

UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS



Desarrollo de un sistema de entrega rápida de péptido vasoactivo

Memoria para optar al título de Químico Farmacéutico por:

Alvaro González Malebrán

Director de Tesis: Dr. Javier Morales Montecinos

Santiago de Chile, 2023

AGRADECIMIENTOS

Es una lista importante de personas a las cuáles debo agradecer su guía y ayuda en este proceso de mi vida que fue intenso, trabajar y estudiar resultó ser desafiante, pero pude dar con mi revancha. Agradezco a Mi Madre que en paz descansa, ha sido un eslabón importante en mi formación tanto como persona como profesional. Es quién me cuida y me guiará por siempre. Agradezco a mi mejor amigo Diego que me acompañó y me brindó su apoyo en todo este proceso, facilitando su computador portátil para poder ejecutar este trabajo. A mi amiga Muriel que también me brindó su apoyo como contención. A mi familia por darme el espacio y apoyo para poder concretar este proyecto de vida. Agradezco al profe JOM por su paciencia y guía en esta importante etapa de crecimiento profesional como a la Universidad de Chile por otorgarme la oportunidad de poder volver a empezar.

TABLA DE CONTENIDOS

1. INTRODUCCIÓN	3
1.1 Vías de administración.....	3
1.2 Administración bucal	3
1.3 Fisiología de la cavidad oral e histología del epitelio basal	4
1.4 Aspectos sobresalientes de los sustratos de impresión de aplicación bucal y componentes a imprimir	6
1.4.1 Administración de medicamentos biológicos de naturaleza proteica.....	6
1.4.2 Películas poliméricas bucales.....	7
1.4.3 Polímeros usados en el diseño de películas mucoadhesivas.....	7
1.5 Aspectos relevantes de procesos de fabricación de películas bucales	9
1.6 Angiotensina II, péptido modelo utilizado en representación de RE-ANG 1-9	11
1.6.1 Angiotensina 1-9 y RE-ANG 1-9	11
1.6.2 Angiotensina II	12
1.7 Potenciadores de la permeación	12
1.7.1 Sales biliares: desoxicolato de sodio (DC) y glicodesoxicolato de sodio (GDC)	13
2. HIPÓTESIS	15
3. OBJETIVO GENERAL	15
4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	15
5. MATERIALES	16
6. METODOLOGÍAS	17
6.1 Desarrollo de películas poliméricas mucoadhesivas de HPMC	17
6.1.1 Moldeo de películas.....	17
6.2 Formulaciones de tintas para impresión por inyección de tinta en películas de HPMC....	17
6.2.1 Tinta 20 mg DF8 por ml.....	17
6.2.2 Tinta 20 mg DF8 y GDC 0,2 mM por ml	18
6.2.3 Tinta 20 mg DF8, DC 0,2 mM y L-Arg 0,124 mM por ml	18
6.3 Impresión por inyección de tinta de películas de HPMC	18

6.4 Caracterización de películas	18
6.4.1 Determinación de DF8 por cm ² de impresión	18
6.4.2 Modelo analítico para determinación de DF8.....	18
6.4.3 Propiedades mecánicas	19
6.4.4 Propiedades mucoadhesivas.....	21
6.4.5 Análisis cinético liberación de DF8 desde películas impresas con diferentes tintas...21	
6.5 Análisis estadístico.....	23
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	24
7.1 Desarrollo de películas de HPMC mediante moldeo por solvente	24
7.2 Formulación de tintas, para impresión por inyección de tinta en películas de HPMC	24
7.3 Caracterización de películas impresas	26
7.3.1 Determinación de mg de DF8 por cm ² de películas de HPMC impresas con diversas tintas	26
7.3.2 Propiedades mecánicas películas de HPMC con diversos estados de impresión	28
7.3.2.1 Propiedades mecánicas películas de HPMC no impresas (S/I)	28
7.3.2.2 Resistencia a la tracción (TS) de películas impresas con diversas tintas.....	29
7.3.2.3 Elongación al quiebre (EB) de películas impresas con diversas tintas	30
7.3.2.4 Módulo de Young (MY) de películas impresas con diversas tintas	32
7.3.3 Propiedades mucoadhesivas películas de HPMC con diversos estados de impresión .	33
7.3.3.1 Propiedades mucoadhesivas de películas de HPMC no impresas (S/I)	34
7.3.3.2 Fuerza de desprendimiento (FD) y trabajo de adhesión (WoA)	35
7.3.4 Análisis cinético de liberación de DF8 desde películas impresas con diversas tintas..	38
8. CONCLUSIONES	46
9. REFERENCIAS.....	47

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Representación esquemática de la mucosa bucal.....	5
Figura 2. Estructuras macromoleculares propuestas para glicoproteínas de mucus. Carbohidratos de mucina.....	8
Figura 3. Estructura química de HPMC.....	9
Figura 4. Procesos de fabricación películas bucales extrusión en caliente y moldeo por evaporación con solvente.....	10
Figura 5. Impresión térmica por impresión de tinta.....	11
Figura 6. Estructura química desoxicolato de sodio (DC) y glicodesoxicolato de sodio (GDC).14	
Figura 7. Resistencia a la tracción (TS) promedio películas de HPMC no impresas e impresas...29	
Figura 8. Elongación al quiebre (EB) de películas de HPMC no impresas e impresas con diversos tipos de tintas.....	31
Figura 9. Módulo de Young (MY) de películas de HPMC no impresas e impresas con diversos tipos de tinta.....	32
Figura 10. Fuerza de desprendimiento (FD) películas de HPMC sin impresión y con diversos tipos de impresión, en contacto con mucina 2% (m/v) en medio acuoso y PBS pH 6,8.....	36
Figura 11. Trabajo de adhesión (WoA), películas HPMC, con diversos tipos de impresión, en contacto con mucina 2% (m/v) en medio acuoso y PBS pH 6,8.....	36
Figura 12. % liberación DF8 desde películas impresas sólo con DF8 y no impresas (control)....	39
Figura 13. % liberación DF8 películas impresas con DC + L-Arg y no impresas (control).....	40
Figura 14. % liberación DF8 películas impresas DF8 + GDC, y no impresas (control).....	41
Figura 15. Perfiles de liberación DF8 desde distintas formulaciones impresas.....	43

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Formulaciones impresas con diversas tintas. Cantidad de mg de DF8 total por cm ² y eficiencia de impresión en cada una de ellas.....	27
Tabla 2. Propiedades mecánicas HPMC sin impresión obtenidas en investigación actual y literatura (investigación) de referencia.....	28
Tabla 3. Resistencia a la tracción (TS) en películas con diversos estados de impresión.....	30
Tabla 4. Elongación al quiebre (EB) en películas con diversos estados de impresión.....	31
Tabla 5. Módulo de Young (MY) en películas con diversos estados de impresión.....	32
Tabla 6. Propiedades mucoadhesivas HPMC sin impresión obtenidos en investigación actual y literatura (investigación) de referencia.....	34
Tabla 7. Propiedades mucoadhesivas HPMC sin impresión y con diversos tipos de impresión, en contacto con mucina 2% m/v en medio acuoso.....	35
Tabla 8. Propiedades mucoadhesivas HPMC sin impresión y con diversos tipos de impresión, en contacto con mucina 2% m/v en medio PBS pH 6,8.....	35
Tabla 9. % de liberación DF8 desde distintas formulaciones impresas.....	38
Tabla 10. Factores de similitud (f2) entre formulaciones impresas y sus controles.....	39
Tabla 11. Parámetros de modelos cinéticos ajustados a perfiles de liberación de DF8.....	43
Tabla 12. Factores de similitud (f2) entre formulaciones impresas.....	44

GLOSARIO

ADN: ácido desoxirribonucleico

ANOVA: análisis de varianza

ATR1: receptor de angiotensina II tipo 1

ATR2: receptor de angiotensina II tipo 2

BCA: ácido bicinconinico

DC: desoxicolato de sodio

DF8: angiotensina II

Djk: coeficiente de difusión del activo, difusión de activo j en una mezcla k (otros componentes)

EB: elongación al quiebre

EC: etilcelulosa

FD: fuerza de desprendimiento

FDA: administración de alimentos y medicamentos de los Estados Unidos

FITC-KP: péptido fluorescente de isocianato de fluoresceína

GDC: glicodesoxicolato de sodio

GRAS: generalmente reconocido como seguro (Generally Recognized As Safe)

HPMC: hidroxipropilmetilcelulosa

J: flujo de difusión por unidad de área por segundo

k_0 : constante de liberación de orden 0

k_1 : constante de liberación de primer orden

k_H : constante de disolución de Higuchi

k_r : constante de Korsmeyer-Peppas, que incorpora características estructurales y geométricas del sistema de liberación.

L-Arg: L-arginina
mJ: milijoule
mM: milimolar
mN: milinewton
MPa: megapascal
 M_{∞} : masa a tiempo infinito
Mt: masa a tiempo t
NF: no fraccionado
MY: módulo de Young
Papp: permeabilidad aparente
PBS: solución tampón fosfato
PCP: policarbófilo
PE: potenciadores de la permeación
PTFE: politetrafluoroetileno
PVDF: fluoruro de polivinilideno
Q: cantidad de fármaco disuelto a tiempo t
Qo: cantidad de activo inicial en solución
Qt: fracción de fármaco liberado a tiempo t
 r^2 : coeficiente de determinación ajustado
RE-ANG 1-9: retro enantiómero angiotensina 1-9
S/I: sin imprimir
SD: desviación estándar
SRA: sistema renina angiotensina
TEC: citrato de trietilo
TS: resistencia a la tracción
 μ M: micromolar
WoA: trabajo de adhesión
WR: reactivo de trabajo

RESUMEN

La ruta bucal, en la actualidad, ha sido enormemente considerada por la industria farmacéutica como una vía alternativa para la administración de medicamentos a través del epitelio bucal, pudiendo lograr un efecto local o sistémico. Por ello las películas poliméricas han sido exploradas como una forma farmacéutica de aplicación bucal ya que se destaca su reducido tamaño, flexibilidad y mucoadhesividad. Su implementación consigue evitar el efecto de primer paso en el hígado y la obtención de un aumento en la biodisponibilidad del fármaco. Las películas poliméricas usadas en esta investigación son de hidroxipropilmetilcelulosa considerado como un polímero seguro de utilizar. Sobre ellas se depositaron tintas con distinta composición, pero que tuvieron en común al activo biológico o péptido modelo angiotensina II en representación del retro enantiómero de angiotensina 1-9. Dichas tintas contenían potenciadores de la permeación del tipo sal biliar como desoxicolato de sodio y glicodesoxicolato de sodio. Se caracterizó a cada una de estas formulaciones impresas en distintos aspectos. Se determinó la cantidad de péptido depositado por cm^2 de multi impresión para obtener la eficiencia de los procesos de impresión, además se obtuvieron sus propiedades mecánicas como mucoadhesivas. En cuanto a las propiedades mecánicas se midió la resistencia a la tracción, elongación al quiebre como la elasticidad de las películas con el módulo de Young. En líneas generales, la impresión tuvo un impacto en las propiedades mecánicas. En mucoadhesividad, el proceso de impresión provoca su reducción, con posibles efectos compensatorios de la misma por la presencia de las sales biliares. Lo anterior se observó mediante la determinación tanto de la fuerza de desprendimiento como el trabajo de adhesión de las películas impresas. Se caracterizó la liberación de angiotensina II desde las formulaciones impresas, por medio del ajuste de modelos cinéticos, para dar con el mecanismo de liberación del péptido. Se determinó que el mecanismo de liberación podría transcurrir por erosión progresiva junto con la formación de poros con contenido acuoso en la capa impresa, con difusión fickiana del péptido.

Las formulaciones impresas con péptidos y sales biliares resultaron complejas de elaborar en cuanto a la preparación de las tintas que incluyen a ambas entidades, por posibles interacciones entre ellas. El péptido podría ser incorporado en un sistema que lo proteja como una nanopartícula y añadir los potenciadores de la permeación en una zona estratégica del núcleo lipídico que impida la interacción, y así obtener una forma farmacéutica de uso bucal considerada como adecuada.

SUMMARY

The oral route, currently, has been widely considered by the pharmaceutical industry as an alternative route for the administration of drugs through the oral epithelium, being able to achieve a local or systemic effect. For this reason, polymeric films have been explored as a pharmaceutical form of oral application because of their reduced size, flexibility and mucoadhesivity. Its implementation manages to avoid the first step effect on the liver and obtain an increase in the bioavailability of the drug. The polymeric films used in this research are hydroxypropyl methylcellulose, considered to be a safe polymer to use. On them were deposited inks with different compositions, but which had in common the biological active or peptide model angiotensin II representing the retro enantiomer of angiotensin 1-9. These inks contained bile salt permeation enhancers such as sodium deoxycholate and sodium glycodeoxycholate. Each of these printed formulations was characterized in different aspects. The amount of peptide deposited per cm^2 of multi-print was determined to obtain the efficiency of the printing processes, besides its mechanical properties as mucoadhesives were obtained. As for the mechanical properties, tensile strength, elongation at break and elasticity of the films were measured with Young's modulus. Overall, printing had an impact on mechanical properties. In mucoadhesivity, the printing process causes its reduction, with possible compensatory effects due to the presence of bile salts. This was observed by determining both the release force and the adhesion work of the printed films. The release of angiotensin II from the printed formulations was characterized by the adjustment of kinetic models to determine the mechanism of peptide release. It was determined that the release mechanism could occur by progressive erosion along with the formation of pores with aqueous content in the printed layer, with fickian diffusion of the peptide.

The printed formulations with peptides and bile salts were complex to elaborate in terms of the preparation of the inks that include both entities, due to possible interactions between them. The peptide could be incorporated into a system that protects it as a nanoparticle and add permeation enhancers in a strategic area of the lipid nucleus that prevents interaction, thus obtaining a pharmaceutical form for oral use considered suitable.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Vías de administración

La vía oral actualmente es una de las rutas de administración de fármacos más utilizadas dentro del campo farmacéutico, debido a su simplicidad en cuanto a su administración. Por ello resulta ser la vía elegida en la gran mayoría de los casos en lo que se refiere a prescripción de medicamentos. Se ha observado que es ampliamente tolerada por los pacientes, principalmente por su seguridad, comodidad y fácil implementación, lo que incrementa la adherencia a la terapia por parte del paciente¹. Sin embargo, pese a sus ventajas ya mencionadas, en la actualidad se desarrollan investigaciones para dar con nuevas rutas de administración, por las desventajas que deben enfrentar las formas farmacéuticas junto con sus principios activos cuando son administradas por esta ruta. Se destaca el efecto de primer paso que sufren los fármacos al pasar por el hígado, procesos de degradación química por el variado perfil de pH presente en todo este tramo como procesos de degradación enzimática y alteraciones de distinta índole debido a la presencia de la flora bacteriana que reside en ella.¹ Lo anterior, se traduce en una baja biodisponibilidad del fármaco en sangre y con ello se consigue un menor efecto terapéutico.² En cuanto a las vías alternativas a la vía oral consideradas en la actualidad, se puede indicar a la vía rectal, nasal, pulmonar y bucal, entre otras. La vía bucal actualmente es de gran interés en el campo de las ciencias farmacéuticas, por lo que en esta investigación es objeto de estudio.

1.2 Administración bucal

La administración de medicamentos por la vía bucal consiste en la absorción de fármacos a través de la mucosa bucal, presente en la cara interna de las mejillas y tejidos circundantes entre las encías y labios.³ Es por esto que la mucosa bucal es muy valorada ya sea por su área superficial ($50,2 \pm 2,9 \text{ cm}^2$) como por su mediana permeabilidad, en comparación con otros tejidos presentes en la cavidad bucal como las encías y el paladar.³ También cabe recalcar que el epitelio bucal cuenta con una alta irrigación y vascularización, por lo tanto, cualquier sustancia que logre atravesar dicho epitelio, pasa de manera directa a la circulación sanguínea sistémica, a través de la vena yugular.⁴ De esta forma se logran evitar los obstáculos ya mencionados con anterioridad, como es el efecto de primer paso realizado por el hígado y los inconvenientes asociados al tracto gastrointestinal.⁵

1.3 Fisiología de la cavidad oral e histología del epitelio bucal

Dentro de la cavidad oral se puede encontrar una gran variedad de tejidos incluyendo los labios, las mejillas, la lengua y el paladar (duro y blando).³ Bajo condiciones tanto fisiológicas como patológicas, el fármaco puede permear de diferentes maneras por dichos epitelios, los cuales son la principal barrera a la penetración de cualquier sustancia.

