



**DETERMINACIÓN DE LA VELOCIDAD DE LIBERACIÓN DE
METRONIDAZOL INCORPORADO EN MEMBRANAS DE QUITOSANO,
UTILIZANDO VOLTAMETRÍA DE PULSO DIFERENCIAL**

Blanca A, Arias¹, Reynaldo Ortiz^{*1}, Gladys Velazco²

1. Laboratorio de Electroquímica, Facultad de Ciencias, Universidad de Los Andes, Mérida, Venezuela
2. Laboratorio Integrado de Biología Celular y Molecular, Centro de Investigaciones Odontológicas, Facultad de Odontología, Universidad de Los Andes, Mérida, Venezuela

Correspondencia: Dr. Reynaldo Ortiz. Núcleo la Hechicera. Facultad de Ciencias. Laboratorio de Electroquímica Fundamental y Aplicada. Tercer Piso. Universidad de Los Andes, Mérida (5101), Venezuela. Tel/Fax. 00(58) 274-2401393.

E-mail: reynaldo@ula.ve

RESUMEN

En este trabajo se determinó la velocidad de liberación de Metronidazol (MTZ), incorporado en películas de quitosano, usando como medio para la liberación, saliva artificial. Se prepararon películas de quitosano mezclado con metronidazol y se estudió la interacción polímero-fármaco a través de espectroscopia infrarroja, mostrando la incorporación del principio activo en la matriz polimérica. Los resultados por voltametría cíclica, muestran que la reducción electroquímica de MTZ 1×10^{-2} M es un proceso irreversible, mostrando una onda de reducción con potencial de pico (E_p) de -0,75V vs

Recibido: 13-11-2011

Aceptado: 17-2-2012



Ag/AgCl en una ventana de potencial de 0,0 a -1,2V. La velocidad de liberación del fármaco en quitosano, fue obtenida determinando el contenido de MTZ liberado en el tiempo en saliva artificial, utilizando la técnica de voltametría de pulso diferencial, sobre un electrodo de carbón vítreo. De la pendiente de una gráfica [MTZ] vs t, se obtuvo una velocidad de liberación de $0,0096 \text{ mg}\cdot\text{min}^{-1}$ para una película de 0,043 mm de espesor. Se encontraron diferentes mecanismos de liberación dependiendo del grosor de la película de quitosano.

Palabras clave: Metronidazol, quitosano, liberación controlada, voltametría, potenciales.

**DETERMINATION OF THE RATE OF RELEASE OF BUILT IN MEMBRANES
METRONIDAZOLE CHITOSAN DIFFERENTIAL PULSE VOLTAMMETRY
USING.**

ABSTRACT

In this work the liberation rate of incorporated metronidazole (MTZ) in a chitosan film was determined. Studies of the interaction polymer-drug, through infrared spectroscopy, shows up the incorporation of the active principle in the polymer matrix. The results by cyclic voltammetry, demonstrated that the electrochemical reduction MTZ is an irreversible process, showing a wave of reduction with peak potential at 0.75V *versus* Ag/AgCl in a potential window of 0.0 to -1.2V. The speed of liberation of the drug in chitosan was obtained determining the content of released MTZ along the time, using differential pulse voltammetry technique, on a glassy carbon electrode, obtaining a speed of liberation of

Recibido: 13-11-2011

Aceptado: 17-2-2012



0.0096 mg.min⁻¹ for a film of 0.043 mm of thickness. There was found a several liberation mechanism depending on chitosan film thickness.

Key Words: Metronidazole, chitosan, controlled released, potential.

INTRODUCCION

El quitosano es un polisacárido natural, biodegradable y biocompatible, cuya estructura corresponde a un copolímero de N-acetilglucosaminas y glucosaminas, que se obtiene principalmente a partir de la quitina, el cual es un polisacárido y se encuentra ampliamente distribuido en la naturaleza, formando parte del exoesqueleto de crustáceos, insectos y paredes celulares de hongos. Gracias a la compatibilidad del quitosano con muchos compuestos orgánicos como surfactantes, almidones, sales de amonio cuaternario, polímeros catiónicos y no iónicos y aniones polivalentes, se pueden formar geles y precipitados. La naturaleza catiónica del polímero permite formar

complejos con fármacos o excipientes de carga opuesta, con lo cual se modifican algunas de sus características físico-químicas. La reacción del quitosano con aniones polivalentes da lugar a uniones tanto en medio ácido, básico y neutro, originando con estos contraiones la formación de geles ionotrópicos de quitosano. El quitosano se ha estudiado por su posible papel en la liberación controlada de principios activos por su habilidad para formar geles, pero también, se le ha visto utilidad en formas de dosificación de liberación rápida. Se ha ensayado el polímero con un alto grado de desacetilación, como excipiente para comprimidos, pero esta aplicación es

Recibido: 13-11-2011

Aceptado: 17-2-2012



limitada, debido a que no presenta propiedades reológicas y de compresibilidad adecuadas (1).

Upadrashta y colaboradores (2), incorporaron diltiazem HCl en comprimidos matriciales de quitosano con otros excipientes tales como lactosa, alginato sódico, carbopol 934, ácido cítrico, etc., y estudiaron las características farmacotécnicas de dichos comprimidos y la influencia de los excipientes en el perfil de liberación del fármaco. Así, la incorporación de carbopol 934 y ácido cítrico produjo comprimidos de friabilidad y dureza mayores que los comprimidos preparados con quitosano como único excipiente. Sin embargo, el laurilsulfato sódico (LSS) y la lactosa provocan el efecto contrario. Comprobaron que la incorporación de LSS retrasa la liberación de diltiazem HCl y con el aumento de la concentración del tensoactivo se reduce el perfil de

liberación del fármaco. La presencia de ácido cítrico provoca un aumento en la velocidad de cesión del diltiazem HCl, debido probablemente a la formación de un complejo hidrosoluble quitosano/ácido cítrico.

