

# **UNIVERSIDAD NACIONAL DE INGENIERÍA**

## **FACULTAD DE CIENCIAS**



### **TESIS:**

**“PREPARACIÓN, CARACTERIZACIÓN, ENSAYOS DE  
LIBERACIÓN Y ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE PELÍCULAS DE  
QUITOSANO CARGADAS CON EL FÁRMACO CLORHEXIDINA”**

### **PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE:**

**LICENCIADA EN QUÍMICA**

### **ELABORADA POR:**

**ANGIE ANDREA SORIA RIOS**

### **ASESORA:**

**DRA. ANA CECILIA VALDERRAMA NEGRÓN**

**LIMA-PERÚ**

**2022**

## **DEDICATORIA**

A Dios y a mis padres por su apoyo incondicional y por ser mi soporte durante mi etapa de estudiante. Son quienes confiaron en mí desde siempre y me impulsaron a culminar todo lo que iniciaba.

## **AGRADECIMIENTO**

A mi asesora, la Dra. Ana Valderrama Negrón, por la paciencia y orientación brindados en este tiempo y por recibirme como integrante del Laboratorio de Investigación en Biopolímeros y Metalofármacos (LIBIPMET); a los profesores Christian Jacinto y Golfer Muedas por sus valiosas críticas a mi trabajo durante su desarrollo; a los integrantes del Círculo de Investigación 163-2016-FONDECYT con quienes trabajé en equipo; a los encargados de los laboratorios de la Universidad Nacional de Ingeniería, Universidad Nacional de Trujillo y Universidad Peruana Cayetano Heredia por permitirme utilizar sus instalaciones para realizar los análisis requeridos en este estudio. Finalmente, a Diego Nieto por su apoyo constante y ayuda durante todo el proceso, y a cada una de las personas que participaron directa o indirectamente en la elaboración de este trabajo de investigación.

## RESUMEN

Este trabajo de investigación abarcó la preparación de películas de Quitosano (CHT) reticuladas con Tripolifosfato de sodio (TPP) y cargadas con Clorhexidina (CLX), las cuales se obtuvieron por el método de evaporación del solvente, también conocido como casting. Los films de quitosano (1%) fueron reticulados con TPP (0.1%) usando Glicerina (GLI) como plastificante (10%) y se cargaron con CLX (0.12%), dado que presentaron las características mecánicas deseadas para utilizarse a manera de sistema de liberación, así como para mantener su integridad física luego de la liberación in vitro.

Las películas a base del biopolímero quitosano (peso molecular 698.13 kDa, grado de desacetilación 71.04%) se caracterizaron utilizando distintas técnicas para determinar las variaciones químicas ocurridas como consecuencia del cargado con el fármaco. Es así que, la interacción con el polianión TPP quedó evidenciada mediante la técnica FTIR, así como la presencia del fármaco. Otros métodos de caracterización utilizados fueron TGA y DSC para determinar la estabilidad térmica de las películas preparadas y SEM con el objetivo de observar la variación morfológica de la superficie del film. El estudio del grado de hinchamiento se llevó a cabo para identificar el comportamiento de las películas en contacto con el medio acuoso, donde se encontró que siguen una cinética de segundo orden. Cabe mencionar que el estudio de liberación

de Clorhexidina se llevó a cabo a temperatura controlada (27 °C, 37 °C y 47 °C), también se hizo variar el volumen de gel utilizado en la preparación de la película (25 mL, 35 mL y 45 mL) y la concentración del reticulante (0.1%, 0.5%). Los perfiles de liberación se ajustaron a distintos modelos matemáticos, donde el modelo de Korsmeyer-Peppas fue el más adecuado para describir la cinética de liberación.

Finalmente, el ensayo cualitativo por el método de difusión en agar de Bauer-Kirby concluyó que las películas cargadas con clorhexidina mostraron actividad fungicida frente al hongo *Candida albicans*, demostrando así que estas funcionan como vehículo potencial para la administración de fármaco dado que permiten la liberación eficaz del principio activo.

## ABSTRACT

This research work covered the preparation of Chitosan (CHT) films crosslinked with Sodium triphosphate (TPP) and loaded with Chlorhexidine (CLX), which were obtained by the solvent evaporation method, also known as casting. The chitosan films (1%) were crosslinked with TPP (0.1%) using Glycerin (GLI) as plasticizer (10%) and loaded with CLX (0.12%) since these showed the desired mechanical characteristics to use them as a release system, such as to maintain its physical integrity after *in vitro* release.

Films made of chitosan biopolymer (molecular weight 698.13 kDa, 71.04% degree of deacetylation) were characterized using different techniques to determine the chemical variations that take place in the films as a consequence of drug loading. Thus, the interaction with the polyanion TPP was evidenced by the FTIR technique, as well as the presence of the drug. Other characterization methods used were TGA and DSC to determine the thermal stability of the prepared films and SEM in order to observe the morphological variation of the film surface. The study of the degree of swelling was carried out to identify the behavior of the films in contact with the aqueous medium., where a second order kinetics was found. It is worth mentioning that the study of the release of Chlorhexidine was carried out at a controlled temperature (27 °C, 37 °C, 47 °C), the volume of gel used in the preparation of the

film (25 mL, 35 mL, 45 mL) and the concentration of the crosslinker were varied (0.1%, 0.5%). Later, release profiles were adjusted to different mathematical models, where the Korsmeyer-Peppas model was the most appropriate to describe the release kinetics.

Finally, the Bauer-Kirby diffusion test concluded that the films loaded with chlorhexidine showed fungicidal activity against *Candida albicans*, thus demonstrating that they work as a potential vehicle for drug administration since they allow the effective release of the active pharmaceutical ingredient.

# ÍNDICE

<b>RESUMEN</b> .....	iv
<b>ABSTRACT</b> .....	vi
<b>ÍNDICE</b> .....	viii
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....	xii
<b>ÍNDICE DE TABLAS</b> .....	xv
<b>ABREVIATURAS</b> .....	xvii
<b>PRÓLOGO</b> .....	xix
<b>CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN</b> .....	1
<b>1.1. Descripción del problema</b> .....	2
<b>1.2. Justificación</b> .....	3
<b>1.3. Objetivos</b> .....	5
<b>1.3.1. Objetivo general</b> .....	5
<b>1.3.2. Objetivos específicos</b> .....	5
<b>1.4. Estado del arte</b> .....	6
<b>CAPÍTULO 2. MARCO TEÓRICO</b> .....	8
<b>2.1. Candida albicans</b> .....	8
<b>2.1.1. Candidiasis oral</b> .....	9
<b>2.2. Clorhexidina</b> .....	10
<b>2.2.1. Estructura química</b> .....	10
<b>2.2.2. Propiedades de la clorhexidina</b> .....	11
<b>2.2.3. Aplicación como agente para tratamiento bucal</b> .....	12
<b>2.3. Quitosano</b> .....	12
<b>2.3.1. Estructura química</b> .....	12
<b>2.3.2. Propiedades del quitosano</b> .....	13
<b>2.3.3. Aplicación como sistema de liberación</b> .....	14



2.3.4.	Caracterización del quitosano.....	14
2.3.4.1.	Grado de desacetilación por valoración conductimétrica.....	14
2.3.4.2.	Peso molecular por viscosimetría .....	16
2.4.	Glicerina .....	18
2.4.1.	Estructura química .....	18
2.4.2.	Aplicación como agente plastificante .....	19
2.5.	Tripolifosfato de sodio.....	19
2.5.1.	Estructura química .....	19
2.5.2.	Aplicación como agente entrecruzante.....	20
2.6.	Películas de quitosano: Caracterización.....	21
2.6.1.	Técnicas instrumentales para la caracterización de las películas..	21
2.6.1.1.	Espectroscopía infrarroja (FTIR) .....	21
2.6.1.2.	Análisis termogravimétrico (TGA) .....	21
2.6.1.3.	Calorimetría diferencial de barrido (DSC) .....	22
2.6.1.4.	Microscopía electrónica de barrido (SEM) .....	23
2.6.1.5.	Espectrofotometría UV-Visible .....	24
2.6.2.	Estudio del grado de hinchamiento .....	25
2.6.3.	Estudio de liberación de la clorhexidina .....	27
2.6.3.1.	Modelos matemáticos para la liberación del fármaco clorhexidina .....	28
2.6.4.	Ensayo microbiológico: Método de difusión en agar (Bauer-Kirby) .....	31
<b>CAPÍTULO 3. DESARROLLO DEL TRABAJO DE INVESTIGACIÓN.....</b>		<b>32</b>
3.1.	Reactivos.....	32
3.2.	Procedimiento experimental.....	32
3.2.1.	Caracterización del quitosano.....	32
3.2.1.1.	Determinación del grado de desacetilación por valoración conductimétrica .....	32
3.2.1.2.	Determinación del peso molecular por viscosimetría .....	33
3.2.2.	Películas de quitosano cargadas con clorhexidina .....	34
3.2.2.1.	Preparación de películas de quitosano.....	34

3.2.2.2.	Reticulación de la película quitosano-clorhexidina .....	36
3.2.3.	Estudio del grado de hinchamiento .....	38
3.2.4.	Estudio de liberación de la clorhexidina .....	39
3.2.4.1.	Curva de calibración del fármaco clorhexidina.....	39
3.2.4.2.	Procedimiento para la liberación del fármaco clorhexidina...	40
3.2.4.3.	Modelos matemáticos para el estudio de la cinética de liberación del fármaco clorhexidina .....	43
3.2.5.	Caracterización instrumental de las películas de quitosano cargadas con clorhexidina .....	45
3.2.5.1.	Espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FTIR) .....	45
3.2.5.2.	Análisis termogravimétrico: TGA y DSC.....	45
3.2.5.3.	Microscopía electrónica de barrido (SEM) .....	46
3.2.6.	Ensayo microbiológico: Método de difusión en agar (Bauer-Kirby) .....	46
<b>CAPÍTULO 4. ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS.....</b>		<b>48</b>
4.1.	Caracterización del quitosano .....	48
4.1.1.	Determinación del grado de desacetilación por valoración conductimétrica.....	48
4.1.2.	Determinación del peso molecular por viscosimetría .....	50
4.2.	Estudio del Grado de hinchamiento .....	54
4.2.1.	Efecto del volumen de preparación de la película sobre el grado de hinchamiento .....	54
4.2.2.	Efecto de la concentración de reticulante sobre el grado de hinchamiento .....	56
4.2.3.	Efecto del tiempo de reticulación sobre el grado de hinchamiento	58
4.2.4.	Modelo cinético del grado de hinchamiento .....	60
4.3.	Liberación del fármaco clorhexidina.....	63
4.3.1.	Curva de calibración.....	63
4.3.2.	Efecto de las variaciones en el estudio de liberación.....	65
4.3.2.1.	Efecto del pH del medio de liberación .....	65
4.3.2.2.	Efecto del volumen de preparación de las películas .....	67

4.3.2.3.	Efecto de la temperatura del medio de liberación .....	68
4.3.2.4.	Efecto de la concentración de reticulante .....	69
4.3.3.	Modelos matemáticos para el estudio de la cinética de liberación del fármaco clorhexidina .....	71
4.3.4.	Caracterización instrumental de las películas de quitosano cargadas con clorhexidina .....	75
4.3.4.1.	Espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FTIR) .....	75
4.3.4.2.	Análisis termogravimétrico: TGA y DTG .....	83
4.3.4.3.	Análisis termogravimétrico: TGA y DSC.....	86
4.3.4.4.	Microscopía electrónica de barrido (SEM) .....	89
4.4.	Ensayo microbiológico: método de difusión en agar (Bauer-Kirby) ....	94
	CONCLUSIONES.....	98
	RECOMENDACIONES.....	101
	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	102

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> <i>Fórmula estructural de la Clorhexidina.</i> .....	11
<b>Figura 2.</b> <i>Fórmula estructural del Quitosano.</i> .....	13
<b>Figura 3.</b> <i>Fórmula estructural de la Glicerina.</i> .....	18
<b>Figura 4.</b> <i>Fórmula estructural del Tripolifosfato de Sodio.</i> .....	20
<b>Figura 5.</b> <i>Diagrama de proceso para la obtención de películas de Quitosano cargadas con Clorhexidina (Şenel et al., 2000).</i> .....	35
<b>Figura 6.</b> <i>(a) Película CHT-CLX-GLI posterior al tiempo de secado (b) Película CHT-CLX posterior al tiempo de secado.</i> .....	36
<b>Figura 7.</b> <i>Diagrama de proceso para la reticulación de películas de quitosano cargadas con clorhexidina.</i> .....	37
<b>Figura 8.</b> <i>(a) Película de quitosano sin CLX (blanco) luego de la reticulación con TPP 0.1%. (b) Película de quitosano cargada con fármaco CLX luego de la reticulación TPP 0.1%.</i> .....	37
<b>Figura 9.</b> <i>Diagrama de proceso para la liberación del fármaco CLX a temperatura controlada.</i> .....	42
<b>Figura 10.</b> <i>Sistema de liberación utilizado para la liberación de Clorhexidina a partir de películas de Quitosano. (a) Shaker y chiller para brindar las condiciones de liberación (b) Chaqueta de vidrio.</i> .....	43
<b>Figura 11.</b> <i>Curva de valoración conductimétrica promedio del quitosano.</i> .....	49
<b>Figura 12.</b> <i>Constante K en función de GD y su ecuación de la curva.</i> .....	51
<b>Figura 13.</b> <i>Constante a en función de GD y su ecuación de la curva.</i> .....	52
<b>Figura 14.</b> <i>Viscosidad intrínseca del Quitosano a partir de la gráfica de Viscosidad inherente y Viscosidad reducida en función de la Concentración.</i> .....	53
<b>Figura 15.</b> <i>Grado de hinchamiento de las películas de quitosano (1%), glicerina (10%), reticuladas con TPP (0.1%) durante 30 min, con un volumen de preparación de 25 mL, 35 mL y 45 mL, en PBS (pH 7.4) a 37 °C.</i> .....	56

<b>Figura 16.</b> Grado de hinchamiento de las películas de quitosano (1%), glicerina (10%), reticuladas con TPP al 0%, 0.1% y 0.5% durante 30 min, con un volumen de preparación de 25 mL, en PBS (pH 7.4) a 37 °C.....	58
<b>Figura 17.</b> Grado de hinchamiento de las películas de quitosano (1%), glicerina (10%), reticuladas con TPP 0.1 % durante 30 min, 60 min y 120 min, con un volumen de preparación de 25 mL, en PBS (pH 7.4) a 37 °C.....	59
<b>Figura 18.</b> Cinética de hinchamiento de las películas de quitosano preparadas a condiciones variadas, ajustadas a Primer Orden.....	60
<b>Figura 19.</b> Cinética de hinchamiento de las películas de quitosano preparadas a condiciones variadas, ajustadas a Segundo Orden.....	61
<b>Figura 20.</b> Barrido espectral de los estándares del fármaco Clorhexidina.....	64
<b>Figura 21.</b> Curva de calibración y ecuación de la recta de la Clorhexidina.....	64
<b>Figura 22.</b> Perfil de liberación de CLX a 37 °C a partir de películas de quitosano 1%, volumen de preparación 25 mL, TPP 0.1 %, liberadas a diferentes condiciones de pH (agua desionizada, buffer pH 6, 7.4 y 9).....	66
<b>Figura 23.</b> Perfil de liberación de CLX a 37 °C a partir de películas de quitosano 1%, volumen de preparación 25 mL, 35 mL y 45 mL, TPP 0.1%. .....	68
<b>Figura 24.</b> Perfil de liberación de CLX a 27 °C, 37 °C y 47 °C a partir de películas de quitosano 1%, volumen de preparación 25 mL, TPP 0.1%. .....	69
<b>Figura 25.</b> Perfil de liberación de CLX a 37 °C a partir de películas de quitosano 1%, volumen de preparación 25 mL, TPP 0.1% y 0.5%. .....	71
<b>Figura 26.</b> Perfiles de liberación ajustados al modelo de Orden Cero.....	73
<b>Figura 27.</b> Perfiles de liberación ajustados al modelo de Primer Orden.....	73
<b>Figura 28.</b> Perfiles de liberación ajustados al modelo de Higuchi.....	74
<b>Figura 29.</b> Perfiles de liberación ajustados al modelo de Korsmeyer-Peppas.....	74
<b>Figura 30.</b> Espectro FTIR-ATR del biopolímero Quitosano.....	76
<b>Figura 31.</b> Espectro FTIR-ATR del Tripolifosfato de Sodio.....	78
<b>Figura 32.</b> Espectro FTIR-ATR del fármaco Clorhexidina.....	79
<b>Figura 33.</b> Espectro FTIR- ATR de la película polimérica Blanco (sin CLX). .....	81
<b>Figura 34.</b> Espectro FTIR-ATR de la película biopolimérica con CLX 0.12%. .....	83
<b>Figura 35.</b> TGA y DTG de la película polimérica Blanco (sin CLX). .....	84
<b>Figura 36.</b> TGA y DTG del fármaco Clorhexidina.....	85
<b>Figura 37.</b> TGA y DTG de la película polimérica cargada con CLX 0.12%. .....	86
<b>Figura 38.</b> TGA y DSC de la película polimérica Blanco.....	87

<b>Figura 39.</b> TGA y DSC del fármaco Clorhexidina. ....	88
<b>Figura 40.</b> TGA y DSC de la película polimérica cargada con CLX 0.12%. ....	89
<b>Figura 41.</b> (a) Película CHT-TPP (blanco sin fármaco) seca y reticulada. (b) Película CHT-TPP-CLX seca y reticulada. ....	90
<b>Figura 42.</b> SEM de la película de CHT-TPP (Blanco sin CLX). ....	92
<b>Figura 43.</b> SEM de la película de CHT-TPP-CLX al 0.08%. ....	92
<b>Figura 44.</b> SEM de la película de CHT-TPP-CLX al 0.12%. ....	93
<b>Figura 45.</b> SEM de la película de CHT-TPP-CLX al 0.16%. ....	93
<b>Figura 46.</b> Actividad antimicrobial de las películas de CHT preparadas contra el hongo <i>Candida albicans</i> (por triplicado) para los discos D1, D2 y D3. ....	96
<b>Figura 47.</b> Actividad antimicrobial de las películas de CHT preparadas contra el hongo <i>Candida albicans</i> (por triplicado) para los discos D5, D6 y D7. ....	96

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> <i>Exponente de liberación <math>n</math> de la ecuación Korsmeyer-Peppas (Rosu &amp; Bratu, 2014; Dash, Murthy, Nath, &amp; Chowdhury, 2010; Aycan, Yayla, &amp; Aydin, 2020).</i>	30
<b>Tabla 2.</b> <i>Especificaciones consideradas en la preparación de los films para el estudio del grado de hinchamiento.</i>	39
<b>Tabla 3.</b> <i>Preparación de la curva de calibración.</i>	40
<b>Tabla 4.</b> <i>(*) Frecuencia de lectura del medio de liberación para cada intervalo.</i>	42
<b>Tabla 5.</b> <i>Especificaciones consideradas en la preparación de las películas de quitosano CLX 0.12%. CHT 1%, y tiempo de reticulación 30 minutos.</i>	44
<b>Tabla 6.</b> <i>Tiempos y viscosidades correspondientes a las soluciones preparadas a diferentes concentraciones.</i>	50
<b>Tabla 7.</b> <i>Constantes <math>K</math> y <math>a</math> para quitosano con distintos grados de acetilación y 0.2M HAc/0.1M NaAc como solvente (Beattie &amp; Booth, 1963; Carlos Salazar, 2013).</i>	51
<b>Tabla 8.</b> <i>Coefficientes de las curvas ajustadas a la recta <math>y=mx+b</math>, producto de aplicar un modelo cinético de hinchamiento de Primer Orden.</i>	61
<b>Tabla 9.</b> <i>Coefficientes de las curvas ajustadas a la recta <math>y=mx+b</math>, producto de aplicar un modelo cinético de hinchamiento de Segundo Orden.</i>	62
<b>Tabla 10.</b> <i>Coefficientes de determinación obtenidos ajustando las curvas de liberación de las películas de CHT-TPP-CLX a los diversos modelos matemáticos.</i>	75
<b>Tabla 11.</b> <i>Bandas y picos característicos del espectro FTIR-ATR del quitosano. ...</i>	77
<b>Tabla 12.</b> <i>Bandas y picos característicos en el espectro FTIR-ATR del TPP. ....</i>	78
<b>Tabla 13.</b> <i>Bandas y picos característicos en el espectro FTIR-ATR del CLX. ....</i>	80
<b>Tabla 14.</b> <i>Bandas y picos característicos en el espectro FTIR-ATR de la película polimérica Blanco (sin CLX en su composición) reticulada con TPP 0.1%.....</i>	81
<b>Tabla 15.</b> <i>Bandas y picos característicos en el espectro FTIR-ATR de la película polimérica cargada con CLX 0.12%. ....</i>	82

**Tabla 16.** *Especificaciones técnicas de las películas del estudio microbiológico. .. 94*

**Tabla 17.** *Diámetros de los halos de inhibición obtenidos por el método difusión en agar de Bauer-Kirby..... 97*



## **ABREVIATURAS**

CHT: Quitosano

CLX: Clorhexidina

TPP: Tripolifosfato de Sodio

GLI: Glicerina

GD: Grado de Desacetilación

W: Grado de Hinchamiento

FTIR: Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier

TGA: Termogravimetría

DSC: Calorimetría Diferencial de Barrido

SEM: Microscopía Electrónica de Barrido

UV-Vis: Ultravioleta-visible

TSA: Agar Triptona-Soja

TSB: Caldo Triptona-Soja

MIC: Concentración Mínima Inhibitoria

CHT-TPP: Película de quitosano reticulada con tripolifosfato de sodio

CHT-TPP-CLX: Película de quitosano reticulada con tripolifosfato de sodio y cargada con clorhexidina

HAc: Ácido acético

NaAc: Acetato de sodio

PBS: Buffer fosfato salino

## PRÓLOGO

El presente trabajo, tesis de licenciatura titulada “Preparación, caracterización, ensayos de liberación y actividad biológica de películas de quitosano cargadas con el fármaco Clorhexidina”, fue motivado por la idea de hacer un aporte científico a manera de agradecimiento para con mi alma mater, la Universidad Nacional de Ingeniería, por los años en que la Facultad de Ciencias me acogió como estudiante y me brindó lo mejor para mi educación profesional. Como integrante del grupo LIBIPMET pude involucrarme en el estudio de los biopolímeros, es en este contexto en el que tuve la oportunidad de formar parte del Círculo de Investigación 163-2016-FONDECYT “Nuevas Tecnologías para suministros de fármacos a base de productos naturales peruanos para el control de salud bucal”. Así inició el reto de elaborar películas utilizando el Quitosano para aprovechar sus propiedades y emplearlo como un posible sistema de transporte de la Clorhexidina, fármaco muy conocido especialmente por uso en la odontología.

