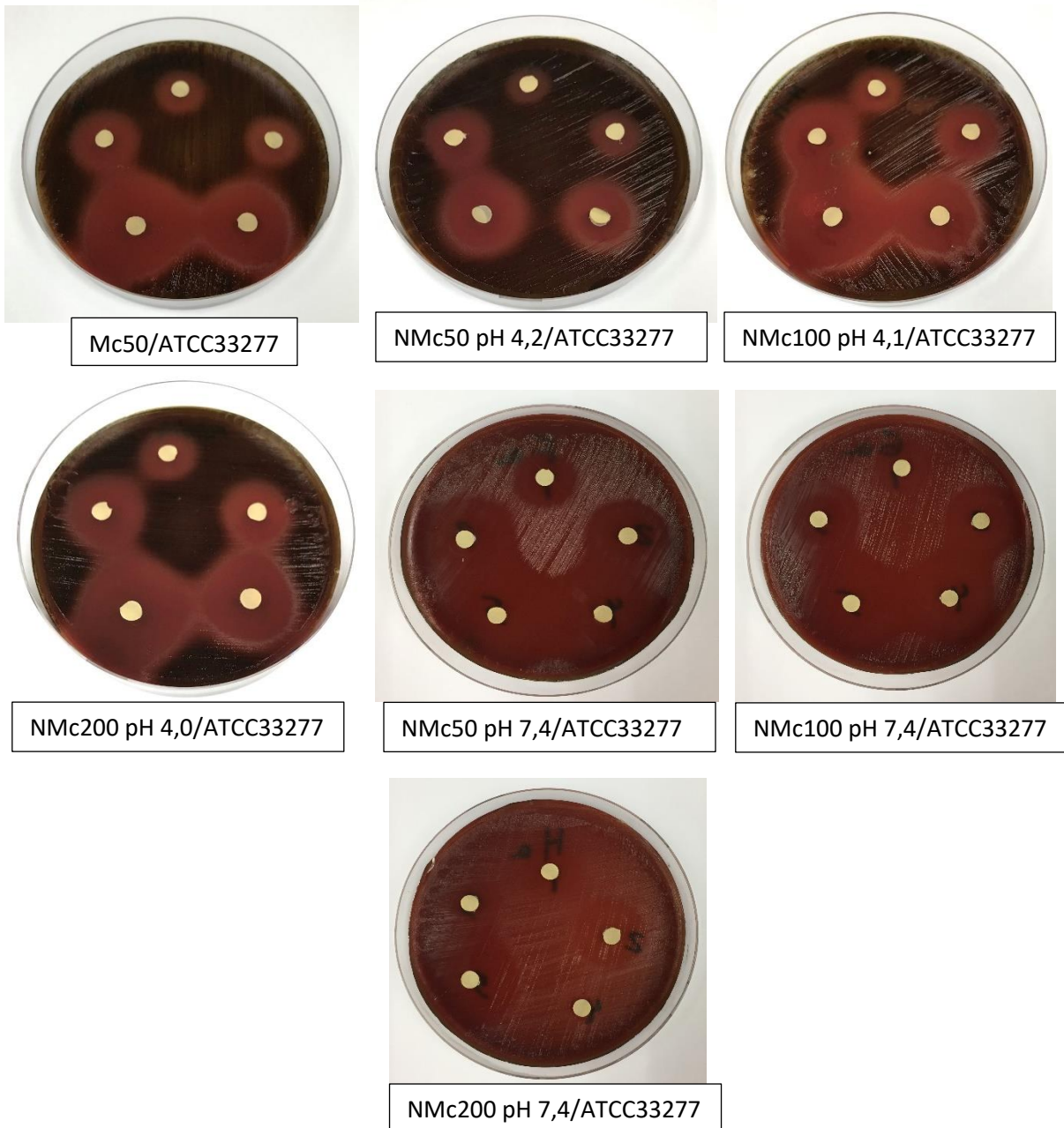
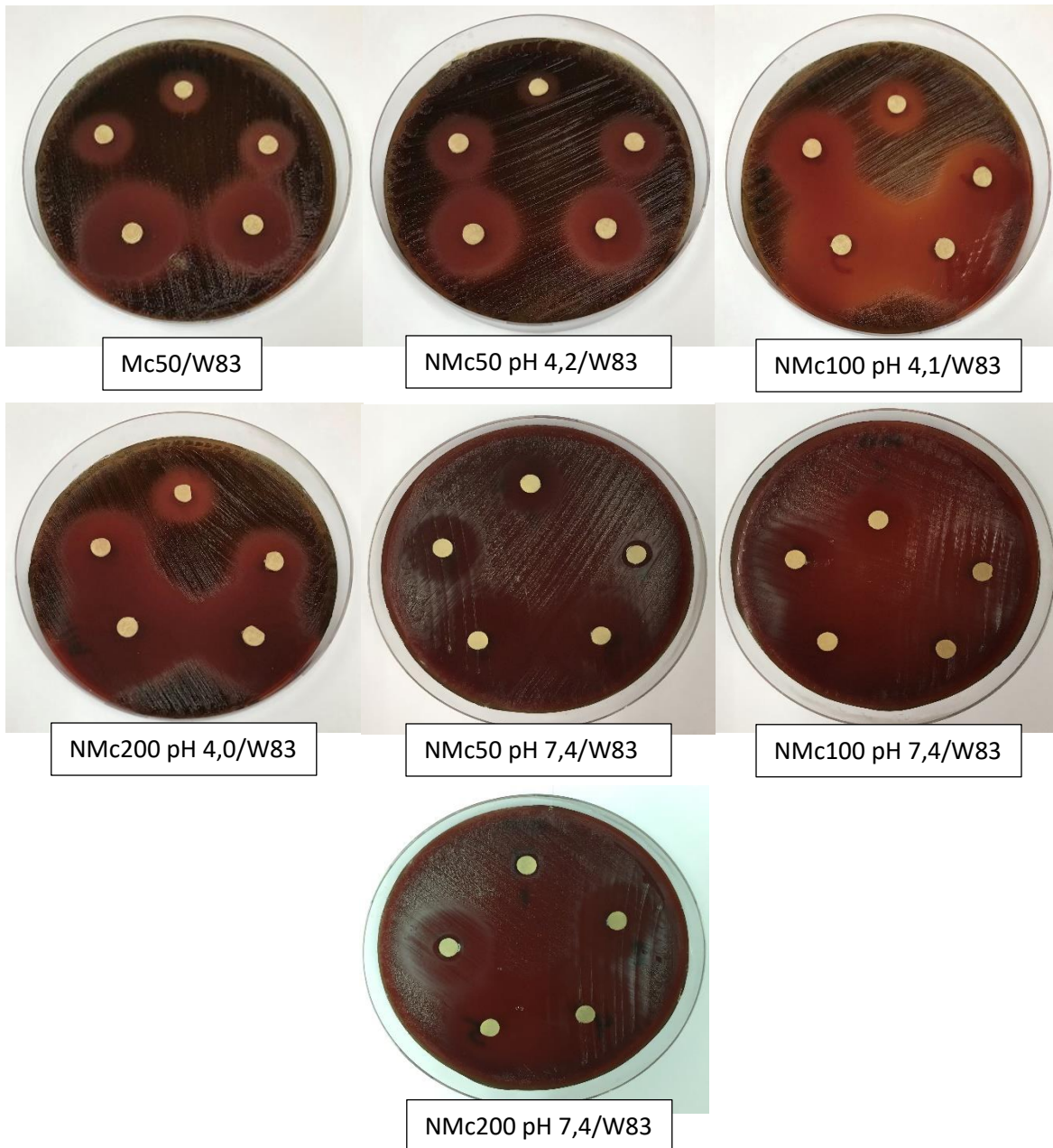