Genta y colaboradores (3), investigaron la posible utilización de quitosano como agente aglutinante en comprimidos de maleato de clorfeniramina. Así, al incorporar un 2% de este excipiente a la formulación se obtienen comprimidos con buenas propiedades físicas y un porcentaje de fármaco disuelto del 75% en 5 minutos. Pero al incrementar la proporción de quitosano hasta un 5% se produce un retraso en la cesión del fármaco obteniéndose una disolución del 30% en el mismo período de tiempo. Así mismo, al utilizarlo al 2% y al 4% en comprimidos de sulfametoxazol, se observa liberación sostenida in vivo frente a formulaciones convencionales.

Recibido: 13-11-2011

Aceptado: 17-2-2012



Concluyeron que la quitina y el quitosano son vehículos útiles para obtener una liberación sostenida de algunos fármacos. Los sistemas microparticulares de quitosano parecen tener determinadas ventajas para la administración oral, parenteral y sobre mucosas de algunos fármacos. También han preparado microesferas de ketoprofeno utilizando quitosanos de diferentes pesos moleculares. Al combinar el quitosano de bajo peso molecular con el de alto peso molecular obtienen liberación controlada de ketoprofeno durante un período de más de 48 horas. El uso de mezclas de quitosano permite obtener micropartículas con buena eficacia de encapsulación, independientemente de las proporciones polímero/fármaco. El retraso en la liberación del fármaco es proporcional al contenido de quitosano en la formulación y al grado de desacetilación del mismo.

BIOADHESIVOS BUCALES PARA LA LIBERACIÓN LOCAL Y CONTROLADA DE FÁRMACOS Y SU REPERCUSIÓN EN LAS ENFERMEDADES PERIODONTALES

La cavidad bucal, es un ecosistema abierto y este se encuentra gobernado por ciertos parámetros, llamados determinantes ecológicos, entre los cuales se encuentra la adherencia bacteriana, caracterizada por un mecanismo mediante el cual los microorganismos son capaces de colonizar los tejidos de la cavidad bucal, y aún más, en las prótesis dentales. Las prótesis dentales parciales o totales, generalmente son fabricadas de resinas acrílicas, las cuales tienen la propiedad de retener la placa bacteriana debido a las características de porosidad y asperezas inherentes, lo que contribuye a la adherencia y proliferación de microorganismos; una vez que estos

Recibido: 13-11-2011

Aceptado: 17-2-2012



comienzan a proliferar, causan enfermedades bucales como es la gingivitis. Cuando la gingivitis no es tratada a tiempo puede convertirse en una periodontitis de leve a crónica llegando a ocasionar la pérdida de piezas dentales (4).

Estudios recientes revelan a través de microscopia de barrido electrónico, que las resinas de polimetilmetacrilato, el cual es el material mayormente utilizado en la fabricación de prótesis dentales, sufren deterioro a través del tiempo, lo que contribuye a la inserción y proliferación de microorganismos en la resina dañada causando así, la inflamación de la cavidad de soporte que está en contacto con la prótesis hasta convertirse en la denominada Estomatitis Subprotésica (4, 5).

En la actualidad existen muchos medicamentos que han evolucionado gracias a la tecnología genética y la

biología molecular, sin embargo, la administración oral de estos medicamentos presentan ciertas desventajas como agentes terapéuticos como lo es el metabolismo presistémico e inestabilidad en medio ácido lo que no permite su adecuada absorción en el organismo. En las últimas, décadas los científicos farmacéuticos en todo el mundo están tratando de explorar rutas transdérmico y transmucosa como una alternativa a las inyecciones. Entre los diversos sitios de transmucosa disponibles, la mucosa de la cavidad bucal resulta ser la más conveniente y un sitio de fácil acceso para la entrega de agentes terapéuticos, tanto para la entrega local y sistémica, como las formas de dosificación de retención, ya que tiene extensión de músculo liso, que es relativamente inmóvil y de abundante vascularización. El acceso directo a la circulación sistémica a través de la vena

Recibido: 13-11-2011

Aceptado: 17-2-2012



yugular interna evita que las drogas pasen al metabolismo hepático como primer paso que conduce a la alta biodisponibilidad.

En base a esto, los sistemas de liberación local de agentes antimicrobianos para el tratamiento de enfermedades periodontales han recibido considerable atención durante la última década frente a las desventajas de la administración sistémica.

Los sistemas mucoadhesivos que pueden ser aplicados y retirados por el paciente son una buena alternativa reciente. Éstos, son fabricados utilizando diferentes mezclas de celulosas y derivados poliacrílicos, para obtener nuevas formulaciones que contienen antibióticos para el tratamiento de enfermedades periodontales. Un polímero bucoadhesivo abarca un grupo grande de diversas moléculas, como lo son los polímeros hidrogeles, los copolímeros, los

polímeros multifuncionales y los polímeros tiolados entre otros. En este trabajo se utilizará un polímero multifuncional como lo es el quitosano, para la liberación controlada de metronidazol, que además, de poseer propiedades bioadhesivas, también sirve para otras funciones como la inhibición de enzimas, permeabilidad entre otros (6, 7).

Perioli y colaboradores (6), estudiaron un nuevo mucoadhesivo que contiene metronidazol, para el tratamiento de enfermedades periodontales. Ya que el desarrollo de microorganismos en la cavidad bucal está gobernado por bacterias anaeróbicas, el metronidazol es uno de los medicamentos preferidos por ser muy selectivo hacia estas bacterias; ellos encontraron un mucoadhesivo (Hidroxietil celulosa y Carbomer 940, 2:2 de radio) óptimo para la liberación local sostenida durante 12 horas de una dosis

Recibido: 13-11-2011

Aceptado: 17-2-2012



mínima (20mg) de Metronidazol, mucho menor a la concentración utilizada con la administración sistémica (600mg), por lo tanto concluyeron que las formulaciones tipo mucoadhesivo, garantiza la concentración terapéutica mínima inhibitoria de las bacterias anaerobias, disminuyendo así los efectos secundarios y la conformidad del paciente, lo que aprueba un sistema prometedor para la aplicación clínica.