Esta investigación contribuye a la ampliación de las aplicaciones de las películas de Quitosano con relación al ámbito farmacéutico. Estas películas biopoliméricas se elaboraron bajo determinadas condiciones de agitación y temperatura, utilizando concentraciones específicas de cada reactivo con el objetivo

de conferirles las características mecánicas esperadas para el uso del film como medio de transporte y sistema de liberación de la Clorhexidina. Para lograrlo, reuní evidencia científica que probara las nuevas interacciones y enlaces formados como consecuencia de la preparación y cargado de los films. Además, con la finalidad de demostrar el éxito de la liberación del fármaco recurrí a la realización de un ensayo de actividad biológica que a su vez pueda corroborar la actividad fungicida de la Clorhexidina frente a un hongo tan común como es la *Candida albicans*.

Dividí este trabajo en cuatro capítulos, el primero está dedicado principalmente a dar una introducción del tema a tratar, el segundo establece el marco teórico que sirve de base para la comprensión de la tesis, el tercer capítulo muestra el desarrollo del trabajo de investigación que incluye la parte experimental realizada en laboratorio, mientras que en el cuarto y último capítulo analizo y discuto los resultados obtenidos.

## CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN

La *Candida albicans* es un hongo que puede presentar hifas, forma parte de la flora gastrointestinal y se encuentra en las áreas mucosas del organismo anfitrión. Sin embargo, las colonias que forma pueden causar infecciones sistémicas bajo ciertas condiciones, en caso se encuentren en un ambiente adecuado otorgado por el huésped.

Por otro lado, la clorhexidina es un antiséptico utilizado en tratamientos pre y post operatorios, se puede hallar colutorios de este medicamento a determinadas concentraciones dependiendo de su aplicación. Además, este fármaco ha mostrado actividad frente a la *Candida albicans*, hecho por el cual se ha venido usando como antifúngico para combatir la candidiasis oral. Mientras que, el quitosano es un biopolímero con un amplio potencial para ser aplicado en la industria farmacéutica, principalmente porque resulta ser no tóxico para el cuerpo humano.

Considerando esto, se optó por preparar películas del biopolímero quitosano usando glicerina como plastificante y tripolifosfato de potasio como agente reticulante, a fin de obtener las propiedades mecánicas esperadas para utilizar el film como una matriz de fácil manipulación que, a su vez, permita el transporte del fármaco clorhexidina y su posterior liberación para mostrar que es posible su uso como parte del tratamiento contra la *Candida albicans*.

## **1.1. Descripción del problema**

La Candidiasis oral es una de las enfermedades micóticas más frecuentes, el hongo *Candida albicans* se presenta en más del 50% de la población pero en un determinado sector se muestra como patógeno (Tapia Castañeda, 2019). Al ser este hongo considerado de alta patogenicidad bajo determinadas condiciones (Küstner, 2003), es necesario buscar métodos efectivos para combatir la candidiasis ya que como se sabe, las enfermedades bucales pueden servir de entrada para causar otras enfermedades aún más severas.

En el contexto actual, se utiliza una amplia variedad de fármacos en el tratamiento de las enfermedades bucales más comunes. Esto como consecuencia del avance en la investigación impulsado por el mayor acceso a la tecnología. Entonces, si bien ya se cuentan con medicamentos que producen resultados efectivos en el tratamiento contra la *Candida albicans*, como es el caso de la Clorhexidina, también es importante ahondar en el estudio de nuevos sistemas de liberación que de alguna manera mejoren la aplicación del fármaco.

Por lo que refiere a la administración de la CLX, si bien esta depende principalmente de la presentación del fármaco (colutorio, gel, spray, crema) y de la etapa en la que se encuentre la enfermedad (tratamiento activo, tratamiento previo a una cirugía, tratamiento posterior a una cirugía, mantenimiento), es comúnmente utilizada en forma de colutorio en dosis de 10-15 mL a una concentración de 0.12-0.20% según lo requiera el tratamiento, aplicada dos veces al día durante un período controlado por un especialista (Dra. Torres, Dr. Alvarez, & Dra. Acosta, 2009). Es así que, prima la necesidad de encontrar nuevas formas de aplicación de CLX que

permitan incrementar los beneficios del fármaco y reducir los efectos adversos. Ya sea favoreciendo el tiempo de retención en la zona afectada, facilitando el modo de empleo, logrando un mayor control en la aplicación que permita focalizar la acción del fármaco en la zona afectada o disminuyendo la frecuencia de aplicación dado que su uso prolongado puede ocasionar efectos secundarios tales como, cambios en el sabor de los alimentos, pigmentación de la parte interna de la boca, entre otros. Cualquier progreso en estos aspectos del tratamiento usando CLX resultaría beneficioso para el paciente. En consecuencia, es preciso buscar nuevas formas para el transporte del fármaco Clorhexidina, ya conocido ampliamente por su uso en el plano odontológico, mediante el uso de un biopolímero como es el quitosano, tal que, al utilizarlo a manera de vehículo y sistema de liberación, se obtengan mejoras en su potencial aplicación en el tratamiento de la candidiasis oral.

## **1.2. Justificación**

En el campo de la medicina oral, se conoce la actividad bactericida y fungicida del fármaco Clorhexidina, hecho por el cual es uno de los antisépticos más empleados en odontología. En virtud de su acción rápida y duradera también es usado como antiséptico cutáneo y ha sido recomendado su uso tanto antes como después de los tratamientos periodontales (Küstner, 2003), así como también en tratamientos anticaries (Boutsiouki, Frankenberger, Lücker, & Krämer, 2019). Este fármaco se comercializa en distintas presentaciones como solución acuosa, solución alcohólica, con diversos excipientes, en pasta dentífrica, o en aerosol. Su uso como colutorio se presenta en una concentración del 0.20%, aunque también es eficaz al 0.12% ya que se ha encontrado que a esta concentración se logra disminuciones de hasta el 90% del

contenido bacteriano presente en la saliva (Küstner, 2003). Asimismo, diversos trabajos fomentan el uso de la clorhexidina contra la Candidiasis oral (Dellinger & Livingston, 2003; Scheibler et al., 2018; Shino et al., 2016).

Por otro lado, el Quitosano al ser un polímero natural muy abundante es de fácil obtención lo que disminuye su costo en comparación con otros biopolímeros. El CHT presenta actividad biológica, esto incluye capacidad antimicrobiana y antifúngica, pero también cabe mencionar sus propiedades biocompatibles, bioadhesivas, biodegradables y no tóxicas (Duttagupta, Jadhav, & Kadam, 2015). Además, este biopolímero puede cambiar sus propiedades fisicoquímicas con la adición de un agente reticulante como el Tripolifosfato de sodio que por medio de interacciones iónicas crea redes tridimensionales entrecruzadas favoreciendo la compactación de la matriz biopolimérica, aportando rigidez al film y afectando la difusión de las moléculas de agua (Wu et al., 2019). También, es posible modificar las características mecánicas del CHT con ayuda del plastificante Glicerina, que al incrementar la movilidad de las cadenas ocasiona el decremento de la resistencia a la tensión y da como resultado una película hidrofílica, más elástica y flexible (Lau, Kahar, & Yusrina, 2021). El CHT está siendo usado como excipiente farmacéutico, lo que le proporciona la capacidad de extender su aplicación a la liberación de fármacos.

Es así que, se pretende encontrar un medio de transporte y liberación de CLX empleando CHT como base para la elaboración de películas con las propiedades mecánicas adecuadas, aprovechar las características anti-*Candida* y la baja toxicidad del biopolímero y del fármaco, y utilizar las propiedades biocompatibles del quitosano como una ventaja para su funcionamiento como sistema de liberación.



### **1.3. Objetivos**

#### **1.3.1. Objetivo general**

Obtener películas de Quitosano con las características adecuadas para el cargado y liberación de la Clorhexidina y su aplicación potencial como un sistema con actividad fungicida.

#### **1.3.2. Objetivos específicos**

- Caracterizar el quitosano utilizado, determinando el grado de desacetilación y peso molecular del polímero.
- Preparar películas de Quitosano cargadas con Clorhexidina por el método casting, utilizando Tripolifosfato de sodio como entrecruzante y Glicerina como plastificante.
- Caracterizar las películas preparadas utilizando técnicas instrumentales como, FTIR, TGA, DSC y SEM.
- Determinar el modelo cinético correspondiente al grado de hinchamiento.
- Realizar un estudio detallado de liberación *in vitro* de Clorhexidina usando películas de quitosano cargadas y reticuladas con tripolifosfato de sodio como sistema de transporte.
- Determinar el modelo cinético más adecuado que explique el comportamiento de la Clorhexidina durante su liberación.
- Comprobar el poder de acción fungicida de la película de quitosano cargada con Clorhexidina contra la *Candida albicans*.

#### 1.4. Estado del arte

Diversos trabajos mencionan la acción de la clorhexidina frente el hongo *Candida albicans*. Un estudio muestra la eficacia de la actividad antimicrobiana de una solución de gluconato de clorhexidina (0.2 - 2%), esta se comparó con otros compuestos y resultó que el efecto fungicida creció conforme lo hizo su concentración, este análisis se llevó a cabo comparando los halos de inhibición obtenidos (M. Singh et al., 2019). Por otro lado, se encontró que el gluconato de clorhexidina presenta superior efectividad anti *Candida albicans* en comparación con el uso nanopartículas de plata a manera de enjuague bucal, por lo que fue usado como control (Panpaliya et al., 2019). También se ha utilizado diacetato de clorhexidina cargado en una resina (polimetil metacrilato), se examinó la actividad antifúngica mediante un ensayo de difusión en agar quedando evidenciado su efecto fungicida con la formación de halos de inhibición como consecuencia de la liberación del fármaco (Maluf et al., 2020). Incluso se han encontrado resultados favorables de la acción de una solución de clorhexidina contra especies de *Candida albicans* aisladas a partir de las membranas mucosas de un grupo de pacientes, donde se evaluó a su vez, la concentración mínima inhibitoria (MIC) y la concentración mínima fungicida (MFC) demostrando así su fuerte actividad fungicida (Biernasiuk, Szymba-Ska, Kustra, Korona-Główniak, & Malm, 2018). Una investigación mostró que el gluconato de clorhexidina al 2% en combinación con hidróxido de calcio, presenta mayor actividad antimicrobiana en comparación con la obtenida por la matriz polimérica y el hidróxido de calcio, dicha diferencia en efectividad quedó establecida gracias a un test de difusión en agar conteniendo *C. albicans* (Balan & Krishna, 2018).

Además, determinados trabajos han mostrado resultados satisfactorios frente a la *Candida albicans* que incluyen el uso del quitosano, como el ensayo microbiológico comparativo que mostró que el quitosano al 0.5% mezclado con metilcelulosa tiene una eficacia antimicrobiana similar a la de la clorhexidina al 2% determinada por las zonas de inhibición formadas en agar (Ramachandran, 2021). Otro estudio exhibe la relación del grado de acción anti-*Candida* con la concentración de la clorhexidina, para esto se compararon geles de quitosano 5% con clorhexidina a distintas concentraciones (0.2%, 0.6%, 1% y 2%) con geles de clorhexidina (0.2%, y 2%) (Kloster et al., 2018). Un trabajo posterior, implicó la formación de nanopartículas de óxido de hierro y quitosano cargadas con el fármaco clorhexidina, en esta ocasión se comparó la eficacia contra la formación de biofilms de *Candida albicans*, dando como resultado efectos similares con respecto a la clorhexidina pura. Mientras que, los resultados del MIC indicaron que el fármaco CLX es el principal responsable de la inhibición del hongo (Vieira et al., 2019).

Finalmente, estas investigaciones previas forman la base para la determinación de los criterios a considerar para la realización del presente trabajo. Dada la evidencia de la acción anti-*C. albicans* tanto por parte de la clorhexidina como del quitosano, ambos utilizados principalmente por separado o empleando este fármaco a manera de control, se optó por elaborar películas del biopolímero cargadas con CLX a un porcentaje comercial como es 0.12% a fin de evaluar los efectos beneficiosos que se pueden obtener en comparación con el fármaco utilizado por sí mismo. Además de corroborar la eficacia de la liberación de CLX a partir de la matriz biopolimérica.

## CAPÍTULO 2. MARCO TEÓRICO

### 2.1. Candida albicans

La *Candida* pertenece al reino Fungi y cuenta con 150 especies aproximadamente, que se pueden encontrar en diversos ambientes, tales como, aire, suelo, agua, plantas y animales, pero solo un pequeño grupo tiene la capacidad de colonizarse y ser patógenas. La *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis*, *Candida krusei*, y *Candida dubliniensis* son las especies más comunes que se pueden asociar a enfermedades en humanos (Muadcheingka & Tantivitayakul, 2015).

El hongo *Candida albicans* se puede encontrar en el bioma humano y generalmente su presencia en los organismos de los individuos es inofensiva. Sin embargo, bajo determinadas circunstancias es capaz de causar infecciones superficiales y sistémicas (Mayer, Wilson, & Hube, 2013). La *Candida* reside principalmente en membranas mucosas del cuerpo humano tales como los oídos, los ojos, el tracto gastrointestinal, la boca, la nariz, los órganos reproductores y la piel. También se le considera como parte de la “flora beneficiosa” del organismo, esto mientras no se genere un desbalance que conlleve a un crecimiento excesivo de este hongo (A. Singh, Verma, Murari, & Agrawal, 2014).

Las especies de *Candida* tienen la capacidad de metabolizar la glucosa tanto bajo condiciones aerobias como anaerobias. La temperatura afecta su crecimiento, es así que en presencia de una temperatura relativamente elevada como 37 °C, que generalmente es la temperatura corporal de su anfitrión potencial, promueve el crecimiento de pseudohifas en su estructura celular favoreciendo de esta forma su proliferación (A. Singh et al., 2014).

En medios bucales, la *Candida albicans* manifiesta características críticas de virulencia oral tales como la adhesión y la capacidad de formar biofilm en la superficie de los dientes, por lo que este hongo también juega un papel importante en el proceso de formación de caries (Palareti et al., 2016). Asimismo, la *Candida albicans* se caracteriza por su transición morfológica entre levaduras y formas hifales, la presencia de la invasina en la superficie celular y por la secreción de enzimas hidrolíticas (Mayer et al., 2013).

### **2.1.1. Candidiasis oral**

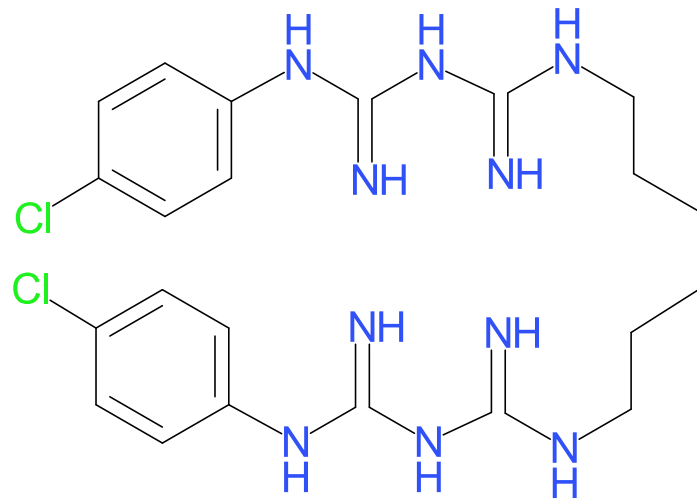
La Candidiasis oral es una enfermedad frecuente causada principalmente por la proliferación del hongo *Candida albicans*. Es una infección superficial de la cavidad oral y la gente de avanzada edad, los pacientes inmunocomprometidos y los usuarios de dentaduras son más propensos a adquirirla, pero usualmente es evitable manteniendo una correcta higiene bucal (Dellinger & Livingston, 2003). Se considera como una fuente significativa de morbilidad, entre sus síntomas más comunes está el dolor crónico o incomodidad al masticar limitando así la correcta nutrición en el individuo (Patil, Rao, Majumdar, & Anil, 2015). La naturaleza comensal de la *Candida albicans* supone que gran parte de las formas de candidiasis oral tienen un origen

endógeno, razón por la cual su erradicación del organismo del humano anfitrión por terapia antifúngica es difícil (Sweet, 1997). Sin embargo, ciertos factores tienen un rol determinante en la transformación de la *Candida* de comensal a patógena, entre estos está la formación de hifas, la secreción de proteasas, la adherencia, y el cambio fenotípico (Samaranayake, 1992). El tratamiento de la candidiasis oral sobre todo se basa en cuatro fundamentos: hacer un diagnóstico temprano y preciso, corregir los factores predisponentes o enfermedades subyacentes, evaluar el tipo de infección a tratar, y usar acertadamente los medicamentos antimicóticos (García-Cuesta, Sarrion-Pérez, & Bagán, 2014).

## **2.2. Clorhexidina**

### **2.2.1. Estructura química**

La molécula de la Clorhexidina está conformada por dos estructuras simétricas que incluye dos anillos 4-clorofenilo y dos grupos biguanidas conectados por una cadena central de hexametileno (Greenstein, Berman, & Jaffin, 1986). El fármaco CLX es una molécula con comportamiento catiónico y debe su actividad biológica a los átomos de cloro ubicados en ambos anillos fenólicos. Su nombre químico es 1,1'-hexametileno bis(5-[4-clorofenil]biguanida) y su fórmula condensada es  $C_{22}H_{30}Cl_2N_{10}$  (Karpíński & Szkaradkiewicz, 2015).



**Figura 1.** *Fórmula estructural de la Clorhexidina.*

### **2.2.2. Propiedades de la clorhexidina**

Al ser la clorhexidina una biguanida catiónica, su superficie positiva es capaz de unirse a superficies cargadas negativamente como lo son los dientes, tejidos blandos y bacterias. Asimismo, es capaz de unirse a la hidroxiapatita del esmalte y también a las proteínas salivales impidiendo de esta forma la colonización bacteriana, lo que se conoce como sustantividad (Rueda, 2017). Además, dado que la CLX es una molécula hidrofóbica y lipofílica cargada positivamente puede interactuar con fosfolípidos y lipopolisacáridos presentes en la membrana celular de las bacterias y de esta manera logra ingresar a la célula a través de alguna clase de mecanismo de transporte ya sea activo o pasivo (Dynes et al., 2006).

Este fármaco se caracteriza por ser poco soluble en agua, mientras que sus sales diacetato de clorhexidina, digluconato de clorhexidina y clorhidrato de clorhexidina, por el contrario, son solubles en agua (Karpiński & Szkaradkiewicz, 2015).

### **2.2.3. Aplicación como agente para tratamiento bucal**

En odontología, la clorhexidina se usa principalmente como enjuague bucal (colutorio), también se emplea en irrigaciones orales (Karpiński & Szkaradkiewicz, 2015). Además, es posible utilizarla tanto antes, durante y después de una cirugía oral, en implantología, durante la higiene de las prótesis dentales, así como durante el tratamiento de enfermedades periodontales (Dra. Torres et al., 2009). Se conoce que la clorhexidina es útil contra la gingivitis, ayuda con la prevención de caries y en tratamientos endodónticos. A su vez, muestra actividad contra bacterias grampositivas, gramnegativas, levaduras y virus. La clorhexidina previene el desarrollo de infecciones causadas por *Candida albicans* y se ha observado que afecta su patogenicidad ya que impide la filamentación del hongo, y es probable que esto conlleve a la inhibición de algunas enzimas (Dra. Torres et al., 2009). Por sus características químicas, al presentar en su estructura biguanidas catiónicas, este fármaco distorsiona las paredes celulares ocasionando cambios en la superficie celular de las bacterias.

## **2.3. Quitosano**

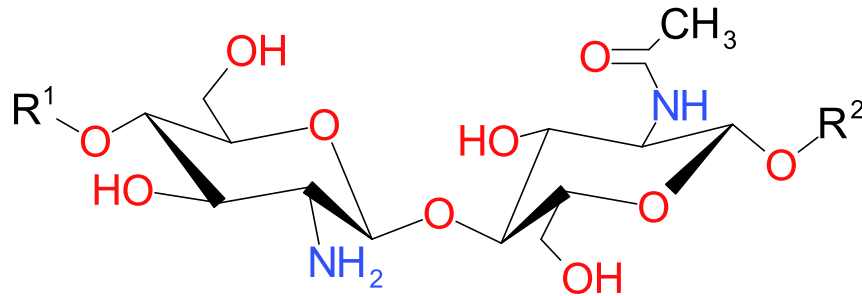
### **2.3.1. Estructura química**

La estructura química ideal del quitosano está comprendida por 2-amino-2-deoxi- $\beta$ -D-glucopiranososa y una forma desacetilada llamada D-glucosamina. Sin embargo, este polímero está constituido por monómeros de D-glucosamina y N-acetil-D-glucosamina (2-acetamido-2-deoxi- $\beta$ -D-glucopiranososa). Es así que ambas formas de la D-glucosamina (acetilada y desacetilada) están distribuidas aleatoriamente en la cadena polimérica (Dutttagupta et al., 2015). Este poliaminosacárido catiónico es obtenido por la desacetilación alcalina del polímero quitina y se caracteriza por la



presencia de un gran número de grupos amino en su cadena (Ahmed & Aljaeid, 2016).

La estructura química del quitosano se muestra en la Figura 2.



**Figura 2.** *Fórmula estructural del Quitosano.*

### 2.3.2. Propiedades del quitosano

Entre sus propiedades más resaltantes destaca que el biopolímero quitosano es escasamente soluble en agua, prácticamente insoluble en etanol (95%) y otros solventes orgánicos con un pH por encima de 6.5. Sin embargo, en presencia de un pH ácido, los grupos amino del CHT se protonan y esto se manifiesta en un incremento de su solubilidad, en consecuencia el polímero cargado adquiere un alto grado de densidad de carga positiva en su estructura (Duttagupta et al., 2015).