Tabla N° 7. Inhibición de crecimiento por difusión de clorhidrato de minociclina 50 mg (Mc50) y nanoemulsiones de minociclina de 50, 100, 200 mg (NMc50, NMc100, NMc200) a pH 4/7,4 sobre *Porphyromonas gingivalis* cepa W 83.

Muestras	W 83	
	Concentración (µg/mL)	Inhibición (mm)
Mc50	15,1	24,0 ± 3,6 ^a
NMc50 (pH 4.2)	10,4	26,3 ± 0,6 ^a
NMc100 (pH 4.1)	12,4	26,7 ± 0,6 ^a
NMc200 (pH 4.0)	13,8	29,7 ± 0,6 ^{ab}
NMc50 (pH 7.4)	12,7	19,3 ± 1,2 ^{ac}
NMc100 (pH 7.4)	10,3	24,7 ± 0,6 ^a
NMc200 (pH 7.4)	10,9	26,3 ± 5,9 ^a

Letras diferentes indican diferencias significativas (p<0,05)

Figura N° 11. Fotografías de Inhibición de crecimiento por difusión de clorhidrato de minociclina 50 mg (Mc50) y nanoemulsiones de minociclina de 50, 100, 200 mg (NMc50, NMc100, NMc200) a pH 4/7,4 sobre *Porphyromonas gingivalis* cepa W 83.



Los resultados del efecto inhibitorio de las nanoemulsiones de minociclina y clorhidrato de minociclina sobre la cepa ATCC 33277 no mostraron diferencias significativas; del mismo modo, que la inhibición sobre la cepa W 83, excepto la muestra NMc200 (pH 4,0) que obtuvo valores de inhibición de crecimiento significativamente mayores que NMc50 (pH 7,4). Estos resultados podrían explicarse por la influencia del pH del medio (7,2 a 7,4), el que aumentaría la ionización del activo en las muestras a pH 4, y mantendría el aumento de ionización del activo en las muestras previamente ajustadas a pH 7,4. Efecto que, si bien incrementa la solubilidad del fármaco, al estar sobre un medio sólido, la dispersión es limitada, a su vez, de acuerdo con el mecanismo de transporte de la minociclina ³³ al estar más ionizada, se restringe la difusión a través de las membranas externas bacterianas ¹¹², además los mecanismos de resistencia conocidos empleados por las cepas de *Porphyromonas gingivalis* descritas anteriormente, como la capacidad de cambiar el pH del medio ¹¹⁰, aumentar la hidrofobicidad de los lipopolisacáridos de membrana, e incrementar la actividad de proteasas ¹¹³ podrían limitar la acción del antibiótico.