Ikinci y colaboradores (7), estudiaron la combinación de quitosano con clorhexidina en bajas concentraciones, para el tratamiento de *Porphyromonas gingivalis*, el cual es una enfermedad periodontal caracterizada por severa inflamación en la cavidad bucal gobernada por bacterias anaerobias. Esta formulación ya sea en forma de gel o en películas, mostró actividad antimicrobiana frente al *P. gingivalis*, viéndose favorecida con el uso del

quitosano ya que este posee favorables propiedades de bioadhesión, es biodegradable, biocompatible, no tóxico y además posee actividad antimicrobiana, esto los llevo a la conclusión de que el quitosano puede ser un sistema de liberación promisorio no sólo para la clorhexidina, sino también para otras drogas antibacterianas para el tratamiento de enfermedades periodontales.

El Metronidazol, es un medicamento que se viene utilizando desde hace casi medio siglo para tratar infecciones provocadas por algunos tipos de bacterias y protozoos anaeróbicos. Es un antibiótico y antiparasitario, que pertenece al grupo de los nitroimidazoles. Inicialmente, el metronidazol se empleó para el tratamiento de *Trichomonas vaginalis* y diez años más tarde fue reconocida su actividad frente a ciertos gérmenes anaerobios, protozoarios y contra el *Helicobacter pylori*, la bacteria

Recibido: 13-11-2011

Aceptado: 17-2-2012



responsable de la mayoría de las úlceras y gastritis crónicas.

En la actualidad el Metronidazol es utilizado para una amplia variedad de patologías como abscesos cerebrales, endocarditis infecciosas, infecciones óseas, articulares, pleuropulmonares y cutáneas. Se emplea como tratamiento profiláctico en infecciones quirúrgicas, tratamientos de periodontitis y gingivitis, colitis C y giardiasis (8). Es la droga patrón de los 5-nitroimidazoles, y con la que se tiene mayor experiencia clínica (9).

DETERMINACIÓN ELECTROQUÍMICA DEL METRONIDAZOL

El metronidazol se ha determinado por espectrofotometría, volumetría, cromatografía de capa fina, cromatografía de gases, y cromatografía líquida de alto rendimiento. Desde el punto de vista

electroquímico, se han publicado varios trabajos sobre la electrorreducción de Metronidazol, entre los que destacan los métodos que emplean Voltametría de pulso diferencial sobre electrodos de carbón vítreo modificados y sin modificar.

Xiaohua Jiang y Xiangqin Lin (10), utilizaron métodos de voltametría, para determinar metronidazol en drogas, sobre un electrodo de carbón vítreo modificado con ADN de becerro; reportaron un límite de detección de $2,0 \times 10^{-8}$ M, haciendo del DNA/VCE un biosensor prometedor para la determinación de MTZ

Wang y colaboradores (11), plantearon un método para la determinación de Metronidazol en trazas (concentración menor a 100ppm), por voltametría adsorbtiva de redisolución, con una respuesta lineal desde 1×10^{-8} a 1×10^{-6} M con 1,5 min de acumulación. El método también mostró, la determinación

Recibido: 13-11-2011

Aceptado: 17-2-2012



submicromolar de metronidazol en suero humano P.C.

Lü, y colaboradores (12), propusieron un método electroquímico sencillo y sensible para la determinación de metronidazol, mostrando un límite de detección de 6×10^{-9} mol/L con un tiempo de acumulación de 2 min.

Bartlett, y colaboradores (13), investigaron la reducción electroquímica del metronidazol sobre un electrodo de fibra de carbono en un buffer a pH 9,0. Este método les ofreció un procedimiento sencillo para determinar metronidazol en la orina sin un tratamiento previo de la muestra antes del análisis.

Dado al gran número de trabajos que existen sobre el metronidazol como bactericida antiprotozoario y su comportamiento electroquímico, al igual que el quitosano como biopolímero versátil en una gran variedad de campos científicos y sobre todo su uso como

sistema liberador de fármacos, el objetivo primordial de este trabajo es estudiar vía electroquímica la liberación del metronidazol incorporado en una membrana de quitosano para su aplicación en nuevos campos, entre las cuales se destaca los sistemas buco-adhesivos para atacar enfermedades periodontales como las existentes con la utilización de prótesis dentales parciales o totales. Además, estas formas de dosificación son auto-administrables y económicas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Para todas la experiencias se empleó Metronidazol 99,9 % puro, gentilmente cedido por Valmorca C.A, Saliva Artificial preparada por el departamento de Farmacia Galénica, Laboratorio de fórmulas magistrales, Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes (composición : sorbitol 3%,

Recibido: 13-11-2011

Aceptado: 17-2-2012



cloruro de potasio 0,012%, cloruro de magnesio 0,005%, carboximetilcelulosa 0,5%). Qitosano Guinama grado de desacetilación (termogravimetría): 87,97±0,01%, masa molecular (viscosimetría): 1,41x10⁵ ± 0,01KDa Solubilidad: Acido acético; 99 ± 1%. Todas las soluciones fueron preparadas con agua ultrapura de 18 MΩ.cm⁻¹

CELDA Y ELECTRODOS

Se utilizó una celda de un solo compartimiento termostalizada con camisa de reflujo y un sistema de tres electrodos; como electrodo de trabajo un disco de carbón vítreo de área geométrica 0,0594 cm² para los estudios cualitativos y otro de 0,0445 cm² para los estudios cuantitativos. Ambos fueron cuidadosamente pulidos con alúmina de 0,3 y 0,05 μm, sometido a ultrasonido por 5 minutos y lavado con agua ultrapura, finalmente éste fue ciclado en una

solución de H₂SO₄ 0,1M en una ventana de -0,2 a 0,8V, hasta obtener un voltograma cíclico estable. Se empleó un electrodo de Ag/AgCl saturado en KCl como electrodo de referencia y como electrodo secundario, un electrodo de platino.