El quitosano es considerado como un vehículo útil para el transporte de fármacos debido a su carácter mucoadhesivo, y a que su superficie debido a que está cargada positivamente es capaz de interactuar con la superficie dental que a su vez está cargada negativamente (Chronopoulou et al., 2016), esta propiedad se debe principalmente a una interacción iónica pero también puede deberse a fuerzas intermoleculares como el puente de hidrógeno (Duttagupta et al., 2015). Su uso incrementa la capacidad de absorción de fármacos polares ya que favorece la

permeabilidad. Esto también se atribuye a que interacciona con la carga negativa de la membrana celular resultando en una apertura transitoria de esta o en un reordenamiento de las uniones presentes en las proteínas (Schipper et al., 1999).

### **2.3.3. Aplicación como sistema de liberación**

Debido a su baja toxicidad, biocompatibilidad y biodegradación, el quitosano es considerado para modular la liberación de fármacos en tratamientos como la terapia de cáncer (Dhanikula & Panchagnula, 2004), o su uso con un antibiótico para tratar infecciones oculares (Silva et al., 2017). Este biopolímero tiene un impacto favorable en el proceso de liberación sostenida de fármaco en la cavidad oral, con un prolongado tiempo de residencia en el lugar de aplicación, esto a consecuencia de las interacciones formadas con las superficies cargadas negativamente (Juliano, Cossu, Pigozzi, Rassu, & Giunchedi, 2008). De la misma manera, este material tiene la capacidad de reducir la liberación brusca inicial del fármaco (Sedghi, Shaabani, Mohammadi, Samadi, & Isaei, 2017) lo que sería favorable ya que mejoraría el control durante la etapa de liberación.

### **2.3.4. Caracterización del quitosano**

#### **2.3.4.1. Grado de desacetilación por valoración conductimétrica**

Las propiedades fisicoquímicas del quitosano están estrechamente relacionadas con el grado de desacetilación del polímero, por lo tanto, determinar el grado de desacetilación (GD) es de suma importancia para caracterizar el CHT, ya que está vinculado a su solubilidad y reactividad, así como a su peso molecular (Lago et al., 2011). El grado de desacetilación es un parámetro que tiene influencia en las propiedades mecánicas y biológicas del biopolímero debido a que la cantidad de

grupos amino presentes que pueden interactuar con superficies cargadas negativamente se ve afectada directamente con la desacetilación de la quitina, a mayor grado de desacetilación le corresponde una mayor cantidad de grupos amino disponibles.

El grado de desacetilación del quitosano es determinante en lo referente a la degradación, a mayor grado de desacetilación la degradación del film ocurre con menor rapidez, mientras que los grados de desacetilación más bajos muestran un comportamiento opuesto (Dhanikula & Panchagnula, 2004). Además, también tiene influencia en la densidad de carga lineal presente a lo largo de la cadena polimérica, esta se incrementa conforme lo hace el grado de desacetilación.

Una de las maneras para hallar el GD es por medio de la espectroscopía IR, y para lo que se recurre al uso de films para un análisis directo o también puede lograrse mediante la preparación de discos de bromuro de potasio (KBr). Posteriormente, se utiliza la razón de absorción  $A_{1655}/A_{3450}$ , donde la banda a  $1655\text{ cm}^{-1}$  corresponde a la Amida I que mide el contenido del grupo N-acetilo, mientras que la banda ubicada a  $3450\text{ cm}^{-1}$  corresponde al grupo O-H (Lago et al., 2011). Sin embargo, el método escogido para la determinación del grado de desacetilación fue el uso de la valoración ácido-base usando la técnica conductimétrica, donde, para determinar el grado de desacetilación de la muestra de quitosano primero es necesario hallar el número de moles de los grupos amino pertenecientes al biopolímero que fueron neutralizados durante la titulación. El número de moles de NaOH es equivalente al número de moles de los grupos amino que se calcula como sigue (M. J. C. Salazar, 2015; Varan, 2017):

$$n_{NH_2} = M_{NaOH} x V_{2-1} \quad (1)$$

Donde,

$n_{NH_2}$ : Número de moles de grupos amino

$M_{NaOH}$ : Molaridad de la solución de Hidróxido de Sodio estandarizada (mol/L)

$V_{2-1}$ : Diferencia de volumen entre los puntos de inflexión (L)

Es así que el grado de desacetilación se calcula con la siguiente ecuación:

$$GD (\%) = \left( \frac{n_{NH_2} \times M_w}{m} \right) \times 100 \quad (2)$$

Donde,

GD (%): Grado de Desacetilación (%)

$M_w$ : Masa molar de la unidad de quitosano repetida = 161.16 (g/mol)

$m$ : Masa de la muestra de quitosano (g)

#### **2.3.4.2. Peso molecular por viscosimetría**

La viscosidad es una de las propiedades más importantes de una solución polimérica ya que depende de la propia estructura química del polímero, así como de su interacción con el disolvente presente en el medio. Dado que la viscosidad depende principalmente del peso molecular del polímero y de su grado de desacetilación, la viscosimetría es un método ampliamente usado para caracterizar quitosano debido a su sencillez para determinar el peso molecular de la macromolécula.

De acuerdo a la ecuación de Mark Houwink Sakurada, el peso molecular de un polímero está relacionado a la denominada viscosidad intrínseca  $[\eta]$  de su solución polimérica (Lago et al., 2011), como sigue:

$$[\eta] = KM^a \quad (3)$$

Donde,

$M$ : Peso molecular medio

$K$  y  $a$ : constantes empíricas

Dichas constantes están vinculadas a la relación soluto-solvente y temperatura en la solución polimérica. Para determinarlas se requieren series de datos de distintos polímeros con pesos moleculares conocidos, los valores obtenidos para  $K$  y  $a$  dependen del solvente, el pH, el grado de desacetilación, la fuerza iónica y la temperatura, estos son válidos para un cierto rango de pesos moleculares. Para los fines previstos, los valores para las constantes  $K$  y  $a$  fueron  $0.157 \times 10^{-5}$  dL/g y 1.091 (Kasaai, 2007; Wang, Bo, Li, & Qin, 1991), respectivamente, utilizando acetato de sodio 0.1 M y ácido acético 0.2 M a una temperatura de 30 °C. Para hallar la viscosidad intrínseca, es necesario determinar las viscosidades asociadas a las soluciones poliméricas: viscosidad relativa ( $\eta_{rel}$ ), viscosidad específica ( $\eta_{sp}$ ), viscosidad reducida ( $\eta_{red}$ ) y viscosidad inherente ( $\eta_{inh}$ ). Para el cálculo se utilizaron las siguientes ecuaciones (Czechowska-Biskup, Wach, Rosiak, & Ulański, 2018; Vijayasri & Tiwari, 2019):

$$\eta_{rel} = \frac{t}{t_s} \quad (4)$$

$$\eta_{sp} = \eta_{rel} - 1 \quad (5)$$

$$\eta_{red} = \frac{\eta_{sp}}{c} \quad (6)$$

$$\eta_{inh} = \frac{\ln(\eta_{rel})}{c} \quad (7)$$

Donde,

t: Tiempo de flujo de la solución de quitosano (s)

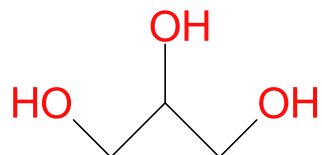
t<sub>s</sub>: Tiempo de flujo del solvente utilizado (s)

c: Concentración del quitosano (g/100 mL)

## 2.4. Glicerina

### 2.4.1. Estructura química

La glicerina con fórmula química C<sub>3</sub>H<sub>8</sub>O<sub>3</sub> (ver Figura 3), muestra una estructura con múltiples grupos hidroxilo, este hecho le proporciona pares de electrones disponibles para vincularse por interacción iónica (Aziz et al., 2020) y a su vez explican su carácter hidrofílico, este también puede favorecer la solubilidad (Ortega, 2017). La glicerina es un compuesto polar, que se mezcla fácilmente con el quitosano debido a la afinidad estructural existente, en contacto con el quitosano forma puentes de hidrógeno.



**Figura 3.** *Fórmula estructural de la Glicerina.*

## **2.4.2. Aplicación como agente plastificante**

La amplia aplicación de la glicerina como plastificante se debe principalmente a que es un compuesto no tóxico, biocompatible y biodegradable (Caroni et al., 2021). Sin embargo, cabe mencionar que el comportamiento de las películas de quitosano depende no solo de la proporción de este plastificante utilizado para su elaboración, sino también de la naturaleza química de este.

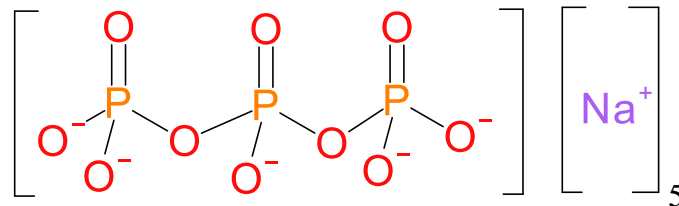
Los films preparados con un determinado porcentaje de glicerina presentan variaciones en las propiedades fisicoquímicas de la película polimérica formada ya que sus moléculas al ser pequeñas en tamaño penetran el polímero debilitando así la interacción entre sus cadenas, lo que se manifiesta con un cambio de propiedades mecánicas (Priyadarshi, Sauraj, Kumar, & Negi, 2018). La adición de este plastificante facilita el movimiento de la película polimérica y también hace que la película sea menos quebradiza, favoreciendo la manipulación del film (Syaubari, Safwani, & Riza, 2018). Como era de esperarse, el uso de la glicerina en la preparación de películas resulta en un film más hidrofílico, es decir se incrementa así su afinidad por el agua (X. Ma, Qiao, Wang, Yao, & Xu, 2019). El uso de la glicerina también favorece la flexibilidad y elasticidad del film preparado. Asimismo, incrementa su resistencia a la tracción y al alargamiento (Lau et al., 2021).

## **2.5. Tripolifosfato de sodio**

### **2.5.1. Estructura química**

Este polianión, presenta iones cargados negativamente y es comúnmente utilizado debido a su baja toxicidad, biocompatibilidad y biodegradabilidad. Dado que

su estructura cuenta con múltiples puntos con densidad de carga negativa, se facilita su interacción con otros compuestos, en consecuencia, esto modifica las propiedades fisicoquímicas del compuesto formado.



**Figura 4.** *Fórmula estructural del Tripolifosfato de Sodio.*

### 2.5.2. Aplicación como agente entrecruzante

El tripolifosfato de sodio (TPP) es utilizado frecuentemente como entrecruzante debido a su no toxicidad y a su facilidad para interactuar con el quitosano. Este polianión al entrar en contacto con el quitosano, produce cambios en las interacciones electrostáticas del polímero, provocando a su vez variación en ciertas propiedades de la película preparada, como la viscosidad, el hinchamiento y la resistencia a la tensión.

La carga negativa del TPP puede interactuar con el polímero mediante fuerzas electrostáticas con los grupos amino del quitosano que están cargados positivamente y de esta forma crear redes entrecruzadas con características fisicoquímicas que dependen tanto de la concentración del entrecruzante como del tiempo de exposición a este (Shafiei, Jafarizadeh-Malmiri, & Rezaei, 2019). Las interacciones producto del proceso de reticulado pueden favorecer la prolongación del tiempo de liberación de un fármaco cargado, dado que al haber más enlaces en el polímero se reducen las cavidades intermoleculares (poros) y así el medio ácido ya no



puede penetrar tan fácilmente, ni protonar el polímero lo que provoca el hinchamiento y en consecuencia estimula la liberación del fármaco (Pemula, 2017).

## **2.6. Películas de quitosano: Caracterización**

### **2.6.1. Técnicas instrumentales para la caracterización de las películas**

#### **2.6.1.1. Espectroscopía infrarroja (FTIR)**

La espectroscopía infrarroja es comúnmente usada debido a su simplicidad, rapidez de resultados, pero principalmente a su fácil aplicación dado que no requiere una elevada manipulación de las muestras, como destruirlas para llevar a cabo el análisis, ni disolverlas en soluciones acuosas. Esta técnica permite la identificación del polímero mediante una comparación de espectros de bandas y picos relativos a los grupos funcionales presentes en la matriz. El principio se basa en la absorción de energía por parte de las moléculas a longitudes de onda definidas que forman un espectro vibracional característico de cada muestra.

Mediante el uso de este método de caracterización es posible confirmar la formación de los nuevos enlaces entre el biopolímero, el fármaco e incluso la variación en las fuerzas electrostáticas producidas como consecuencia del entrecruzamiento. Además, esta metodología de caracterización permite observar la variación en el comportamiento de la película de quitosano preparada al agregar el plastificante.

#### **2.6.1.2. Análisis termogravimétrico (TGA)**

Este análisis es utilizado para evaluar la estabilidad térmica de las películas de quitosano, consiste en medir el peso del polímero a lo largo del tiempo durante el cual es sometido a un programa de temperatura. Los resultados obtenidos del

comportamiento térmico se pueden comparar con gráficas usuales de la matriz polimérica en estudio, de esta forma, se identifica la temperatura que corresponde a la pérdida de humedad absorbida y se distingue del paso de la degradación oxidativa, para lo que se recurre a la gravimetría mediante la evaluación de los cambios en peso del polímero inicial conforme se incrementa la temperatura.

La selección de la atmósfera a la cual se lleva a cabo el estudio térmico, puede influir en la formación de nuevos compuestos que permanecerían como productos finales de la reacción. Su elección es determinante y depende de lo que se desea obtener del estudio dado que permite detectar procesos que involucren variación en el peso, como la descomposición, sublimación, absorción, desorción, contenido de humedad, etc.

Entre los gases más usados están  $N_2$ , aire, Ar, He y  $CO_2$ , y se clasifican según la atmósfera que generan, esta puede ser inerte, oxidante, reductora, corrosiva o autogenerada. La Atmósfera inerte como Ar o  $N_2$  se utiliza para evitar la oxidación dado que estos gases no interfieren con la muestra durante el tratamiento térmico. En cambio, al usar atmósfera de  $O_2$  o aire para una muestra carbonosa no quedaría carbón remanente porque este al quemarse produce CO y  $CO_2$ , lo que se refleja en una variación de masa.

#### **2.6.1.3. Calorimetría diferencial de barrido (DSC)**

En este caso lo que se mide es el cambio de calor asociado a la desnaturalización del polímero, por lo que esta técnica permite conocer cómo cambian las propiedades físicas de una muestra, es decir, determina el flujo de calor relacionado a determinadas transiciones del material en estudio en función de la temperatura y el

tiempo. También se pueden determinar las características térmicas de las películas biopoliméricas preparadas, esto es posible analizando la temperatura de transición vítrea. Dicha temperatura en el caso de las películas de quitosano puede verse afectada por ciertas características propias de las moléculas, como son el grado de desacetilación y el peso molecular, por las condiciones de preparación utilizadas tales como la concentración del biopolímero y el pH del solvente utilizado para la disolución (X. Ma, Qiao, Zhang, & Xu, 2018).

La Calorimetría Diferencial de Barrido también brinda información acerca de distintas transiciones ocurridas en el polímero, como la cristalización, la fusión, la descomposición o cambio en la capacidad calorífica, la interacción entre diferentes compuestos, así como además es útil para evaluar el estado fisicoquímico del fármaco cargado (Auda, Mahrous, Ibrahim, Shazly, & Salem-Bekhit, 2017).

#### **2.6.1.4. Microscopía electrónica de barrido (SEM)**

La Microscopia Electrónica de Barrido es una de las técnicas de caracterización de materiales que nos permite estudiar la morfología de las muestras, esto se logra al hacer incidir un haz de electrones sobre la superficie escogida, es decir, se genera la imagen deseada a partir de la interacción de los electrones con la superficie de la muestra. Esta técnica hace posible visualizar las características superficiales de las películas preparadas y así observar las diferencias físicas en su microestructura que se producen como consecuencia de la reticulación o del cargado.

La microscopía electrónica de barrido se utiliza comúnmente para estudiar los detalles estructurales del biopolímero CHT. La técnica SEM hace posible evaluar la morfología superficial del film preparado mediante la comparación de las diferencias

halladas entre imágenes en relación a las variaciones realizadas en la preparación (volumen de preparación, concentración del entrecruzante, tiempo de entrecruzamiento, etc.) así confirmar la correcta incorporación de CLX y su efecto en la estructura, para lo cual se utiliza un film sin fármaco a manera de blanco control.

#### **2.6.1.5. Espectrofotometría UV-Visible**

Esta técnica de análisis permite determinar de manera cuantitativa componentes que absorben radiación en el rango UV-Visible por medio de la medición de la energía absorbida y transmitida por la muestra a determinadas longitudes de onda en comparación con una muestra de referencia también llamada blanco que usualmente es el disolvente utilizado. Posteriormente mediante la relación existente entre las absorbancias obtenidas a una determinada longitud de onda máxima y la concentración, se cumple la ley de Lambert-Beer, así es posible determinar la concentración del fármaco en solución, por lo que es usada en el estudio de la liberación de CLX a partir de las películas de quitosano cargadas y reticuladas.

El biopolímero es transparente en el rango UV, es decir, preparado por sí mismo en la solución de ácido acético no presenta picos evidentes de absorción en el rango de 200-400 nm (G. Ma, Qian, Yang, Hu, & Nie, 2010). Sin embargo, debido a que el fármaco en estudio sí posee picos relevantes en esta parte del rango UV, esto permite una fácil identificación y cuantificación del fármaco CLX presente en la película de polímero preparada. Es decir, esta técnica permite hallar la concentración del medicamento en la solución supernadante resultante de la liberación. Es así que el contenido de clorhexidina se puede cuantificar en tiempos determinados manteniendo la temperatura controlada a lo largo de la liberación.

Finalmente, para definir la longitud de onda más adecuada para medir la concentración de CLX liberada por cada film se recurre al barrido espectral de un estándar del fármaco en concentración conocida, una vez determinada la longitud de onda óptima de la banda de mejor absorción o la más representativa, esta se utiliza para leer cada punto preparado para establecer la curva de calibración y posteriormente dar lectura a las muestras. La longitud de onda correspondiente a la máxima absorción de fármaco se determinó mediante la realización de barridos espectrales de 200 a 400 nm, siendo el pico ubicado a 256 nm el escogido como principal para la lectura de la concentración de CLX liberado por las películas de CHT.

### **2.6.2. Estudio del grado de hinchamiento**

Un factor relevante para la liberación del fármaco presente en el film biopolimérico es la hidratación de la matriz, en este contexto las interacciones iónicas ocasionadas por el entrecruzante utilizado son propias de la preparación particular de cada película dado que el entrecruzamiento modifica las propiedades mecánicas del film y dependen de la concentración del reticulante y tiempo de reticulación escogidos. Para estudiar el grado de hinchamiento se recurre al método gravimétrico y el pH del medio es determinante dadas las interacciones electrostáticas presentes debido al entrecruzamiento del CHT con TPP (M. C. Salazar & Negrón, 2013; Rodr, Negr, & Alarc, 2010). Se considera el peso inicial seco de una película de área conocida y el peso de la película hinchada después de un tiempo determinado de inmersión en solución de buffer fosfato salino (Pavoni, dos Santos, May, Pollo, & Tessaro, 2021). El grado de fluido captado por la película polimérica durante un tiempo determinado de inmersión en el medio se calcula como el grado de hinchamiento (Juliano et al., 2008; Rogério dos Santos Alves, Alex Soares de Souza, 2014):

$$W = \frac{(m_t - m_0)}{m_t} \times 100 \quad (8)$$

Donde,

$W$ : Grado de hinchamiento

$m_t$ : Peso de la muestra en el tiempo  $t$

$m_0$ : Peso inicial de la muestra

Posteriormente, es necesario determinar el orden de la cinética de hinchamiento que siguen los films de CHT bajo condiciones variadas para establecer el comportamiento de la matriz polimérica. Se tienen las siguientes ecuaciones (Povea et al., 2008; Rogério dos Santos Alves; Alex Soares de Souza, 2014):

a) Primer Orden

$$\frac{dW}{dt} = K(W_\infty - W) \quad (9)$$

$$\ln\left(\frac{W_\infty}{W_\infty - W}\right) = Kt \quad (10)$$

b) Segundo Orden

$$\frac{dW}{dt} = K(W_\infty - W)^2 \quad (11)$$

$$\frac{t}{W} = \frac{t}{W_\infty} + \frac{1}{KW_\infty^2} \quad (12)$$

Donde,

$dW/dt$ : Velocidad de hinchamiento

$W_\infty$ : Mayor grado de hinchamiento en el equilibrio termodinámico

*W*: Grado de hinchamiento

*K*: Constante de velocidad de hinchamiento

De la cinética tenemos que, cuando la zona interna del polímero interactúa con el medio acuoso se produce el hinchamiento producto de la protonación del polímero y también debido a la flexibilidad de las cadenas de la red polimérica. En la zona intermedia, el medio acuoso debe solubilizar el fármaco para que se lleve a cabo la difusión de CLX hacia el exterior y esto ocurre de manera simultánea al hinchamiento. Mientras que, en la zona externa el fármaco se disuelve en el medio y se expulsa provocando la erosión del polímero (Pemula, 2017).

### **2.6.3. Estudio de liberación de la clorhexidina**

El quitosano ya ha sido utilizado como transportador de distintos fármacos dado que puede presentarse en variadas formas, tales como films, nanopartículas, microesferas, cápsulas, entre otros. Este polímero se presta para su aplicación en la liberación de medicamentos, debido a sus propiedades intrínsecas tiene la capacidad de formar películas que cuenten con características adecuadas para ser usadas como un portador en sistemas de liberación tanto de moléculas de poco tamaño como de macromoléculas (Ali & Ahmed, 2018).

Asimismo, para modificar las propiedades fisicoquímicas del film biopolimérico, favorecer su capacidad transportadora y facilitar su aplicación, es posible recurrir al uso de entrecruzantes y/o plastificantes no tóxicos con la finalidad de que estos produzcan cambios en su estructura final, y en consecuencia les confieran propiedades distintas a las iniciales que sean más favorables según la aplicación esperada. Es así que, es de suma importancia analizar los cambios ocurridos en la

liberación de la clorhexidina frente a las variaciones realizadas tanto en la preparación de las películas como durante la etapa misma de liberación, es decir, las variaciones de las condiciones de liberación del medicamento. De esta manera, en base a la información experimental obtenida, es posible conseguir películas que se adecúen mejor a los propósitos establecidos previamente y también nos permitan determinar el modelo cinético que mejor explique el comportamiento del fármaco durante su proceso de liberación.