Por otro lado, al comparar los efectos inhibitorios por formulación entre ambas cepas, se encontró que las nanoemulsiones presentaron significativamente mayor efecto inhibitorio sobre la cepa ATCC 33277 que sobre la cepa W 83. Exceptuando los efectos de las formulaciones NMc100 (pH 7,4) y NMc200 (pH 7,4), las que no tuvieron diferencias en la inhibición en ambas cepas. Del mismo modo, no hubo diferencias significativas de los efectos inhibitorios del control (clorhidrato de minociclina) en las cepas mencionadas.

A pesar de que no se han establecido puntos de corte estandarizados de ensayos antimicrobianos por difusión o dilución de minociclina sobre *Porphyromonas gingivalis*, el CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) recomienda interpretar los valores de los diámetros de inhibición de bacterias anaerobias Gram (-) frente a tetraciclinas como sensibles cuando el diámetro es mayor o igual a 15 mm; siendo en este caso que todas las formulaciones y el control presentaron halos mayores o iguales al referenciado. Sin embargo, se requiere además la determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) para poder correlacionar

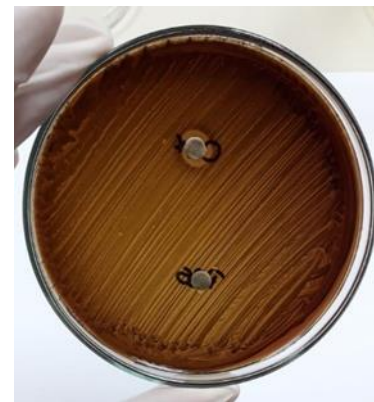
este ensayo con la inhibición de crecimiento y establecer la susceptibilidad de cada cepa. La CMI no se efectuó debido a que la turbidez de las formulaciones en el medio limitó la lectura por densidad óptica.

Finalmente es importante señalar que las concentraciones inhibitorias de las nanoemulsiones fueron significativamente menores que las concentraciones inhibitorias del control sobre la cepa W 83, y en el caso de la cepa ATCC 33277, las concentraciones inhibitorias de las muestras NMc50 (pH 4,2) y NMc100 (pH 4,1) fueron significativamente menores que los resultados inhibitorios del control (Clorhidrato de minociclina).

Figuras N° 12a y 12b. Controles de viabilidad de siembra y cultivo de cepas ATCC 33277 y W 83. Control positivo (Disco superior: Gluconato de clorhexidina 0,12%)/ Control negativo (Disco inferior: PBS: Tampón fosfato salino).



12a



12b

CONCLUSIONES

El desarrollo de nanoemulsiones por emulsificación espontánea para encapsulamiento de minociclina es un método efectivo, con valores de parámetros de caracterización adecuados para sistemas de liberación controlada nanoparticulados y altos porcentajes de eficiencia de encapsulación y capacidad de carga. Así mismo los porcentajes de liberación de minociclina desde las nanoemulsiones a pH neutro fueron significativamente mayores que las nanoemulsiones a pH ácido en 24 horas, sin embargo hubo cambios físicos observables en las formulaciones a pH neutro en 21 días aproximadamente.

En cuanto a la actividad antimicrobiana, concentraciones mínimas bactericidas de nanoemulsiones de minociclina fueron significativamente menores que las concentraciones del antibiótico sin encapsular sobre la cepa de *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277, mostrando además que las concentraciones de las formulaciones a pH 7,4 fueron significativamente menores que todas las muestras. Respecto al efecto bactericida sobre la cepa de *Porphyromonas gingivalis* W 83, solo las concentraciones de las formulaciones NMc50 (pH 4,2) y NMc100 (pH 4,1) presentaron menores valores comparados con el control y las demás muestras, siendo estas diferencias significativas.

La actividad inhibitoria de crecimiento de las nanoemulsiones de minociclina sobre la cepa ATCC 33277 y W 83 fueron efectivas, aunque sin diferencias con el control. No obstante, las formulaciones NMc50 (pH 4,2) y NMc100 (pH 4,1) presentaron concentraciones significativamente menores que el control sobre la cepa ATCC 33277. Y sobre la cepa W 83, todas las preparaciones tuvieron concentraciones significativamente menores que el control.

La evidencia en este trabajo muestra que existe efectividad antimicrobiana de nanoemulsión de minociclina obtenida por emulsificación espontánea sobre *Porphyromonas gingivalis* y que la encapsulación del fármaco aumenta la actividad antimicrobiana a menores concentraciones comparado con el activo sin encapsular.