En la cavidad bucal se pueden identificar tres tipos de mucosa oral: mucosa de revestimiento (60%), mucosa masticatoria (25%) y mucosa especializada (15%).³ La mucosa de revestimiento considera a la mucosa sublingual y bucal, que se encuentran no queratinizadas. Por otro lado, la mucosa masticatoria incluye el paladar duro y las encías, ambos queratinizados. Por último, la mucosa especializada tiene regiones queratinizadas y no queratinizadas, en la zona superior dorsal de la lengua.⁶

En lo que se refiere al epitelio bucal, está conformado por 40 a 50 capas de células epiteliales escamosas y estratificadas no queratinizadas, formando una barrera cuyo espesor está dentro del rango de 100 a 800 μm , a diferencia de las encías y paladar duro donde hay presencia de queratinización muy similar a la epidermis (Figura 1)⁵. El epitelio se encuentra situado sobre células continuas no estratificadas y tejido conectivo, lo que se conoce como láminas basal y propia. A continuación, sigue un lecho altamente vascularizado de células musculares lisas en la capa submucosa.⁷⁻⁹ En cuanto a la superficie más externa de este epitelio se encuentra un revestimiento de saliva cuyo espesor ronda entre 70 a 100 μm , compuesto mayormente por mucus.⁷ El mucus está formado principalmente por agua y glicoproteínas, denominadas mucinas, que presentan carga negativa por la presencia de grupos funcionales ionizables de carácter ácido, los cuáles al pH de la cavidad oral se encuentran en su forma aniónica.^{10,11} La presencia de estas cargas negativas permite que estas glicoproteínas se adhieran al epitelio bucal y cumplen una función en la interacción con los sistemas de entrega de principios activos, permitiendo la adhesión con cada uno de ellos.^{10,11}

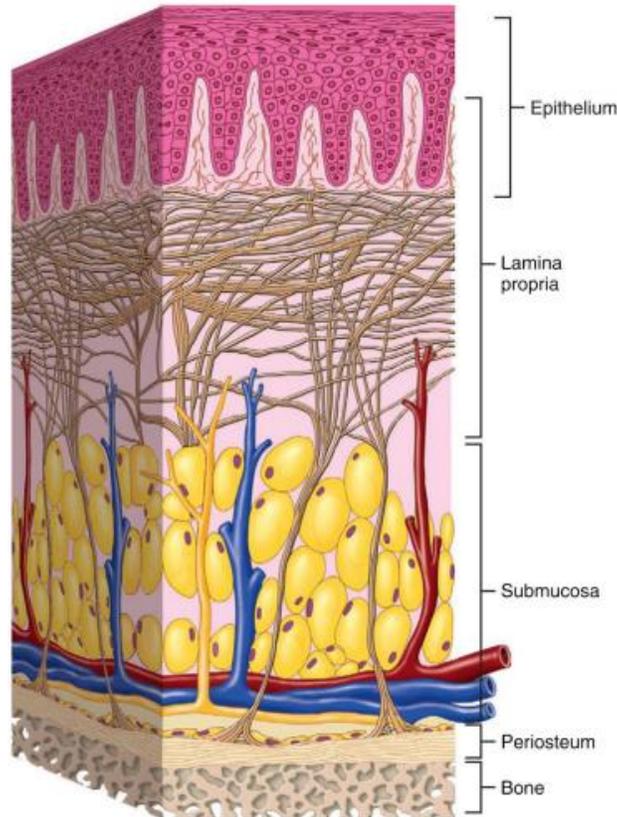


Figura 1. Representación esquemática de la mucosa bucal.⁷

Dentro de los aspectos que pueden dificultar la permeabilidad de sustancias a través de los epitelios, se encuentra la diferencia existente en el grosor de cada uno de ellos, la irrigación sanguínea y la presencia de enzimas.³ Ahora bien, la presencia de queratina también influye en la permeabilidad de los epitelios, donde la mucosa oral resulta ser más permeable que la piel, pero menos permeable que el intestino.⁸ Por lo tanto, la permeabilidad en la cavidad oral aumenta desde la zona sublingual, bucal y paladar, por presencia de queratinización y composición lipídica.^{9,10} Se ha descubierto que las capas celulares más externas suponen ser la mayor barrera en la penetración de sustancias debido a la presencia de contenido liberado desde gránulos recubridores de membrana.¹² Dentro del primer tercio superior del espesor del epitelio (los primeros 200 μm), se encuentra el mayor número de este tipo de gránulos, cuyo contenido se encuentra entre los espacios intercelulares y cuya composición lipídica es principalmente de carácter más polar. Por consiguiente, es posible diferenciar dos dominios en el epitelio bucal: el dominio lipófilo, correspondiente a las membranas celulares del epitelio estratificado, y el dominio hidrofílico, donde hay contenido extruido de los gránulos recubridores de membrana, presentes en el espacio

intracelular.^{5,9} A raíz de lo mencionado anteriormente, se describe la existencia de dos rutas de transporte de fármacos en la mucosa bucal: la ruta paracelular, donde el fármaco difunde entre las células; y la ruta transcelular, que se desarrolla a través las células.⁶

1.4 Aspectos sobresalientes de los sustratos de impresión de aplicación bucal como de los componentes a imprimir

Hay diversas formas farmacéuticas que son utilizadas para la entrega de principios activos a través de la ruta bucal. Ejemplos de éstas incluyen a las obleas, soluciones, geles, suspensiones, tabletas y películas mucoadhesivas.³

1.4.1 Administración de medicamentos biológicos de naturaleza proteica

Durante el último tiempo, la industria farmacéutica ha logrado diseñar técnicas para la fabricación de péptidos y proteínas. Ahora bien, para la industria ha supuesto un desafío y un esfuerzo, definir tanto rutas como formas de administración que resulten sencillas de aplicar, velando por la integridad de este tipo de medicamentos. En general, la vía de administración inyectable es la elegida para incorporar a este tipo de productos biológicos a expensas de otras vías más accesibles para el paciente. Se podría pensar en la vía oral como ruta alternativa, pero productos biológicos como péptidos y proteínas, presentan desventajas en cuanto a su integridad a lo largo del tracto gastrointestinal, con resultado de una escasa biodisponibilidad. Como ejemplo se puede citar a la insulina, hormona involucrada en el control de la concentración de glucosa en la sangre y que es extremadamente esencial en pacientes diabéticos. La vía de administración elegida para aplicarla es la vía subcutánea, que a largo plazo supone una incomodidad para el paciente ya debe estar inyectándola en diferentes sitios en la piel.¹³ Ante esto, la industria ha logrado explorar vías alternativas para la aplicación de este tipo de medicamentos como insulina inhalable para el tratamiento de la diabetes. Ahora bien, las películas mucoadhesivas han surgido como formas de dosificación que pueden abordar las dificultades antes mencionadas, permitiendo plantear la administración bucal como una vía alternativa.¹⁴ Debido a su gran potencial para satisfacer necesidades médicas no cubiertas, se espera un crecimiento en el número de productos que utilizan esta tecnología.¹⁵ Tal es el ejemplo de MidaForm Insulin PharmaFilm®, que corresponde a películas mucoadhesivas utilizadas para administrar insulina humana recombinante, que va unida de forma no covalente a nanopartículas recubiertas de glicano de oro e incrustadas

en una película de disolución transbucal. Sin embargo, Insulin PharmaFilm aún se encuentra actualmente en ensayos clínicos.¹⁶ En base a lo relatado anteriormente, surgió la motivación de implementar la presente investigación para poder aportar datos cruciales en cuanto a la viabilidad de la administración de péptidos por la vía bucal, pensando en la comodidad del paciente y en el grado de apego a la terapia que eventualmente debería seguir.

1.4.2 Películas poliméricas bucales

Las películas bucales mucoadhesivas resultan ser una forma farmacéutica amigable para la mayoría de los pacientes, dado que, por su pequeño tamaño y grosor, otorga comodidad mientras se está bajo una terapia determinada, lo que ayuda al cumplimiento de la misma por parte del paciente.¹⁷ En la mayoría de los casos, las películas mucoadhesivas están conformadas por polímeros con propiedades mucoadhesivas, que dentro de su formulación pueden contener al principio activo junto a otros excipientes tales como plastificantes, saborizantes, estabilizantes, entre otros. En cuanto a esta investigación, su enfoque es la generación de películas mucoadhesivas impresas con tintas de diversa composición que incluyen dentro de su formulación a un principio activo junto con potenciadores de la permeación, que aumentan la velocidad de paso de sustancias a través de la mucosa bucal. Estas películas al estar conformadas por polímeros mucoadhesivos, presentan propiedades de adhesión sobre superficies biológicas como lo es la mucosa bucal, proceso que es denominado mucoadhesión.¹⁵ Luego de desarrollada la mucoadhesión, los principios activos pueden difundir a través del epitelio bucal, pudiendo llegar a la circulación sistémica dado que este sitio es altamente irrigado por la circulación sanguínea.¹⁸

1.4.3 Polímeros usados en el diseño de películas mucoadhesivas

Al momento de decidir fabricar películas poliméricas, se debe tener en cuenta la naturaleza del polímero a utilizar, por ello se cuenta con varios tipos de ellos, están: los polímeros aniónicos, catiónicos, no iónicos y anfóteros.¹⁹

Los polímeros aniónicos presentan una baja mucoadhesividad, que se asocia a la formación de puentes de hidrógeno por parte de grupos polares que interactúan con las cadenas de oligosacáridos de la mucina. Ejemplo de polímeros aniónicos: alginato de sodio, carbomer.²⁰ Por otro lado, están los polímeros catiónicos, cuya principal característica es que poseen alta mucoadhesividad, dado

que en su estructura presentan grupos funcionales que, a determinados valores de pH, se ionizan positivamente. La carga positiva percibida en aquellos grupos funcionales permite la interacción de estos polímeros con las cargas negativas presentes en la superficie de la mucosa, interacción electrostática que resulta ser muy fuerte o intensa. Por ejemplo, el quitosano presenta en su estructura grupos amino que a pH bajo 7 pueden ionizarse positivamente y generar una fuerte interacción electrostática con la carga negativa presente en la mucosa.³ En lo que respecta a los polímeros no iónicos tienen una mucoadhesividad moderada en la interacción con la mucina y la mucosa.¹⁹ Esto se explica a través de procesos de interpenetración de las cadenas poliméricas hacia la capa de la mucosa o por formación de puentes de hidrógeno con grupos funcionales polares presentes en los carbohidratos en la mucina (Figura 2).^{19,21} Y por último están los polímeros anfóteros, que poseen en su estructura grupos funcionales aniónicos y catiónicos, donde su mucoadhesividad dependerá del pH del medio en el que se encuentre como también de su punto isoeléctrico.²⁰

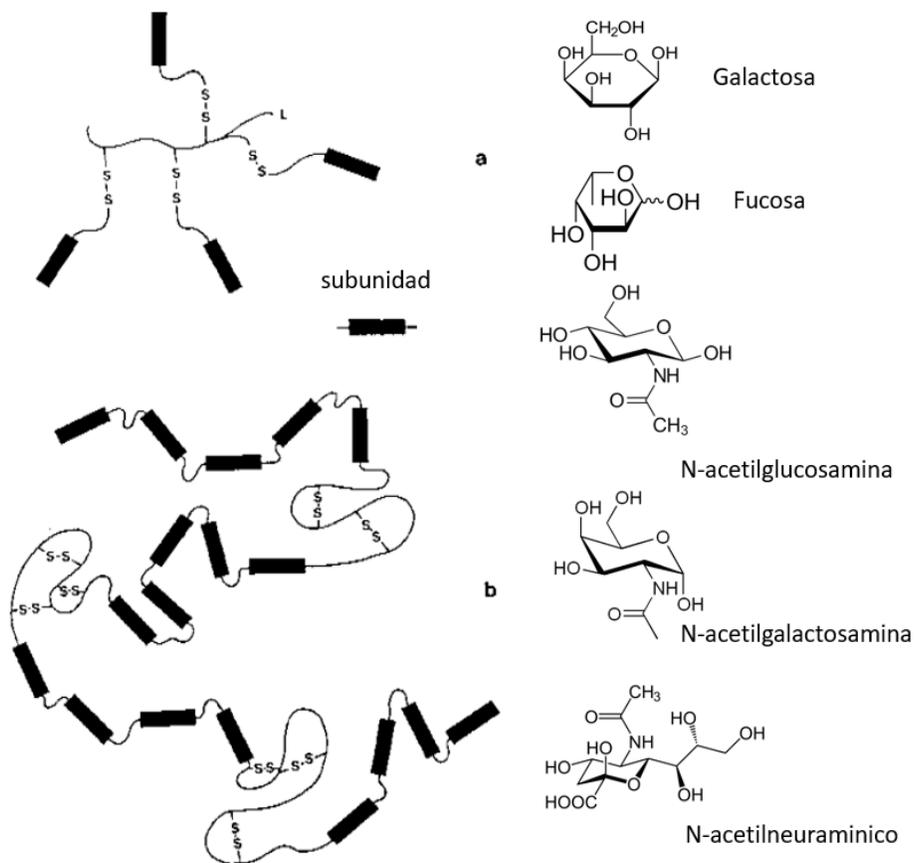


Figura 2. Estructuras macromoleculares propuestas para las glicoproteínas del mucus. a) modelo no lineal, b) modelo lineal. Carbohidratos de la mucina.²²

El polímero hidroxipropilmetilcelulosa o HPMC (Figura 3) es un polímero considerado como seguro (GRAS) por FDA²³ y por tanto, es ampliamente utilizado en la industria farmacéutica.²⁴ Si se contempla su estructura, se puede apreciar que no presenta grupos funcionales que puedan ser ionizables, por ello se trata de un **polímero de carácter no iónico**. Por consiguiente, este polímero para poder fijarse en la mucosa bucal lo hace ya sea a través de puentes de hidrógeno con grupos polares presentes en los azúcares que conforman la mucina o podría existir interpenetración de sus cadenas poliméricas a la mucosa, como dos mecanismos que pueden explicar la adhesión.¹⁹

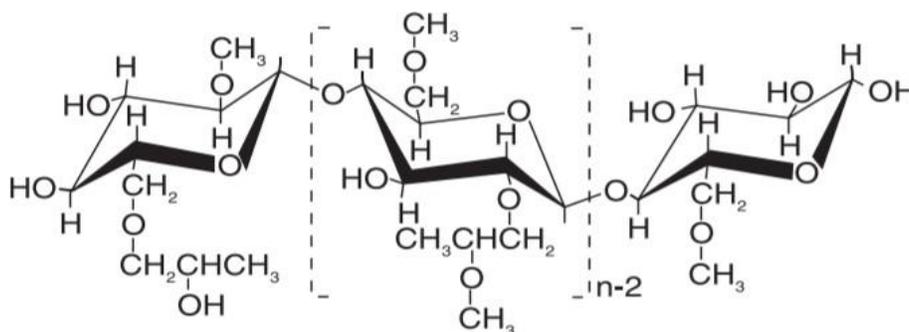


Figura 3: Estructura química de HPMC.⁷

1.5 Aspectos relevantes de procesos de fabricación de películas bucales

Los procesos de fabricación de películas poliméricas más utilizados actualmente comprenden a la extrusión en caliente y moldeo por evaporación de solvente. En ambos procesos existe una etapa que permite la adición del fármaco. Sin embargo, hay que tener presente las propiedades y características del principio activo ya que éste puede resultar incompatible con aspectos que atañen al proceso de fabricación. Tal es el caso del proceso de extrusión en caliente (Figura 4), donde la incorporación de activos farmacéuticos que sean termosensibles podrían experimentar fenómenos de degradación por las temperaturas de operación que son propias de este tipo de proceso. En consecuencia, la formulación desarrollada podría presentar problemas de estabilidad durante su fabricación e incluso durante su almacenamiento.⁵ Con respecto al proceso de moldeo convencional o por evaporación de solvente (Figura 4), el principio activo podría presentar fenómenos de incompatibilidad con el polímero utilizado en la formulación, que derivaría en procesos de agregación o cristalización del principio activo. Esto último, afectaría de manera directa en las propiedades mecánicas de la película como en los procesos de liberación del principio activo desde la forma farmacéutica.⁵