INSTRUMENTACIÓN

Todos los experimentos de voltametría cíclica y de pulso diferencial se realizaron con un potenciostato-galvanostato Autolab PGSTAT 30, acoplado a una computadora equipada con el software adecuado para la adquisición y manipulación de datos.

Se utilizó un termostato Thomas Scientific para mantener la saliva artificial a una temperatura de 37 °C.

Los estudios espectroscópicos por IR se realizaron utilizando un espectrofotómetro Perkin Elmer System 2000. Todas las medidas de pH se

Recibido: 13-11-2011

Aceptado: 17-2-2012



realizaron con un pH-metro (Thomas Scientific ts625).

PREPARACION DE PELICULAS DE QUITOSANO

Para la preparación de las películas de quitosano, se utilizó el método de evaporación del solvente. Primero se preparó una solución (250mL) de quitosano (Quitosan, Guinama, 87,97% de grado de desacetilación) disolviendo 5g de quitosano en 250mL de una solución ácida constituida por ácido acético glacial, la cual debe agitarse durante 12 horas, hasta la obtención de un hidrogel de quitosano ácido. El volumen total de la solución fue doblemente filtrado con papel whatman #1 y luego con papel whatman #0,45mm, para la eliminación de impurezas, microorganismos o formación de microesferas de quitosano. Luego, se prepararon distintas películas de diferente

espesor, incorporándole un solo tipo de formulación farmacéutica (genérico ELTER) en forma de tabletas. Las tabletas fueron trituradas, y se añadieron las cantidades necesarias de metronidazol en volúmenes crecientes de solución de quitosano (ver tabla I), agitando hasta obtener una solución homogénea.

Tabla I.- Preparación de las películas

Película	Volumen Quitosano 2%p/v (mL)	Cantidad de MTZ (g)	Espesor (mm)
#1	20	0,4	0,043
#2	30	0,6	0,45
#3	40	0,8	0,56
#4	50	1	0,63

Cada solución fue vertida en placas de petri y se colocaron en un horno a 50°C durante 24 horas para eliminar los rastros de agua. Las películas secas fueron sumergidas en una solución de NaOH

Recibido: 13-11-2011

Aceptado: 17-2-2012

0,5% hasta que se desprenden por sí solas, luego fueron enjuagadas con abundante agua destilada, se les da forma en un recipiente y se dejaron secar a temperatura ambiente (Figura 1).



Figura 1. Películas de quitosano, obtenidas por el método de evaporación

Para el estudio voltamétrico del metronidazol incorporado en las películas de quitosano, una cantidad dada de la película, fue sumergido en 3mL de saliva artificial termostatzada a 37⁰C y se registro un voltagrama cada cierto

tiempo. El contenido de metronidazol fue obtenido midiéndose mediante la ecuación de regresión lineal de la curva de calibración sencilla. Las películas de quitosano fueron caracterizadas mediante espectroscopia infrarroja (IR) sin y con la incorporación de MTZ, con la finalidad de comprobar que el MTZ incorporado en el quitosano, mantiene su estructura química y por ende sus propiedades farmacéuticas.

Todos los experimentos se realizaron a 37⁰C. El software del origin-pro 8 fue utilizado para procesar los datos y para el análisis de la regresión lineal Ip vs. C.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados de espectroscopía infrarroja, mostraron que la estructura del Metronidazol se mantiene intacta, luego de ser incorporado y sometido al procedimiento experimental empleado para formar las películas.

Recibido: 13-11-2011

Aceptado: 17-2-2012

ESTUDIO DE LA REDUCCIÓN ELECTROQUÍMICA DEL MTZ EN SALIVA ARTIFICIAL

El estudio preliminar de reducción del MTZ, se llevó a cabo mediante voltametría cíclica, sumergiendo un electrodo de carbón vítreo en una solución $1 \times 10^{-2} \text{M}$ de MTZ patrón (caracterizado por IR) en saliva artificial pH 4,8 como electrolito soporte, en una ventana de potencial de 0,0 a -1,2 V a 25mv/s.

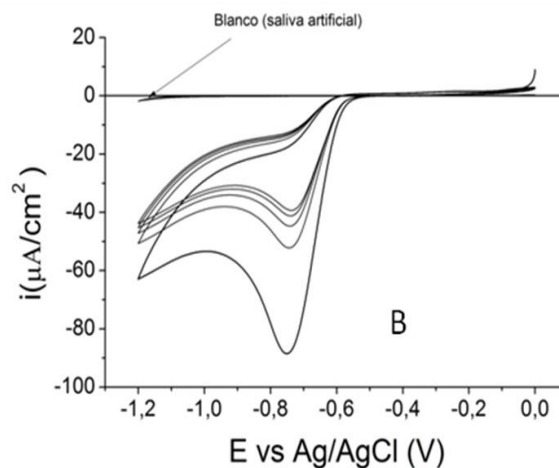
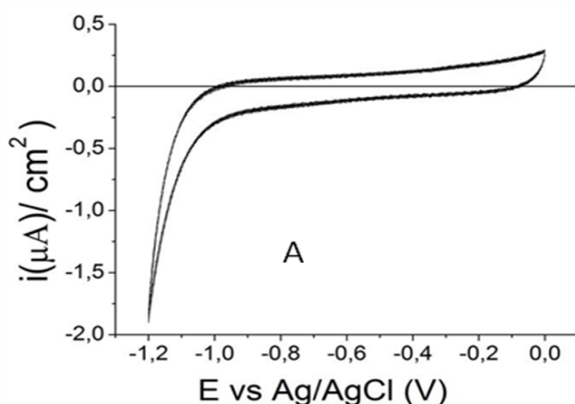


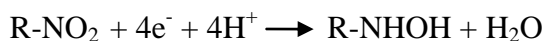
Figura 2: Respuesta voltamétrica del electrodo de carbón vítreo ($0,06 \text{cm}^2$) en saliva artificial (A) y (B) en $0,01 \text{M}$ de MTZ a 25mv/s y saliva artificial pH= 4,8 como electrolito soporte a 37°C .