Referencias Bibliográficas

1. Papapanou PN, Sanz M, Budunelli N y cols. (2018). Workgroup 2: Consensus Report, Periodontitis. *Journal of Clinical Periodontology*. 2018;45, S162-S170.
2. Kornman KS, Page RC, Tonetti MS. The host response to the microbial challenge in periodontitis: assembling the players. *Periodontol 2000*, 1997; 14: 33-53.
3. Ali Cekici, Alpdogan Kantarci, Hatice Hasturk, Thomas E. van Dyke. Inflammatory and immune pathways in the pathogenesis of periodontal disease. *Periodontology 2000*, Vol. 64, 2014; 57-80.
4. Gary C. Armitage. Development of a Classification System for Periodontal Diseases and Conditions. *Annals of Periodontology*, December 1999; Vol. 4, No. 1:1-6.
5. Hajishengallis, G., Lamont, R. J. Beyond the red complex and into more complexity: the polymicrobial synergy and dysbiosis (PSD) model of periodontal disease etiology. *Molecular oral microbiology*, 2012; 27: 409-419.
6. Haffajee, AD. & Socransky, SS. Microbial etiological agents of destructive periodontal disease. *Periodontol 2000*. 1994; 5: 78-111.
7. Noguero Rodríguez B, Liébana Ureña J, Sanz Alonso M, Herrera González D, Mesa Aguado F. Microbiología Periodontal y Periimplantaria. Cap. 55. En: Liébana-Ureña J., *Microbiología Oral*. 2ª ed. MacGraw-Hill Interamericana. Madrid, 2002; pp. 571-596.
8. Marsh, P.D.; Martin, M.V. *Oral Microbiology*, 5th ed.; Churchill-Livingstone: London, UK, 2009; Chapter 5, pp. 58-79.

9. Takeuchi Y., Umeda M., Benno Y., Huang Y. *Treponema socranski*, *Treponema denticola*, y *Porphyromona gingivalis* are Associated with Severity of Periodontal Tissue Destruction. *J. Periodontol.* 2001; 72: 1354-1363.
10. Feng Z, Weinberg A. Role of bacteria in health and disease of periodontal tissues. *Periodontol 2000.* 2006; 40(1): 50-76.
11. Lisa J. A. Heitz-Mayfield, Niklaus P. Lang. Surgical and nonsurgical periodontal therapy. Learned and unlearned concepts. *Periodontology 2000*, Vol. 62, 2013; 218-231.
12. Makoto Umeda, Yasuo Takeuchi, Kazuyuki Noguchi, Yi Huang, Geena Koshy, Isao Ishikawa. Effects of nonsurgical periodontal therapy on the microbiota. *Periodontology 2000*, Vol. 36, 2004; 98-120.
13. A.M. Allahverdiyev, K.V. Kon, E.S. Abamor, M. Bagirova, M. Rafailovich, Coping with antibiotic resistance: combining nanoparticles with antibiotics and other antimicrobial agents, *Expert Rev. Anti-Infect. Ther.* 9, 2011; 1035-1052.
14. Falcao Costa C, Moura e Sá A, Faria Almeida R, Bascones A. Antibioterapia en Periodoncia. Situación actual. 1- antibióticos Sistémicos. *Av Periodon Implantol.* 2001; 13, 1: 39-47.
15. Goodson JM, Gunsolley JC, Grossi SG, Bland PS, Otomo-Corgel J, Doherty F, Comiskey J. Minocycline HCl microspheres reduce red-complex bacteria in periodontal disease Therapy. *J Periodontol* 2007; 78: 1568-79.
16. W. Keung Leung, Lijian Jin, Joyce Y.Y. Yau, Qiang Sun, Esmonde F. Corbet. Microflora cultivable from minocycline strips placed in persisting periodontal pockets. *Archives of Oral Biology* 2005; 50, 39-48.
17. Rojewska E, Popiolek-Barczyk K, Jurga AM, Mackuch W, Przewlicka B, Mika J. Involvement of pro and antinociceptive factors in minocycline analgesia in rat neuropathic pain model. *J Neuroimmunol.* 2014; 277: 57-66.

18. Leite LM, Carvalho AG, Ferreira PL, Pessoa IX, Gonçalves DO, Lopes Adea et al. Anti-inflammatory properties of doxycycline and minocycline in experimental models: an in vivo and in vitro comparative study. *Inflammopharmacology*, 2011; 19:99-110.
19. D.F. Kinane, Local antimicrobial therapies in periodontal disease, *Ann. R. Aust. Coll. Dent. Surg.* 15, 2000; 57-60.
20. W.A. Soskolne, Subgingival delivery of therapeutic agents in the treatment of periodontal diseases, *Crit. Rev. Oral Biol. Med.* 8 (2) 1997; 164-174.
21. V. dodwad, S. Vaish, A. mahajan, M. chhokra. Local drug delivery in periodontics: a strategic intervention. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 2012; Vol 4, Issue 4.
22. M. B´elanger, P. H. Rodrigues, W. A. Dunn Jr., and A. Progulské-Fox, "Autophagy: a highway for *Porphyromonas gingivalis* in endothelial cells," *Autophagy*, 2006; vol. 2, no. 3, pp. 165-170.
23. d'Empaire G, Baer MT, Gibson FC. K1 serotype capsular polysaccharide of *Porphyromonas gingivalis* elicits chemokine production from murine macrophages that facilitates cell migration. *Infect Immun*, 2006; 74(11): 6236-6243.
24. Vernal R, León R, Silva A, van Winkelhoff AJ, García-Sanz JA, Sanz M. Differential cytokine expression by human dendritic cells in response to different *Porphyromonas gingivalis* capsular serotypes. *J Clin Periodontol*, 2009; 36: 823-829.
25. R. Vernal, J. Díaz-Zúñiga, and S. Melgar-Rodríguez, "Activation of RANKL-induced osteoclasts and memory T lymphocytes by *Porphyromonas gingivalis* is serotype-dependant," *Journal of Clinical Periodontology*, 2014.
26. Díaz Zúñiga J, Yáñez Figueroa J, Melgar Rodríguez S, Álvarez Rivas C, Rojas Lagos C, Vernal Astudillo R. Virulence and variability on

Porphyromonas gingivalis and *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* and their association to periodontitis. Rev. Clin. Periodoncia Implantol. Rehabil. Oral, 2012; vol.5 no.1 Santiago.