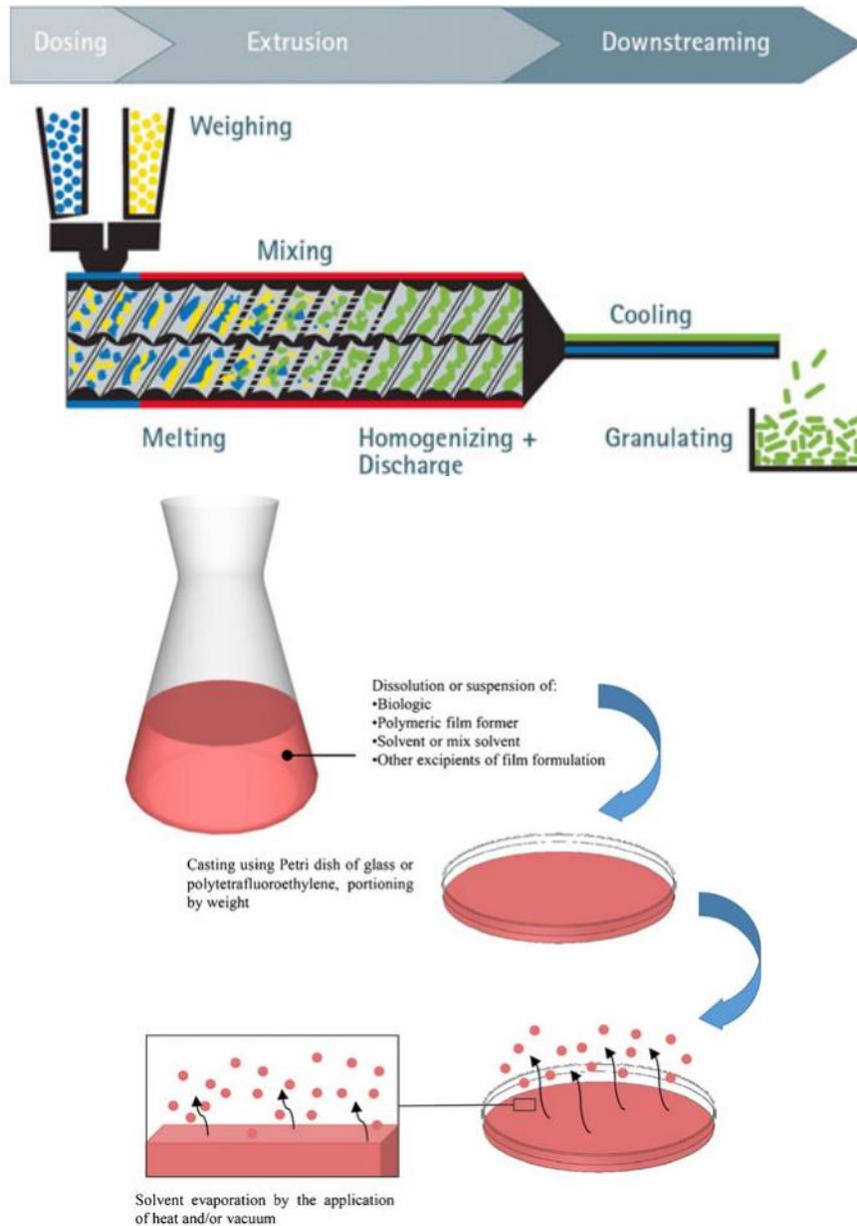


Figura 4. Procesos de fabricación películas bucales extrusión en caliente (arriba) y por moldeo por evaporación de solvente (abajo).²⁵

Tomando en consideración las desventajas descritas en cada uno de los procesos de fabricación tanto de extrusión en caliente como por moldeo por evaporación de solvente, se ha desarrollado la técnica de impresión por inyección de tinta que permite poder trabajar con las películas bucales como sustratos de impresión para cargarlas con fármacos biológicos. Utilizando tintas para su impresión, la formulación de la tinta contiene al principio activo junto con excipientes (Figura 5).²⁵ En esta técnica, el fármaco puede disolverse o dispersarse en un disolvente, lo que da como

resultado una tinta cargada de fármaco para imprimir.²⁵ En la deposición de la tinta se desarrolla la expulsión de la tinta con el fármaco desde un cartucho fijo, que ocurre por la generación de un pulso térmico (producción térmica de la gota). Como consecuencia, ocurre la formación de una burbuja que otorga la correspondiente expulsión de gotitas de tinta cuyo volumen se encuentra entre 2 y 180 pL de volumen con un diámetro de 18 a 50 μm .^{21,25}

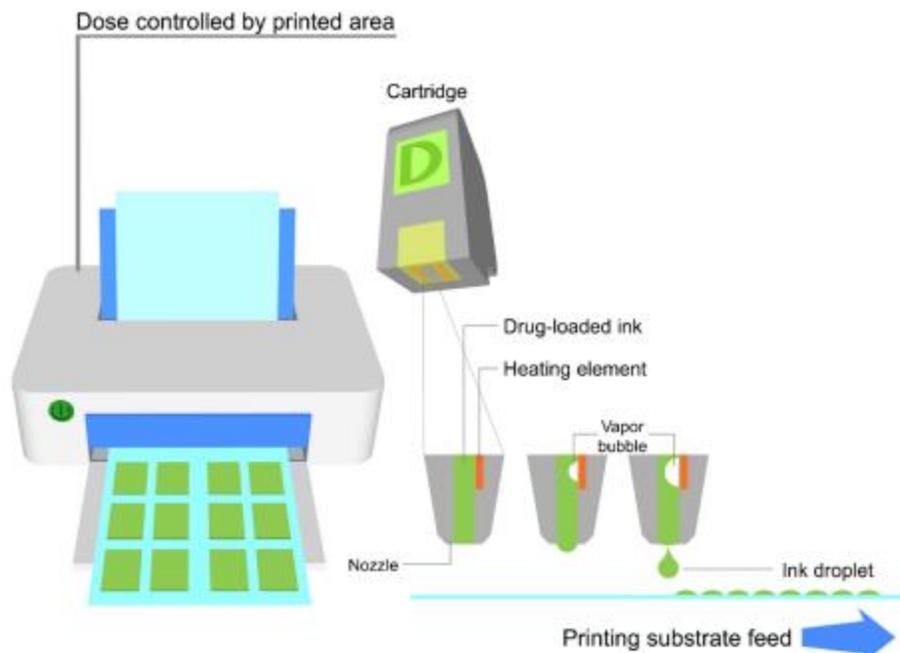


Figura 5. Impresión térmica por inyección de tinta.¹⁶

1.6 Angiotensina II, péptido modelo utilizado en representación de RE-ANG 1-9

1.6.1 Angiotensina 1-9 y RE-ANG 1-9

Angiotensina 1-9, es un péptido del sistema renina-angiotensina, que contrarregula tanto las acciones fisiológicas como patológicas de la angiotensina II. Datos recientes han demostrado que angiotensina 1-9 protege el corazón y los vasos sanguíneos de la remodelación cardiovascular adversa en modelos experimentales de hipertensión y/o insuficiencia cardíaca y reduce la fibrosis cardíaca. Estos efectos están mediados por el receptor de angiotensina II tipo 2 (ATR2).²⁴

Sin embargo, como la mayoría de los péptidos, aunque son moléculas muy activas poseen una vida media corta, siendo degradados fácilmente por enzimas, lo que dificulta sus aplicaciones en terapia. Una estrategia es utilizar su retro enantiómero, RE-Angiotensina 1-9, péptido cuya

secuencia es inversa en comparación con angiotensina 1-9, conformado por aminoácidos de la serie L, en vez de aminoácidos de la serie D que son naturales. La ventaja que tiene este retro enantiómero es que, si es aplicado, se puede llegar a percibir que su vida media es mayor que angiotensina 1-9, ya que sus L-aminoácidos no son reconocidos por las proteasas, que son enzimas propias del organismo.²⁶

1.6.2 Angiotensina II

Angiotensina II es el principal efector del Sistema Renina-Angiotensina (SRA), donde la mayor parte de sus efectos que incluyen vasoconstricción, estimulación de liberación de aldosterona y los efectos natriuréticos en el riñón, se llevan a cabo por medio de los receptores de angiotensina II subtipo 1 (ATR1). Este péptido va en representación del retro enantiómero angiotensina 1-9, como principio activo en las diversas formulaciones de tintas para su uso en la impresión de películas mucoadhesivas de polímero HPMC. Su elección radica por varios motivos, primero porque RE-ANG 1-9, presenta inconvenientes en cuanto a su límite de detección. Es por ello que angiotensina II se usó en su representación dado que su composición aminoacídica es semejante a RE-ANG 1-9, ya que angiotensina II es un octapéptido (Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe) que presenta un aminoácido menos que RE-ANG-1-9, donde el aminoácido faltante corresponde a leucina.²⁶ Además, la masa molecular de ambos péptidos es similar, en el caso de RE-ANG 1-9 es 1183,3 g/mol ²⁷ y en angiotensina II tiene un valor de 1046,2 g/mol.²⁸ La diferencia que se logra observar entre los valores antes citados es por la ausencia de leucina en angiotensina II. Ahora bien, esto último es relevante en aspectos como la determinación del % de liberación del péptido desde la película impresa en función del tiempo a través de membrana de diálisis con una determinada abertura. En términos de esto último, el paso de ambos péptidos a través de la membrana filtrante debe ser lo más parecida posible, para un correcto análisis cinético de liberación. Por ello, angiotensina II sería el péptido más indicado para representar a RE-ANG 1-9.

1.7 Potenciadores de la Permeación

Un potenciador de la permeación (PE) es un compuesto químico que se añade a la formulación junto con el fármaco o principio activo, para mejorar su permeabilidad a través de membranas o superficies biológicas. Se han realizado numerosos estudios para encontrar potenciadores de la permeación para la administración de fármacos a través de la piel, las mucosas nasales e

intestinales. Incluso, en los últimos años, muchos de estos compuestos también han sido investigados por sus efectos sobre la absorción de fármacos a través de la mucosa de la cavidad oral y que por consiguiente, podrían ser aplicados en la mucosa bucal.²⁹ Investigaciones recientes han explorado esta posibilidad.³⁰

1.7.1 Sales biliares: desoxicolato de Sodio (DC) y glicodesoxicolato de Sodio (GDC)

Hay potenciadores de la permeación de diversa naturaleza química, como ácidos grasos (ácido oleico), polímeros (quitosano), surfactantes (lauril sulfato de sodio) y sales biliares. En lo que se refiere a sales biliares, diversas investigaciones han comprobado que tienen la capacidad de mejorar la permeación de fármacos a través de los epitelios nasal, rectal, pulmonar y vaginal.²⁹

Además, se han desarrollado estudios *in vitro* y *ex vivo* que han demostrado que las sales biliares tienen la capacidad de aumentar la permeación de compuestos estructuralmente semejantes a péptidos y proteínas. Estudios *ex vivo* desarrollados en mucosa colónica de rata, revelaron que los agentes desoxicolato de sodio (DC) y glicodesoxicolato de sodio (GDC), lograron duplicar la permeabilidad aparente (Papp) de octreótido. En mucosa bucal de porcino, GDC logró aumentar aproximadamente 3 veces la permeabilidad aparente (Papp) de octreótido y FITC-LKP (péptido fluorescente de isocianato de fluoresceína), sin causar daño. En general, GDC y DC fueron eficaces en modelos intestinales y bucales.³⁰

Por esto, esta investigación buscó caracterizar las películas de polímero mucoadhesivo de HPMC impresas con tintas de diversa composición pero que contenían en común al péptido modelo angiotensina II (DF8). El péptido contó con la presencia de una sal biliar, que puede ser desoxicolato de sodio (DC) o glicodesoxicolato de sodio (GDC), como sales biliares potenciadoras de la permeación (Figura 6).

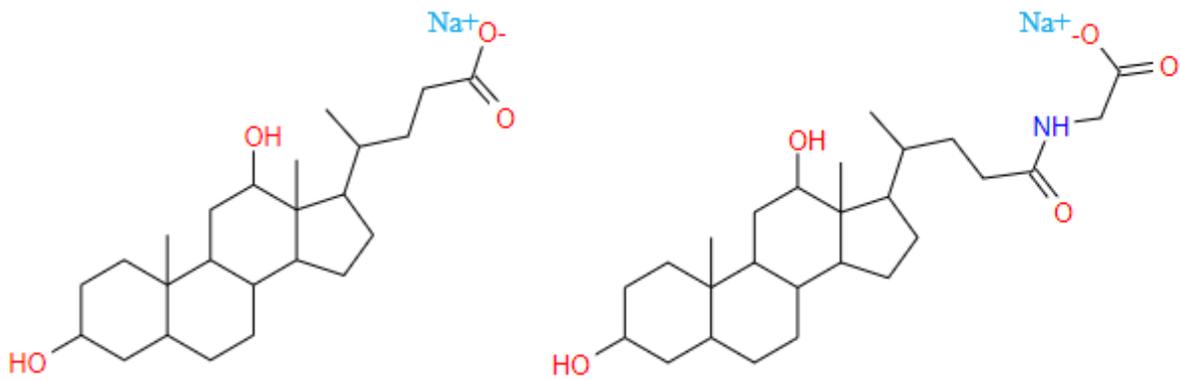


Figura 6: Estructura química desoxicolato de sodio (DC, izquierda) y glicodesoxicolato de sodio (GDC, derecha).^{31,32}

2. HIPÓTESIS

Es posible desarrollar y caracterizar películas mucoadhesivas de HPMC cargadas con un péptido modelo y con un potenciador de la permeación, como una potencial forma farmacéutica de administración bucal de medicamentos biológicos.

3. OBJETIVO GENERAL

Desarrollar, caracterizar y analizar la impresión de películas mucoadhesivas de HPMC, con tintas cuya composición incluye a angiotensina II (DF8) como un péptido junto con potenciadores de la permeación del tipo sal biliar como DC y GDC para evaluar su potencial como eventual forma farmacéutica bucal.

4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

4.1. Desarrollar películas de HPMC mediante el proceso de fabricación de moldeo por evaporación, para ser sometidas a procesos de impresión.

4.2. Determinar tanto el contenido en mg de DF8 multi impresa por cm^2 de película, como la eficiencia de los procesos de impresión con diversos tipos de tintas con diferente composición.

4.3. Caracterización de formulaciones impresas en cuanto a sus propiedades mecánicas como mucoadhesivas y analizar e implementar modelos cinéticos que logren ajustarse a los perfiles de liberación de angiotensina II desde cada una de las formulaciones impresas.

5. MATERIALES

Agua milli-Q

Glicerol 85% Merck KGaA (Alemania, Emsure)

Hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC) K100 Methocel LV Premium. (USA, DOW).

Angiotensina II (DF8), n° lote: P220920-2-LR193974. (China, GL Biochem Shanghai)

L-Arginina 98,5 – 101,0%, n° lote: SLBS2263V. (Japón, Sigma Aldrich)

Desoxicolato de sodio, n° lote: SLBG4508V. (USA, Sigma Aldrich)

Glicodesoxicolato de sodio, n° lote: BCCG0654. (UK, Sigma Aldrich)

Fosfato de potasio monobásico (Sigma Aldrich), n° lote: K18387080

Hidróxido de sodio en lentejas (Sigma Aldrich), n° lote: SO-1510

Etanol 95° (TCL Group)

Mucina de estómago de porcino tipo III, unido a ácido siálico (0,5-1,5%), n° lote: SLBX8660 (USA, Sigma Aldrich)

Etilcelulosa NF (EC) Standard 10, BASF (Ludwigshafen am Rhein, Germany).

Citrato de trietilo (TEC) Adquirido desde AK Scientific Inc. (Union City, CA, USA).

Policarbófilo, Lubrizol.

Filtros hidrofílicos baja unión a proteína LCR, PTFE. 0,45 μm . (Japón, Millex – LH)

Jeringas 1 ml y 5 ml. (falta especificar)

Filtros de membrana hidrofílicos PVDF, 47 mm, abertura poro 0,45 μm (Ireland, Durapore, Merck Millipore Ltd)

6. METODOLOGÍAS

6.1 Desarrollo de películas poliméricas mucoadhesivas de HPMC

6.1.1 Moldeos de películas

Se pesaron 4 g de polímero HPMC Methocel K100 en balanza analítica para la elaboración de películas mucoadhesivas bucales a través de proceso de fabricación por moldeo con solvente.³³ Se agregaron 130 mL de agua milli-Q a los 4 g de polímero pesados previamente. La mezcla obtenida se agitó aproximadamente durante 1 hora en placa calefactora a 600 rpm con una temperatura de 70 °C, la cual fue controlada para lograr una completa dispersión del polímero. Luego de que se observó una solución traslúcida, se adicionaron 2 g de glicerol al 85% m/v (volumen equivalente a 1,626 mL) junto con 70 mL de agua milli-Q a 4 °C. Luego de ello, la mezcla se almacenó a 4 °C durante 24 horas para la remoción de burbujas de aire que pudiesen estar presentes en ella. Concluido el periodo anterior, se masaron 25 g de la solución obtenida en placas de vidrio petri, las cuales fueron dispuestas bajo campana para su secado completo entre 24 a 48 horas.³³ Finalmente, las películas obtenidas, fueron de una superficie lisa y homogénea, que posteriormente se almacenaron en un desecador para evitar la excesiva humedad y posible degradación de cada una de ellas.