En la figura 2A, se muestra el voltagrama cíclico obtenido en saliva artificial usada como blanco, lo cual muestra que la misma puede ser utilizada como electrolito soporte ya que presenta buena conductividad eléctrica y la ausencia de procesos de reducción en la ventana de trabajo, indica que no existe interferencia con la respuesta electroquímica del MTZ.

Recibido: 13-11-2011

Aceptado: 17-2-2012

En el voltograma de la figura 2B, muestra una señal de reducción que presenta un pico a $-0,75\text{V}$ durante el primer barrido catódico. La ausencia de picos de oxidación en el barrido inverso incluso a distintas velocidades de barrido (25 a 100 mv/s), indica la naturaleza totalmente irreversible de la reducción del MTZ (13). Este pico de reducción es atribuido a la reducción de cuatro electrones para transformar el grupo nitro en un derivado de hidroxilamina, acorde al mecanismo aceptado para la electroreducción de compuestos aromáticos y nitro compuestos heteroaromáticos (14).



Obtenida la ventana de potencial por Voltametría cíclica, se procedió a realizar la determinación electroquímica de MTZ, utilizando la técnica de Voltametría de pulso diferencial, ya que la misma es

mucho más sensible y tiene menores límites de detección. El electrodo de carbón vítreo fue sumergido en soluciones patrón de MTZ a diferentes concentraciones, las cuales se variaron entre $0,3$ y 8 mM disueltos en saliva artificial $\text{pH } 4,8$ como electrolito soporte, para cada solución se obtuvo la respuesta voltamétrica en una ventana de $0,0$ a $-1,2$ V a 10mv/s como se muestra en la Figura 3.

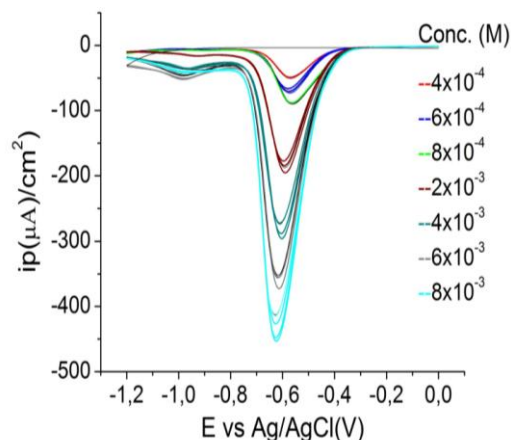


Figura 3. Voltograma de pulso diferencial de MTZ patrón a diferentes concentraciones en saliva artificial $\text{pH } 4,8$ a 37°C . Amplitud= 100mv , ancho de pulso 25ms , velocidad de barrido= 10mv/s . Área del electrodo: $0,0445\text{cm}^2$.

Recibido: 13-11-2011

Aceptado: 17-2-2012



Se prepararon cuatro películas de quitosano con el mismo contenido de MTZ (2%) pero de distinto espesor (Tabla II), con el fin de ver el comportamiento de liberación del MTZ variando este parámetro. Una cantidad dada de cada una, fue sumergida en 3 mL de saliva artificial, simulando las condiciones bucales como son temperatura (37°C) y pH 5-7. El contenido de metronidazol que fue liberado “in situ”, fue medido con el electrodo de carbón vítreo el cual era sumergido en el tiempo preciso en el cual se requería realizar la medida, la cual se realizó en intervalos de 30 minutos y de 24 horas. Utilizando la técnica de voltametría de pulso diferencial (cuyos parámetros ya fueron optimizados) se realizó la reducción electroquímica cuyos voltagramas se observan en la figura 4.

Tabla II. Espesor de las membranas

Película	Volumen de hidrogel de quitosano (ml)	Espesor (mm)
#1	20	0,043
#2	30	0,45
#3	40	0,56
#4	50	0,63

En la figura 4, se observan los voltagramas de pulso diferencial típicos de las distintas películas de quitosano que contenían el MTZ de origen farmacéutico. Para la primera película se realizaron medidas de cada media hora y de cada 24 horas, el resto de las películas sólo se le hicieron medidas de cada media hora. Las medidas fueron realizadas por triplicado en momentos distintos, esto se realizó en una ventana de potencial de 0,0 a -1,2 V a 10mv/s. A partir de los voltagramas se observa que hay un aumento gradual de la corriente de pico catódico, lo que indica que en efecto el metronidazol se está liberando desde la matriz del quitosano hacia el seno de la solución. También se aprecia que el quitosano no presenta

Recibido: 13-11-2011

Aceptado: 17-2-2012

actividad redox en la ventana de trabajo lo cual facilita el estudio y la determinación electroquímica del fármaco.

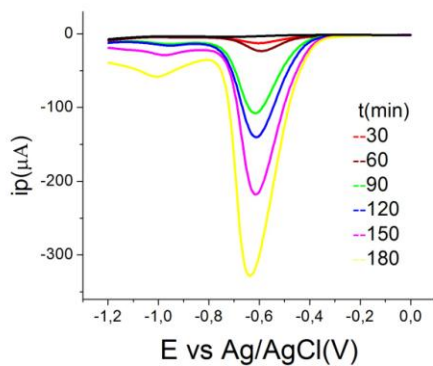


Figura 4. Reducción electroquímica de MTZ liberado en el tiempo desde una película de quitosano, en 3mL de saliva artificial pH 4,8 a 37°C; para todas las películas la forma de la respuesta voltamétrica fue similar.

La corriente de pico catódico obtenida para cada muestra problema, fue promediada e interpolada en una curva de calibración sencilla.