### **2.6.3.1. Modelos matemáticos para la liberación del fármaco clorhexidina**

Existen diversos modelos matemáticos orientados a explicar el comportamiento de liberación de fármacos a partir de sistemas biopoliméricos. A fin de estudiar el mecanismo de liberación de la clorhexidina a partir de películas de quitosano, se tomaron datos de la liberación *in vitro* haciendo variar diferentes condiciones de preparación de los films (volumen de preparación, concentración del reticulante y temperatura del medio) y dichos datos obtenidos se graficaron y se ajustaron a cuatro modelos matemáticos: Orden cero, Primer orden, Higuchi y Korsmeyer-Peppas. Estos modelos están expresados con las siguientes ecuaciones matemáticas.

#### a. Modelo cinético de orden cero

$$Q_t = Q_0 + k_0 * t \quad (13)$$

Donde,

$Q_t$ : Cantidad de fármaco en un tiempo  $t$

$Q_0$ : Cantidad inicial de fármaco

$k_0$ : Constante de proporcionalidad



b. Modelo cinético de primer orden

$$Q_t = Q_0 * e^{-k_1 * t} \quad (14)$$

$$\text{Ln } Q_t = \text{Ln } Q_0 - k_1 * t \quad (15)$$

Donde,

$Q_t$ : Cantidad de fármaco en un tiempo  $t$

$Q_0$ : Cantidad inicial de fármaco

$k_1$ : Constante de liberación de primer orden

c. Modelo cinético de Higuchi:

$$Q_t = k_H * t^{\frac{1}{2}} \quad (16)$$

Donde,

$Q_t$ : Cantidad acumulada de fármaco liberado en un tiempo  $t$

$k_H$ : Constante de Higuchi.

d. Modelo cinético de Korsmeyer-Peppas:

$$Q_t = k_{KP} * t^n \quad (17)$$

$$\text{Log } Q_t = \text{Log } k_{KP} + n \text{Log } t \quad (18)$$

Donde,

$Q_t$ : Cantidad acumulada de fármaco liberado en un tiempo  $t$

$k_{KP}$ : Constante incorporando las características geométricas y estructurales del aparato de liberación

$n$ : Exponente de liberación que se relaciona al mecanismo de liberación de fármaco como se indica en la Tabla 1.

**Tabla 1.** Exponente de liberación  $n$  de la ecuación Korsmeyer-Peppas (Rosu & Bratu, 2014; Dash, Murthy, Nath, & Chowdhury, 2010; Aycan, Yayla, & Aydin, 2020).

Exponente $n$ de liberación	Mecanismo de transporte de fármaco	Liberación controlada por:	Tasa en función de $t$
$n \leq 0.5$	Difusión Fickiana	Difusión	$t^{0.5}$
$0.5 < n < 1$	Transporte No-Fickiano (anómalo)	Difusión, erosión y relajación	$t^{n-1}$
$n = 1$	Transporte Caso II	Hinchamiento, relajación	Liberación orden cero
$n > 1$	Super transporte Caso II	Relajación de las paredes poliméricas	$t^{n-1}$

Los mecanismos que rigen la liberación de fármacos a partir de matrices poliméricas hidrofílicas son: la relajación, la difusión, la erosión y el hinchamiento de las cadenas poliméricas. Es decir, simultáneamente ocurren la absorción del agua y la desorción del fármaco. Cuando la relajación de las cadenas poliméricas supera por mucho la penetración del agua y el valor de  $n$  queda muy por debajo de 0.5, se considera que el comportamiento continúa siendo Fickiano pero también se le llama menos Fickiano (Ganji, Vasheghani-Farahani, & Vasheghani-Farahani, 2010). Un modelo de liberación cinética de tipo Fickiano es aquel cuya liberación está controlada netamente por la difusión obteniéndose  $n$  igual a 0.5. En el tipo no-Fickiano o transporte anómalo, la relación de transporte engloba, además de la difusión y relajación, contribuciones producto del hinchamiento y también de los mecanismos de erosión (Aycan et al., 2020). Sin embargo, cuando la contribución por hinchamiento predomina sobre la difusión, el modelo de liberación se alinea a la cinética de orden cero y da un valor de  $n$  igual a 1, es decir, es independiente del tiempo (Rosu & Bratu, 2014). Mientras que por otro lado, cuando los valores de  $n$  son mayores a 1, la

liberación está controlada por la relajación de las cadenas poliméricas (Ciro, Rojas, Yarce, & Salamanca, 2019; Gierszewska-Drużyńska & Ostrowska-Czubenko, 2012).

#### **2.6.4. Ensayo microbiológico: Método de difusión en agar (Bauer-Kirby)**

A fin de evaluar la actividad microbiológica, esta prueba cualitativa permite corroborar la efectividad del método de liberación y del fármaco cargado a través del uso de un medio de cultivo, que puede ser un medio líquido o sólido, inoculado con el microorganismo de estudio. Se requiere colocar discos de tamaño definido sobre la superficie del agar previamente inoculado con el hongo para determinar el grado de sensibilidad del microorganismo frente al fármaco liberado en el medio a temperatura y tiempo controlados. Este método se basa en la resistencia del microorganismo frente al fármaco bajo determinadas condiciones y para medirla se evalúa la presencia o ausencia de un área clara (halo de inhibición) alrededor de los discos embebidos con el antifúngico en solución. El halo de inhibición está directamente relacionado con la actividad del fármaco frente al microorganismo elegido, para lo que requiere medir la zona formada alrededor del disco en estudio. Por otro lado, el MIC es la concentración mínima inhibitoria, es decir, es la dilución más baja del medicamento a la que no se observa crecimiento bacteriano. Los halos de diámetros pequeños pueden estar relacionados a valores altos de MIC, es decir, reflejan un microorganismo resistente al medicamento. Sin embargo, los halos de diámetros grandes se relacionan a valores bajos de MIC, es decir, evidencian un microorganismo sensible al fármaco (Cercenado & Saavedra-Lozano, 2009).

## **CAPÍTULO 3. DESARROLLO DEL TRABAJO DE INVESTIGACIÓN**

### **3.1. Reactivos**

Quitosano SIGMA ALDRICH lote STBF8219V quitina desacetilada, poli(D-glucosamina). Clorhexidina > 99.5 % SIGMA ALDRICH lote 1312398  $C_{22}H_{30}Cl_2N_{10}$  MW: 505.45 g/mol Solubilidad 0.08% a 20 °C. Tripolifosfato de Sodio de SIGMA ALDRICH lote 23713MIV  $Na_5O_{10}P_3$  MW: 367.86 g/mol. GLICERINA, solución Laboratorio Alkofarma E.I.R.L. GN-0020 lote 1020318.

### **3.2. Procedimiento experimental**

#### **3.2.1. Caracterización del quitosano**

##### **3.2.1.1. Determinación del grado de desacetilación por valoración conductimétrica**

La determinación del grado de desacetilación del quitosano empleado en la preparación de los films se realizó mediante el método de titulación conductimétrica, disolviendo por completo el biopolímero en una solución de ácido fuerte. Para esto, se pesó 52.04 mg de quitosano y se disolvió en 100 mL de HCl 0.05M. posteriormente

se procedió a titular el hidrogel preparado empleando una base fuerte, se utilizó una solución de NaOH 0.1 M previamente estandarizada (M. J. C. Salazar, 2015).

Las lecturas de conductividad se midieron con un conductímetro GONDO modelo PL-700PC, y se registraron los datos después de cada adición de 0.2 mL de solución básica manteniendo temperatura y agitación constantes en todo momento. Con los datos obtenidos se elaboró una gráfica Conductividad vs. Volumen de NaOH añadido para su posterior interpretación. Finalmente, el análisis fue realizado por triplicado.

#### **3.2.1.2. Determinación del peso molecular por viscosimetría**

Para hallar la viscosidad intrínseca necesaria para el cálculo del peso molecular, primero, se procedió a preparar una solución buffer conformada por ácido acético 0.2M y acetato de sodio 0.1M, y esta se utilizó como solvente para disolver el quitosano en estudio manteniéndolo bajo agitación constante y a temperatura ambiente. Luego, se tomaron alícuotas de la solución madre preparada hasta obtener concentraciones del polímero de 0.5%, 0.25%, 0.125% y 0.0625% (w/v), utilizando la solución amortiguadora inicial para enrasar las fioles, con el propósito de evaluar el tiempo que tarda en fluir cada una de estos hidrogeles a través de las marcas del viscosímetro.

Finalmente, este análisis se realizó usando un viscosímetro capilar de vidrio tipo Ubbelohde, la temperatura fue controlada mediante baño maría manteniendo el sistema a 30 °C. Por otro lado, el tiempo de paso se midió empleando un cronómetro digital, este ensayo fue realizado por cuadruplicado.

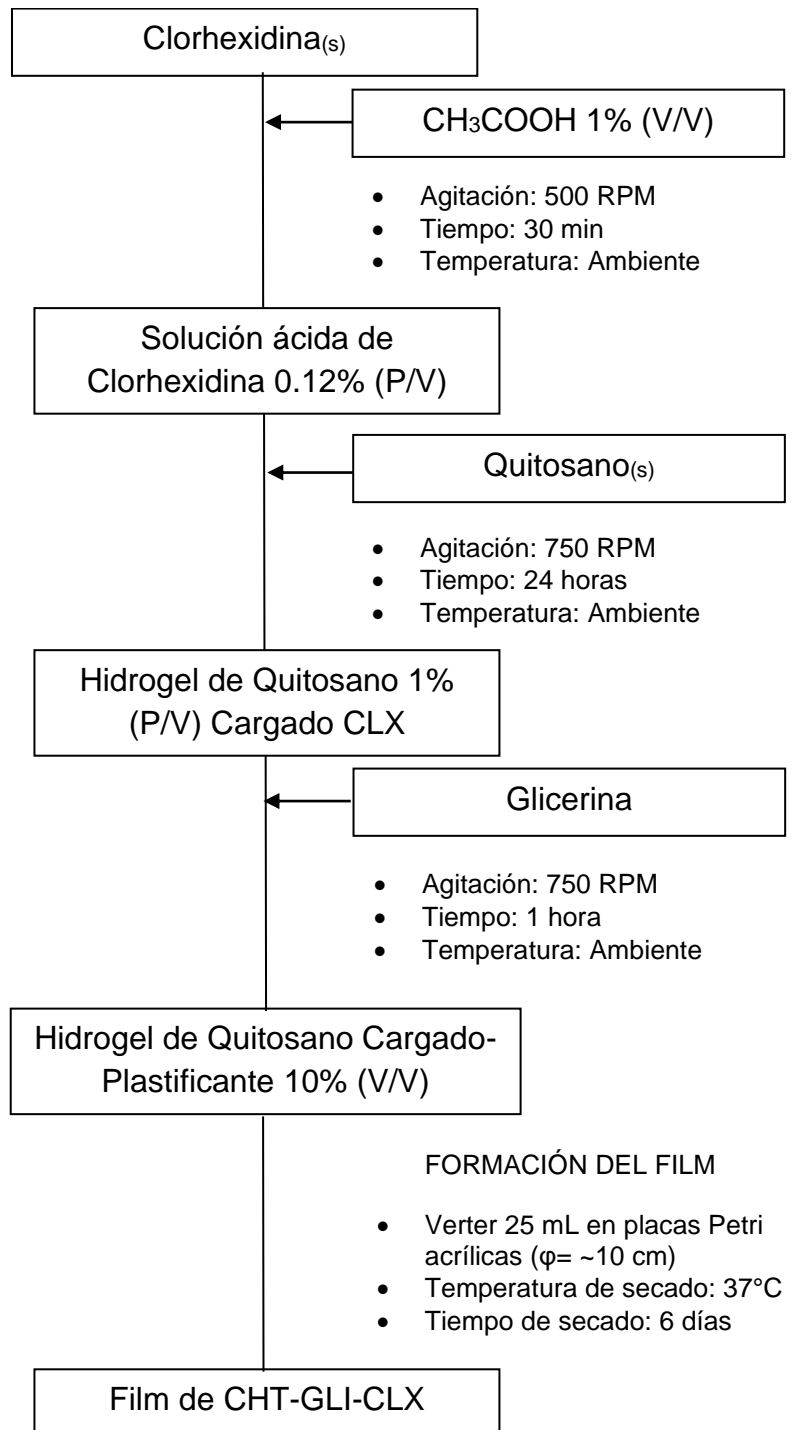
### **3.2.2. Películas de quitosano cargadas con clorhexidina**

#### **3.2.2.1. Preparación de películas de quitosano**

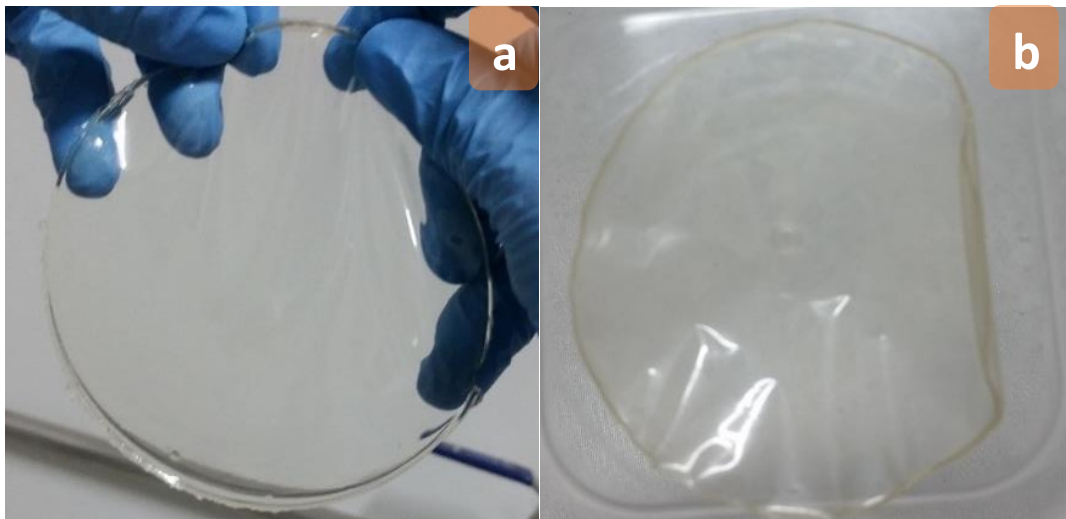
El método utilizado para la elaboración de las películas de quitosano cargadas con clorhexidina fue el de evaporación del solvente, casting. Se procedió a disolver una cantidad determinada de fármaco en solución de ácido acético 1% v/v con agitación constante a 500 RPM durante 30 min aproximadamente, para obtener una solución de CLX con una concentración inicial de 0.12% p/v. Una vez disuelto el fármaco en su totalidad, se agregó el biopolímero CHT en estado sólido, tal que la concentración final para el Quitosano fuera 1% p/v, a fin de obtener el hidrogel de quitosano cargado con CLX y esta se mantuvo bajo agitación constante a 750 RPM y a temperatura ambiente ( $T \sim 25^{\circ}\text{C}$ ) durante 24 horas.

Posteriormente, se añadió el volumen necesario de plastificante, de tal manera que el porcentaje final de Glicerina presente en el hidrogel fuera de 10% (v/v) y se continuó con la agitación por 1 hora adicional (750 RPM). Luego para la formación de las películas biopoliméricas se vertió 25 mL del hidrogel preparado, Quitosano Cargado-Plastificante, en placas Petri de material acrílico con un diámetro aproximado de 10 cm a manera de molde.

Finalmente, las placas se sometieron a una temperatura constante de secado a  $37^{\circ}\text{C}$  en estufa durante un período de 6 días, este fue el tiempo necesario para poder despegar y retirar el film por completo de la placa Petri. La Figura 6 a) muestra la película CHT-CLX-GLI luego del correspondiente tiempo de secado, la Figura 6 b) muestra una película CHT-CLX sin la adición del plastificante GLI con el mismo tiempo de secado.



**Figura 5.** Diagrama de proceso para la obtención de películas de Quitosano cargadas con Clorhexidina (Şenel et al., 2000).



**Figura 6.** (a) Película CHT-CLX-GLI posterior al tiempo de secado (b) Película CHT-CLX posterior al tiempo de secado.

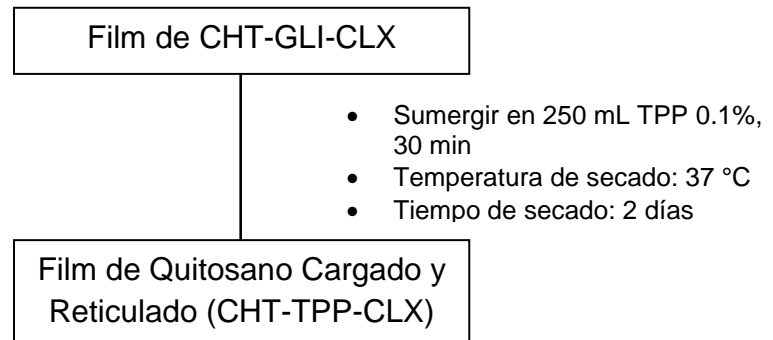
#### **3.2.2.2. Reticulación de la película quitosano-clorhexidina**

Una vez obtenida la película seca, esta se colocó en el desecador para que enfríe a temperatura ambiente. Posteriormente, el film que fue retirado completamente de la placa Petri se sumergió en aproximadamente 250 mL de solución de TPP 0.1% p/v (volumen suficiente para mantener al film suspendido en la solución y también cubierto en su totalidad), durante un tiempo de reticulado de 30 minutos sin agitación.

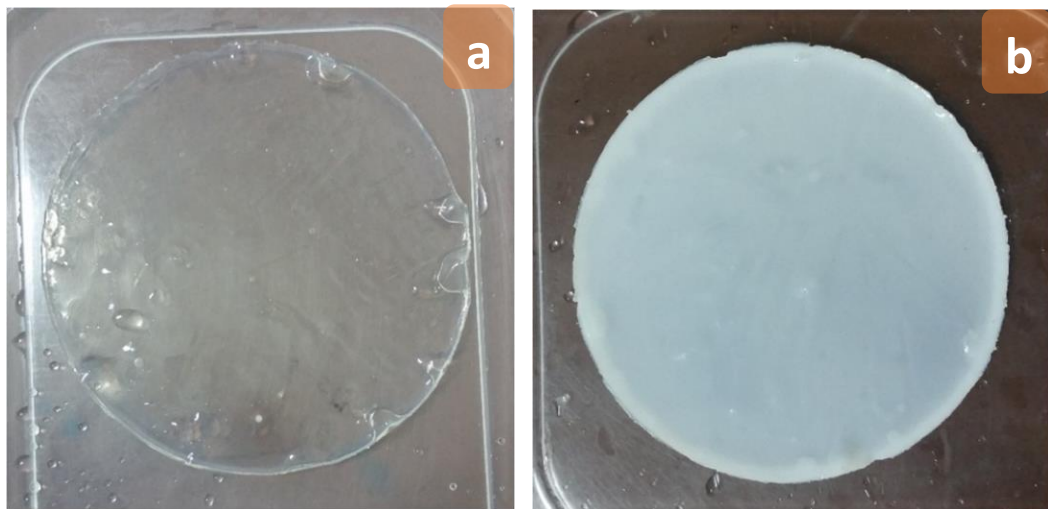
Transcurrido dicho lapso de tiempo se procedió a lavar la película con agua desionizada cuatro veces para retirar el exceso de reticulante. Finalmente, la temperatura de secado fue de 37 °C, y el tiempo de secado de 2 días, la película se conservó en el desecador hasta su uso. Los diagramas de proceso del cargado y la reticulación de los films se muestran en las Figuras 5 y 7. Mientras que la Figura 8, evidencia el cambio producido en la apariencia de una película reticulada sin fármaco



en su composición (film blanco) frente a una película reticulada y cargada con el fármaco clorhexidina.



**Figura 7.** Diagrama de proceso para la reticulación de películas de quitosano cargadas con clorhexidina.



**Figura 8.** (a) Película de quitosano sin CLX (blanco) luego de la reticulación con TPP 0.1%. (b) Película de quitosano cargada con fármaco CLX luego de la reticulación TPP 0.1%.

### **3.2.3. Estudio del grado de hinchamiento**

El hinchamiento respecto a cada película polimérica se evaluó usando el método gravimétrico, se midió el incremento del peso de la película polimérica luego de su contacto con el buffer fosfato salino (BFS) a pH 7.4. Se usaron muestras de películas con un área de 2 cm x 2 cm aproximadamente, estas no contenían fármaco CLX en su composición (blancos), se anotaron los pesos iniciales de los films secos y se colocaron en cada chaqueta conteniendo un volumen de 25 mL de BFS sometiendo el sistema a temperatura controlada de 37 °C. Las muestras fueron removidas a intervalos de tiempo apropiados y pesadas luego de limpiar el exceso de buffer usando papel de filtro, esta operación se repitió hasta que se observó un peso constante.

Como se sabe, el hinchamiento de las películas de quitosano-glicerina entrecruzadas con tripolifosfato de sodio depende del pH del medio de liberación, dado que este controla las interacciones electrostáticas entre los polianiones (Carlos Salazar, 2013). En el presente trabajo se estudió el efecto del volumen de preparación de la película, la concentración de TPP utilizado en la reticulación y el tiempo de reticulación con relación al hinchamiento de las películas de quitosano libres de fármaco CLX, cabe mencionar que tanto la concentración de quitosano y glicerina se mantuvieron constantes, 1% w/v y 10% v/v respectivamente, y que el fármaco no estuvo presente en la composición de dichas películas para restar la influencia de la salida de CLX al medio. La Tabla 2 muestra las variaciones que se hicieron en la preparación de las películas consideradas para el estudio de hinchamiento.

**Tabla 2.** Especificaciones consideradas en la preparación de los films para el estudio del grado de hinchamiento.

<b>Nombre</b>	<b>Volumen de preparación (mL)</b>	<b>TPP (%)</b>	<b>Tiempo de reticulación (min)</b>
<b>F1</b>	25	0	0
<b>F2</b>	25	0.1	30
<b>F3</b>	25	0.1	60
<b>F4</b>	25	0.1	120
<b>F5</b>	25	0.5	30
<b>F6</b>	35	0.1	30
<b>F7</b>	45	0.1	30

### **3.2.4. Estudio de liberación de la clorhexidina**

#### **3.2.4.1. Curva de calibración del fármaco clorhexidina**

Para preparar la solución madre de la curva de calibración, se disolvió 12.5 mg de Clorhexidina en 250 mL de agua desionizada bajo agitación constante (400 RPM) y a temperatura ambiente con la finalidad de obtener una solución de fármaco con una concentración aproximada de 50 ppm. A partir de esta solución madre preparada, se tomaron seis alícuotas de distintos volúmenes (Ver Tabla 3) y se vertieron en fioles con un volumen nominal de 25 mL, aforando lo matraces con agua desionizada para así obtener los puntos restantes y graficar sus absorbancias correspondientes ya que están directamente relacionadas a la concentración del analito presente en cada muestra.