6.2 Formulación de tintas, para impresión por inyección de tinta en películas de HPMC

Se elaboraron tres tipos de tintas, para impresión de películas poliméricas mucoadhesivas de HPMC. Las tintas tienen en común el péptido modelo utilizado (angiotensina II, DF8) y dos de ellas incluyen a potenciadores de la permeación del tipo sal biliar como desoxicolato (DC) y glicodesoxicolato de sodio (GDC), en proporciones definidas.

6.2.1 Tinta 20 mg DF8 por mL

Se pesaron 20 mg de DF8 con papel para pesar, en balanza analítica. Luego se disolvieron en 700 µL de agua milli-Q con los cuales se arrastró los restos de DF8 sobre papel para pesar, para disponer los 20 mg pesados en tubos de centrifuga de 1,5 mL. Luego, se procedió con agitación del tubo en vortex. Finalmente se tomaron 300 µL de glicerol al 85%, lo cuales fueron depositados en tubos de centrifuga que se sometieron a agitación hasta obtener una solución homogénea, logrando la tinta deseada.

6.2.2 Tinta 20 mg de DF8 y GDC 0,2 mM por mL

Al igual que la elaboración de la tinta descrita con anterioridad, el procedimiento es similar, es decir, hubo la existencia de una fase acuosa y de glicerina, donde se añadieron 20 mg de DF8, junto con la adición de glicodesoxicolato de sodio (GDC) hasta obtener una mezcla de concentración de 0,2 mM de la sal biliar en el mL de tinta.

6.2.3 Tinta 20 mg de DF8, DC 0,2 mM por mL

Para la elaboración de esta tinta, estuvo presente la misma cantidad de DF8 por mL al igual que en las tintas ya descritas. La sal biliar utilizada fue desoxicolato de sodio (DC) a una concentración de 0,2 mM en tinta, junto con L-Arginina para la obtención de una mezcla con una viscosidad adecuada para poder ser manipulada o usada como tinta para impresión.³⁴

6.3 Impresión por inyección de tinta de películas de HPMC

Una vez que se formularon las tintas, se procedió a adherir las películas en una plantilla plástica de impresión. El proceso involucró la determinación de la cantidad de “multi impresiones” que se pueden desarrollar sobre cada película, para ello se probaron impresiones continuas que fueron desde 4, 5, 6 hasta 7 impresiones sobre cada una de ellas (es decir, 4, 5, 6 y hasta 7 multi impresiones). El procedimiento incluyó el debido secado de las películas impresas a temperatura ambiente entre cada impresión, donde fueron guardadas en un desecador hasta su caracterización.

6.4 Caracterización de películas

6.4.1 Determinación de DF8 por cm² de impresión

El número de multi impresiones de tinta que se desarrollaron en este proyecto fue de cuatro sobre cada una de las películas de HPMC fabricadas.

6.4.2 Método analítico para determinación de DF8

El método analítico utilizado para determinación del contenido de péptido DF8 en una muestra, fue el de Micro BCA Protein Assay Kit Thermo Scientific, que contiene formulaciones con ácido bicinconínico y iones de cobre.

El procedimiento de medición se desarrolló mezclando los reactivos presentes en el kit, todos en una proporción definida y fija, para obtener el reactivo de trabajo WR (proporción WR soluciones kit: solución reactivo A: 50%, solución reactivo B: 48% y solución reactivo C: 2%). Luego, WR se mezcló con un volumen de muestra de solución proteica en una proporción 1:1. Una vez que se elaboró la mezcla, inmediatamente fue incubada a 60 °C durante 1 hora exacta, para que el proceso de reducción de Cu^{+2} y formación del complejo quelato se desarrollara de manera óptima. Cabe señalar, que la relación que existe entre la absorbancia percibida por el complejo quelato es lineal con respecto a la concentración de proteínas a medir.³⁵ A partir de esto, se elaboró una curva de calibración de DF8 en agua milli-Q que permitió cuantificar el contenido de DF8 presente en cada cm^2 de las películas impresas con tintas de diversa composición.

Con respecto al procedimiento de formación de las muestras, para determinar el contenido en mg de DF8 por cm^2 para cada tipo de película, incluyó la disolución de 1 cm^2 de formulación impresa en un volumen de 5 mL en agua milli-Q. Después se tomó un volumen de esta solución que fue previamente tratada con filtros Millex – LH hidrofílicos con membrana de PTFE tamaño de poro de 0,45 μm de baja unión a proteínas, para la remoción del polímero HPMC presente en la muestra. El volumen de filtrado obtenido posteriormente se mezcló con el WR. A su vez, se tomaron películas que fueron impresas con tintas de diversa composición para obtener los valores de blancos para cada tipo de película y solo contabilizar la absorbancia atribuida al complejo quelato soluble, formado por reducción del ion cúprico por parte de angiotensina II (DF8). La lectura de las absorbancias de las muestras incubadas se llevó a cabo utilizando un lector de absorbancia de microplaca iMark – Biorad.

Este método analítico también fue utilizado en los ensayos de liberación de DF8 desde películas impresas con diversos tipos de tintas.

6.4.3 Propiedades mecánicas

Se determinó las propiedades mecánicas de las películas no impresas como de aquellas que sí fueron impresas con diversos tipos de tintas, en sextuplicado, con un texturometro (TA.XT Plus Stable Micro Systems. Godalming, UK).

El texturometro presenta un sistema de abrazaderas donde se colocó a las películas que terminaron acopladas a ellas. Se midió el largo inicial de la película, previo al desarrollo del experimento, para luego dar inicio al proceso de estiramiento de las películas. La abrazadera superior subió mientras la película comenzó a estirarse hasta que se produjo su rotura. En forma simultánea el instrumento presentó los resultados a través de curvas de carga (N) en función de la extensión de máquina (abrazadera superior) en mm. A partir de estos datos, se determinaron las siguientes propiedades:

- **Elongación al quiebre (EB)**

Este parámetro da cuenta del cambio en el largo de la película polimérica hasta antes de que se produzca su rotura. Corresponde a una relación del aumento de la longitud de la película hasta antes de su ruptura con respecto a su largo inicial, el cual es equivalente a un porcentaje del mismo, que se expresa como un porcentaje de elongación (% strain).¹⁴

- **Resistencia a la tracción (TS)**

Propiedad mecánica que se refiere a la máxima tensión que es capaz de soportar la película hasta su ruptura. Para su obtención se debe identificar cuál es la carga o máxima fuerza responsable de la rotura de la película y luego se debe dividir aquella magnitud, por el área de sección transversal de la película. Por ello, es importante saber las dimensiones de cada una de las películas a medir, como su ancho (medido con una regla normal, en mm) y el espesor, que fue determinado a través de un medidor de espesor en mm, lo que finalmente arrojó el valor del área de sección transversal de cada película.¹⁴

- **Módulo de Young (MY)**

También denominado módulo de elasticidad, el cual es indicador de la rigidez de la película y mide la resistencia del material a experimentar pequeñas deformaciones en su región elástica. Corresponde a la pendiente de la curva de tensión versus elongación de la película, en su región inicial elástica.³⁶

Como control, se imprimieron películas con una mezcla de agua y glicerol (70% y 30% de un mL, respectivamente), que, junto con las mediciones obtenidas con las películas no impresas, permitieron realizar comparaciones con los valores determinados en cada una de las propiedades,

obtenidas de las películas impresas con diversos tipos de tinta.

6.4.4 Propiedades Mucoadhesivas

Se utilizó el mismo texturometro que midió propiedades mecánicas (TA.XT Plus stable micro systems. Godalming, UK), en el que se dispusieron diversas películas horizontalmente sobre una estructura de forma cúbica. En este sitio, a cada tipo de película se le añadió un volumen de 70 μ L de dos tipos de dispersiones modelo de mucina al 2% (m/v), donde una de ellas fue elaborada con agua milli-Q y en la otra se utilizó una solución tampón PBS pH 6,8 como medio líquido de dispersión³⁷, que simula las condiciones de pH salival humano donde se desenvuelve la mucina.³⁸ Se hicieron las mediciones de mucoadhesividad con ambas dispersiones, para ver el efecto del medio acuoso sobre la adhesión en las películas, además estas dispersiones humectaron a cada una de ellas.

Se midió fuerza de desprendimiento (FD) como trabajo de adhesión (WoA), en sextuplicado, que se obtuvieron a partir del peak y el área bajo la curva en el perfil de carga versus extensión, respectivamente, en películas impresas como no impresas. También se consideró la medición de parámetros de adhesión sobre dos películas que actuaron como controles en este ensayo de caracterización: como control positivo se trabajó con películas de Policarbófilo (PCP), indicado como un polímero que tiene altas propiedades mucoadhesivas.¹⁴ Como control negativo se midió adhesión de películas de Etilcelulosa (EC), con reducidos valores en sus propiedades mucoadhesivas.³⁶ Para ejecutar cada una de las mediciones, se estableció un tiempo de contacto de 60 segundos, fuerza de contacto de 50 mN y velocidad de retiro de 0,5 mm/s del cilindro de acero inoxidable de las películas humectadas con mucina. El cilindro se acercó a la película en estudio, tomó contacto con ella y luego procedió a retraerse. En paralelo, el software utilizado entregó valores de carga (N) y extensión en mm, donde se pudo contemplar la fuerza necesaria para romper la adhesión.¹⁴

6.4.5 Análisis cinético de liberación DF8 desde películas impresas con diferentes tintas.

El ensayo para la obtención de los perfiles liberación de DF8 desde películas impresas con diversos tipos de tinta, contempló el uso de celdas de Franz en el equipo Difusor Phoenix DB-6.³⁹

Se trabajó con 5 celdas de Franz por cada ensayo de liberación de DF8 para cada una de las películas impresas. Para ello, se preparó solución de PBS pH 6,8³⁷, que se utilizó como medio acuoso en las celdas tanto donoras como receptoras, simulando las condiciones de pH salival humano, para que el contexto de liberación de DF8 desde las películas sea lo más cercano al real.³⁸ Se dispuso un material filtrante de PVDF cuyo tamaño de abertura es de 0,45 μm y sobre él se dispuso 1 cm^2 de película impresa, todo esto entre celda donora y receptora. Luego, DF8 se liberó en 1 mL de solución PBS pH 6,8³⁷, esto en la cámara donora de la celda. Luego de la liberación de DF8, este péptido traspasó aquel filtro y, éste último impidió el paso del polímero HPMC hacia la cámara receptora de la celda que contenía 10,1 mL de la misma solución de PBS que la cámara donora. El proceso de liberación de DF8 se desarrolló con agitación suave (200 rpm) hacia la cámara receptora y a una temperatura de 37 °C. Se extrajeron 400 μL de muestra desde cada cámara receptora en cada celda a intervalos programados de 3, 18, 33, 48, 120 y 540 minutos. Luego automáticamente se agregó un volumen de reposición equivalente al extraído, de PBS a 37 °C. Los 400 μL extraídos desde las cámaras receptoras se dispusieron en viales de 1,5 mL, con la ayuda de un toma muestra acoplado a un brazo mecánico.

También se procedió a determinar la difusión de DF8 libre como control para cada tipo de formulación impresa. DF8 se encontraba como molécula libre en 1 mL de PBS pH 6,8 en la cámara donora, que luego difundió hacia la cámara receptora. Luego de esto se determinaron los factores de similitud entre cada control con su respectivo perfil de liberación de DF8 desde cada formulación impresa.

Se construyó una curva de calibración de DF8 en solución de PBS pH 6,8, con la cual se determinó la cantidad en mg de DF8 en cada uno de los viales con muestra extraída de la celda receptora a los tiempos indicados con anterioridad. Todo lo anterior para finalmente poder obtener el % de liberación acumulada de DF8, a través del uso del método analítico Micro BCA Protein Assay Kit Thermo Scientific. Se mezcló un determinado volumen de WR con un volumen de muestra de DF8 presente en los viales en una proporción de 1:1, para poder medir en triplicado.

Luego, las mezclas obtenidas fueron incubadas a 60 °C, para su posterior lectura en lector de absorbancia de microplaca iMark – Biorad a 562 nm. Se elaboraron en paralelo los blancos

correspondientes a cada tipo de película impresa que fueron sometidas a los ensayos de liberación.

Todo lo anteriormente descrito se ejecutó para determinar el mecanismo de liberación de DF8 a partir de las películas impresas. Por consiguiente, se evaluaron modelos cinéticos de regresión lineal (cero y primer orden) y no lineal (Higuchi y Korsmeyer-Peppas) para el ajuste de datos y se compararon en función de los valores obtenidos del coeficiente de determinación ajustado (r^2). Para ello se utilizó el programa DDSolver desarrollado para Microsoft Excel.

6.5 Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó con el software Minitab 17. Se utilizó ANOVA para comparación entre múltiples grupos y posteriormente se realizó el test de Tukey para comparaciones pareadas. Un nivel de $p < 0,05$ fue considerado como estadísticamente significativo. Los resultados fueron expresados como el promedio de las mediciones junto con su desviación estándar y el cálculo del coeficiente de variación. Se utilizó también el factor de similitud (f_2) para comparar perfiles de liberación.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 Desarrollo de películas de HPMC mediante moldeo por solvente.

El método ocupado para elaborar las películas poliméricas fue el moldeo por evaporación por solvente, que consiste en solubilizar el polímero junto al fármaco y excipientes en algún solvente para formar una suspensión o solución.¹⁶ Sin embargo, la principal diferencia de la metodología utilizada en esta investigación, con respecto al moldeo por solvente tradicional, tiene relación en que la solución polimérica obtenida incluye al fármaco integrado en ella, lo cual puede ser desventajoso en formulaciones sobresaturadas de fármaco. La respuesta a lo indicado se puede atribuir a que la solubilidad del activo en el polímero puede llevar a problemas de incompatibilidad con resultado en la separación de fases debido a una posible recristalización.¹⁶ En consecuencia, el péptido modelo utilizado fue dispuesto en diversas tintas que se ocuparon para imprimir sobre películas poliméricas mucoadhesivas, por un proceso de inyección de tinta con pulso térmico.

Ahora bien, con respecto a las propiedades reológicas de la dispersión polimérica obtenida, éstas tienen un fuerte impacto en aspectos importantes como el nivel de secado y la apariencia final de la película.¹⁴ La generación de burbujas en el proceso de mezclado de la dispersión, puede llegar a generar películas con un espesor variable como de aspecto rugoso y poco liso en la superficie de ellas, pudiendo afectar en la homogeneidad de la impresión⁴⁰. Una vez que se obtuvo la dispersión desprovista de burbujas se procedió a moldearlas, para ello se utilizaron placas de vidrio petri, que se dispusieron bajo campana, para su secado que ocurrió entre 24 y 48 horas. El rango de tiempo de secado mencionado con anterioridad es relativo, en términos de la apariencia de las películas dispuestas en las placas, que debe contemplar un secado homogéneo de la película formada y evitar que la superficie de ellas sea irregular y de espesor heterogéneo.¹⁴ Como resultado, se obtuvo películas homogéneas y óptimamente secas, que fueron sometidas a procesos de impresión, ya que de esta forma es como se dispuso el péptido o activo biológico, en cada una de ellas.

7.2 Formulación de tintas, para impresión por inyección de tinta en películas de HPMC

Estudios de permeación de péptidos *ex vivo* en mucosa bucal de cerdo, sirvieron de referencia

para poder construir la composición de las tintas para imprimir en películas de HPMC. Se indica que con 10 mM de GDC se logró aumentar la permeabilidad aparente de fármacos de naturaleza peptídica como octreótido y FITC-LKP (péptido fluorescente de isocianato de fluoresceína), cuyos valores de concentración utilizados corresponden a 0,714 μM y 500 μM , respectivamente.³⁰ En base a aquello, se estableció un rango de concentración de trabajo de péptido modelo DF8 (angiotensina II) que va desde 1 μM a 500 μM , en el sitio donde se desarrollaría un estudio de liberación y futuramente de permeación *ex vivo* de aquel péptido, que corresponde a la celda donora de Franz. Es por esto que para asegurar que la cantidad de DF8 en la celda donora estuviera dentro del rango de concentración indicado, se trabajó con 20 mg de DF8 por cada mL de tinta. Lo anterior se corroboró experimentalmente más adelante.