Tabla III. Desprendimiento del MTZ, en el tiempo

Película	t (min)	\bar{i}_p (µA)	conc (mM)	masa liberada (mg)	% MTZ liberado
#1	30	187,6	4,13	2,12	0,309
$\bar{m}= 13,7$	60	202,6	4,54	2,33	0,340
mg	90	225,3	5,15	2,64	0,380
	120	249,0	5,79	2,97	0,430
	150	275,0	6,49	3,33	0,480
	180	284,6	6,76	3,47	0,506
#1	24	261	6,12	3,14	0,450
$\bar{m}= 13,8$	48	326	7,87	4,04	0,580
mg	72	419	10,4	5,34	0,770
	96		11,9	6,11	0,880

Como se observa en la tabla III, para la película #1, el desprendimiento del metronidazol en el tiempo es sostenido y controlado hasta 96 horas (4 días), ya que la concentración en el seno de la solución aumenta gradualmente, liberándose aproximadamente la misma cantidad de fármaco por unidad de tiempo.

Tabla IV. Efecto del espesor de la membrana en la velocidad de liberación del MTZ

Película	t (min)	\bar{i}_p (μA)	conc (mM)	masa liberada (mg)	% MTZ
#2 $\bar{m}=$ 13,63mg	30	32,4	0,065	0,033	0,005
	60	115	1,6	0,8	0,12
	90	180	3,6	1,9	0,27
	120	235	5,24	2,7	0,39
	150	277	6,53	3,4	0,49
	180	349	8,73	4,5	0,65
#3 $\bar{m}=$ 13,4mg	30	94	0,93	0,47	0,07
	60	125	1,87	0,96	0,14
	90	194	3,98	2,0	0,31
	120	235	5,24	2,7	0,40
	150	264	6,14	3,1	0,47
#4 $\bar{m}=$ 13,8mg	180	290	9,93	3,56	0,53
	30	10,7	-	-	-
	60	27,5	-	-	-
	90	82,9	0,58	0,30	0,04
	120	135	2,2	1,1	0,16
	150	205	4,3	2,2	0,32
	180	259	5,9	3,1	0,44

Este tipo de liberación, presentan una cinética de orden cero, y es el mecanismo de liberación ideal cuando se quiere conseguir una acción farmacológica prolongada. Este comportamiento de liberación se puede describir mediante la siguiente ecuación:

$$Q_t = Q_0 + K_0t$$

Donde Q_t es la cantidad de fármaco liberado en el tiempo t , Q_0 es la cantidad de fármaco inicial de fármaco en solución, que generalmente es cero y K_0 es la constante de velocidad en la cinética de orden cero, de esta forma una gráfica de la cantidad de fármaco liberado en función del tiempo para cada película será lineal si cumple con las condiciones antes mencionadas como se observa en la Figura 5.

En la tabla III, también se observa que en tan solo 30 minutos se alcanza una concentración de $2,12 \times 10^{-3}$ M de MTZ liberado, lo que es igual a 2,12 mg en 3ml de saliva artificial, y la cantidad mínima para inhibir bacterias anaerobias está entre 0,25 a 4 $\mu g/mL$ (14), por lo que la cantidad liberada en 30 minutos está por encima del valor mínimo para una dosis terapéutica y por debajo del valor tóxico, esto garantiza que el MTZ

Recibido: 13-11-2011

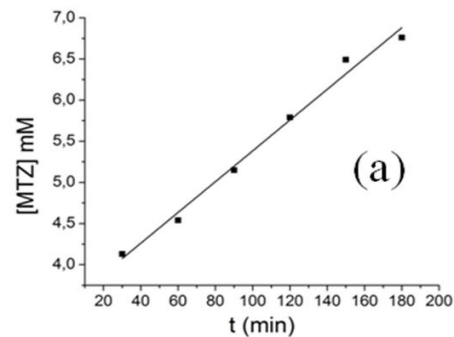
Aceptado: 17-2-2012

desprendido va a actuar de manera eficaz hacia este tipo de bacterias en el tratamiento local de enfermedades bucales.

Se estudió el efecto del espesor de las películas sobre liberación del metronidazol, variando los volúmenes de quitosano. Los valores obtenidos son resumidos en la tabla IV, donde se observan como efectivamente las películas liberan el medicamento en menor proporción, evidenciándose en la disminución de las corrientes de pico catódico en las primeras tres medidas para las tres películas debido a la mayor distancia que debe recorrer el fármaco para atravesar la matriz de quitosano (13, 14). Sin embargo, un comportamiento anómalo de liberación ocurre de la misma forma en las tres películas después de transcurrir los primeros 120 minutos, y cuya explicación se dará a continuación observando los perfiles de liberación de

cada película utilizando la ecuación 1 (Figura 5).

Tomando de la tabla III y IV la concentración de fármaco liberado en función del tiempo, la velocidad de liberación del metronidazol dada por la pendiente de cada curva de la figura 4.12 y al multiplicar por el peso molecular del MTZ y el volumen de la solución, se obtiene la masa liberada en el tiempo. Estos resultados son resumidos en la tabla V que se muestra a continuación.