Finalmente, estos puntos de curva preparados se leyeron en un equipo espectrofotómetro UV-Vis Shimadzu UV-1800 a una longitud de onda de 256 nm

determinada experimentalmente como el punto de máxima absorbancia de un barrido espectral, utilizando celdas de cuarzo con un camino óptico de 10 mm.

**Tabla 3.** Preparación de la curva de calibración.

Nombre	Alícuota de la solución madre (mL)	V <sub>final</sub> del matraz aforado (mL)	Concentración STD (ppm)
<b>STD 1</b>	1	25	2
<b>STD 2</b>	2	25	4
<b>STD 3</b>	4	25	8
<b>STD 4</b>	6	25	12
<b>STD 5</b>	8	25	16
<b>STD 6</b>	10	25	20

#### 3.2.4.2. Procedimiento para la liberación del fármaco clorhexidina

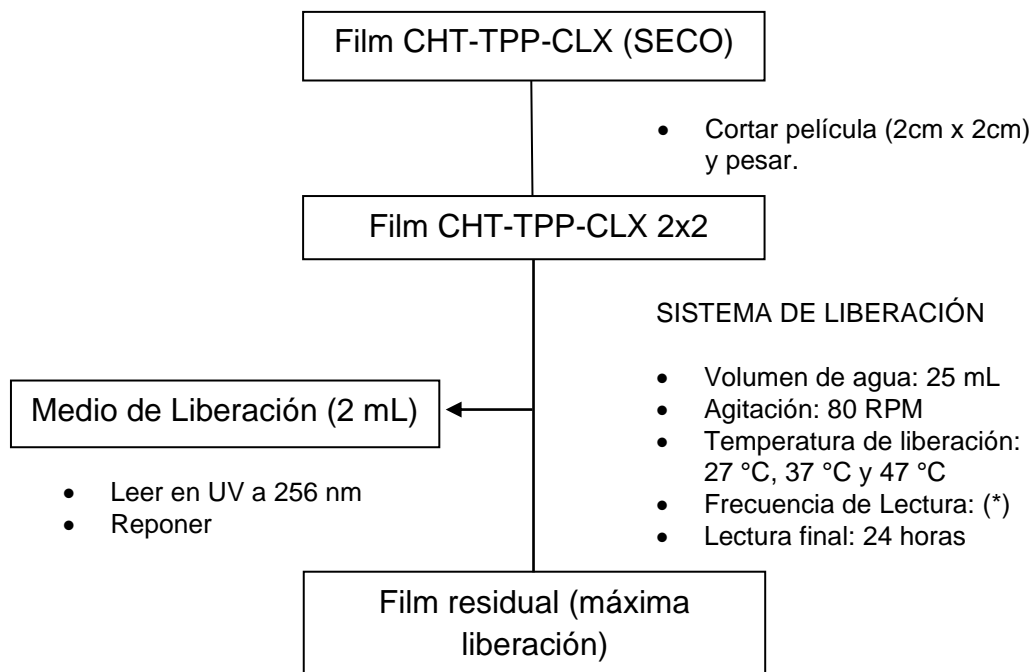
Con el objeto de determinar la capacidad que tiene el film preparado como un sistema efectivo para la liberación de fármaco, se estudió la liberación *in vitro* de CLX a partir de las películas de quitosano. Asimismo, se optó por evaluar la relevancia del pH del medio de liberación (agua, buffer pH 6.4 y buffer pH 8.5), el volumen de hidrogel usado para la preparación de la película (25 mL, 35 mL y 45 mL), la influencia de la temperatura del medio (27 °C, 37 °C y 47 °C) y la concentración del reticulante (0.1% y 0.5%).

Para iniciar el proceso de liberación, los films de quitosano-clorhexidina reticulados y secos se cortaron para obtener áreas definidas, cuadrados de 2 cm x 2 cm, con el fin de facilitar el control visual del desgaste que podría ocurrir como consecuencia de la liberación y contacto con el medio acuoso. Posteriormente, se colocó dicha porción de película en una chaqueta de vidrio conteniendo un volumen

de 25 mL de agua desionizada cuidando que el film quedara totalmente suspendido en el agua, la temperatura del medio de liberación se controló mediante el uso de un chiller llevándolo a la temperatura requerida para cada ensayo; mientras que, simultáneamente el sistema se mantuvo bajo agitación constante a 80 RPM mediante el uso de un shaker. Cada chaqueta utilizada fue cubierta con una luna de reloj para evitar la contaminación, mantener la temperatura interna y evitar la evaporación del medio de liberación (Ver figura 10).

En puntos de tiempo predeterminados (Tabla 4) se tomó 2 mL del medio de liberación para su lectura con reposición de la muestra, la solución se colocó en una celda de cuarzo de 10 mm, se leyó la muestra en el espectrofotómetro UV-Vis Shimadzu UV-1800 a una longitud de onda de 256 nm para calcular la cantidad acumulada de CLX liberada en el medio en función del tiempo, obteniéndose de esta forma la concentración del fármaco a lo largo de las horas.

Además, la cantidad máxima liberada del fármaco CLX se determinó dejando el sistema de liberación funcionando durante 24 horas y después de transcurrido dicho lapso de tiempo se tomó la medida de la concentración final. La Figura 9 muestra el diagrama de proceso para la liberación del fármaco a partir de la matriz polimérica preparada.



**Figura 9.** Diagrama de proceso para la liberación del fármaco CLX a temperatura controlada.

**Tabla 4.** (\*) Frecuencia de lectura del medio de liberación para cada intervalo.

Número de lectura	Intervalo para la toma de muestra (min)
1-10	7
11-14	15
15-16	30



**Figura 10.** Sistema de liberación utilizado para la liberación de Clorhexidina a partir de películas de Quitosano. (a) Shaker y chiller para brindar las condiciones de liberación (b) Chaqueta de vidrio.

### 3.2.4.3. Modelos matemáticos para el estudio de la cinética de liberación del fármaco clorhexidina

Para la realización del estudio cinético se variaron determinadas características tanto en la preparación de las películas de quitosano, como uno de los parámetros de liberación, la temperatura. Esto debido a que, si bien la principal temperatura en evaluación fue la temperatura corporal ( $37^{\circ}\text{C}$ ), también era importante determinar si la película biopolimérica cargada respondía efectivamente a temperaturas superiores e inferiores sin afectarse significativamente su integridad física y conocer la manera en

que esta influye en el proceso de liberación. La variación en el volumen de preparación de la película nos mostraría el impacto que tiene en el comportamiento mecánico del film. Y, la alteración del grado de reticulación posibilita conocer cómo se manifiesta este cambio en el comportamiento del sistema de liberación.

A fin de determinar estos efectos en la liberación del fármaco CLX, la tabla 5 muestra a detalle las especificaciones consideradas en la preparación de cada película biopolimérica para el estudio cinético. Cabe destacar que, todos los films elaborados presentaron especificaciones que se mantuvieron constantes, como la concentración de quitosano de 1%, el tiempo de reticulación de 30 minutos y la concentración de fármaco clorhexidina 0.12%.

Los resultados de liberación de CLX (%) se graficaron siguiendo los modelos cinéticos de Orden Cero, Primer orden, Higuchi y Korsmeyer-Peppas. A fin de hallar el modelo matemático que mejor se ajuste a los perfiles de liberación obtenidos experimentalmente.

**Tabla 5.** *Especificaciones consideradas en la preparación de las películas de quitosano CLX 0.12%. CHT 1%, y tiempo de reticulación 30 minutos.*

<b>Nombre</b>	<b>Volumen de preparación (mL)</b>	<b>TPP (%)</b>	<b>Temperatura (°C)</b>
<b>P1</b>	25	0.1	27
<b>P2</b>	25	0.1	37
<b>P3</b>	25	0.1	47
<b>P4</b>	25	0.5	37
<b>P5</b>	35	0.1	37
<b>P6</b>	45	0.1	37



### **3.2.5. Caracterización instrumental de las películas de quitosano cargadas con clorhexidina**

#### **3.2.5.1. Espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FTIR)**

Se cortaron películas de aproximadamente 1cm x 1cm de área y se analizaron utilizando un espectrómetro FTIR THERMO SCIENTIFIC NICOLET iS5 ubicado en la Facultad de Ciencias de la UNI, perteneciente al Grupo de Investigación en Síntesis de Materiales Avanzados (GISMA). Se utilizó la técnica de Reflectancia Total Atenuada (ATR) en el modo transmitancia en el intervalo 650-4000  $\text{cm}^{-1}$ , con una resolución de 4  $\text{cm}^{-1}$  y 32 barridos.

#### **3.2.5.2. Análisis termogravimétrico: TGA y DSC**

Los análisis termogravimétricos de los films de quitosano cargados con Clorhexidina se llevaron a cabo en atmósfera inerte de nitrógeno  $\text{N}_{2(g)}$ . Para determinar a qué temperaturas se descomponen las películas preparadas, se evaluó un rango de 35 °C hasta 550 °C. Se debe considerar que, por lo general, los compuestos orgánicos se descomponen a temperaturas entre 200 a 300 °C.

Se tomó una masa de 10 mg de muestra para cada análisis, el equipo utilizado fue el modelo STA 6000 de Perkin Elmer ubicado en la Facultad de Ciencias de la UNI, laboratorio de Tecnología Materiales para la Remediación Ambiental (TECMARA). La rampa de calentamiento fue de 10 °C/min y el flujo de nitrógeno gaseoso utilizado fue de 20 mL/min.

### **3.2.5.3. Microscopía electrónica de barrido (SEM)**

El equipo usado para la caracterización superficial fue el Microscopio Electrónico de Barrido modelo SU8230 Hitachi de la Facultad de Ciencias de la UNI, Centro para el Desarrollo de Materiales Avanzados y Nanotecnología (CEMAT).

Para colocar las muestras sólidas en el microscopio electrónico de barrido se colocó una cinta adhesiva doble de carbón sobre el sustrato de aluminio, tal que la parte inferior de la cinta de carbón quede adherida al sustrato, mientras que, sobre la parte superior de la cinta de carbón se colocaron las películas de quitosano preparadas. Este sistema se ubicó sobre la platina del microscopio electrónico para su análisis posterior.

### **3.2.6. Ensayo microbiológico: Método de difusión en agar (Bauer-Kirby)**

La actividad antifúngica fue evaluada cualitativamente contra el hongo *Candida albicans* ATCC 24433. El hongo creció en un medio aerobio, y fue inoculado en placas Petri siguiendo el método de difusión en agar de Bauer-Kirby.

Las placas conteniendo agar triptona-soja (TSA) con una altura aproximada de 0.5 cm, se incubaron durante 24 horas antes de su uso a una temperatura de 37 °C. En el caso del inóculo, este se preparó con una turbidez equivalente a 0.5 según la escala de McFarland en caldo triptona-soja (TSB) y fue aplicado sobre el medio de cultivo sólido por tres veces con una inclinación de 60°, cubriendo totalmente la superficie del medio. Finalmente, se dejó secar de 3 a 5 minutos antes de depositar los discos correspondientes sobre la superficie inoculada.

Se ensayó la viabilidad de las películas preparadas (blanco, disco embebido con solución CLX 0.12%, films CHT-TPP-CLX 0.12% variando los volúmenes de

preparación de 25 mL, 35 mL y 45 mL), esto se llevó a cabo colocando las porciones de films de tamaño definido (discos de diámetro 6 mm) a una distancia del borde de la placa no menor de 15 mm y a una distancia entre ellas que asegure que no ocurra superposición de los halos de inhibición que pueda afectar la visibilidad de estos, añadiendo agua estéril en la superficie para evitar que los discos se arruguen. De esta manera, las tres placas inoculadas previamente se incubaron en forma invertida a una temperatura de 37 °C por 24 horas.

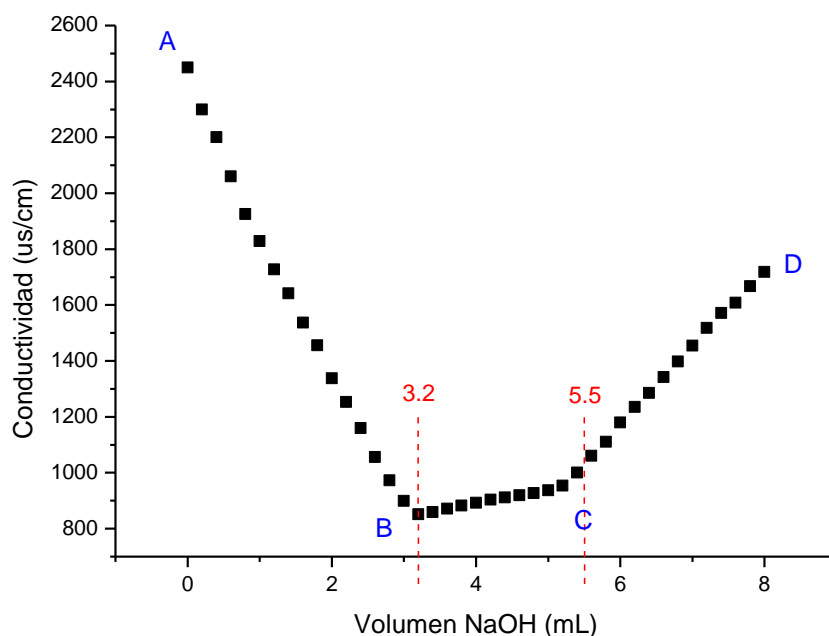
## **CAPÍTULO 4. ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS**

### **4.1. Caracterización del quitosano**

#### **4.1.1. Determinación del grado de desacetilación por valoración conductimétrica**

La base del método de titulación conductimétrica radica en la formación de tres fases notorias al graficar los datos de conductividad (en  $\mu\text{S}/\text{cm}$ ) versus volumen de solución básica añadida (en mL). En la primera zona A-B, se titula el exceso de la solución de HCl 0.05M con la que se disolvió el quitosano inicialmente respecto de la solución de NaOH 0.1M como titulante, la pendiente negativa de esta zona se explica con la disminución de la movilidad de los cationes  $\text{H}_3\text{O}^+$  como consecuencia de la neutralización ácido-base llevada a cabo. La segunda etapa B-C, involucra la titulación de los grupos  $\text{R-NH}_3^+$  dado que todo el HCl presente ya ha reaccionado con el titulante y se ha consumido, esto se manifiesta con un leve aumento en la conductividad debido a la mayor movilidad de los cationes  $\text{Na}^+$  agregados en esta fase. La tercera y última etapa C-D inicia cuando se ha completado la titulación de los grupos amino protonados y se evidencia con un incremento en la movilidad de los iones, debido a la movilidad superior que presentan los iones  $\text{OH}^-$  que se encuentran en exceso en la última fase.

El ensayo se realizó por triplicado, la Figura 11 presenta la gráfica promedio de las tres lecturas de conductividad relativas a cada 0.2 mL de base agregada. Graficando Conductividad Vs. Volumen de NaOH añadido, se determinó el valle formado y los dos puntos de inflexión, al primer punto con un volumen añadido de 3.2 mL de solución de NaOH, le corresponde la conductividad promedio de 854.7  $\mu\text{s}/\text{cm}$ , mientras que el segundo punto de inflexión con un volumen acumulado añadido de 5.5 mL mostró un promedio de 1010.3  $\mu\text{s}/\text{cm}$  de conductividad. El número de moles usado entre la primera y segunda inflexión (zona B-C de la gráfica) es equivalente al número de moles de los grupos amino pertenecientes al quitosano (ver ecuación 1). Finalmente, aplicando la ecuación 2 se determinó que el grado de desacetilación correspondiente al quitosano utilizado para la preparación de los films fue de 71.04%.



**Figura 11.** Curva de valoración conductimétrica promedio del quitosano.

#### 4.1.2. Determinación del peso molecular por viscosimetría

Las mediciones realizadas en segundos en base al tiempo que tomó cada solución polimérica en fluir a través de las marcas presentes en el viscosímetro de Ubbelohde se registraron para realizar los cálculos de las viscosidad relativa, viscosidad específica, viscosidad reducida y viscosidad inherente ( $\eta_{rel}$ ,  $\eta_{sp}$ ,  $\eta_{red}$  y  $\eta_{inh}$ ), necesarias para obtener la viscosidad intrínseca  $[\eta]$  y así determinar el peso molecular del polímero usando la ecuación de Mark Houwink Sakurada.

El tiempo promedio que tardó el solvente (buffer de ácido acético 0.2 M y acetato de sodio 0.1 M sin presencia de polímero) en fluir a través del capilar fue de 146.8 segundos, los demás tiempos y valores calculados para las distintas viscosidades necesarias se muestran en la siguiente tabla.

**Tabla 6.** *Tiempos y viscosidades correspondientes a las soluciones preparadas a diferentes concentraciones.*

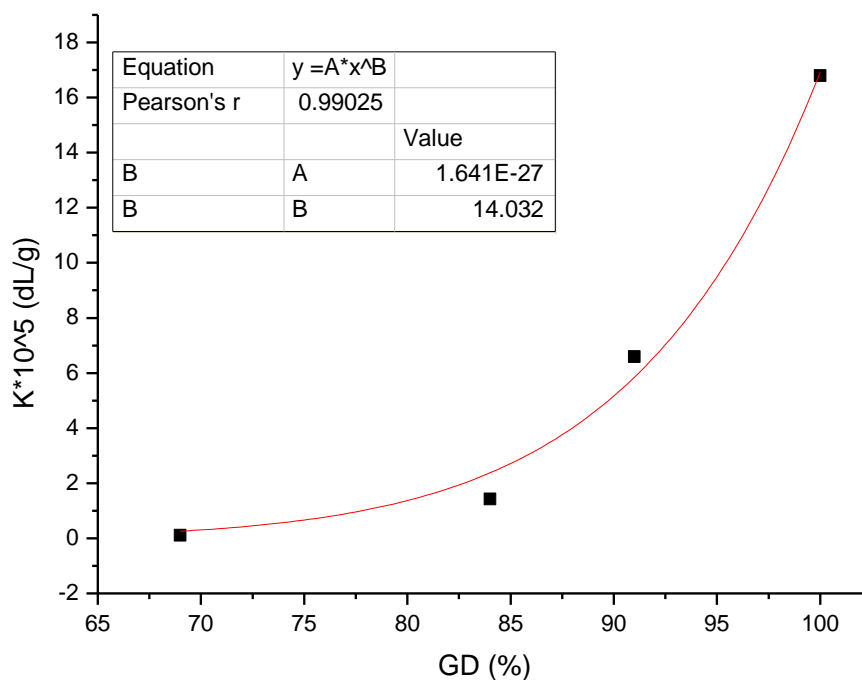
N°	Concentración (g/100 mL)	Tiempo promedio (s)	Viscosidad relativa ( $\eta_{rel}$ )	Viscosidad Específica ( $\eta_{sp}$ )	Viscosidad Reducida ( $\eta_{red}$ )	Viscosidad Inherente ( $\eta_{inh}$ )
S1	0.0625	188.1	1.281	0.281	4.502	3.967
S2	0.1250	262.1	1.785	0.785	6.283	4.637
S3	0.2500	443.8	3.024	2.024	8.095	4.426
S4	0.5000	1054.7	7.186	6.186	12.372	3.944

Para hallar las constantes más adecuadas, se graficaron por separado los valores para  $K$  y  $a$  en función del grado de desacetilación, estas curvas fueron elaboradas a partir de los datos previamente reportados en la literatura considerando condiciones similares (temperatura, pH, etc), y se usaron dichas ecuaciones obtenidas para calcular

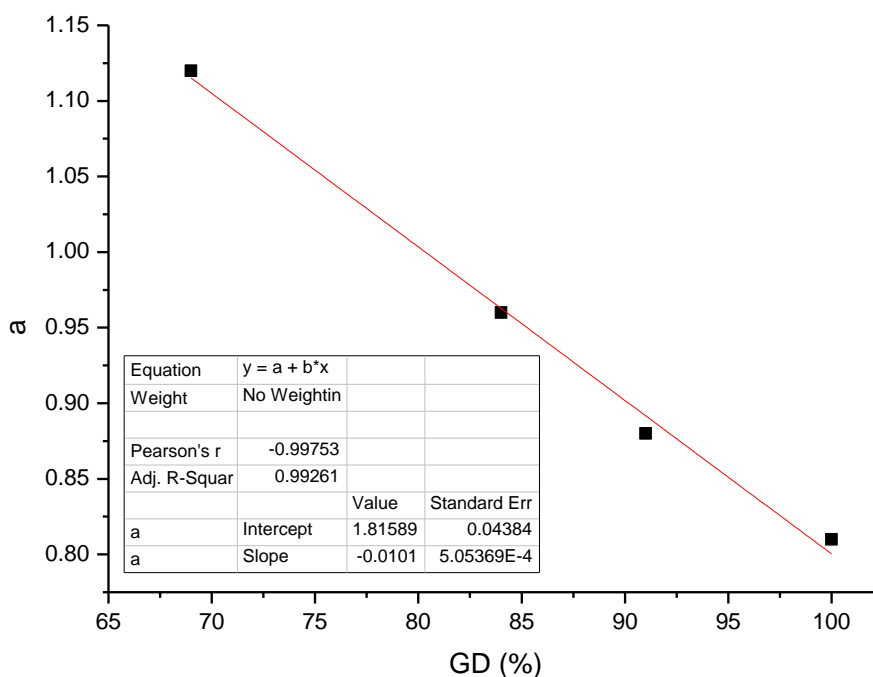
las constantes  $K$  y  $a$  por interpolación, estos valores fueron  $0.157 \times 10^{-5}$  dL/g y 1.091, respectivamente (ver Tabla 7, Figuras 12 y 13).

**Tabla 7.** Constantes  $K$  y  $a$  para quitosano con distintos grados de acetilación y 0.2M HAc/0.1M NaAc como solvente (Beattie & Booth, 1963; Carlos Salazar, 2013).