Ahora bien, independiente del tipo de tinta a utilizar, el volumen elaborado fue de 1 mL, en donde la composición general de cada una de ellas comprendió una mezcla de un 70% con fase acuosa, con un 30% de glicerol, para asegurar las características fisicoquímicas de la tinta como la viscosidad y tensión superficial. Ambas propiedades mencionadas anteriormente, influyen tanto en la formación y tamaño de gota de tinta.²¹ Además, se buscó prevenir posibles filtraciones de tinta desde el cartucho hacia la zona de impresión.

En lo que respecta a la composición de las tintas que incluyeron en su formulación a sales biliares, se tenía previsto elaborar una tinta de 20 mg de DF8 junto con 10 mM de GDC por mL, dado que aquella concentración logró aumentar la permeabilidad aparente (Papp) tanto de octreótido como de FITC-LKP en estudios de permeación *ex vivo* con mucosa bucal de porcino.³⁰ Sin embargo, se observó la formación de precipitado en la tinta lo que derivó en hacer un estudio de la concentración de GDC óptima a utilizar. A través de la reducción de la concentración del potenciador por órdenes de magnitud, se logró determinar que con una concentración de 0,2 mM GDC no se observó formación de precipitado, por tanto, ésta última concentración resultó ser la elegida para la sal biliar junto con los 20 mg DF8 por mL, en la tinta. En cuanto a la tinta con DC como sal biliar, se tenía planificado trabajar con 5 mM de DC en contacto con 20 mg de DF8 por mL de tinta. Aquella concentración de DC resultó ser efectiva en el aumento de permeación de sustancias peptídicas y glucosídicas a través de mucosas de animales con reducidas alteraciones sobre la histología de los tejidos usados.³⁰ No obstante, se presentaron inconvenientes en la tinta

por aumento en su viscosidad, con lo cual se utilizó a L-Arginina que en literatura se reporta como reductor de la viscosidad de soluciones proteicas.³⁴ Es por esto que se añadió una cantidad de 20,1 mg (equivalente a una punta de espátula), que resultó en la obtención de una tinta con una viscosidad reducida. Posterior a esto, se decidió elaborar una tinta con una concentración de 0,2 mM de DC y 0,124 mM, de L-Arg. Los fenómenos relatados se podrían explicar considerando las evidencias encontradas por investigaciones que indican que las sales biliares pueden presentar un cierto grado de interacción con péptidos o proteínas, con dependencia del pH presente en el medio.⁴¹ Entre las interacciones reportadas se indican la formación de precipitados y de estructuras gelificadas.⁴² Por tanto, para obtener películas impresas elaboradas bajo las mismas condiciones en términos de concentración en tinta, estas fueron iguales para ambas sales biliares (DC y GDC a 0,2 mM), que se utilizaron para imprimir películas. Ahora bien, todo lo anterior fue ejecutado con fines comparativos para cada uno de los estudios de caracterización de las formulaciones impresas.

7.3 Caracterización de películas impresas

7.3.1 Determinación de mg de DF8 por cm² de películas de HPMC impresas con diversas tintas.

Previo a desarrollar el proceso de impresión formal de las películas poliméricas, se determinó la cantidad de impresiones que es posible ejecutar con 1 mL de tinta, cuya fracción acuosa es del 70% y un 30% es de fase líquida de glicerina. Para ello con la ayuda de una planilla plástica, se contabilizaron 18 impresiones.

Con respecto al número de impresiones reiteradas que se desarrollaron sobre cada película polimérica, se estableció que el material fue capaz de tolerar hasta 4 multi impresiones, en base a aspectos cualitativos, tales como, el grado de desprendimiento de la película de la lámina base por cada paso en la zona de impresión. Con un número superior de multi impresiones, las películas comenzaron a desmontarse o deslizarse de la lámina basal. En términos de aspectos cuantitativos, se midieron los mg de DF8 por cm² de película con 4, 5 e incluso 7 multi impresiones con 1 mL tinta con 20 mg de DF8. Se encontró que no hubo diferencias notables en los miligramos de péptido por cm² entre las multi impresiones desarrolladas, por ello, se seleccionó aplicar 4 multi impresiones sobre cada sustrato de impresión.

El método analítico Micro BCA Protein Assay Kit Thermo Scientific, fue elegido para la cuantificación de DF8 en cada tipo de película impresa, ya que es definido como altamente sensible. La medición ocurre a través de la detección colorimétrica a 562 nm por absorbancia del complejo quelato soluble en agua de ácido bicinconinico con ion cuproso (Cu^{+1}), donde ésta última entidad, se forma por la reducción del ion cúprico Cu^{+2} . El catión de cobre con carga +2, se encuentra presente en uno de los reactivos que se mezclaron a una determinada proporción con la solución proteica. Ahora bien, la reducción de Cu^{+2} , se produce por la presencia de proteínas en la solución que es analizada.³⁵

La curva de calibración que se obtuvo de DF8 en agua milli-Q tuvo un rango de concentración de 5 a 120 ppm, utilizando el método analítico ya indicado, con un valor de r^2 de 0,9946. La finalidad de la construcción de la curva es para poder obtener la cantidad de mg de DF8 por cm^2 de diversos tipos de impresión. Cabe destacar que el volumen de solución proteica fue previamente filtrado con filtros Millex – LH hidrofílicos con membrana de PTFE tamaño de poro de 0,45 μm de baja unión a proteínas para remover polímero de HPMC que podría haber actuado como interferente en la medición. Los resultados obtenidos se encuentran en la siguiente tabla:

Tabla 1. Formulaciones impresas con diversas tintas. Cantidad de mg de DF8 total por cm^2 y eficiencia de impresión, en cada una de ellas. Valores que no comparten la misma letra, presentan diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

Formulación impresa	mg DF8 total cm^2	Estadística mg DF8/cm^2	Eficiencia impresión (%)
DF8	0,12 ± 0,00	A	95,6 ± 2,7
DF8 + DC	0,10 ± 0,00	B	85,2 ± 0,1
DF8 + GDC	0,09 ± 0,00	C	77,0 ± 0,1

Se puede observar en la Tabla 1, que las formulaciones resultaron ser estadísticamente significativamente diferentes entre sí con un nivel de $p < 0,05$. En cuanto a los mg de DF8 por cm^2 en cada tipo de impresión hubo leves diferencias. La misma tendencia se obtuvo con la medición de la eficiencia de impresión para cada tipo de formulación impresa. Estas diferencias se podrían explicar por eventuales interacciones entre las sales biliares y el péptido, con dependencia del pH presente en el medio.⁴¹ Estos estudios se han desarrollado en otras investigaciones donde se han

observado este tipo de diferencias y esta investigación no estuvo ajena a esto.¹⁶ De todas maneras, estos estudios son reproducibles, por los reducidos valores de dispersión (desviación estándar) que presentan los resultados.

7.3.2 Propiedades mecánicas películas de HPMC con diversos estados de impresión.

Las propiedades mecánicas medidas fueron: módulo elástico (MY), fuerza máxima – resistencia a la tracción (TS) y elongación al quiebre (EB). El análisis se realizó comparando las propiedades mecánicas obtenidas de las películas impresas con distintos tipos de tinta, con películas de HPMC sin impresión, para ver el efecto que provoca la impresión sobre dichas propiedades. A su vez, se contó con un control para ver el efecto de la composición de la tinta utilizada para imprimir, sobre las propiedades mecánicas de las películas ya impresas. Por ello, se utilizó películas impresas con tintas cuya composición fue de un 70% y un 30%, de una fase acuosa (agua milli-Q) y fase líquida de glicerina, respectivamente.

7.3.2.1 Propiedades mecánicas películas HPMC no impresas (S/I).

La resistencia a la tracción como la elongación al quiebre en películas de HPMC sin imprimir resultó ser de $27,8 \pm 3,6$ MPa y $43,8 \pm 4,6$ %, respectivamente según la Tabla 2. El valor obtenido fue 3 veces mayor y 1,6 veces menor para TS y EB, respectivamente, en comparación al reportado por la literatura utilizada como referencia, que desarrolló un sistema de administración de fármacos biológicos a través de sistemas nanoparticulados que fueron impresos en películas de HPMC.⁴³

Tabla 2. Propiedades mecánicas HPMC sin impresión obtenidos en investigación actual y literatura (investigación) de referencia.

Propiedades mecánicas investigación actual			
Películas	TS (MPa)	EB (%)	MY (MPa)
HPMC (S/I)	$27,7 \pm 3,6$	$43,8 \pm 4,6$	$3,1 \pm 0,5$
Propiedades mecánicas literatura de referencia			
Películas	TS (MPa)	EB (%)	MY (MPa)
HPMC (S/I)	$8,2 \pm 1,0$	$73,2 \pm 8,3$	$4,4 \pm 1,0$

Los motivos que pueden explicar las diferencias que se obtuvieron en las propiedades

mecánicas señaladas responden a aspectos tales como la diferencia en el espesor de las películas analizadas tanto en la literatura considerada como la que se relata en este escrito. También, consideraciones operacionales como, por ejemplo, el control de la temperatura de mezclado en la elaboración de la dispersión polimérica puede repercutir en el contenido de agua que queda en la dispersión y por tanto puede afectar en el contenido de agua de las películas que se obtuvieron, volviéndolas más rígidas. Las condiciones de almacenamiento de las películas previo a ser analizadas, es un punto relevante para considerar, ya que el estado de un agente desecante en el desecador repercute en el contenido de humedad ambiental que pueda llegar a tener. Diferencias en el estado del agente desecante como una temperatura de almacenamiento no adecuada, puede dar cuenta de la variabilidad de los resultados obtenidos. Sin embargo, los valores del módulo de Young en ambos estudios resultaron ser cercanos ($3,1 \pm 0,5$ y $4,4 \pm 0,9$ MPa, en investigación actual y de referencia, respectivamente). Esto se puede atribuir a la acción del glicerol añadido como plastificante ya que en ambas investigaciones la cantidad agregada resultó ser la misma, para otorgar una mayor elasticidad a las películas, lo cual es un aspecto deseado al momento de elaborar una película polimérica para administración bucal.

7.3.2.2 Resistencia a la tracción (TS) de películas impresas con diversas tintas.

Al observar los resultados de la Figura 7 se puede deducir que la impresión, independiente de la tinta a utilizar, genera una disminución en TS en películas impresas.

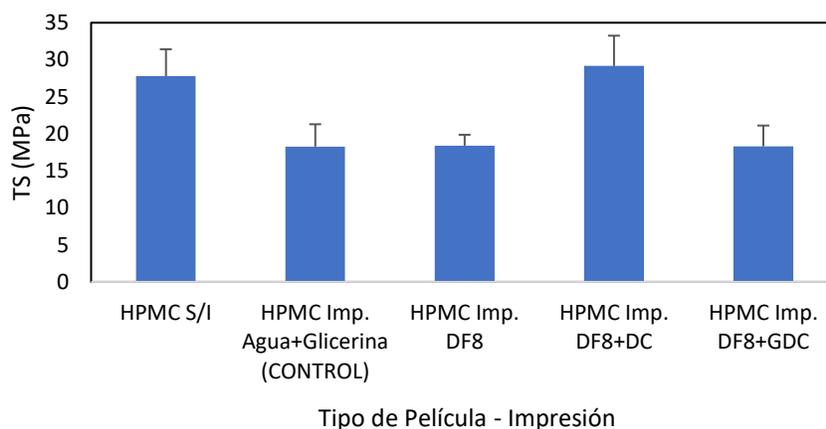


Figura 7: Resistencia a la tracción promedio (TS) de películas de HPMC no impresas e impresas.

Tabla 3. Resistencia a la tracción (TS) en películas con diversos estados de impresión. *: Valores que no comparten la misma letra, presentan diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

Tipo de impresión	TS (MPa)	Estadística TS*
HPMC S/I	27,8 ± 3,6	A
HPMC: agua y glicerina	18,3 ± 3,0	B
HPMC: DF8	18,4 ± 1,5	B
HPMC: DF8 + DC	29,2 ± 4,1	A
HPMC: DF8 + GDC	18,3 ± 2,8	B

La posible explicación a los valores de TS que se obtuvieron tanto en películas no impresas como impresas, se debe a que la tinta en el proceso de impresión, al momento de ser dispuesta en la película desnuda genera una humectación en su superficie, lo que se traduce en una irregularidad en su grosor, lo que vuelve a la película más vulnerable a la rotura. Por ello, se requirió la aplicación de una fuerza de menor magnitud y en su defecto una menor tensión, para ocasionar la ruptura en películas impresas.⁴⁴ No obstante, el papel de la película control no solo permitió contemplar lo antes mencionado, sino también pudo explicar el efecto de los componentes presentes en la tinta en los cambios observados en TS para cada una de las películas analizadas. En general, se puede examinar que no hay una tendencia totalmente definida, pero en la mayoría de las películas impresas, ni el péptido ni las sales biliars generaron grandes cambios en los valores de resistencia a la tracción si se comparan películas impresas entre sí y con el control. Se requiere de un estudio más profundo para explicar el comportamiento mecánico que se contempló con las películas impresas con DF8 y DC.

7.3.2.3 Elongación al quiebre (EB) de películas impresas con diversas tintas.

En la Figura 8 se puede ver que la impresión generó un aumento en la elongación al quiebre en las películas sometidas a este proceso. La posible explicación a esto puede deberse al mayor contenido de agua que otorgó la tinta a la película, ya que es considerada como plastificante.⁴⁵

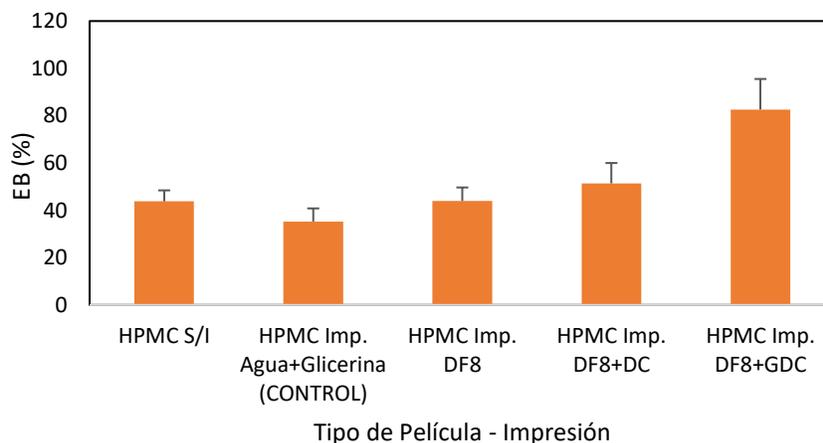


Figura 8: Elongación al quiebre (EB) de películas de HPMC no impresas e impresas con diversos tipos de tinta.

Tabla 4. Elongación al quiebre (EB) en películas con diversos estados de impresión. *: Valores que no comparten la misma letra, presentan diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

Tipo de impresión	EB (%)	Estadística EB*
HPMC S/I	43,8 ± 34,6	BC
HPMC: agua y glicerina	35,3 ± 5,5	C
HPMC: DF8	44 ± 5,7	BC
HPMC: DF8 + DC	51,4 ± 8,6	B
HPMC: DF8 + GDC	82,6 ± 12,9	A

El agua como sustancia polar, presenta la facultad de actuar como plastificante al generar puentes de hidrógeno con las cadenas poliméricas hidrofílicas con grupos polares.⁴⁵ Ahora bien, por cada multi impresión que se ejecutó no sólo se añadió más agua, sino también más glicerol que también es calificado como un plastificante. En cuanto a las sales biliares, si se considera su naturaleza anfifílica, es decir, que presentan una zona hidrófoba (del sistema de anillos derivados del ciclopentanoperhidrofenantreno) y zonas hidrófilas, también podrían haber actuado como posibles plastificantes. Tanto el grupo carboxilo, presente en la cadena lineal unida al carbono número 17 del sistema cíclico, junto con los grupos hidroxilos presentes en el mismo,⁴⁶ podrían haber interactuado por enlaces intermoleculares, con los grupos polares de las cadenas poliméricas de HPMC, interponiéndose entre ellas, aumentando el volumen libre y movilidad de estas cadenas. Por lo tanto, componentes básicos de la tinta como el agua y el glicerol, como los otros

componentes añadidos a ellas podrían contribuir a que exista un aumento en la EB en las películas impresas.