27. Kocgozlu L, Elkaim R, Tenenbaum H, Werner S. Variable cell responses to *P. gingivalis* lipopolysaccharide. *J Dent Res*, 2009; 88(8): 741-745.
28. Zaric, S., Shelburne, C., Darveau, R., Quinn, D., Weldon, S., Taggart, C., Coulter, W. Impaired Immune Tolerance to *Porphyromonas gingivalis* Lipopolysaccharide promotes Neutrophil Migration and Decreased Apoptosis. *Infection and Immunity*, 2010; 78(10): 4151-4156.
29. H. Kato, Y. Taguchi, K. Tominaga, M. Umeda, and A. Tanaka, "Porphyromonas gingivalis LPS inhibits osteoblastic differentiation and promotes pro-inflammatory cytokine production in human periodontal ligament stem cells" *Archives of Oral Biology*, 2014; vol. 59, no. 2, pp. 167-175.
30. Jaroslav Mysak, Stepan Podzimek, Pavla Sommerova, Yelena Lyuya-Mi, Jirina Bartova, Tatjana Janatova, Jarmila Prochazkova, and Jana Duskova. *Porphyromonas gingivalis*: Major Periodontopathic Pathogen Overview. *Journal of Immunology Research* Volume 2014; Article ID 476068, 8 pages
31. Nelson ML. Chemical and biological dynamics of tetracyclines. *Advances in Dental Research* 1998; 12(2):5–11.
32. Smilack JD. The tetracyclines. *Mayo Clin Proc* 1999; 74:727–9.
33. Schnappinger D, Hillen W. Tetracyclines: antibiotic action, uptake, and resistance mechanisms. *Arch. Microbiol.* 1996; 165: 359-69.
34. Agwuh KN, MacGowan A. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of the tetracyclines including glycylicyclines. *J Antimicrob Chemother* 2006; 58:256-65.

35. Jonas M, Cunha BA. Minocycline. *Ther Drug Monit* 1982; 4:137-45.
36. Böcker RH, Peter R, Machbert G, Bauer W. Identification and determination of the two principal metabolites of minocycline in humans. *J Chromatogr.* 1991; 568(2): 363-74.
37. Smith K, Leyden JJ. Safety of doxycycline and minocycline: a systematic review. *Clin Ther* 2005; 27:1329-42.
38. Sapadin AN, Fleischmajer R. Tetracyclines: nonantibiotic properties and their clinical implications. *Journal of the American Academy of Dermatology* 2006; 54(2): 258-65.
39. Golub LM, Ramamurthy NS, McNamara TF, Greenwald RA, Rifkin BR. Tetracyclines inhibit connective tissue breakdown: new therapeutic implications for an old family of drugs. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine* 1991; 2(3): 297-321.
40. Kielian T, Esen N, Liu S, Phulwani NK, Syed MM, Phillips N, et al. Minocycline modulates neuroinflammation independently of its antimicrobial activity in staphylococcus aureus-induced brain abscess. *The American Journal of Pathology* 2007; 171(4): 1199-214.
41. Griffin MO, Fricovsky E, Ceballos G, Villarreal F. Tetracyclines: a pleiotropic family of compounds with promising therapeutic properties. Review of the literature. *American Journal of Physiology, Cell Physiology* 2010; 299(3): C539-48.
42. Amin AR, Attur MG, Thakker GD, Patel PD, Vyas PR, Patel RN, et al. A novel mechanism of action of tetracyclines: effects on nitric oxide synthases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1996; 93(24): 14014-9.

43. Whiteman M, Halliwell B. Prevention of peroxynitrite-dependent tyrosine nitration and inactivation of alpha1-antitrypsin by antibiotics. *Free Radical Research* 1997; 26(1): 49-56.
44. Chen M, Ona VO, Li M, Ferrante RJ, Fink KB, Zhu S, et al. Minocycline inhibits caspase-1 and caspase-3 expression and delays mortality in a transgenic mouse model of Huntington disease. *Nature Medicine* 2000; 6(7): 797-801.
45. Jordan J, Fernandez-Gomez FJ, Ramos M, Ikuta I, Aguirre N, Galindo MF. Minocycline and cytoprotection: shedding new light on a shadowy controversy. *Current Drug Delivery*, 2007; 4(3): 225-31.
46. Alano CC, Kauppinen TM, Valls AV, Swanson RA. Minocycline inhibits poly (ADP-ribose) polymerase-1 at nanomolar concentrations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2006; 103(25): 9685-90.
47. Pharmacopeia.cn, (2016). USP Monographs: Minocycline Hydrochloride. [online] Available at: http://www.pharmacopeia.cn/v29240/usp29nf24s0_m54170.html [Accessed 14 Dec. 2016].
48. Heidi M. Mansour , MinJi Sohn, Abeer Al-Ghananeem and Patrick P. DeLuca. Materials for Pharmaceutical Dosage Forms: Molecular Pharmaceutics and Controlled Release Drug Delivery Aspects. Review. *Int. J. Mol. Sci.* 2010; (11) 3298-3322.
49. Miyazaki, Y.; Yakou, S.; Takayama, K. Study on jelly fig extract as a potential hydrophilic matrix for controlled drug delivery. *Int. J. Pharm.* 2004; 287, 39-46.
50. Panyam, J.; Dali, M.M.; Sahoo, S.K.; Ma, W.; Chakravarthi, S.S.; Amidon, G.L.; Levy, R.J.; Labhasetwar, V. Polymer degradation and *in vitro* release of