Recibido: 13-11-2011

Aceptado: 17-2-2012

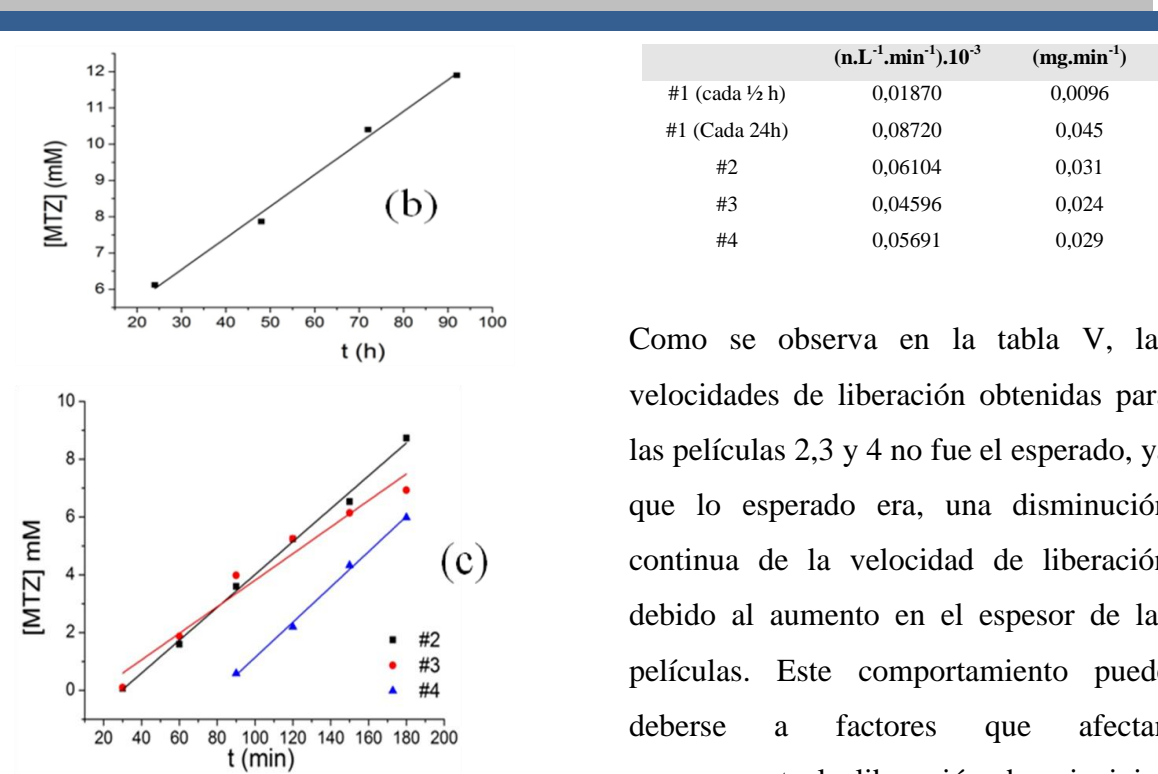


Figura 5.

Figura 5. Perfiles de liberación de las membranas. En a) Liberación de metronidazol de la membrana 1a, en b) liberación de metronidazol de la membrana 1b y en c) Comparación de la Liberación de metronidazol de las membranas 2,3 y 4.

Tabla V. Velocidad de liberación de las membranas de quitosano

Película	Velocidad de liberación	Masa Liberada
----------	-------------------------	---------------

Como se observa en la tabla V, las velocidades de liberación obtenidas para las películas 2,3 y 4 no fue el esperado, ya que lo esperado era, una disminución continua de la velocidad de liberación debido al aumento en el espesor de las películas. Este comportamiento puede deberse a factores que afectan enormemente la liberación de principios activos en polímeros como son; la hidratación y la hidrofiliidad del polímero, el cual viene dado por el grado de hinchamiento y que a su vez viene dada por la incorporación del líquido en el interior de la matriz, producto de la diferencia de potencial químico del disolvente dentro y fuera de ella, que provoca una dilatación de la misma, el

Recibido: 13-11-2011

Aceptado: 17-2-2012



cual se le opone una fuerza elástica-retráctil a la penetración del solvente, esto puede ser la causa por el cual al principio las corrientes obtenidas para estas tres películas son más pequeñas, y una vez que las cadenas poliméricas son relajadas por la penetración del solvente y pierden sus propiedades mecánicas de elasticidad, el fármaco se libera de forma incontrolada (efecto estallido) y a mayor velocidad, por ello las velocidades de liberación se asemejan, ya que, cuando se alcanza el equilibrio de hinchamiento se igualan la fuerza de hinchamiento y la fuerza elástica-retráctil y el fármaco se libera aproximadamente en la misma proporción (13, 14). Este supuesto, puede verificarse utilizando dos modelos matemáticos; modelo de Higuchi y el modelo de Kormsmeyer Peppas (12, 13, 14). El primer modelo describe la liberación del fármaco como un proceso de difusión a través de la matriz de polímero basado

en la ley de Fick, y viene descrita por la siguiente ecuación:

$$Q = KH t^{1/2}$$

Donde Q es la cantidad de fármaco liberado y KH es la constante de disolución de Higuchi.

El segundo modelo es especialmente útil cuando se desconoce el mecanismo de liberación o cuando ésta ocurre por más de un mecanismo, y viene descrita por la siguiente ecuación:

$$\text{Log } Mt/M_{\infty} = \text{Log } K + n \text{Log } t$$

Donde Mt es cantidad de fármaco liberado a tiempo t , M_{∞} es la cantidad de fármaco que se liberaría a tiempo infinito (por tanto, Mt/M_{∞} es la fracción de fármaco liberado a tiempo t), K es la constante del sistema y n es el exponente difusional. Según los valores que tome n

Recibido: 13-11-2011

Aceptado: 17-2-2012

se pueden definir distintos mecanismos de transporte.

Utilizando estos dos modelos, para definir cual es el mecanismo que siguió cada película para la liberación del fármaco y utilizando los valores de las tablas IV y V, se obtuvieron los siguientes resultados resumidos en la tabla VI.

Tabla VI. Cinética de disolución/liberación de las películas de quitosano de distinto espesor

Película de quitosano 2%p/V	Higuchi		Korsmeyer - Peppas		
	K_H	R^2	K_H	R^2	n
#1	0,18	0,9857	0,23	0,9898	0,4
#2	0,55	0,9748	0,0004	0,9738	1,5
#3	0,41	0,9755	0,0025	0,9904	1,2
#4	0,72	0,9923	3,2x10 ⁻⁸	0,9892	3,4

La tabla VI muestra para el modelo Higuchi, valores altos de correlación, lo que indica que las cuatro películas siguen un mecanismo de difusión para la liberación del principio activo. Para el tipo de difusión, el modelo de

Korsmeyer-Peppas muestra los valores del coeficiente difusional (n) que indican que en efecto, las tres últimas películas presentaron diferentes comportamientos, respecto a la difusión Fickiana que presentó la película #1 con $n=0,4$. En la tabla VII, se resumen los tipos de difusión de cada película según los valores del coeficiente de difusión obtenidos (14).