7.3.2.4 Módulo de Young (MY) de películas impresas con diversas tintas.

Los valores del módulo elástico (Figura 9) de las películas de HPMC impresas con diversas tintas, tuvieron valores menores al módulo de Young medido en las películas sin imprimir. La tendencia que se pudo apreciar indica que la impresión de tinta tiene un impacto en la rigidez de la película impresa en la región elástica de la película.

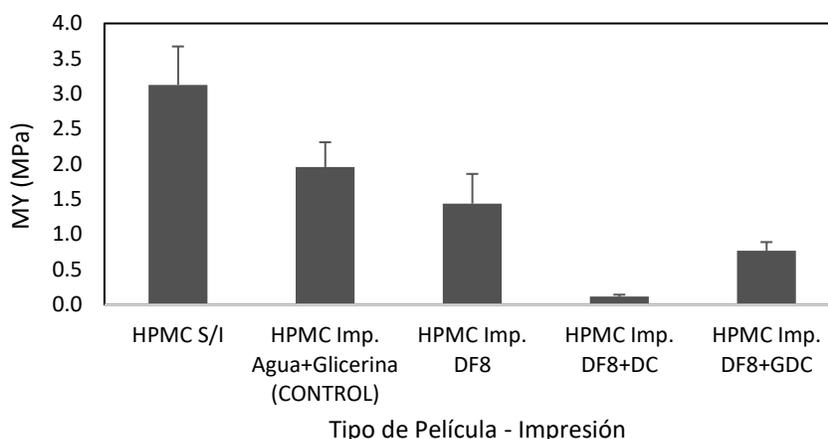


Figura 9: Módulo de Young (MY) de películas no impresas e impresas con tipos de tintas.

Tabla 5. Módulo de Young (MY) en películas con diversos estados de impresión. *: Valores que no comparten la misma letra, presentan diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

Tipo de impresión	MY (MPa)	Estadística MY*
HPMC S/I	3,1 ± 0,6	A
HPMC: agua y glicerina	2,0 ± 0,4	B
HPMC: DF8	1,4 ± 0,4	BC
HPMC: DF8 + DC	0,1 ± 0,0	D
HPMC: DF8 + GDC	0,8 ± 0,1	CD

El módulo elástico es un indicador de la rigidez que posee una película polimérica. Mientras mayor sea su valor, más rígido es el material analizado.⁴⁷ Por lo tanto, películas impresas con

módulo de elasticidad menor al obtenido en películas no impresas, quiere decir que la impresión otorgó una menor rigidez y mayor plasticidad a los materiales impresos. Esto ocurre porque la tinta adicionó agua y glicerina, que son reconocidos plastificantes que aumentan el volumen libre entre las cadenas poliméricas de HPMC. Ahora bien, tanto el péptido como las sales biliares aportaron en la reducción de la rigidez en las películas impresas, que es incluso menor que la película usada como control. Tanto el péptido como la sal biliar utilizada podrían haberse introducido entre las cadenas poliméricas interactuando con los grupos polares confinados en ellas, puesto que tanto DF8 como las sales biliares presentan grupos con polaridad e incluso grupos ionizables, los que terminaron aumentando el espacio libre entre las cadenas poliméricas. Por tanto, aportaron a las propiedades plastificantes que otorga un proceso de impresión. Ahora bien, la diferencia en el módulo de elasticidad observado entre películas impresas con distintas sales biliares puede tener respuesta en sutiles diferencias existentes en sus estructuras químicas. En GDC, el grupo carboxilo ionizable pudo haber interactuado con mayor dificultad con los grupos polares de las cadenas poliméricas por impedimento estérico, en comparación a los otros grupos polares presentes en la sal biliar. En cambio, en DC, el grupo carboxilo ionizable se encuentra más libre y estableció eventuales interacciones del tipo ion dipolo con grupos polares en el polímero y así aumentó aún más el volumen libre y la separación entre las cadenas de HPMC, lo que redujo aún más la rigidez de la película impresa.

7.3.3 Propiedades mucoadhesivas de películas de HPMC con diversos estados de impresión.

En la actualidad existen métodos experimentales que permiten medir la mucoadhesividad de formulaciones farmacéuticas de aplicación bucal, como es el método de la tracción. El cuál consiste en poner la formulación en estudio en contacto con mucosa *ex vivo* que se encuentra fija en la superficie de una sonda en un texturometro²⁰. Este último aparato medirá la fuerza necesaria para separar la sonda que tendrá en su extremo a la mucosa, con la formulación. Ahora bien, esta metodología antes descrita, puede ser modificada dependiendo de la naturaleza de la forma farmacéutica. Por ello, en esta investigación, para medir la mucoadhesividad de las películas poliméricas, se reemplazó la mucosa de cerdo en la sonda movable, por una dispersión de mucinas de estómago de cerdo al 2% (m/v) tanto en medio acuoso (agua milli-Q) como en un medio tamponante PBS pH 6,8 cuyo valor de pH es similar al salival.³⁸ Previo al análisis de

mucoadhesividad de las películas poliméricas utilizadas en esta investigación, es adecuado considerar la naturaleza polimérica de las películas de HPMC, el cuál es un polímero no iónico, que establece interacciones intermoleculares con los grupos polares presentes en la mucina. Estas interacciones corresponden principalmente a la formación de puentes de hidrógeno¹⁹.

7.3.3.1 Propiedades mucoadhesivas de películas HPMC no impresas (S/I).

Los parámetros de mucoadhesividad de películas de HPMC sin imprimir elaboradas en la presente investigación, se contrastaron con los valores reportados en la investigación que desarrolló un sistema de administración de fármacos biológicos a través de nanopartículas que fueron impresas en películas de HPMC⁴³, que se encuentran en la siguiente tabla:

Tabla 6. Propiedades mucoadhesivas HPMC sin impresión obtenidos en investigación actual y literatura (investigación) de referencia.

Propiedades mucoadhesivas investigación actual		
Películas	FD (mN)	WoA (mJ)
HPMC S/I	30,9 ± 2,7	0,030 ± 0,009
Propiedades mucoadhesivas literatura de referencia		
Películas	FD (mN)	WoA (mJ)
HPMC S/I	188,5 ± 38,6	0,192 ± 0,021

Existen diferencias notables entre las propiedades mucoadhesivas obtenidas en la presente investigación en relación con la literatura utilizada como referencia. Al igual como se señaló en la sección de propiedades mecánicas, las diferencias serían atribuibles tanto a condiciones operacionales, experimentales como de almacenamiento de las películas, pese a que se utilizó el mismo procedimiento experimental para la construcción de ellas. Diferencias en condiciones experimentales como el contenido de plastificante (glicerol) utilizado en la fabricación de las películas, donde pequeñas diferencias volumétricas en la cantidad de plastificante utilizado para la construcción de las películas de HPMC explicaría las disimilitudes en la adhesión observadas con las dispersiones de mucina utilizadas. Esto en base a estudios realizados que indican que el contenido de plastificante presente como en contacto con las películas poliméricas afectan en la adhesión de las películas con las glicoproteínas de mucina. El estudio evidenció que, a mayor contenido de plastificante, se reduce la adhesión.⁴⁸

7.3.3.2 Fuerza de desprendimiento (FD) y trabajo de adhesión (WoA), en diversas impresiones (en contacto con dispersiones de mucina, en diferentes medios).

Se midieron las propiedades mucoadhesivas de películas impresas con diversos tipos de tintas, en contacto con dispersiones de mucina al 2% (m/v) en diferentes medios. Se buscó determinar el efecto que provocó tanto la impresión en la adhesión de las películas con la mucina, como el efecto de los componentes añadidos en las tintas en los procesos adhesivos. Además, se buscó establecer si es relevante el efecto del medio en que se preparan las dispersiones de mucina, en la adhesión.

Tabla 7. Propiedades mucoadhesivas HPMC sin impresión y con diversos tipos de impresión, en contacto con mucina 2% (m/v) en medio acuoso. *: Valores que no comparten la misma letra, presentan diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

Mucina 2% (m/v), medio acuoso (agua milli-Q)				
Tipo de impresión	FD (mN)	Est. FD*	WoA (mJ)	Est. WoA*
PCP (Control positivo)	258,6 ± 49,6	A	0,428 ± 0,105	A
EC (Control negativo)	15,4 ± 1,9	C	0,031 ± 0,008	C
HPMC S/I	188,5 ± 7,9	B	0,192 ± 0,021	B
HPMC: agua + glicerina	26,5 ± 7,9	C	0,044 ± 0,008	C
HPMC: DF8	23,1 ± 4,9	C	0,045 ± 0,009	C
HPMC: DF8 + DC	35,1 ± 3,9	C	0,046 ± 0,005	C
HPMC: DF8 + GDC	141,7 ± 0,0	B	0,092 ± 0,018	C

Tabla 8. Propiedades mucoadhesivas HPMC sin impresión y con diversos tipos de impresión, en contacto con mucina 2% (m/v) en medio PBS pH 6,8. *: Valores que no comparten la misma letra, presentan diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

Mucina 2% (m/v), medio PBS pH 6,8				
Tipo de impresión	FD (mN)	Est. FD*	WoA (mJ)	Est. WoA*
PCP (Control positivo)	264,7 ± 28,3	A	0,391 ± 0,040	A
EC (Control negativo)	10,6 ± 2,4	C	0,040 ± 0,001	D
HPMC S/I	154,0 ± 45,3	B	0,189 ± 0,040	B
HPMC: agua + glicerina	151,6 ± 14,2	B	0,066 ± 0,011	D
HPMC: DF8	51,4 ± 15,3	C	0,049 ± 0,009	D
HPMC: DF8 + DC	42,7 ± 10,7	C	0,059 ± 0,004	D
HPMC: DF8 + GDC	163,9 ± 17,5	B	0,131 ± 0,037	C

En los estudios de adhesión se utilizó como control positivo a películas de PCP que, según la

literatura disponible, son sustratos de impresión de alta mucoadhesividad¹⁴. Como control negativo se utilizaron películas de EC, que son reportadas como de muy baja adhesión³⁶. Al contemplar los parámetros de adhesión de las películas analizadas en la Tabla 7 y Tabla 8, todas las películas de HPMC ya sea sin imprimir como impresas con diversas tintas, presentaron valores menores al control positivo pero mayores al control negativo. Esto último, aporta solidez y respaldo a los resultados obtenidos en estos experimentos. Ahora bien, cuando ocurre la impresión sobre las películas hay una disminución tanto de la fuerza de desprendimiento (FD) como del trabajo de adhesión (WoA), en comparación a la adhesión que presentan las películas antes de la impresión, independiente del medio utilizado en la dispersión de mucina.

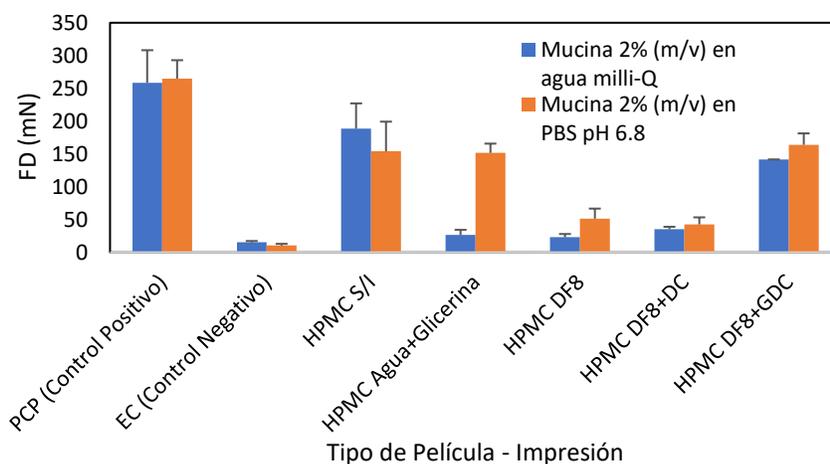


Figura 10: Fuerza de desprendimiento (FD), películas HPMC sin impresión y con diversos tipos de impresión, en contacto con mucina 2% (m/v) en medio acuoso y PBS pH 6,8.

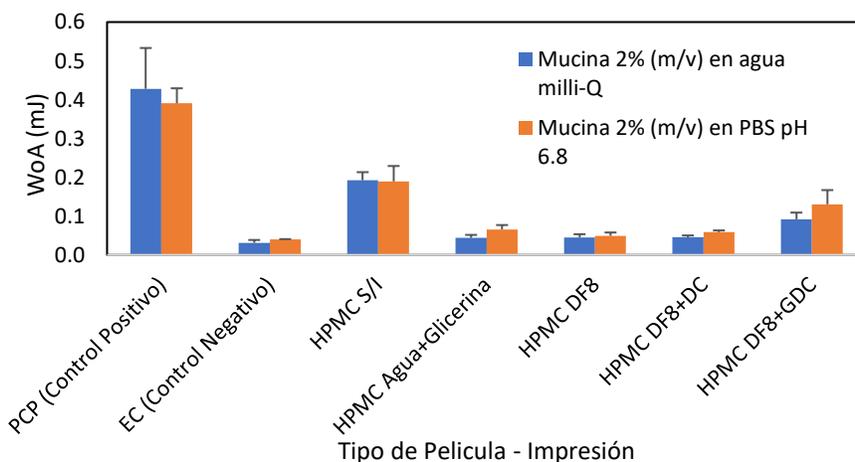


Figura 11: Trabajo de adhesión (WoA), películas HPMC sin impresión y con diversos tipos de impresión, en contacto con mucina 2% (m/v) en medio acuoso y PBS pH 6,8.

La tendencia que se puede presenciar para ambos parámetros de mucoadhesión tanto en la Figura 10 y 11, se podría explicar considerando que la tinta al disponerse sobre las películas generó en ellas una irregularidad en su superficie, producto de que la película sufre procesos de humectación generando una disminución del área de contacto efectiva entre la superficie de la película y la superficie de la sonda con mucina. Al disminuir, queda una menor disponibilidad superficial que resulte viable para la formación de enlaces que favorezcan las fuerzas de mucoadhesión. Además, como se indicó con anterioridad, por cada impresión desarrollada en cada película se añadió cada vez más glicerol y por tanto cada vez más plastificante, como también se agregó cada vez más agua, DF8 y sales biliares, que pudieron intensificar el efecto plastificante. Por lo tanto, ante una mayor cantidad de plastificante eso se traduce en una mayor flexibilidad de la película, lo que provoca que ella no pueda fijarse bien para formar los puentes de hidrógeno característicos de HPMC. Sin embargo, tanto la fuerza de desprendimiento (FD) como el trabajo de adhesión (WoA), fueron mayores en aquellas impresiones que contenían sales biliares. Considerando la naturaleza anfifílica tanto de DC y GDC, ambas sales biliares redujeron la tensión superficial entre la dispersión de mucina frente a las películas impresas, aumentando la humectabilidad o que la dispersión de mucina “mojó” aún más a estas películas impresas, lo que aportó a la interacción entre grupos polares presentes tanto en la mucina como en las cadenas poliméricas, lo que favoreció la adhesión. Como consecuencia, tanto la fuerza como la energía mecánica necesaria para poder despegar a estas películas impresas de las moléculas de mucina resultaron ser de mayor magnitud, en contraste con los valores de adhesión para películas no impresas e impresas con agua, glicerina y angiotensina II. En estricto rigor, la presencia de las sales biliares compensó la pérdida de adhesión producida en las películas por el propio proceso de impresión.

Finalmente, el efecto del medio en que se prepara la dispersión de mucina resultó en que los parámetros de mucoadhesión en la mayoría de los casos son levemente mayores cuando se utiliza PBS pH 6,8 como medio. Esta última observación se podría explicar al considerar que la solución de PBS contiene iones libres que podrían haber interactuado con los grupos polares presentes en las cadenas poliméricas de las películas, aumentando como consecuencia la adhesión. A pesar de que la diferencia entre los parámetros de adhesión no resultó ser considerable distinta en términos del medio de preparación de las dispersiones, el medio PBS pH 6,8 resulta ser más cercano al

contexto que presentan las mucinas en la cavidad bucal.