T (°C)	pH	$\mu$ (M)	GA (%)	$K \times 10^5$ (dL/g)	A
30	4.4	0.1	0	16.8	0.81
30	4.4	0.1	9	6.59	0.88
30	4.4	0.1	16	1.42	0.96
30	4.4	0.1	31	0.104	1.12



**Figura 12.** Constante  $K$  en función de GD y su ecuación de la curva.

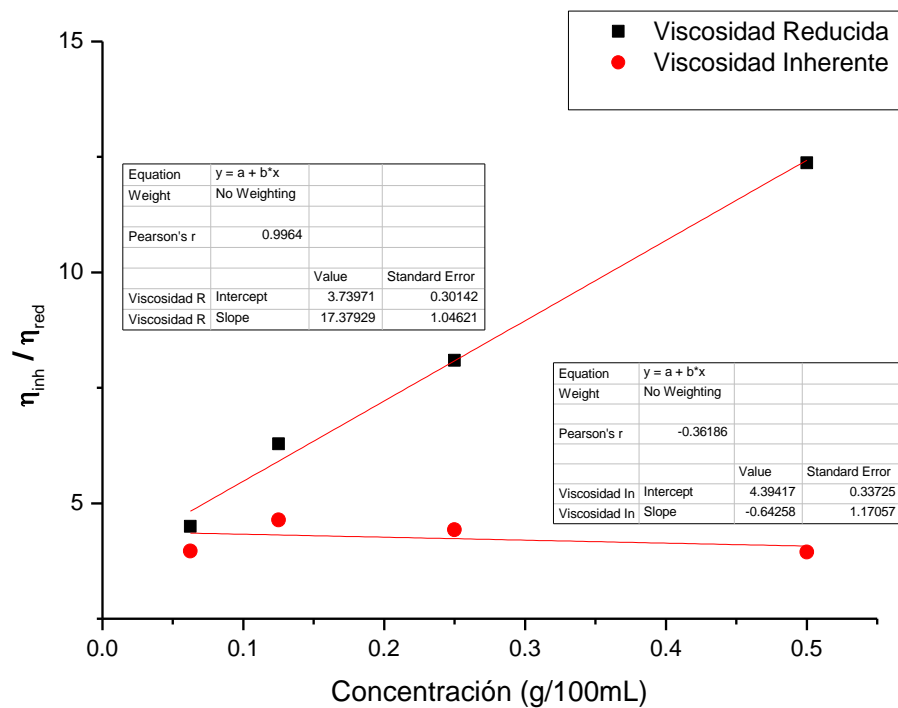


**Figura 13.** Constante  $a$  en función de  $GD$  y su ecuación de la curva.

Para determinar la viscosidad intrínseca, primero fue necesario graficar  $\eta_{red}$  y  $\eta_{inh}$  vs. concentración para hallar los valores relativos a la viscosidad reducida y viscosidad inherente cuando la concentración tiende a cero, estos fueron 3.740 dL/g y 4.394 dL/g respectivamente, tal como se muestra en la Figura 14. Sin embargo, tomando en cuenta las ecuaciones obtenidas al ajustar los puntos a una recta, se optó por utilizar solo el valor correspondiente a  $\eta_{red}$ , ya que esta presentó un coeficiente de determinación dentro de los parámetros de linealidad aceptables, a diferencia de la recta de  $\eta_{inh}$ . Luego, la viscosidad intrínseca  $[\eta]$  se consideró igual a la viscosidad reducida  $\eta_{red}$  previamente calculada, dando como resultado un valor de 3.740 dL/g. Finalmente, de la ecuación 1 se obtuvo que el polímero quitosano utilizado para la elaboración de los films tiene un peso molecular de 698.13 kDa.



El peso molecular tiene relación con la solubilidad, viscosidad y propiedades mecánicas de los hidrogeles de quitosano, a mayor peso molecular le corresponde una menor solubilidad. Entonces, un mayor peso molecular puede dificultar la manipulación del film (Serrato Rodríguez & Ruiz Marines, 2017). Pero también se debe considerar que un peso molecular superior usualmente incrementa las propiedades mecánicas de los hidrogeles favoreciendo la mucoadhesión (Losada, 2004), lo que podría ser útil para su aplicación como sistema de transporte de CLX en el tratamiento anti-*Candida*.



**Figura 14.** Viscosidad intrínseca del Quitosano a partir de la gráfica de Viscosidad inherente y Viscosidad reducida en función de la Concentración.

## **4.2. Estudio del Grado de hinchamiento**

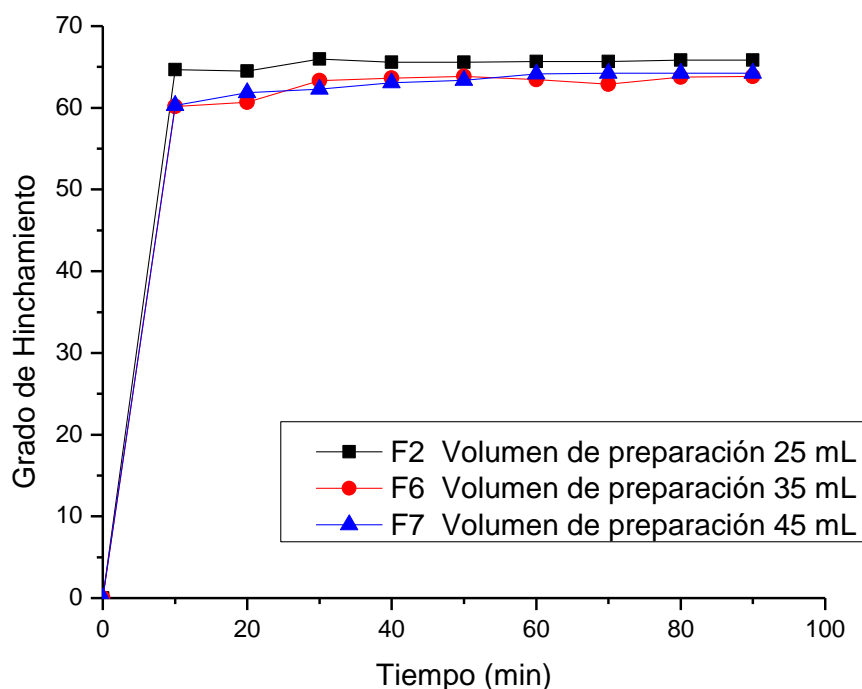
Para el análisis del grado de hinchamiento se hicieron variar diferentes parámetros en la preparación del film que pueden afectar el hinchamiento de la película durante su exposición al medio acuoso, estas fueron: el volumen utilizado preparación de la película, porque este afecta el espesor del film; la concentración del reticulante, porque la cantidad de TPP tiene un impacto en la disposición de las redes en la macromolécula; y el tiempo de la reticulación, dado que el reticulante altera la distancia entre las cadenas presentes en la estructura del hidrogel y este se incrementa de manera proporcional al tiempo de exposición. Adicionalmente, para obtener las características mecánicas deseadas de las películas en estudio, se mantuvieron constantes la concentración del quitosano al 1% y el porcentaje de plastificante presente en la película al 10%. Los films utilizados no contenían fármaco en su composición para lograr el estudio del hinchamiento del biopolímero por sí mismo y conocer solo el comportamiento de las películas para determinar el sistema de transporte del fármaco.

### **4.2.1. Efecto del volumen de preparación de la película sobre el grado de hinchamiento**

En la Figura 15 se muestran los perfiles de hinchamiento de las películas F2, F6 y F7 cuya única diferencia en la elaboración de las películas radica en el volumen de hidrogel (mL) de quitosano-plastificante agregado a la placa Petri previo al secado inicial del film. En este estudio se optó por usar volúmenes de 25 mL, 35 mL y 45 mL del gel, respectivamente, para hacer variar el espesor usando en cada caso los mismos moldes para la preparación: placas Petri de acrílico.

La película F2 tuvo un grado de hinchamiento de 66%, mientras que F6 y F7 mostraron un grado de hinchamiento menor pero no relevante de 60%. La tendencia a la disminución del grado de hinchamiento que presentaron las películas F6 y F7 podría deberse a que al reducirse la relación área superficial/masa de quitosano respecto al film F2, como consecuencia del aumento de la masa de quitosano que está dada por el volumen de gel añadido en la etapa de preparación, se produce también un incremento de las interacciones entre las cadenas biopoliméricas producto del acercamiento provocado al mantener el tamaño del recipiente de moldeo que confiere directamente el área superficial, resultando en una red ligeramente más compacta (García, 2020).

Además, se observa que la diferencia encontrada entre los films de distinto volumen de preparación no es significativa, lo que indicaría que las películas preparadas F6 y F7, presentan un grado de hinchamiento que puede considerarse como independiente de la variación en el volumen de preparación en el rango de 25-45 mL, esto amplía las posibilidades de selección del volumen más adecuado para el film cargado de CLX.



**Figura 15.** Grado de hinchamiento de las películas de quitosano (1%), glicerina (10%), reticuladas con TPP (0.1%) durante 30 min, con un volumen de preparación de 25 mL, 35 mL y 45 mL, en PBS (pH 7.4) a 37 °C.

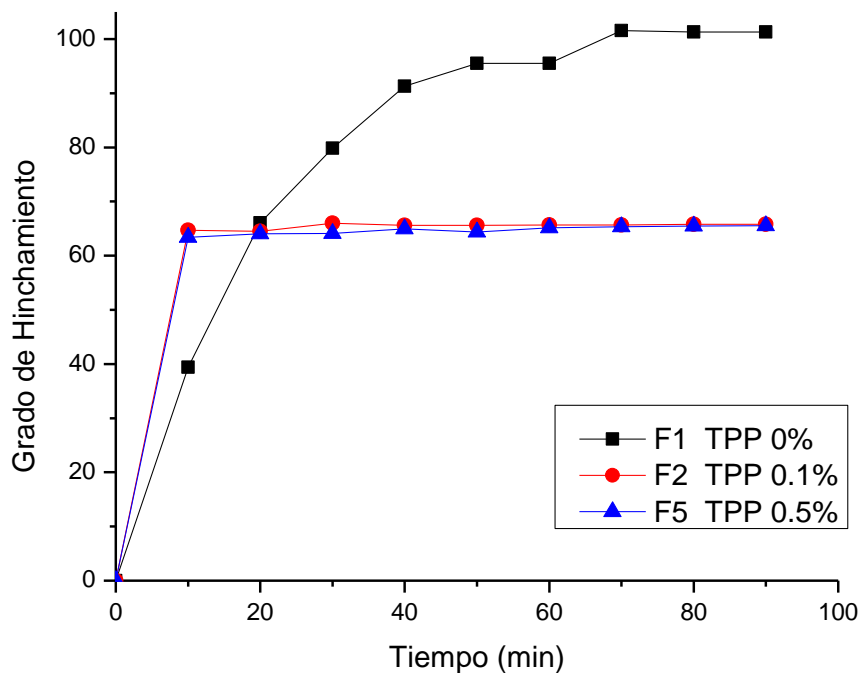
#### 4.2.2. Efecto de la concentración de reticulante sobre el grado de hinchamiento

La Figura 16, muestra los perfiles de hinchamiento de las películas F1, F2 y F5 cuya diferencia en la elaboración solo involucró la etapa de reticulación, variando la concentración del tripolifosfato de sodio, pero manteniendo un tiempo de 30 min para dicho entrecruzamiento. Las películas a base de CHT-GLI-TPP que fueron reticuladas al 0%, 0.1% y 0.5% presentaron grados de hinchamiento de 96%, 66% y 65% respectivamente. De la gráfica se obtiene que la película F1 que no fue reticulada presenta un grado de hinchamiento considerable, este cambia drásticamente en

presencia del reticulante. La interpretación de esto es que las matrices poliméricas consistentes en CHT-TPP impiden eficientemente el ingreso del medio acuoso (Carlos Salazar, 2013). La interacción entre el CHT y el TPP genera interacciones químicas que fortalecen la estructura del polímero, dichas interacciones provocan la disminución de la movilidad del polímero (Pavoni et al., 2021), así como la reducción del tamaño de poro, lo que impide el ingreso del agua y se manifiesta en un hinchamiento menor (Rogério dos Santos Alves; Alex Soares de Souza, 2014).

El uso del TPP desempeña un papel importante en el grado de hinchamiento del polímero, su entrecruzamiento con los grupos  $\text{NH}_3^+$  y  $-\text{OH}$  del CHT genera interacciones iónicas y favorece la formación de puentes de hidrógeno TPP-CHT, CHT-GLI y CHT-CHT producto del entrecruzamiento (Martins, de Oliveira, Pereira, Rubira, & Muniz, 2012; (Moeini et al., 2018). Se observó experimentalmente que al incremento de la concentración del TPP le corresponde una disminución en el hinchamiento. Al aumentar la concentración del entrecruzante iónico, también se incrementan las interacciones presentes en las películas reticuladas produciendo redes formadas por las cadenas poliméricas más estables mecánicamente, esto impide la entrada de las moléculas de agua y se manifiesta en un menor grado de hinchamiento. A su vez, la repulsión electrostática generada entre los grupos aminos propios del quitosano también podría favorecer el incremento del hinchamiento, dado que aumenta la separación entre cadenas favoreciendo la solvatación de los grupos  $\text{NH}_2$ . Es así como, en el caso de las películas F5 y F6 el entrecruzante ocupa lugares de enlace que en el caso de la película F2 solo interactúan con las moléculas de agua. Sin embargo, se halló que el factor concentración de TPP 0.1% y TPP 0.5% para F2 y F5, no presenta una diferencia considerable en la cantidad de agua retenida por cada film, lo que puede

deberse a la poca diferencia entre las concentraciones del entrecruzante. Cabe mencionar que este rango de concentraciones permite mantener las propiedades mecánicas deseadas para las películas.

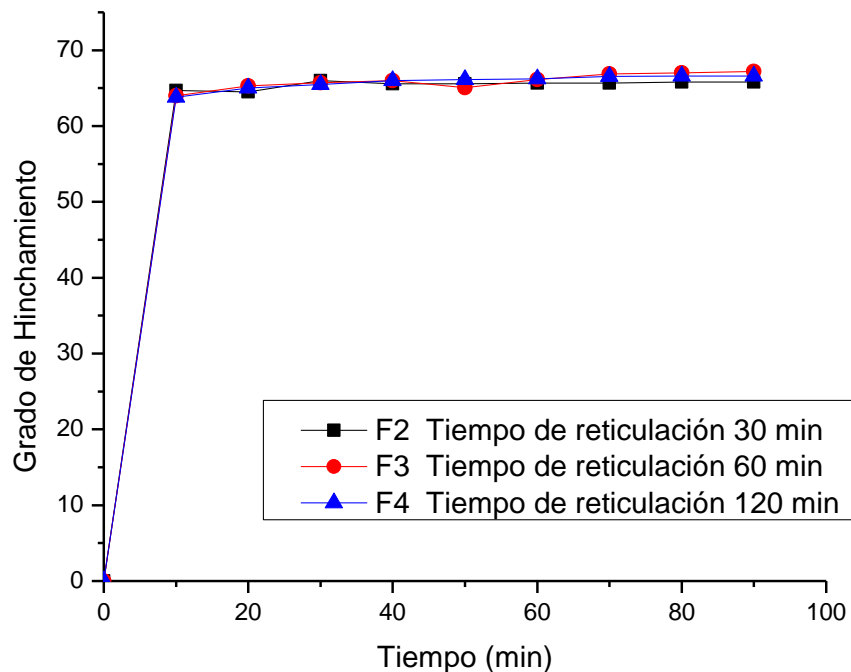


**Figura 16.** Grado de hinchamiento de las películas de quitosano (1%), glicerina (10%), reticuladas con TPP al 0%, 0.1% y 0.5% durante 30 min, con un volumen de preparación de 25 mL, en PBS (pH 7.4) a 37 °C.

#### 4.2.3. Efecto del tiempo de reticulación sobre el grado de hinchamiento

En la Figura 17 se encuentran los perfiles de hinchamiento de las películas F2, F3 y F4, para realizar esta comparación la diferencia radica en el proceso de entrecruzamiento, específicamente, el tiempo al que las películas estuvieron expuestas al reticulante TPP 0.1% (no en la concentración de TPP). En este estudio se optó por reticular los films durante 30 min, 60 min y 120 min. Tanto las películas F2 como F3

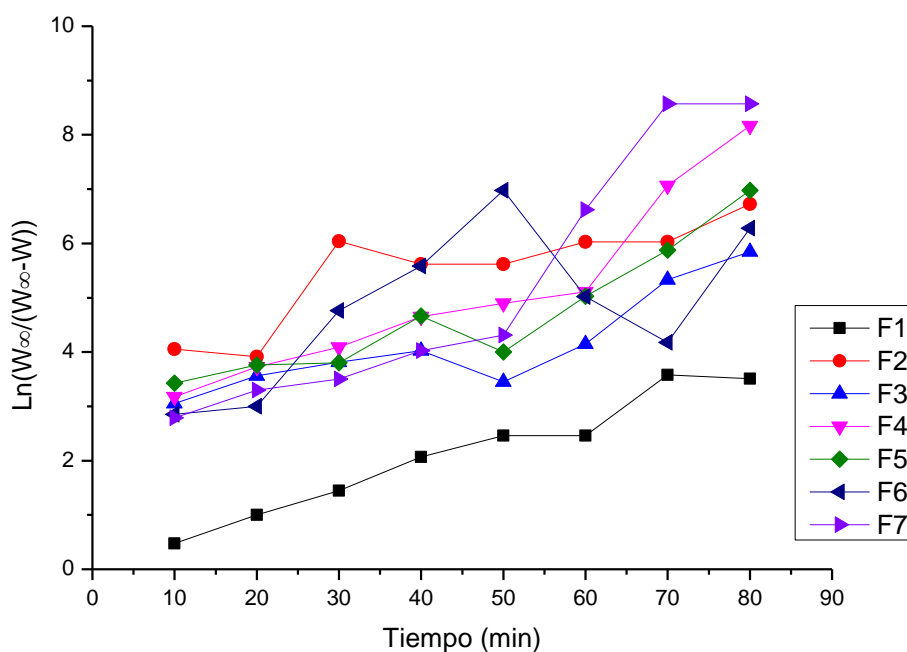
evidenciaron un grado de hinchamiento de 66%, mientras que el film F4 mostró un grado de hinchamiento de 65%. Si bien el tiempo de exposición al reticulante es relevante para lograr un adecuado proceso de entrecruzamiento, la variación en el hinchamiento es evidentemente no significativa, este hecho denota que el grado de entrecruzamiento alcanzado en cada película no se ve afectado considerablemente. Entonces, se puede deducir que las películas F2, F3 y F4 presentan un grado de hinchamiento que no depende de manera directa de la variación en el tiempo de entrecruzamiento, es decir, dicho tiempo no es un factor determinante para el grado de hinchamiento en el rango de 30 a 120 minutos escogido para este estudio.



**Figura 17.** Grado de hinchamiento de las películas de quitosano (1%), glicerina (10%), reticuladas con TPP 0.1 % durante 30 min, 60 min y 120 min, con un volumen de preparación de 25 mL, en PBS (pH 7.4) a 37 °C.

#### 4.2.4. Modelo cinético del grado de hinchamiento

Para determinar el orden más adecuado para el modelo cinético del grado de hinchamiento, se optó por graficar los resultados obtenidos en función del tiempo aplicando las ecuaciones 10 y 12 para primer orden y segundo orden, respectivamente. Se analizó el comportamiento de las películas de quitosano asumiendo que siguen una cinética de primer orden. Tal como se aprecia en la Figura 18, las curvas formadas por cada film preparado no presentan un comportamiento lineal, a excepción de la curva correspondiente a F1 que sí muestra una pendiente constante, pero con un coeficiente de determinación menor a 0.99, los valores de  $R^2$  se pueden ver en la Tabla 8.

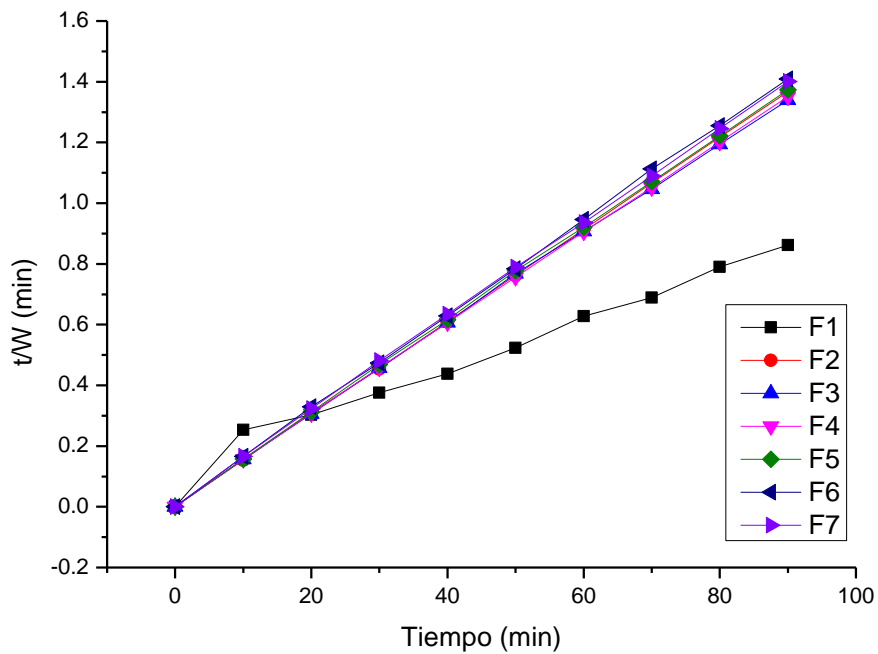


**Figura 18.** Cinética de hinchamiento de las películas de quitosano preparadas a condiciones variadas, ajustadas a Primer Orden.