a model protein from poly (D,L-lactide-co-glycolide) nano- and microparticles. *J. Control. Release* 2003; 92, 173-187.

51. Seymour R., Heasman P. Tetracyclines in the management of periodontal diseases. *J. Clin. Periodontol.* 1995; 22: 22-35.
52. Vandekerckhave B., Quirynen M., van Steenberghe D. The use of locally-delivered minocycline in the treatment of chronic periodontitis. A review of the literature. *J. Clin. Periodontol.* 1998; 25: 964-968
53. Jones A., Kornman K. Newbold D., Manwell M. Clinical and microbiological effects of controlled release locally delivered minocycline in periodontitis. *J. Periodontol.* 1994; 65: 1058-1066.
54. Radvar M., Pourtaghi N., Kinane D. Comparison of periodontal local antibiotic therapies in persistent periodontal pockets. *J. Periodontol.* 1996; 67: 860-1.
55. Lee, S.J.; Park, Y.J.; Lee, M.J.; Yeom, H.L.; Chung, C.P. Polysaccharide Microcapsules for the Treatment of Periodontitis. Proceedings of 23rd International Symposium Controlled Release Bioactive Mater, Kyoto, Japan, 7– 10 July, 1996; Controlled Release Inc.: St Paul, Minnesota, USA, 1996; pp. 373–374.
56. Okuda K., Wolff L., Oliver R., Osborn J., Stoltenberg J., Bereuter J., Anderson L., Foster P., Hardie N., Aeppli D., Hara K. Minocycline slow release formulation on subgingival bacteria. *J. Periodontol.* 1992; 63: 73-79
57. Umeda M., Tominaga Y., He T. Microbial flora in the acute phase of periodontitis and the effect of local administration of minocycline. *J. Periodontol.* 1996; 67: 422-427.
58. Xu Yan, Wei Wei. A comparative study of systemic subantimicrobial and topical treatment of minocycline in experimental periodontitis of rats *Archives of Oral Biology*, 2006; 51, 794—803

59. K. Schwach-Abdellaouia, N. Vivien-Castionib, R. Gurnya. Local delivery of antimicrobial agents for the treatment of periodontal diseases. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 50, 2000; 83-99
60. Vijayalakshmi, N Ambalavanan, Pamela Emmadi, V Gopinath, Biju Mammen, T Ramakrishnan. Effect of a controlled release device containing minocycline microspheres on the treatment of chronic periodontitis: A comparative study *Journal of Indian Society of Periodontology*, Vol. 13, No. 2, March-April, 2009; pp. 79-84
61. Williams, R.C.; Paquette, D.W.; Offenbacher, S.; Adams, D.F.; Armitage, G.C.; Bray, K.; Caton, J.; Cochran, D.L.; Drisko, C.H.; Fiorellini, J.P.; et al. Treatment of Periodontitis by Local Administration of Minocycline Microspheres: a Controlled Trial. *J. Periodontol.* 2001; 72, 1535-1544.
62. Bhushan B, editor. *Springer Handbook of Nanotechnology*. 3 ed. Würzburg: Springer Science & Business Media; 2010.
63. Abbas S, Hayat K, Karangwa E, Bashari M, Zhang X. An Overview of Ultrasound-Assisted Food-Grade Nanoemulsions. *Food Engineering Reviews*. 2013; 5(3):139-57.
64. J.Irache, *Nanotecnología farmacéutica: Aplicaciones farmacoterapéuticas*. RANF, 2010; Cap.10. pág. 345-359.
65. Carlo Paderni, DDS, PhD,^a Domenico Compilato, DDS, PhD,^a Libero Italo Giannola, BS,^b and Giuseppina Campisi, DDS, MS,^a Palermo, Italy. University of Palermo. Oral local drug delivery and new perspectives in oral drug formulation. *Med Oral Pathol Oral Radiol*, 2012; 114: 25-34.
66. Harris D, Robinson JR. Drug delivery via the mucous membranes of the oral cavity. *J Pharmacol Sci*, 1992; 81:1-10.
67. Shojaei AH. Buccal mucosa as a route for systemic drug delivery: a review. *J Pharm Pharm Sci*, 1998; 1:15-30.