7.3.4 Análisis cinético de liberación DF8 desde películas impresas con diversas tintas.

Se desarrollaron experimentos en celdas de Franz, para la determinación del perfil de liberación de DF8 desde diversas formulaciones impresas. Se analizaron y compararon cada uno de estos perfiles, con sus respectivos controles donde DF8 se dispuso en forma libre (no impresa) en la celda donora de Franz en medio PBS pH 6,8, donde el péptido pasó a través de una membrana hidrófila de PVDF de diámetro de poro de 0,45 μm , hacia la celda receptora. Como resultado se obtuvo el perfil de difusión acumulado de DF8 libre a través de la membrana porosa que pasó con el resto de los componentes presentes por cada cm^2 de formulación impresa. Ahora bien, por medio de la determinación del factor de similitud (f_2) entre cada perfil de liberación de DF8 con su respectivo control, se buscó determinar si ambos procesos se desarrollaron de la misma manera. Por tanto, cada uno de los experimentos se realizaron en condiciones *in vitro* simulando un ambiente fisiológico con PBS pH 6,8 o pH salival³⁸ a 37 °C con 200 rpm de agitación en celda receptora.

Tabla 9. % Liberación DF8 desde distintas formulaciones impresas. A: Impresión sólo DF8, B: Impresión DF8 + DC, C: Impresión DF8 + GDC.

% Lib. DF8 según formulación impresa			
	A	B	C
	Promedio \pm SD		
Tiempo (min)	% Lib. Acum.	% Lib. Acum.	% Lib. Acum.
3	59,3 \pm 2,3	45,0 \pm 6,3	55,8 \pm 1,6
18	83,9 \pm 5,9	70,2 \pm 3,0	71,6 \pm 2,4
33	91,1 \pm 3,4	80,3 \pm 4,4	83,5 \pm 2,9
48	95,4 \pm 0,9	89,7 \pm 3,6	83,5 \pm 2,5
120	97,8 \pm 0,6	95,3 \pm 1,6	86,6 \pm 1,8
540	99,9 \pm 2,3	98,5 \pm 0,8	93,4 \pm 2,3

Tabla 10. Factores de similitud (f2) entre formulaciones impresas y sus controles.

F. de similitud (f2) entre control y formulación			
Control			
Formulación	A	B	C
A	59,4	-	.
B	-	55,6	-
C	-	-	53,6

Tal y como se muestra en la Figura 12, DF8 fue capaz de difundir libremente hacia la celda receptora a través de los poros de la membrana, en donde la difusión de la molécula comenzó rápidamente alcanzando $59,3 \pm 2,3$ % y $91,1 \pm 3,4$ % de difusión acumulada a los 3 y 33 minutos. En cambio, DF8 impresa presentó un % liberado acumulado de $70,6 \pm 1,7$ % y $95,0 \pm 1,2$ % a los 3 y 33 minutos respectivamente, hasta que el proceso alcanzó su equilibrio aproximadamente entre los 33 y 48 min de iniciado el experimento.

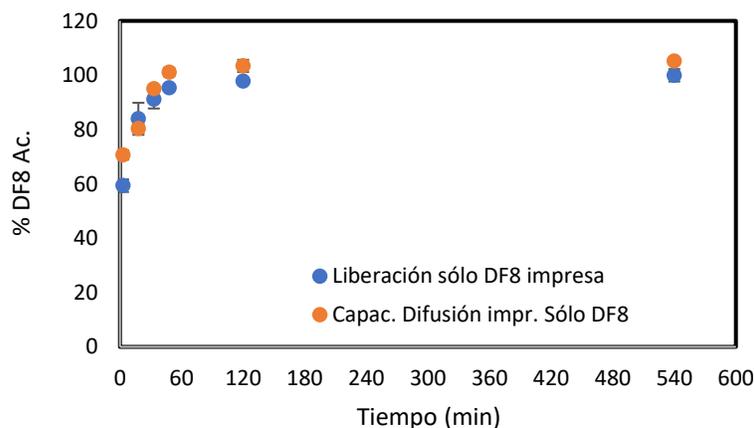


Figura 12: % Liberación DF8 desde películas impresas solo DF8 y no impresa. (control)

En Figura 13, se tiene a DF8 que difundió de manera libre junto con la sal biliar DC. Se tiene un $79,3 \pm 5,1$ % y $91,2 \pm 7,2$ % de difusión acumulada a los 18 y 33 minutos. En cambio, DF8 impresa junto DC y L-Arg, presentó un % liberado acumulado de $70,2 \pm 3,0$ % y $80,3 \pm 4,4$ % a los 18 y 33 minutos. Luego de ello, se logró observar que al cabo de 48 minutos aproximadamente se llegó a un 100% de DF8 liberada desde la impresión y que ya se encontró localizada en la celda receptora.

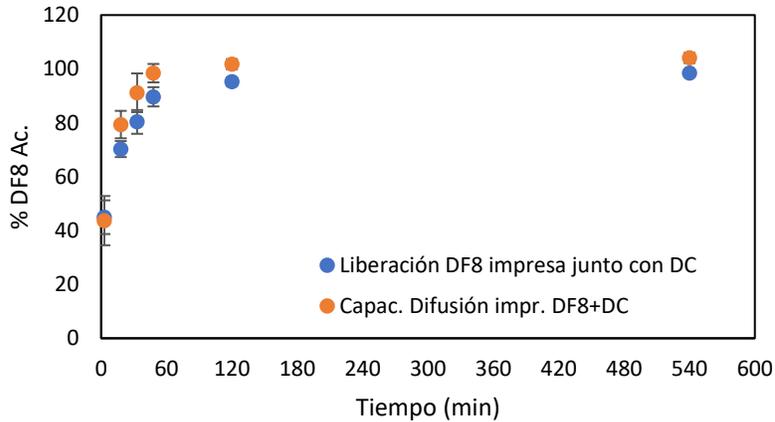


Figura 13: % Liberación DF8 películas impresas con DC + L-Arg y no impresa (control)

Ahora bien, como se puede examinar en la Figura 14, DF8 difundió libremente junto con GDC, pasando por medio de la membrana porosa, obteniéndose tanto a los 18 y 48 minutos con un $79,3 \pm 5,1$ % y $91,2 \pm 7,2$ % de DF8 que ha difundido y que se ha acumulado en la celda receptora.

En contraste, se tuvo a DF8 impresa junto con la sal biliar, que llegó a un % de DF8 liberada y acumulada de $72,9 \pm 1,8$ % y $71,6 \pm 2,4$ % en los mismos instantes medidos anteriormente. Alcanzando cerca de un 100 % de DF8 liberada alrededor de las 2 horas aproximadamente, valor que fue pesquisado en la celda receptora de Franz.

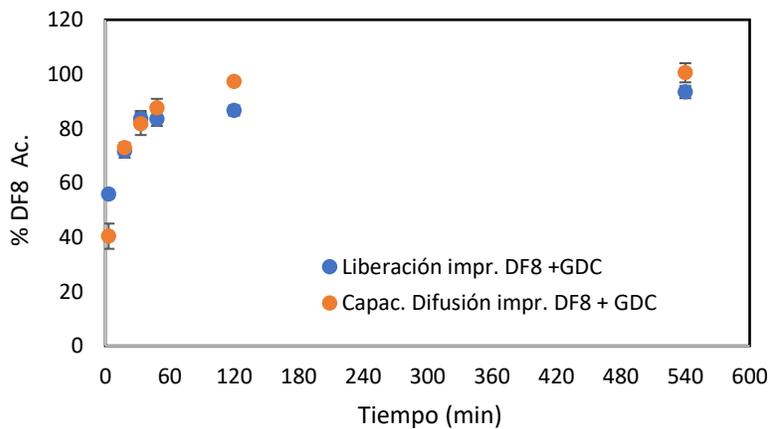


Figura 14: % Liberación DF8 películas impresas DF8 + GDC, y no impresa (control)

A pesar de las diferencias mencionadas con anterioridad, se pudo establecer a través de la determinación de los factores de similitud (f_2) entre cada uno de los perfiles de liberación de DF8 con sus respectivos controles, que DF8 libre difundió de la misma manera que DF8 dispuesta de manera impresa y liberada desde cada tipo de formulación impresa. Esto último se pudo afirmar con toda seguridad ya que los valores de los factores de similitud fueron mayores a 50, como se puede apreciar en la Tabla 10.

Para determinar el mecanismo de liberación de principios activos desde una determinada forma farmacéutica, se desarrolla un ajuste de los datos experimentales de un perfil de liberación a modelos matemáticos. En ellos, se relaciona la liberación acumulada del fármaco en función del tiempo. Los modelos se ajustan principalmente hasta el 70% aproximadamente de la cantidad de fármaco liberado acumulado desde la forma farmacéutica.⁴⁹

A continuación, se describen los modelos matemáticos implementados en esta investigación y la interpretación de los parámetros presentes en las ecuaciones:

- **Modelo de orden cero:**

Modelo utilizado para sistemas de dosificación que no se desagregan. Aquí se asume que el área del dispositivo no cambia considerablemente y que no se forman condiciones de equilibrio material.

Este es expresado a partir de la siguiente ecuación:

$$Q = Q_0 + k_0 * t$$

Donde Q es la cantidad de fármaco disuelto en el tiempo t. En tanto Q_0 es la cantidad de activo inicial en la solución (la mayoría de las veces $Q_0 = 0$) y k_0 corresponde a la constante de liberación de orden cero⁵⁰.

- **Modelo de primer orden:**

Este modelo es utilizado para describir la absorción y la liberación de algunos fármacos desde matrices porosas. La liberación de los fármacos que siguen esta cinética se puede expresar mediante la siguiente ecuación:

$$\text{Log } C_t = \text{Log } C_o - \frac{k_1}{2,303} * t$$

Donde C_t es la cantidad de fármaco remanente a un tiempo t , C_o es la cantidad inicial de fármaco en la solución y k_1 se denomina como constante de liberación de primer orden.

- **Modelo Higuchi:**

Este modelo se basa en la hipótesis de que la difusión del fármaco se lleva a cabo en una sola dimensión; que la disolución y la hinchazón de la matriz son despreciables; que la difusividad del fármaco es constante, y que, en el medio de disolución, siempre se alcanzan condiciones de sumidero o sink. Es ampliamente utilizado para describir la liberación de fármacos solubles y poco solubles en medios acuosos, desde diversas matrices. Su ecuación es la siguiente:

$$Q_t = k_H * t^{0,5}$$

Donde k_H es la constante de disolución de Higuchi, mientras que Q_t es la fracción de fármaco liberado a un tiempo t .

- **Modelo de Korsmeyer – Peppas:**

Este modelo permite explicar mecanismos de liberación de activos en donde se presenta erosión y/o disolución de la matriz. Ha sido ampliamente usado para describir la liberación de fármacos desde sistemas poliméricos. Su ecuación es la siguiente:

$$\frac{M_t}{M_\infty} = k_r * t^n$$

Donde el valor del parámetro n comanda que mecanismo de liberación del activo es el que se está desarrollando en la formulación. Si $n < 0,5$, puede concluirse que el mecanismo de liberación es por difusión fickiana o difusión casi fickiana posiblemente debida a una combinación de mecanismos de difusión a través de matriz hinchada y difusión a través de poros llenos de agua. Si n es igual a $0,5$, esto indica que el mecanismo de liberación del fármaco es de tipo fickiano. Si $0,5 < n < 1$, indica que hay un mecanismo de liberación no fickiano. Mientras que, si n es igual a 1 , el mecanismo es similar a una cinética de liberación de orden cero. Para valores de n superiores que 1 , es indicativo que la liberación del activo depende de la relajación de las cadenas poliméricas en la matriz.⁵¹

En la Figura 15 se encuentran los perfiles de liberación de DF8 desde las distintas formulaciones impresas desarrolladas en la investigación. Se puede contemplar que luego de 20 a 30 minutos de iniciado el proceso de liberación, se observa el denominado efecto “burst” o liberación rápida de DF8, en todas las formulaciones impresas.

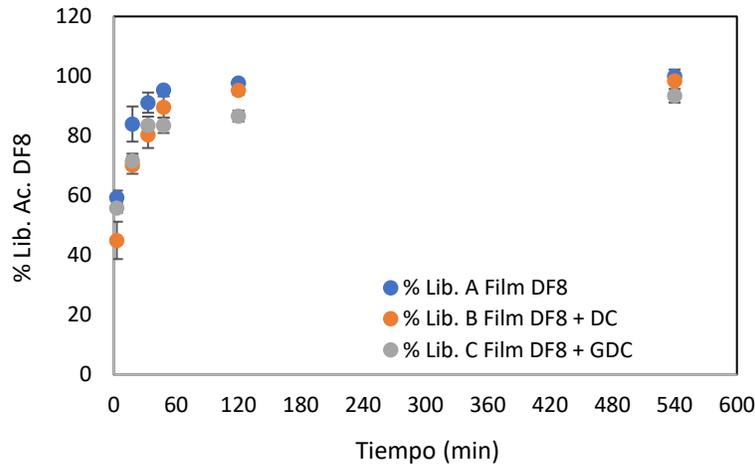


Figura 15: Perfiles de liberación DF8 desde distintas formulaciones impresas.

Tabla 11. Parámetros de modelos cinéticos ajustados a perfiles liberación de DF8.

Modelo cinético	Coef. Correlación	Formulación impresa		
		DF8 (A)	DF8+DC (B)	DF8+GDC (C)
Orden Cero	r^2	0,949	0,965	0,991
	k_0	$3,3 \pm 0,1$	$2,8 \pm 0,1$	$3,0 \pm 0,1$
Orden Uno	r^2	0,992	0,993	0,9645
	k_1	$0,124 \pm 0,019$	$0,071 \pm 0,030$	$0,090 \pm 0,006$
Higuchi	r^2	0,982	0,99	0,992
	k_H	$18,2 \pm 0,8$	$15,5 \pm 0,6$	$16,3 \pm 0,3$
Korsmeyer-Peppas	r^2	0,9925	0,994	0,9824
	k_r	$48,8 \pm 2,2$	$34,7 \pm 7,2$	$46,4 \pm 2,3$
	n	$0,182 \pm 0,007$	$0,247 \pm 0,070$	$0,162 \pm 0,021$

Tabla 12. Factores de similitud (f2) entre formulaciones impresas.

Factores de similitud (f2) entre formulaciones			
Formulación	A	B	C
A	-	50,8	51,2
B	-	-	58,5
C	-	-	-

Según los valores de coeficiente de determinación ajustado (r^2), en la Tabla 11, se pudo observar que el mejor modelo cinético que se ajustó a los perfiles de liberación de DF8 desde películas impresas con tinta que contiene sólo DF8 y DF8 con la sal biliar DC, es el de modelo de **Korsmeyer-Peppas**. Los valores del parámetro n en el modelo cinético aplicado sobre los datos de liberación acumulada de DF8 son de $0,182 \pm 0,007$ y $0,247 \pm 0,070$, para películas impresas con DF8 sin sal biliar y con el potenciador de la permeación DC, respectivamente. Según literatura con respecto a los valores del parámetro n, en ambos tipos de formulaciones impresas, el mecanismo de liberación de DF8, fue una combinación de procesos de difusión fickiana y semi fickiana, que implicaría procesos de hinchazón de matriz y difusión por poros de agua.⁵¹ Ahora bien, para comprender lo obtenido, se puede considerar que las películas utilizadas en esta investigación se encontraban recubiertas por una superficie que contiene glicerol, DF8 y la sal biliar DC en el caso de las impresiones que la contienen. Por tanto, a medida que el medio en la celda donora, es decir, PBS pH 6,8, comenzó a humectar dicha superficie que recubría a una cara de la película polimérica, ésta comenzó a erosionarse o a desintegrarse poco a poco, lo que generó socavones de distinto relieve en ella. Esto último sería análogo a decir que DF8 se liberó por difusión fickiana por la formación de “poros” en la superficie impresa, que en su interior contenía al medio tamponante.

Una difusión de un activo del tipo fickiana, se rige por el gradiente de concentración del activo en dirección perpendicular de la superficie por donde transita el flujo de activo. Lo anterior se puede resumir en la siguiente ecuación, que corresponde a la primera ley de Fick:

$$J = -D_{jk} * \frac{dC_j}{dz}$$

Esta expresión es válida en situaciones no muy alejadas del equilibrio, es decir, cuando la fuerza impulsora o gradiente de concentración de una molécula no es muy grande. En la ecuación, J

corresponde al flujo de difusión que indica la cantidad de sustancia que transita por unidad de área por segundo. El flujo difusivo sería directamente proporcional a la diferencia de concentración del activo considerado en diferentes posiciones. En relación con D_{jk} , es el coeficiente de difusión que depende de los estados de presión, temperatura y composición, por lo que en principio varía a medida que se produjo la difusión del activo. Es indicado considerar el orden de los subíndices, que se refiere a la difusión de j (activo) en una mezcla con k (otros componentes).