**Tabla 8.** *Coefficientes de las curvas ajustadas a la recta  $y=mx+b$ , producto de aplicar un modelo cinético de hinchamiento de Primer Orden.*

Nombre	Pendiente (m)	Intercepto (b)	Coefficiente de Determinación ( $R^2$ )
F1	0.0447	0.1128	0.9647
F2	0.0348	3.9381	0.7289
F3	0.0343	2.6078	0.7686
F4	0.0654	2.1669	0.8929
F5	0.0458	2.6312	0.8400
F6	0.0381	3.1160	0.4072
F7	0.0910	1.1155	0.8877



**Figura 19.** *Cinética de hinchamiento de las películas de quitosano preparadas a condiciones variadas, ajustadas a Segundo Orden.*

**Tabla 9.** *Coefficientes de las curvas ajustadas a la recta  $y=mx+b$ , producto de aplicar un modelo cinético de hinchamiento de Segundo Orden.*

<b>Nombre</b>	<b>Pendiente (m)</b>	<b>Intercepto (b)</b>	<b>Coefficiente de Determinación (<math>R^2</math>)</b>
<b>F1</b>	0.0087	0.0968	0.9742
<b>F2</b>	0.0152	0.0023	1.0000
<b>F3</b>	0.0149	0.0090	0.9997
<b>F4</b>	0.0150	0.0062	1.0000
<b>F5</b>	0.0152	0.0068	0.9999
<b>F6</b>	0.0156	0.0070	0.9998
<b>F7</b>	0.0155	0.0106	0.9999

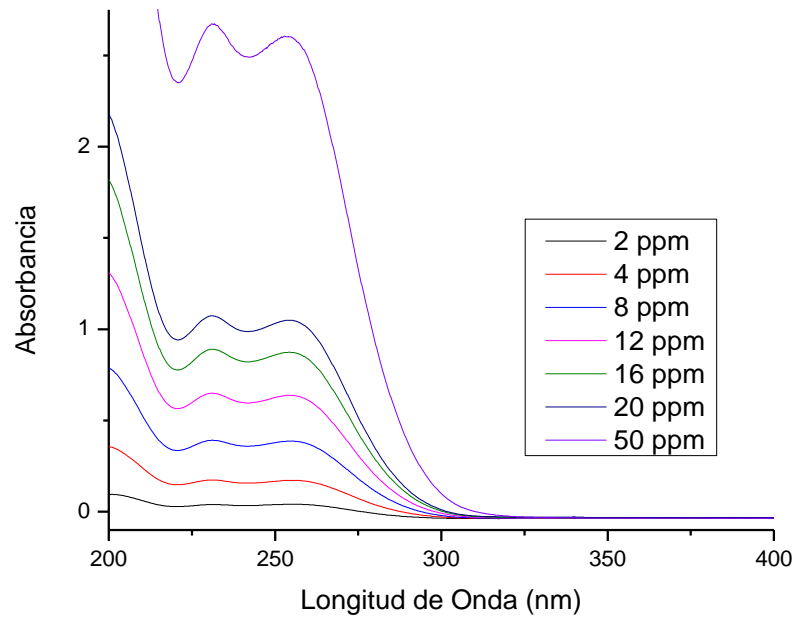
En contraste, la Figura 19 muestra el comportamiento evidentemente lineal que siguen las curvas de las películas preparadas al ajustarse a una cinética de hinchamiento de segundo orden, el criterio se basó en los valores de  $R^2$  superiores a 0.99. Esto implica que el proceso de difusión en la cinética de segundo orden se explica con la relajación de las cadenas poliméricas para que ocurra la salida del agua (Ortiz, Rapado, & Peniche, 2021; Povea et al., 2008). Si bien la película F1 también presentó un comportamiento lineal frente al modelo cinético de primer orden, en este caso se presenta un valor de  $R^2$  mayor, por lo que se prefirió la cinética de Segundo Orden para explicar el hinchamiento. En tanto, las películas F2-F7 también presentaron coeficientes de determinación superiores para el modelo cinético de segundo orden, este ajuste se explica dado que el proceso de difusión se lleva a cabo más lentamente alejándose de la cinética de primer orden, lo que favorecería la liberación gradual del fármaco si consideramos la aplicación que se le daría a los films. La Tabla 9 presenta los coeficientes de la ecuación y determinación ( $R^2$ ) correspondientes a cada película.

### **4.3. Liberación del fármaco clorhexidina**

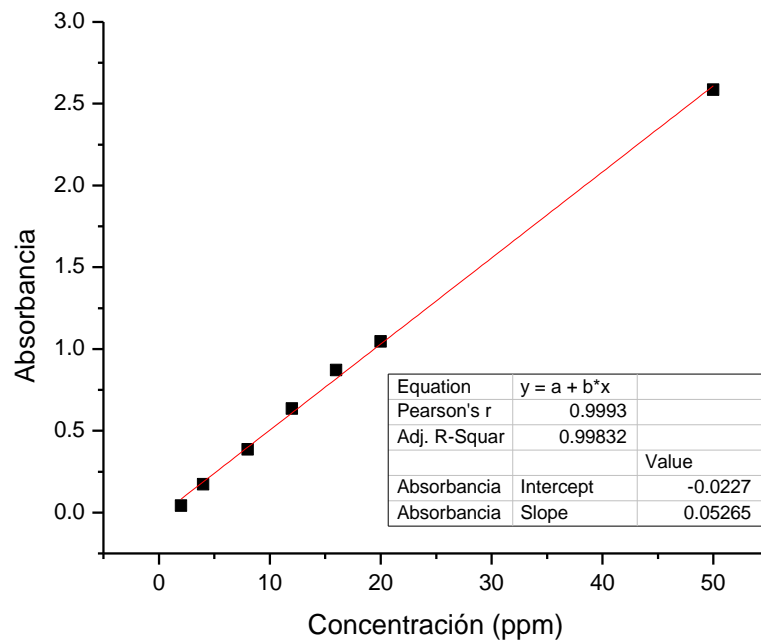
Los resultados de la liberación de CLX se muestran en gráficos que están expresados en porcentaje de liberación de fármaco (%) Vs Tiempo (min). Para este estudio se hizo variar el volumen de preparación del film, la temperatura de liberación y el grado de reticulación. Considerando los resultados obtenidos del estudio del grado de hinchamiento, en la preparación de las películas de CHT-CLX se optó por usar 25 mL para el volumen de preparación porque no se encontró diferencia significativa en el hinchamiento en comparación con los volúmenes de 35 mL y 45 mL utilizados. La concentración del reticulante y el tiempo de exposición a este fue de 0.1% y 30 min, respectivamente, a fin de no afectar la flexibilidad y fácil manipulación de los films. En tanto, la temperatura óptima seleccionada para el medio de liberación fue 37 °C dado que se asemeja a la temperatura promedio del cuerpo humano y tomando en cuenta que, para la aplicación potencial del film, esta sería la temperatura del entorno. Sin embargo, por fines comparativos también se hicieron ensayos a 27 °C y 47 °C.

#### **4.3.1. Curva de calibración**

La Figura 20 muestra el barrido espectral correspondiente a la lectura de los estándares preparados (STD) a partir de una solución madre de 50 ppm, para determinar la longitud de onda más adecuada para la clorhexidina. En base a la literatura y como consecuencia del barrido obtenido, se concluye que la longitud de onda representativa de CLX es 256 nm. Por otro lado, la Figura 21 muestra la curva de calibración, así como los coeficientes de la ecuación de la recta y el coeficiente de determinación  $R^2$  obtenido superior a 0.99.



**Figura 20.** Barrido espectral de los estándares del fármaco Clorhexidina.



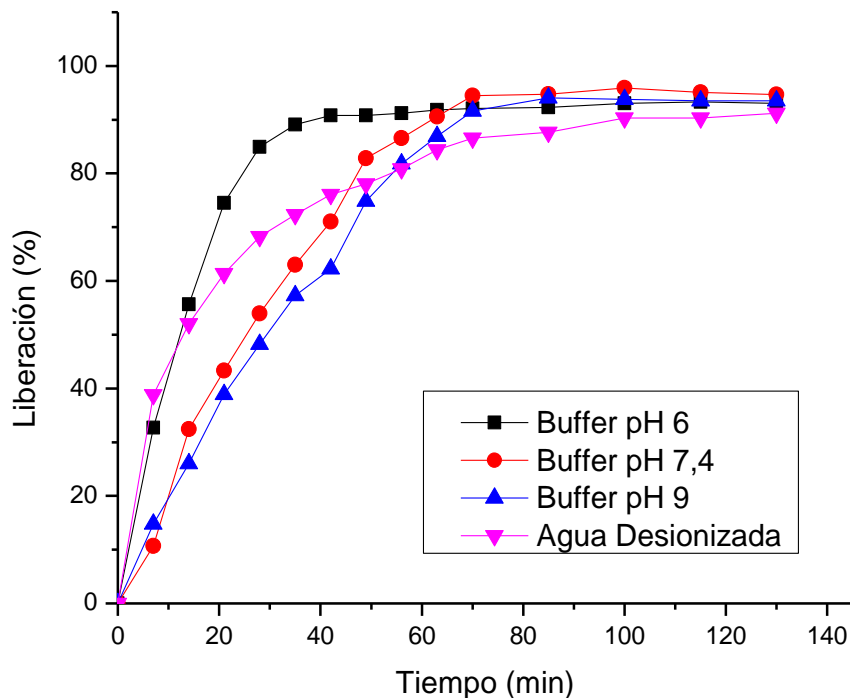
**Figura 21.** Curva de calibración y ecuación de la recta de la Clorhexidina.

### **4.3.2. Efecto de las variaciones en el estudio de liberación**

#### **4.3.2.1. Efecto del pH del medio de liberación**

La Figura 22 muestra el efecto que tiene el pH del medio en la liberación del fármaco Clorhexidina que se da a través de la matriz biopolimérica. Para realizar este estudio se utilizó buffer fosfato salino pH 7.4, buffer pH 6 y buffer pH 9, y adicionalmente se hizo la comparación usando agua desionizada como medio para determinar si hay variaciones considerables entre sus resultados.

Si bien, el pH suele ser determinante en un ensayo de liberación debido a que las interacciones electrostáticas presentes durante el contacto del film con el medio influyen en la salida del fármaco, en este caso no se encontró gran diferencia en cuanto al porcentaje de liberación de clorhexidina final obtenida entre el uso de cada buffer puesto a prueba como medio (pH 7.4 con 93.4%, pH 6 y pH 9 con 93.3%) y el agua desionizada (93.1%). Es así que las diferencias halladas en el porcentaje de liberación del fármaco en cada uno de los medios evaluados se consideraron como despreciables para el fin requerido en esta investigación. Se optó entonces por estandarizar el uso de agua desionizada como medio de liberación para todos los ensayos posteriores debido a la practicidad de su uso.



**Figura 22.** Perfil de liberación de CLX a 37 °C a partir de películas de quitosano 1%, volumen de preparación 25 mL, TPP 0.1 %, liberadas a diferentes condiciones de pH (agua desionizada, buffer pH 6, 7.4 y 9).

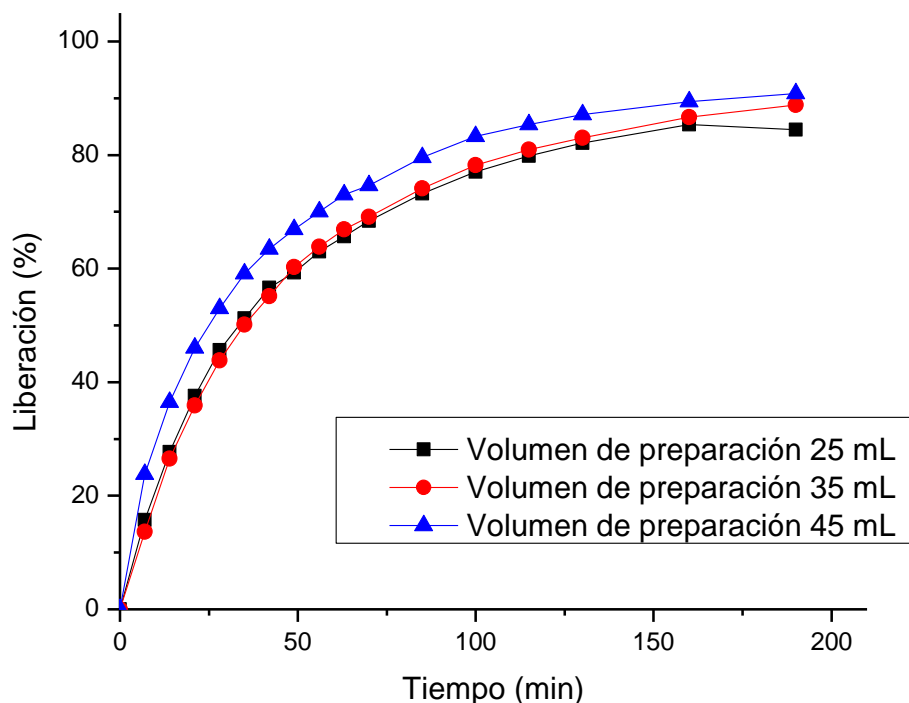
Adicionalmente, se presenta el estudio de los siguientes efectos sobre la liberación de Clorhexidina: Volumen de preparación de las películas, Temperatura de liberación y Concentración del reticulante. La liberación del fármaco a partir de una película polimérica usualmente se ve afectada por diferentes mecanismos como el ingreso del medio de liberación en la matriz, el grado de hinchamiento, la disolución del fármaco en el medio, la difusión del fármaco a través de la matriz hidratada y también la erosión que se presenta principalmente en la superficie del film y cada uno tiene su aporte en la liberación (Bavarsad, Kouchak, Varmaziar, & Sadeghi-Nejad, 2015). Dado que el CHT es polielectrolítico e hidrofílico, al entrar en contacto con el

medio acuoso absorbe las moléculas de agua provocando el hinchamiento del hidrogel, es así que debido a la relajación de sus cadenas se generan cavidades intermoleculares (también llamados poros) por donde el fármaco CLX sale con el fin de mantener un gradiente de concentración apropiado. Además, simultáneamente el polímero se expande ocasionando la erosión de la superficie.

#### **4.3.2.2. Efecto del volumen de preparación de las películas**

La Figura 23 muestra el perfil de liberación de CLX con una concentración inicial de 0.12% durante un periodo de 3 horas de exposición al medio a partir de las películas de quitosano entrecruzadas con TPP 0.1%. Para este ensayo, se prepararon películas con volúmenes diferentes utilizados para su preparación al momento de realizar el método casting, siendo 25 mL, 35 mL y 45 mL respectivamente.

Analizando el perfil obtenido, se determinó que las películas de mayor volumen de preparación liberan mayor porcentaje de fármaco que las de menor volumen de preparación. Esto puede estar relacionado directamente al incremento de masa total, es decir, a mayor volumen de preparación utilizado para la elaboración del film también le corresponde una mayor cantidad de CLX en su composición que se libera en el medio. Los porcentajes de liberación de CLX correspondientes a cada volumen de preparación, 25 mL, 35 mL y 45 mL, fueron de 84.4%, 88.8% y 90.8% respectivamente.



**Figura 23.** Perfil de liberación de CLX a 37 °C a partir de películas de quitosano 1%, volumen de preparación 25 mL, 35 mL y 45 mL, TPP 0.1%.

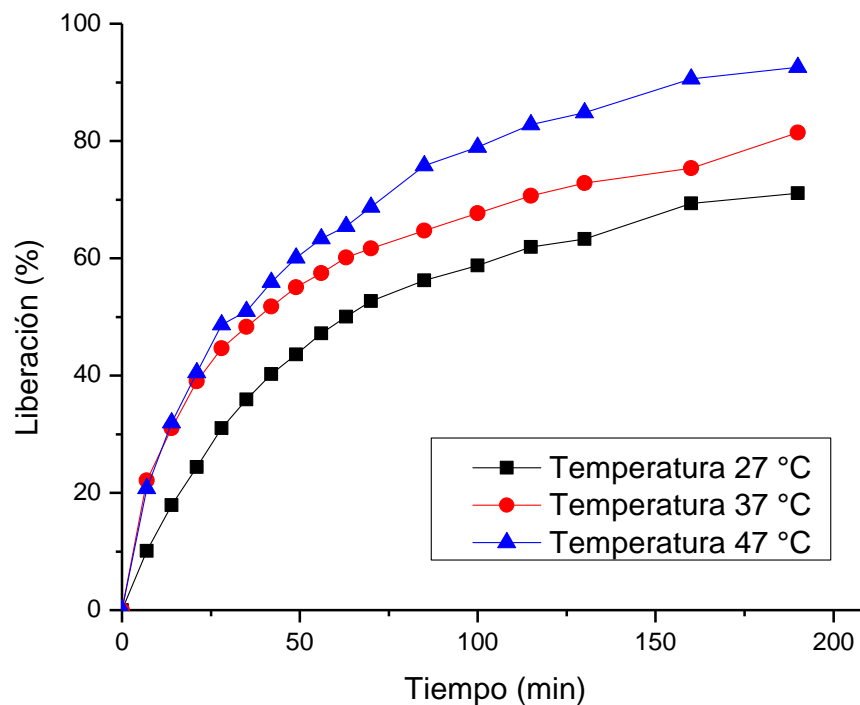
#### 4.3.2.3. Efecto de la temperatura del medio de liberación

La temperatura del medio de liberación es un factor determinante para el proceso de liberación del fármaco, un incremento de este favorece a la liberación de CLX, lo que podría deberse principalmente al debilitamiento de las fuerzas intermoleculares presentes en la estructura de la matriz polimérica provocando que el tamaño de los poros aumente favoreciendo de esta manera la liberación.

Para este ensayo las películas preparadas mantuvieron una concentración determinada de fármaco, mismo volumen de preparación y porcentaje de reticulación. La Figura 24 muestra como los porcentajes de CLX liberados se incrementan conforme



lo hace también la temperatura del medio. La gráfica muestra aproximadamente 3 horas de exposición de los films a 27 °C, 37 °C y 47 °C manteniendo agitación constante, donde se obtuvo un porcentaje de CLX liberado de 71.1%, 81.4% y 92.6%, respectivamente.



**Figura 24.** Perfil de liberación de CLX a 27 °C, 37 °C y 47 °C a partir de películas de quitosano 1%, volumen de preparación 25 mL, TPP 0.1%.

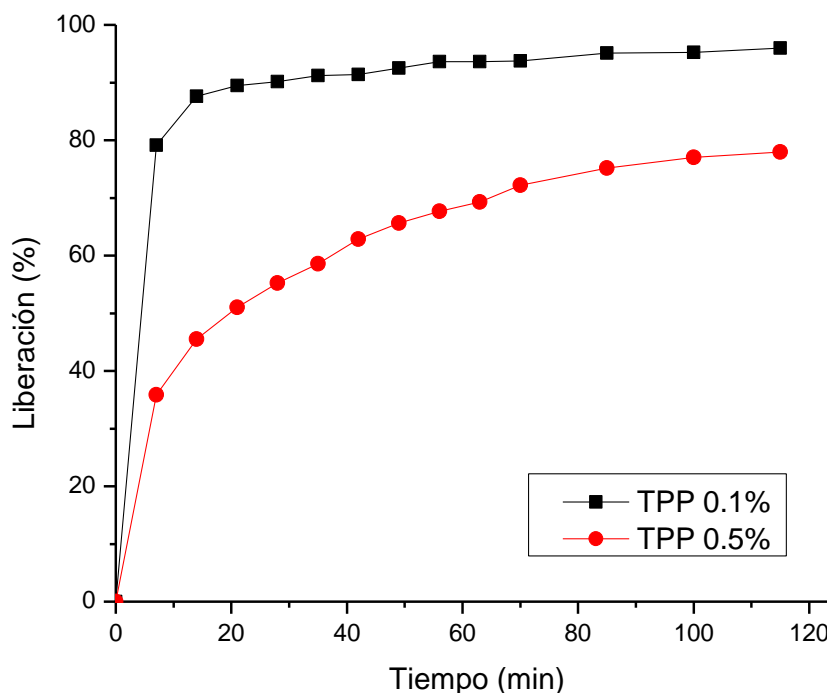
#### 4.3.2.4. Efecto de la concentración de reticulante

La Figura 25 muestra el perfil de liberación de CLX a partir de películas de quitosano entrecruzadas con TPP 0.1% y 0.5% p/v, en esta ocasión se mantuvo constante la temperatura a 37 °C, la concentración de CLX fue de 0.12% y el volumen

de preparación utilizado fue 25 mL, mientras que el tiempo de reticulación fue 30 min para ambos films.

Como era de esperarse, los distintos grados de reticulación provocaron una reducción significativa en la liberación de fármaco, esta pasó de 95.9% de CLX para el film reticulado con TPP 0.1%, a un valor de 77.9% de CLX para la película reticulada con TPP 0.5%. Este comportamiento fue el esperado, considerando que el efecto del entrecruzante implica la formación de redes tridimensionales entre el TPP y la macromolécula CHT, dificultando de esta manera la salida del fármaco de su estructura como consecuencia de la reducción de las cavidades intermoleculares (poros). De esto resulta que, una mayor concentración de TPP en el proceso de reticulación se manifiesta en una red menos flexible y en consecuencia más difícil de atravesar, lo que conlleva a perjudicar la libre salida del fármaco CLX a través de la estructura CHT-TPP formada.

Asimismo, se pudieron apreciar las diferencias que existen en las propiedades físicas de las películas preparadas, la película reticulada con la solución de TPP 0.5% resultó ser más quebradiza y de difícil manipulación, en contraste, la película con TPP 0.1% mantuvo propiedades mecánicas adecuadas para su uso como sistema de liberación.



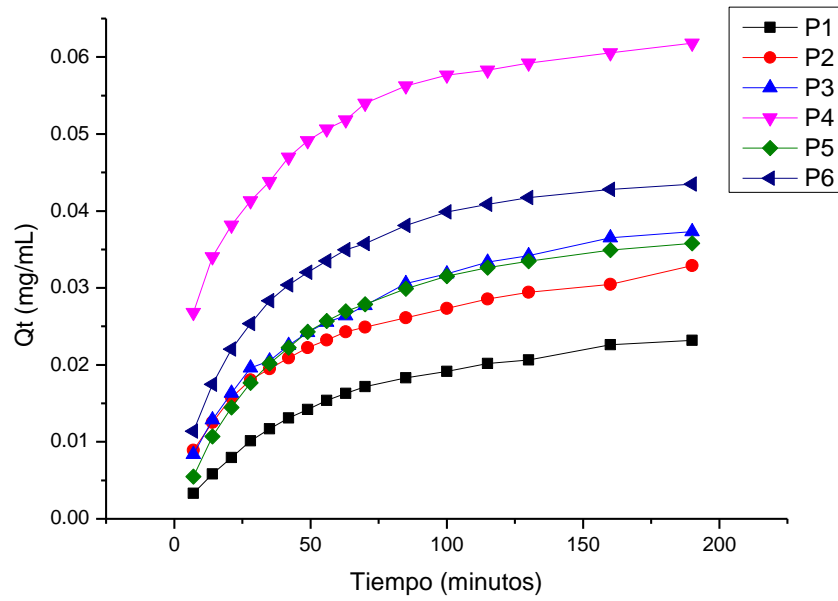
**Figura 25.** Perfil de liberación de CLX a 37 °C a partir de películas de quitosano 1%, volumen de preparación 25 mL, TPP 0.1% y 0.5%.