68. Collins LM, Dawes C. The surface area of the adult human mouth and thickness of the salivary film covering the teeth and oral mucosa. *J Dent Res* 1987; 66: 1300-2.
69. Tolo KJ. A study of permeability of gingival pocket epithelium to albumin in guinea pigs and Norwegian pigs. *Arch Oral Biol*, 1971; 16: 881-8.
70. Patel VF, Liu F, Brown MB. Advances in oral transmucosal drug delivery. *J Control Release*, 2011; 153: 106-16.
71. A. Luzardo Alvarez, F. Otero Espinar, J. Blanco Méndez, The application of microencapsulation techniques in the treatment of endodontic and periodontal diseases, *Pharmaceutics* 3, 2009; 538-571.
72. N. Jain, G.K. Jain, S. Javed, Z. Iqbal, S. Talegaonkar, F.J. Ahmad, et al., Recent approaches for the treatment of periodontitis, *Drug Discov. Today* 13, 2008; 932-943.
73. L.M. Shaddox, C.B. Walker, Treating chronic periodontitis: current status, challenges, and future directions, *Clin. Cosm. Invest. Dent.* 2010; 2:79-91.
74. G. Lambert, E. Fattal, P. Couvreur, Nanoparticulate systems for the delivery of antisense oligonucleotides, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2001; 47(1) 99-112.
75. A. Bhardwaj, S.V. Bhardwaj, R. Pandey, Advances in periodontal drug delivery systems, *Int. J. Novel Drug Deliv. Tech.* 2012, (2)271-275.
76. S.K. Sahoo, S. Parveen, J.J. Panda, The present and future of nanotechnology in human health care, *Nanomedicine*, 2007; (3)20-31.
77. A.Renugalakshmi, T.S. Vinothkumar, D.Kandaswamy, Nanodrug delivery systems in dentistry: a review on current status and future perspectives, *Curr. Drug Deliv.* 8(5) (2011;):586-594. Review. PubMed PMID: 21696348.

78. A.M. Allahverdiyev, K.V. Kon, E.S. Abamor, M. Bagirova, M. Rafailovich, Coping with antibiotic resistance: combining nanoparticles with antibiotics and other antimicrobial agents, *Expert Rev. Anti-Infect. Ther.* 9, 2011; 1035-1052.
79. T.S.J. Kashi, S. Eskandarion, M. Esfandyari-Manesh, S.M.A. Marashi, N. Samadi, S.M. Fatemi, et al., Improved drug loading and antibacterial activity of minocycline-loaded PLGA nanoparticles prepared by solid/oil/water ion pairing method, *Int. J. Nanomed.* 2012; (7)221-234.
80. S. Pragati, S. Ashok, S. Kuldeep, Recent advances in periodontal drug delivery systems, *Int. J. Drug Deliv.* 2009; (1)1-14.
81. F.M.Chen, Y.An, M.Zhang, New insights into and novel applications of release technology for periodontal reconstructive therapies, *J.Control. Release*, 2011; (149)92-110.
82. E. Piñón-Segundo, A. Ganem-Quintanar, V. Alonso-Pérez, D. Quintanar Guerrero, Preparation and characterization of triclosan nanoparticles for periodontal treatment, *Int.J.Pharm.* 2005; (295)217-232.
83. B.Moulari, H.Lboutounne, J.P.Chaumont, Y.Guillaume, J.Millet, Y.Pellequer, Potentiation of the bactericidal activity of *Harungana madagascariensis* Lam. exPoir.(Hypericaceae) leaf extract against oral bacteria using poly (D,L-lactide-co-glycolide) nanoparticles: in vitro study, *ActaOdontol.Scan.* 2006; (64)153-158.
84. H.Liu, B.Chen, Z.Mao, C.Gao, Chitosan nanoparticles for loading of tooth paste actives and adhesion on tooth analogs, *J.Appl. Polym. Sci.* 2007; (106) 4248-4256.
85. Solans C, Solé I. Nano-emulsions: Formation by low-energy methods. *Current Opinion in Colloid & Interface Science.* 2012; 17(5):246-54.

86. Silva HD, Cerqueira MA, Vicente AA. Nanoemulsions for Food Applications: Development and Characterization. *Food and Bioprocess Technology*. 2012; 5(3):854-67.
87. McClements DJ. Edible nanoemulsions: fabrication, properties, and functional performance. *Soft Matter*. 2011; 7(6):2297-316.
88. Chang Y, McLandsborough L, McClements DJ. Physicochemical Properties and Antimicrobial Efficacy of Carvacrol Nanoemulsions Formed by Spontaneous Emulsification. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2013; 61(37):8906-13.
89. Silva, N., Dutzan, N., Hernandez, M. & other authors. Characterization of progressive periodontal lesions in chronic periodontitis patients: levels of chemokines, cytokines, matrix metalloproteinase-13, periodontal pathogens and inflammatory cells. *Journal of Clinical Periodontology*, 2008; 35:206-214.
90. Sociedad española de enfermedades infecciosas y microbiología clínica. *Procedimientos en microbiología clínica. Métodos básicos para el estudio de la sensibilidad a los antimicrobianos*. 2000; cap. 11.
91. Yang Y, Marshall-Breton C, Leser ME, Sher AA, McClements DJ. Fabrication of ultrafine edible emulsions: Comparison of high-energy and low-energy homogenization methods. *Food Hydrocolloids*. 2012; 29(2) 398-406.
92. Chang Y, McClements DJ. Optimization of Orange Oil Nanoemulsion Formation by Isothermal Low-Energy Methods: Influence of the Oil Phase, Surfactant, and Temperature. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2014; 62(10) 2306-12.
93. Lamaallam S, Bataller H, Dicharry C, Lachaise J. Formation and stability of miniemulsions produced by dispersion of water/oil/surfactants concentrates in a large amount of water. *Colloids and Surfaces A: Physicochem Eng Aspects*, 2005; 270–271, 44–51.