Para el caso de la impresión **de DF8 con GDC, el modelo de Higuchi** es el que presenta el valor más alto del coeficiente de determinación ajustado (r^2). Según la literatura, es un modelo adecuado para describir la liberación de fármacos solubles y poco solubles en medios acuosos, desde diversas matrices. Además, el modelo describe el proceso de liberación del activo, a partir de una de las caras de la matriz donde el medio de disolución tiene condiciones de sumidero o sink. Lo primero, es considerado como correcto, ya que la impresión sobre las películas de HPMC se desarrollan en una sola cara. Ahora bien, con respecto a la condición sink, para que exista dicha condición, el medio de disolución debe tener la capacidad para disolver al menos 3 veces la cantidad de activo que se encuentra en su forma farmacéutica. En la impresión con DF8 + GDC, la cantidad de péptido por cm^2 fue de 0,09 mg. Por tanto, lo máximo que se podría disolver por mL de medio sería de 0,09 mg de DF8 y al tener presente que el volumen de PBS pH 6,8 en la celda receptora es de 10,1 mL, en ese volumen como máximo se podría disolver 2,73 mg de DF8. Este último valor, es mayor a 0,27 mg de DF8 (que es equivalente a 3 veces la cantidad de DF8 por cm^2 de impresión en la formulación). Por consiguiente, el modelo de Higuchi resulta adecuado y válido para describir el proceso de liberación de DF8 desde este tipo de formulación impresa, ya que existe la condición de sumidero.

Con relación a los factores de similitud (f_2) entre cada uno de los perfiles de liberación de DF8 desde las formulaciones impresas (Tabla 12), estos resultaron ser superiores a 50. Esto último indicaría que los perfiles de liberación de DF8 obtenidos tienen una importante similitud entre ellos, es decir, que se desarrollaron de la misma forma.

8. CONCLUSIONES

Pese a las dificultades que hubo en la elaboración de las respectivas tintas como los procesos de precipitación y aumento en la viscosidad, estos fueron superados, ya que se pudieron elaborar las formulaciones impresas planificadas.

En lo que respecta a la caracterización de las formulaciones impresas, se observó que el proceso de impresión causó un impacto en las propiedades mecánicas de las películas impresas.

En los parámetros de mucoadhesión FD como WoA en las formulaciones impresas, sus valores disminuyeron por los procesos de impresión ejecutados sobre estas películas. No obstante, con la presencia de sales biliares hubo una recuperación de la adhesión perdida.

Los procesos de liberación de DF8 desde cada formulación impresa, tuvieron un buen ajuste al modelo cinético de Korsmeyer-Peppas, incluyendo a la formulación impresa de DF8 con GDC, a pesar de que el valor de r^2 en el modelo de Higuchi fue levemente superior. Por lo tanto, considerando los valores obtenidos en el parámetro n para cada formulación, se puede señalar que la liberación de DF8 involucró procesos de erosión de la capa impresa con formación de poros con medio acuoso, desde donde DF8 difundió hacia el medio de disolución.

A través de la determinación y valor de los factores de similitud (f_2) entre los perfiles de liberación de DF8 desde cada una de las formulaciones impresas. Se puede afirmar que se desarrollaron de la misma manera.

Luego del análisis tanto del procedimiento experimental como del teórico desarrollado para la obtención de los resultados descritos en este trabajo, fue posible desarrollar y caracterizar películas de HPMC impresas con un péptido junto con un potenciador de la permeación, a pesar de las dificultades que existieron en el diseño y elaboración de las tintas para impresión. Como recomendación se podría investigar la implementación de un sistema de entrega rápida de DF8 encapsulada en un sistema nanoparticulado que proteja al péptido y que impida la interacción con la sal biliar utilizada como potenciador de la permeación. Y finalmente ver el aumento en la permeación de DF8 por mucosa bucal de porcino y desde allí evaluar que tan atractiva puede llegar a ser la eventual forma farmacéutica bucal.

9. REFERENCIAS

- (1) Abruzzo, A.; Bigucci, F.; Cerchiara, T.; Cruciani, F.; Vitali, B.; Luppi, B. Mucoadhesive Chitosan/Gelatin Films for Buccal Delivery of Propranolol Hydrochloride. *Carbohydr. Polym.* **2012**, *87* (1), 581–588.
- (2) Kianfar, F.; Chowdhry, B. Z.; Antonijevic, M. D.; Boateng, J. S. Novel Films for Drug Delivery via the Buccal Mucosa Using Model Soluble and Insoluble Drugs. *Drug Dev. Ind. Pharm.* **2012**, *38* (10), 1207–1220.
- (3) Lam, J. K.; Xu, Y.; Worsley, A.; Wong, I. C. Oral Transmucosal Drug Delivery for Pediatric Use. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2014**, *73*, 50–62.
- (4) Şenel, S.; Rathbone, M. J.; Cansız, M.; Pather, I. Recent Developments in Buccal and Sublingual Delivery Systems. *Expert Opin. Drug Deliv.* **2012**, *9* (6), 615–628.
- (5) Shojaei, A. H. Buccal Mucosa As A Route For Systemic Drug Delivery: A Review. **1998**.
- (6) *Ten Cate's Oral Histology - 9th Edition*. <https://shop.elsevier.com/books/ten-cates-oral-histology/nanci/978-0-323-48518-0> (accessed 2023-10-01).
- (7) Montero-Padilla, S.; Velaga, S.; Morales, J. O. Buccal Dosage Forms: General Considerations for Pediatric Patients. *AAPS PharmSciTech* **2017**, *18* (2), 273–282. <https://doi.org/10.1208/s12249-016-0567-2>.
- (8) Harris, D.; Robinson, J. R. Drug Delivery via the Mucous Membranes of the Oral Cavity. *J. Pharm. Sci.* **1992**, *81* (1), 1–10. <https://doi.org/10.1002/jps.2600810102>.
- (9) Wertz, P. W.; Swartzendruber, D. C.; Squier, C. A. Regional Variation in the Structure and Permeability of Oral Mucosa and Skin. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **1993**, *12* (1), 1–12. [https://doi.org/10.1016/0169-409X\(93\)90037-5](https://doi.org/10.1016/0169-409X(93)90037-5).
- (10) Campanile, G. L.; Lotti, T. M.; Orlandini, S. Z. Macroscopic Anatomy, Histology and Electron Microscopy of the Oral Cavity and Normal Anatomic Variants. In *Oral Diseases: Textbook and Atlas*; Lotti, T. M., Parish, L. C., Rogers, R. S., Eds.; Springer: Berlin, Heidelberg, 1999; pp 1–5. https://doi.org/10.1007/978-3-642-59821-0_1.
- (11) Fonseca-Santos, B.; Chorilli, M. An Overview of Polymeric Dosage Forms in Buccal Drug Delivery: State of Art, Design of Formulations and Their in Vivo Performance Evaluation. *Mater. Sci. Eng. C* **2018**, *86*, 129–143. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2017.12.022>.
- (12) Matoltsy, A. G.; Parakkal, P. F. Membrane-Coating granules of keratinizing epithelia. *J. Cell Biol.* **1965**, *24* (2), 297–307. <https://doi.org/10.1083/jcb.24.2.297>.
- (13) Franch, J.; Lloveras, N. Guía Práctica de Las Insulinas. **2017**.
- (14) Morales, J. O.; McConville, J. T. Manufacture and Characterization of Mucoadhesive Buccal Films. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2011**, *77* (2), 187–199. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2010.11.023>.
- (15) Silva, B. M. A.; Borges, A. F.; Silva, C.; Coelho, J. F. J.; Simões, S. Mucoadhesive Oral Films: The Potential for Unmet Needs. *Int. J. Pharm.* **2015**, *494* (1), 537–551. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2015.08.038>.
- (16) Montenegro-Nicolini, M.; Miranda, V.; Morales, J. O. Inkjet Printing of Proteins: An Experimental Approach. *AAPS J.* **2017**, *19* (1), 234–243. <https://doi.org/10.1208/s12248-016-9997-8>.
- (17) Peh, K. K.; Wong, C. F. Polymeric Films as Vehicle for Buccal Delivery: Swelling, Mechanical, and Bioadhesive Properties. **1999**.
- (18) Squier, C.; Wertz, P. Structure and function of the oral mucosa and implications for drug delivery. *Drugs Pharm. Sci.* **1996**.
- (19) *Oral Mucosal Drug Delivery and Therapy*; Rathbone, M. J., Senel, S., Pather, I., Eds.; Advances in Delivery Science and Technology; Springer US: Boston, MA, 2015. <https://doi.org/10.1007/978-1-4899-7558-4>.
- (20) Khutoryanskiy, V. V. Advances in Mucoadhesion and Mucoadhesive Polymers. *Macromol. Biosci.* **2011**, *11* (6), 748–764. <https://doi.org/10.1002/mabi.201000388>.
- (21) Genina, N.; Fors, D.; Palo, M.; Peltonen, J.; Sandler, N. Behavior of Printable Formulations of

- Loperamide and Caffeine on Different Substrates—Effect of Print Density in Inkjet Printing. *Int. J. Pharm.* **2013**, *453* (2), 488–497. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2013.06.003>.
- (22) Rodríguez, I.; Cerezo, A.; Salem, I. Sistemas de liberación Bioadhesivos. *Ars Pharm. Internet* **2000**, *41* (1), 115–128.
- (23) Mašková, E.; Kubová, K.; Raimi-Abraham, B. T.; Vllasaliu, D.; Vohlídalová, E.; Turánek, J.; Mašek, J. Hypromellose – A Traditional Pharmaceutical Excipient with Modern Applications in Oral and Oromucosal Drug Delivery. *J. Controlled Release* **2020**, *324*, 695–727. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2020.05.045>.
- (24) Chou, W.-H.; Gamboa, A.; Morales, J. O. Inkjet Printing of Small Molecules, Biologics, and Nanoparticles. *Int. J. Pharm.* **2021**, *600*, 120462. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2021.120462>.
- (25) Montenegro-Nicolini, M.; Morales, J. O. Overview and Future Potential of Buccal Mucoadhesive Films as Drug Delivery Systems for Biologics. *AAPS PharmSciTech* **2017**, *18* (1), 3–14. <https://doi.org/10.1208/s12249-016-0525-z>.
- (26) Núñez Aliste, A. A. Evaluación de estabilidad y bioactividad del péptido retro-enantio análogo de angiotensina-(1-9). **2019**.
- (27) PubChem. *Angiotensin (1-9)*. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/71745056> (accessed 2023-10-01).
- (28) PubChem. *Angiotensin II*. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/172198> (accessed 2023-10-01).
- (29) *Chemical Methods for Enhancing Oral Mucosal Delivery* | SpringerLink. https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-1-4899-7558-4_3 (accessed 2023-10-01).
- (30) Brayden, D. J.; Stuetgen, V. Sodium Glycodeoxycholate and Sodium Deoxycholate as Epithelial Permeation Enhancers: In Vitro and Ex Vivo Intestinal and Buccal Bioassays. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2021**, *159*, 105737. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2021.105737>.
- (31) *Ácido Fusídico con Sal Sódica*. DC Fine. <https://www.dcfinechemicals.com/es/producto-detalle-template/> (accessed 2023-10-02).
- (32) Glycodeoxycholic acid sodium salt. *AldrichCPR* | Sigma-Aldrich. <http://www.sigmaaldrich.com/> (accessed 2023-10-02).
- (33) Montenegro-Nicolini, M.; Reyes, P. E.; Jara, M. O.; Vuddanda, P. R.; Neira-Carrillo, A.; Butto, N.; Velaga, S.; Morales, J. O. The Effect of Inkjet Printing over Polymeric Films as Potential Buccal Biologics Delivery Systems. *AAPS PharmSciTech* **2018**, *19* (8), 3376–3387. <https://doi.org/10.1208/s12249-018-1105-1>.
- (34) Inoue, N.; Takai, E.; Arakawa, T.; Shiraki, K. Arginine and Lysine Reduce the High Viscosity of Serum Albumin Solutions for Pharmaceutical Injection. *J. Biosci. Bioeng.* **2014**, *117* (5), 539–543. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2013.10.016>.
- (35) Thermo Scientific. Micro BCA Protein Assay Kit, 2015.
- (36) Bagul, U.; Gujar, K.; Dhat, S.; Aphale, S.; Bhavsar, M. In Vitro Study of Mucoadhesive Strength of Polymers for Mucoadhesive Drug Delivery Systems. *Int J Curr Pharm Res* **2009**, *1*, 42–46.
- (37) Formulario Nacional. *USP 37. Farmacopea de Los Estados Unidos de América*; 2014; Vol. NF 32 Volumen 1.
- (38) Muñoz L, S.; Narváez, C. G. pH Salival, Capacidad Buffer, Proteínas Totales y Flujo Salival En Pacientes Hipertensos Controlados Usuarios de Diuréticos. *Int. J. Odontostomatol.* **2012**, *6* (1), 11–17. <https://doi.org/10.4067/S0718-381X2012000100002>.
- (39) Ortiz Orrego, A. C. Desarrollo de un carrier lipídico nanoestructurado como sistema gastroretentivo para el reconocimiento y posterior unión covalente a mucina gástrica mediante transglutaminasa 2. **2022**.
- (40) Dixit, R. P.; Puthli, S. P. Oral Strip Technology: Overview and Future Potential. *J. Controlled Release* **2009**, *139* (2), 94–107. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2009.06.014>.
- (41) Bellesi, F. A.; Pilosof, A. M. R. Potential Implications of Food Proteins-Bile Salts Interactions. *Food Hydrocoll.* **2021**, *118*, 106766. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2021.106766>.
- (42) Orioni, B.; Roversi, M.; La Mesa, C.; Asaro, F.; Pellizer, G.; D’Errico, G. Polymorphic Behavior in

- Protein–Surfactant Mixtures: The Water–Bovine Serum Albumin–Sodium Taurodeoxycholate System. *J. Phys. Chem. B* **2006**, *110* (24), 12129–12140. <https://doi.org/10.1021/jp055950r>.
- (43) Chou, W.-H.; Galaz, A.; Jara, M. O.; Gamboa, A.; Morales, J. O. Drug-Loaded Lipid-Core Micelles in Mucoadhesive Films as a Novel Dosage Form for Buccal Administration of Poorly Water-Soluble and Biological Drugs. *Pharmaceutics* **2020**, *12* (12), 1168. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12121168>.
- (44) Buanz, A. B. M.; Belaunde, C. C.; Soutari, N.; Tuleu, C.; Gul, M. O.; Gaisford, S. Ink-Jet Printing versus Solvent Casting to Prepare Oral Films: Effect on Mechanical Properties and Physical Stability. *Int. J. Pharm.* **2015**, *494* (2), 611–618. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2014.12.032>.
- (45) Levine, H.; Slade, L. Water as a Plasticizer: Physico-Chemical Aspects of Low-Moisture Polymeric Systems. In *Water Science Reviews 3: Water Dynamics*; Franks, F., Ed.; Water Science Review; Cambridge University Press: Cambridge, 1988; Vol. 3, pp 79–185. <https://doi.org/10.1017/CBO9780511552083.002>.
- (46) Frutos del Río, S. de. *Estructura cristalina y propiedades coloidales de ácidos biliares modificados*.
- (47) Romero, A. M. G.; Guisasaola, N. M. Introducción a la ciencia de los materiales y sus propiedades (I).
- (48) Montero-Padilla, S. Fabricación de Películas Poliméricas Con Adición de Pululan Para La Impresión 2D de Tinta Modelo Como Potencial Forma Farmacéutica de Administración Bucal. Magíster, Universidad de Chile, 2018.
- (49) Silveira, J. C. C. da. Cimentos ósseos alfa-fosfato tricálcico e alfa fosfato tricálcico de dupla pega : desenvolvimento/caracterização para fins de liberação controlada de fármacos e vigilância sanitária. **2017**.
- (50) Singhvi, G.; Singh, M. Review: In Vitro Drug Release Characterization Models. *Int. J. Pharm. Stud. Res.* **2011**, *2*, 77–84.
- (51) Martínez, M. T. Desarrollo y Aplicaciones de Hidrogeles Para La Administración y Liberación Modificada de Fármacos. Doctoral, Universidad de Valencia, 2016.