Tabla VII. Tipo de difusión de las membranas de distinto espesor

Película	n	Tipo de difusión
#1	0,4	Difusión Fickiana, el principio activo se libera de manera constante desde la matriz del polímero.
#2	1,5	Difusión no Fickiana, denominado
#3	1,2	“transporte caso II”. Este tipo de difusión está controlada por el hinchamiento y la relajación de las cadenas del polímero
#4	3,4	Es una difusión con tiempos de liberación muy elevados y a este tipo de transporte lo denominan “transporte Supercaso II”

Como se observa en la tabla VII, los datos cuantitativos indican que la liberación del

Recibido: 13-11-2011

Aceptado: 17-2-2012



fármaco en las películas 2, 3 y 4 se asocian a un mecanismo de difusión anómalo (no Fickiano) por efecto de relajación de las cadenas del polímero y pérdida de las propiedades mecánicas del mismo, obteniéndose así, una liberación sostenida en el tiempo sólo para la película de menor espesor (0,043mm), liberando el fármaco a una velocidad de $0,0096 \text{ mg} \cdot \text{min}^{-1}$.

CONCLUSIONES

- 1.- El uso de la técnica de voltametría cíclica como estudio preliminar, demostró que la saliva artificial es un buen medio electrolítico para llevar a cabo la reducción del metronidazol en una ventana de potencial de 0,0 a -1,2 V vs Ag/AgCl y que el sistema se comporta de forma irreversible en estas condiciones.
- 2.- La determinación de metronidazol (MTZ) mediante la técnica de voltametría de pulso diferencial, permitió calcular de

manera sencilla los parámetros de calidad, obteniéndose un rango lineal entre 0,3 y 8 mM, con un límite de detección de $1,22 \times 10^{-4} \text{ M}$ y un límite de cuantificación de $4,07 \times 10^{-4}$. Estos resultados permiten proponer el uso de ésta técnica para la determinación de MTZ a nivel de fármacos.

- 3.- Para una película de 0,043 mm de espesor, y ajustando el perfil de liberación a las ecuaciones sencillas de Higuchi y Korsmeyer Peppas, el principio activo fue liberado siguiendo un mecanismo de difusión (cinética de orden cero) a través de la película de quitosano. Este resultado resulta conveniente en la odontología para atacar uniones estrechas que se encuentran en el epitelio de la cavidad bucal y que son de difícil acceso.

- 4.- Los perfiles de liberación ajustadas a las ecuaciones simplificadas de Higuchi y Korsmeyer Peppas para películas de quitosano de mayor espesor, mostraron

Recibido: 13-11-2011

Aceptado: 17-2-2012



una liberación anómala del principio activo dada por una difusión no Fickiana y relajación de las cadenas poliméricas.

5.- La velocidad de liberación del metronidazol desde una película de quitosano puede ser determinada utilizando técnicas electroquímicas.

REFERENCIAS

1. Ochoa V, Caro R, El Quitosano: usos farmacéuticos y biológicos [Documento en línea]. Rev OFIL, 14 2004 33-42. Disponible: <http://biblioteca.utec.edu/sv/cita.pdf>. [consulta: 2010 febrero 2].
2. Upadrashta S, Katikaneni P, Nuessle N. Chitosan as a tablet binder. Drug Dev Ind Pharm. 1992; 18(15): 1701-1708.
3. Genta I, Perugini P, Pavanetto F. Different molecular weight chitosan microspheres: Influence on drug loading and drug release. Drug Dev Ind Pharm. 1998; 2(4): 779-784.
4. Velazco G, Ortiz R, Bustillos L, González A, Solórzano E. Análisis estructural de un acondicionador de tejido utilizado para el tratamiento de Estomatitis Subprotésica. Acta Microscópica. 2009; 1(8): 232 – 236.
5. Arellano L, Velazco G, Ortiz R, Bustillos L. Evidencia microscópica de *Candida albicans* en una resina resiliente para rebase de dentaduras. ODOUS. 2009; 10 (1): 18-25
6. Perioli L, Ambrogi V, Rubini D, Giovagnoli S, Ricci M, Blasi P, *et al.* Novel mucoadhesive buccal formulation containing metronidazole for the treatment of periodontal disease. J Control Release. 2004; 95(3): 521– 533.
7. İkinci G, Senel S, Akıncıbay H, Kas S, Ercis S, Wilson C, *et al.* Effect of chitosan on a periodontal pathogen

Recibido: 13-11-2011

Aceptado: 17-2-2012



- Porphyromonas gingivalis*. Int J Pharm. 2002; 235(1-2): 121–127.
8. Metronidazol [Documento en línea]. Disponible en: <http://www.salud.com/medicamentos/metronidazol.asp>. [Consulta: 2010 febrero 5].
9. Vives E, Ventriglia V, Medvedovsky D, Rothlin R. Nitroimidazoles y Nitrofuranos [Documento en línea]. Disponible en: <http://www.scribd.com/doc/6559051/NITROIMIDAZOLES>. [Consulta: 2010 Febrero 3].
10. Xiaohua J; Lin X voltimetría de la interacción del metronidazol con el ADN y sus aplicaciones analíticas. Bioelectroquímica 2006; 68 (2) :206-12
11. Wang Z, Zhou H, Zhou S. Study o the determination of Metronidazole in human serum by adsorptive stripping voltammetry. Talanta. 1993; 40(7): 1073-1075.
12. Lu S, Wu K, Dang X, Hu S. Electrochemical reduction and voltammetric determination of metronidazole at a nanomaterial thin film coated glassy carbon electrode". Talanta, 2004; 63(3): 653–657.
13. Bartlett P, Ghoneim E, El-Hefnawy G, El-Hallag I. Voltammetry and determination of metronidazole at a carbon fiber microdisk electrode. Talanta. 2005; 66(4):869–874.
14. Mandal P. Reactions of the nitro radical anion of metronidazole in aqueous and mixed solvent: a cyclic voltammetric study. J Electroanal Chem, 2004; 570(1): 55–61.

Recibido: 13-11-2011

Aceptado: 17-2-2012