94. Saberi AH, Fang Y, McClements DJ. Fabrication of vitamin E-enriched nanoemulsions: Factors affecting particle size using spontaneous emulsification. *Journal of Colloid and Interface Science* 2013; 391:95-102.
95. Sugumar S, Singh S, Mukherjee A, Chandrasekaran N. Nanoemulsion of orange oil with non ionic surfactant produced emulsion using ultrasonication technique: evaluating against food spoilage yeast. *Applied Nanoscience*. 2015; 1-8.
96. Gulotta A, Saberi AH, Nicoli MC, McClements DJ. Nanoemulsion-based delivery systems for polyunsaturated (omega-3) oils: formation using a spontaneous emulsification method. *J Agric Food Chem*. 2014; 62(7)1720-5.
97. Taylor P. Ostwald ripening in emulsions. *Advances in Colloid and Interface Science*. 1998; 75 (2)107-63.
98. Wilson and Gisvold's "Textbook of Organic, Medicinal and Pharmaceutical Chemistry", 10th Edition, Edited by Jaime N. Delgado and William A. Remers, Lippincott — Raven Publishers, Philadelphia — New York, 1998.
99. Evans WE, Schentag JJ, Kusko WJ. *Applied pharmacokinetics: principles of therapeutic drug monitoring*, 3.^a ed. Vancouver: Applied Therapeutics, 1992.
100. Bilbao-Sáinz C, Avena-Bustillos RJ, Wood DF, Williams TG, McHugh TH. Nanoemulsions Prepared by a Low-Energy Emulsification Method Applied to Edible Films. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2010; 58 (22) 11932-8.
101. Jae-Woon, N. y Mi-Kyeong, J. Spectroscopic characterization and preparation of low molecular, water soluble chitosan with free amine group by novel

methods. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, 2002; 40(21) 3796-3803.

- 102.** Anton, N., Benoit, J.-P., & Saulnier, P. (2008). Design and production of nanoparticles formulated from nano-emulsion templates—A review. *Journal of Controlled Release*, 128(3), 185–199.
- 103.** Bouchemal, K., Briançon, S., Perrier, E., & Fessi, H. (2004). Nanoemulsion formulation using spontaneous emulsification: Solvent, oil and surfactant optimisation. *International Journal of Pharmaceutics*, 280(1–2), 241–251.
- 104.** Wilson and Gisvold's "Textbook of Organic, Medicinal and Pharmaceutical Chemistry", 10th Edition, Edited by Jaime N. Delgado and William A. Remers, Lippincott — Raven Publishers, Philadelphia — New York, 1998.
- 105.** Capek I. Degradation of kinetically-stable o/w emulsions. *Adv Colloid Interface Sci.* 2004 Mar 19;107(2–3):125–55.
- 106.** Courier, H.M, Vandamme, T.F., Krafft, M.P. (2004) Reverse water in fluorocarbon emulsiones and microemulsions obtained with a flurorinated surfactant. *Colloids and surfaces, A: Physicochemical and Engineering aspects.* 244 (1-3): 141 – 148
- 107.** Raetz, C., Whitfield, C. (2002). Lipopolysaccharide Endotoxins. *Annual Review of biochemistry* 71: 635-700.
- 108.** D.E. Brodersen, W.M. Clemons Jr., A.P. Carter, R.J. Morgan-Warren, B.T. Wimberly, V. Ramakrishnan. The structural basis for the action of the

antibiotics tetracycline, pactamycin, and hygromycin B on the 30S ribosomal subunit. *Cell*, 103 (2000) 1143 – 1154.

109. Lilly Zollinger, Simone Schnyder, Sandor Nietzsche, Anton Sculean, Sigrun Eick. (2014). In-vitro activity of taurolidine on single species and a multispecies population associated with periodontitis. *Anaerobe* 32 (2015) 18 – 23
110. Nelson, K. E., Fleischmann, R. D., DeBoy, R. T., Paulsen, I. T., Fouts, D. E., Eisen, J. A., Fraser, C. M. (2003). Complete genome sequence of the oral pathogenic bacterium *Porphyromonas gingivalis* strain W83. *Journal of Bacteriology*, 185(18), 5591 - 5601.
111. Takahashi, N. (2003). Acid-neutralizing activity during amino acid fermentation by *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* and *Fusobacterium nucleatum*. *Oral Microbiology Immunology*, (18), 109- 113.
112. Rowland M, Tozer TN. *Clinical Pharmacokinetics: Concepts and applications*, 3.^a ed. Filadelfia: Lea and Febiger, 1995.
113. Needham BD, Trent MS. (2013). Fortifying the barrier: the impact of lipid A remodelling on bacterial pathogenesis. *Nature Review of Microbiology* 11: 467-481.