#### 4.3.3. Modelos matemáticos para el estudio de la cinética de liberación del fármaco clorhexidina

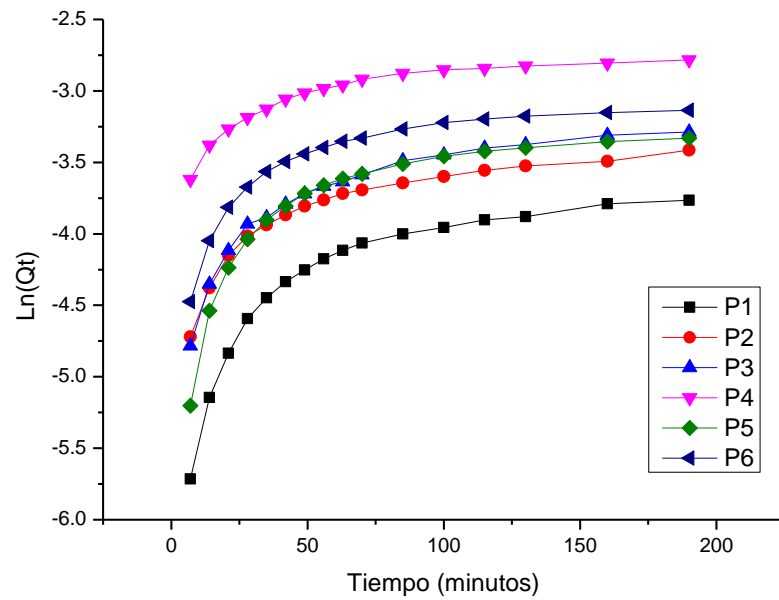
Los datos que fueron obtenidos de la liberación *in vitro* de las películas preparadas según la Tabla 5, mostraron un mejor ajuste al modelo Korsmeyer-Peppas, dado que tuvieron coeficientes de determinación ( $R^2$ ) superiores a los obtenidos con los demás modelos. Sugiriendo así, que este es el modelo matemático más adecuado para describir la cinética de liberación del sistema estudiado. La comparación de los coeficientes de determinación obtenidos se muestra en la Tabla 10.

Las constantes de difusión,  $n$ , para las películas P2, P3, P4 y P6 presentaron valores que oscilaron entre 0.25-0.44, mostrándose un comportamiento de tipo Fickiano donde la liberación está controlada por la difusión. En esta situación, la velocidad de relajación de las cadenas poliméricas del polímero es mayor comparada con la velocidad de difusión (Rahim & Mas Haris, 2021). Mientras que los films P1 y P5 presentaron valores de  $n$  ligeramente superiores a 0.5, indicando una tendencia a la liberación de tipo anómalo o no Fickiano, que está controlada además de la difusión por la erosión y relajación. Es así que, en este caso, la velocidad de difusión es equivalente a la velocidad de relajación de las cadenas (Gierszewska-Drużyńska & Ostrowska-Czubenko, 2012).

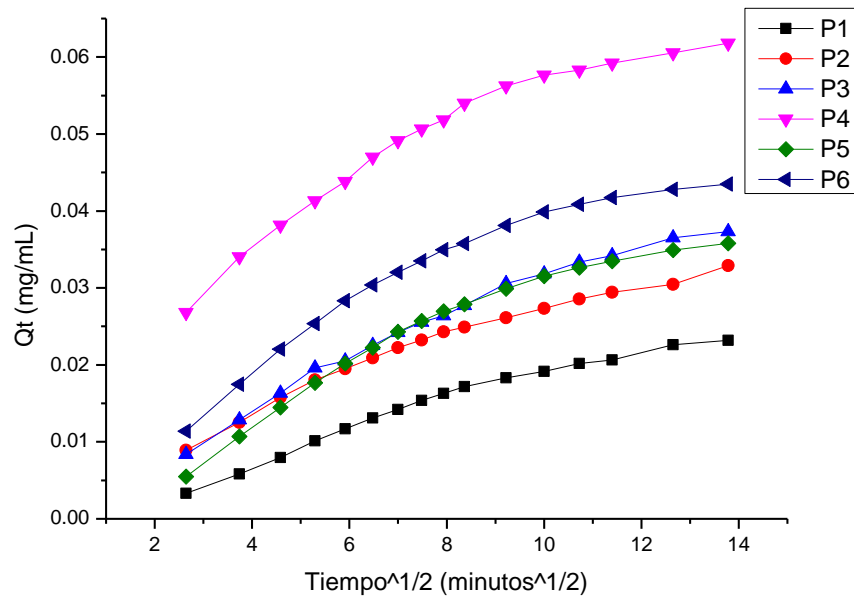
Para la película P1, la temperatura de liberación del medio influye en el valor de  $n$  correspondiente, dado que al ser menor ( $27^{\circ}\text{C}$ ) podría provocar la disminución de la relajación de las cadenas poliméricas y esto ocasionaría que se equipare la velocidad de relajación con la velocidad de penetración de agua al no darse la difusión adecuadamente. Pero, en el caso de la película P5, el aumento del volumen de preparación de 25 mL a 35 mL también implica un incremento en la cantidad de fármaco asociado a la matriz biopolimérica, lo que podría aumentar su velocidad de difusión. Sin embargo, se observó que, si bien la película P6 se preparó usando un volumen de 45 mL, este film mantuvo un comportamiento de liberación de tipo Fickiano.



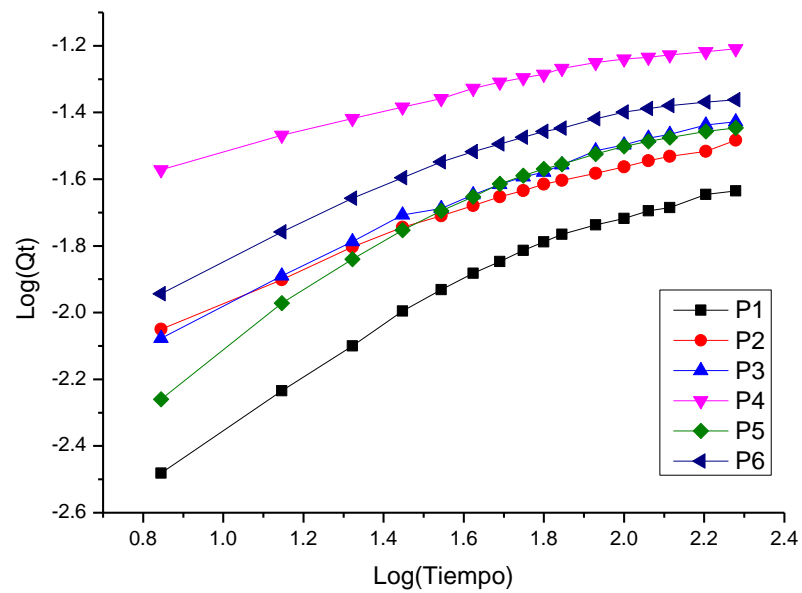
**Figura 26.** *Perfiles de liberación ajustados al modelo de Orden Cero.*



**Figura 27.** *Perfiles de liberación ajustados al modelo de Primer Orden.*



**Figura 28.** *Perfiles de liberación ajustados al modelo de Higuchi.*



**Figura 29.** *Perfiles de liberación ajustados al modelo de Korsmeyer-Peppas.*

**Tabla 10.** *Coefficientes de determinación obtenidos ajustando las curvas de liberación de las películas de CHT-TPP-CLX a los diversos modelos matemáticos.*

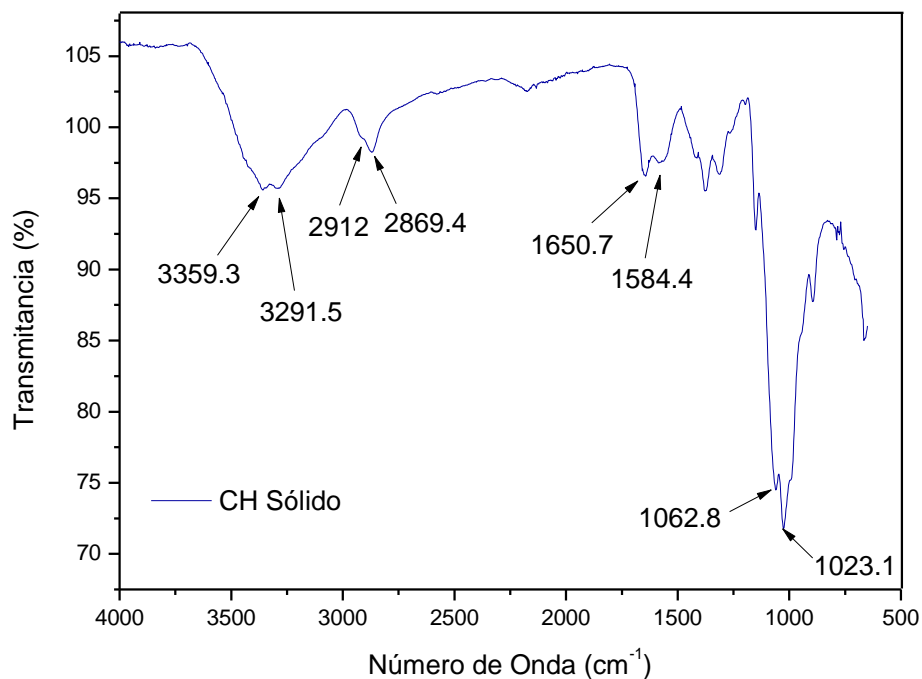
Película	Coeficiente de Determinación (R <sup>2</sup> )				Constante de difusión Korsmeyer-Peppas (n)
	Orden Cero	Primer Orden	Modelo Higuchi	Modelo Korsmeyer-Peppas	
<b>P1</b>	0.84572	0.64395	0.95694	0.95621	0.57716
<b>P2</b>	0.84307	0.6944	0.95456	0.97406	0.37884
<b>P3</b>	0.85862	0.69571	0.96428	0.97509	0.44333
<b>P4</b>	0.77338	0.68413	0.91276	0.97251	0.25424
<b>P5</b>	0.79456	0.59364	0.92713	0.93099	0.53543
<b>P6</b>	0.76711	0.61868	0.90889	0.94513	0.39379

#### **4.3.4. Caracterización instrumental de las películas de quitosano cargadas con clorhexidina**

##### **4.3.4.1. Espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FTIR)**

En la Figura 30 se muestra el espectro del polímero Quitosano puro utilizado para la preparación de los films en su estado sólido (polvo). Se observa una banda ancha a  $3359.3\text{ cm}^{-1}$  que se debe a la presencia de los grupos hidroxilo (Escobar Sierra, Ossa Orozco, & Alexander Ospina, 2013) y a  $3291.5\text{ cm}^{-1}$  se encuentra la señal correspondiente al estiramiento vibracional del enlace N-H (Carlos Salazar, 2013; Dhanikula & Panchagnula, 2004), mientras que en la zona de C-H el pico ubicado a  $2912\text{ cm}^{-1}$  es asignado al estiramiento en modo asimétrico del grupo CH<sub>2</sub> y el que está a  $2869.4\text{ cm}^{-1}$  se asocia su estiramiento en modo simétrico (Dhanikula & Panchagnula, 2004) Por otro lado, la banda a  $1650.7\text{ cm}^{-1}$  le corresponde a la vibración de

estiramiento del grupo C=O de la amida (Abruzzo et al., 2013), y la banda a 1584.4  $\text{cm}^{-1}$  se le asigna a la flexión de N-H de los grupos amino (Abruzzo et al., 2013; Martins et al., 2012). El pico ubicado a 1062.8  $\text{cm}^{-1}$  es asignado a la flexión del enlace carbono-oxígeno (COC) presente en el polímero quitosano (Shabnam, Mohammad, Seyed, & Behnam, 2018). Finalmente, la banda a 1023.1  $\text{cm}^{-1}$  se le atribuye al estiramiento del enlace C-O de los alcoholes primarios (Martins et al., 2012). La Tabla 11 muestra el resumen de los principales picos característicos del quitosano.



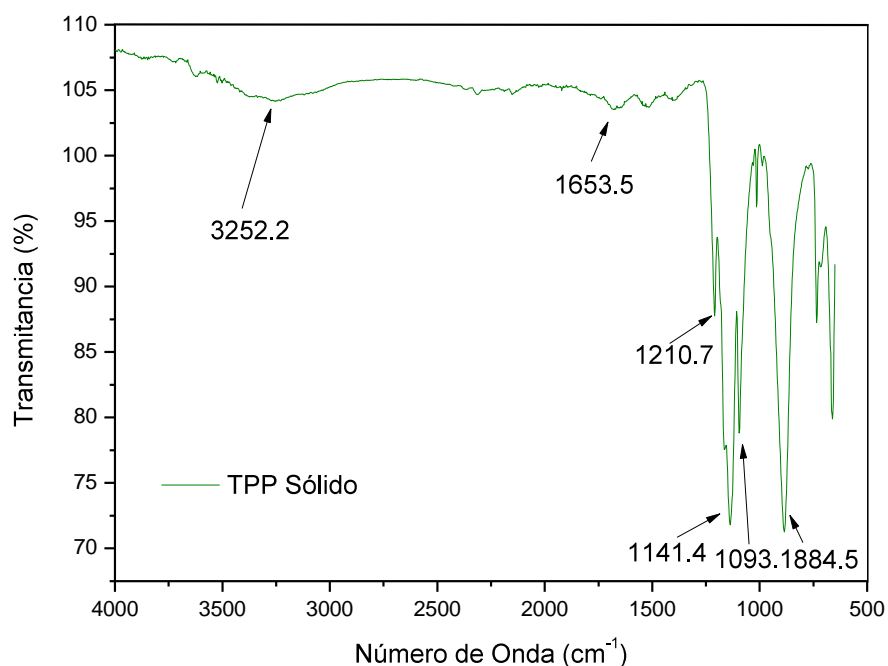
**Figura 30.** Espectro FTIR-ATR del biopolímero Quitosano.



**Tabla 11.** *Bandas y picos característicos del espectro FTIR-ATR del quitosano.*

<b>Tipo de Vibración</b>	<b>Número de onda (cm<sup>-1</sup>)</b>
Estiramiento -OH	3359.3
Estiramiento N-H	3291.5
Estiramiento asimétrico CH <sub>2</sub>	2912
Estiramiento simétrico CH <sub>2</sub>	2869.4
Estiramiento C=O de la amida	1650.7
Flexión N-H de la amina	1584.4
Flexión C-O-C	1062.8
Estiramiento C-O	1023.1

También se caracterizó el Tripolifosfato de Sodio y su espectro correspondiente se muestra en la Figura 31. Los picos ubicados a 3252.2 cm<sup>-1</sup> y a 1653.5 cm<sup>-1</sup> se deben a las vibraciones de tensión y flexión del grupo hidroxilo, respectivamente (Carlos Salazar, 2013), la presencia de estos picos débiles podría asociarse a la humedad. El pico a 1210.7 cm<sup>-1</sup> se atribuye al estiramiento asimétrico del grupo PO<sub>2</sub> (Gierszewska, Ostrowska-Czubenko, & Chrzanowska, 2018) y también puede corresponder al estiramiento P=O (Carlos Salazar, 2013; Shafiei et al., 2019)), en cuanto al pico ubicado a 1141.4 cm<sup>-1</sup> se refiere al estiramiento simétrico y asimétrico de PO<sub>2</sub> (Martins et al., 2012). El pico a 1093.1 cm<sup>-1</sup> es relativo tanto al estiramiento simétrico como asimétrico del grupo PO<sub>3</sub> (Martins et al., 2012; Mazancová et al., 2018). Finalmente, el pico a 884.5 cm<sup>-1</sup> está asociado al estiramiento asimétrico del enlace P-O (Martins et al., 2012; Mazancová et al., 2018) presente en el enlace P-O-P (Safdar et al., 2019).



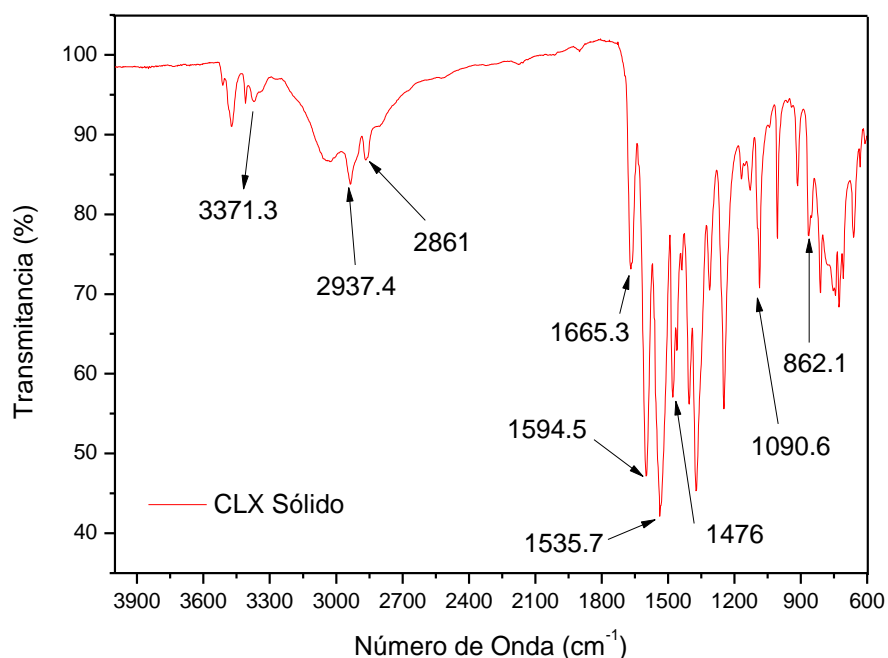
**Figura 31.** Espectro FTIR-ATR del Tripolifosfato de Sodio.

**Tabla 12.** Bandas y picos característicos en el espectro FTIR-ATR del TPP.

Tipo de Vibración	Número de onda (cm <sup>-1</sup> )
Estiramiento asimétrico P=O	1210.7
Estiramiento a/s O-P=O	1141.4
Estiramiento a/s PO <sub>3</sub>	1093.1
Estiramiento asimétrico P-O-P	884.5

Por otro lado, en la Figura 32 se muestra el espectro del fármaco Clorhexidina. La banda alrededor de 3371.5 cm<sup>-1</sup> se atribuye al estiramiento del grupo N-H perteneciente la imina (Onnainty et al., 2016; Vieira et al., 2019). En el rango 2850-3000 cm<sup>-1</sup> (2937.4 cm<sup>-1</sup> y 2861 cm<sup>-1</sup>) se encuentra el estiramiento C-H del alqueno aromático (Daud, Tapsir, Idris, Nasution, & Saidin, 2019), también se le atribuye al

estiramiento  $\text{CH}_2\text{C-H}$  de los grupos metileno de la clorhexidina (Onnainty et al., 2016). Por otro lado, el pico a  $1665.3\text{ cm}^{-1}$  corresponde al estiramiento  $\text{C=N}$  (Balasankar Meera Priyadarshini et al., 2017; Kim et al., 2016; Shabnam et al., 2018) característico de los derivados de la biguanida (Tokajuk et al., 2017). El espectro muestra a  $1594.5\text{ cm}^{-1}$  el estiramiento relativo al grupo  $-\text{NH}$  (Balasankar Meera Priyadarshini et al., 2017; B. M. Priyadarshini et al., 2016) de la amina (Vieira et al., 2019) y el pico ubicado a  $1535.7\text{ cm}^{-1}$  se asocia a la flexión aromática  $\text{C=C}$  (Kim et al., 2016; Onnainty et al., 2016), así como también se encuentra la flexión correspondiente al grupo  $\text{N-H}$  de la amina (Kim et al., 2016). Finalmente, los picos ubicados en  $1090.6\text{ cm}^{-1}$  y  $862.1\text{ cm}^{-1}$  se deben a las vibraciones del grupo aromático (Ar) con el Cl y CH del anillo respectivamente (Vieira et al., 2019).

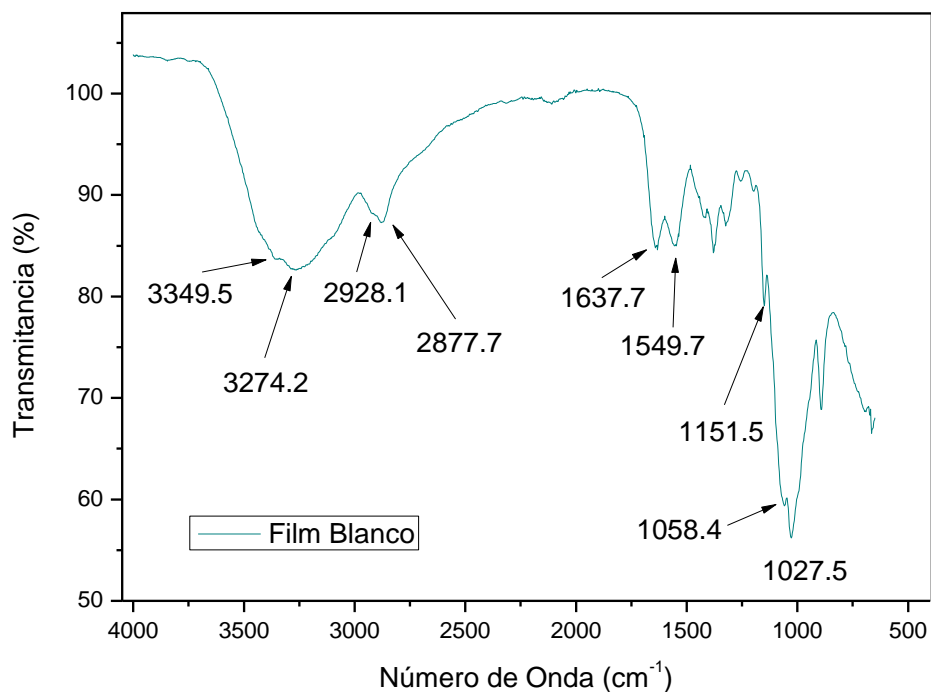


**Figura 32.** Espectro FTIR-ATR del fármaco Clorhexidina.

**Tabla 13.** *Bandas y picos característicos en el espectro FTIR-ATR del CLX.*

<b>Tipo de Vibración</b>	<b>Número de onda (cm<sup>-1</sup>)</b>
Estiramiento N-H de la imina	3300-3500
Estiramiento C-H del alqueno aromático	2850-3000
Estiramiento C=N de la biguanida	1665.3
Estiramiento -NH de la amina	1594.5
Flexión aromática C=C	1535.7
Vibración Ar-Cl	1090.6
Vibración CH del Ar	862.1

Para realizar una adecuada comparación entre las películas preparadas, en la Figura 33 se muestra el espectro del Blanco (película de CHT reticulado con TPP 0.1% y glicerina 10% sin presencia de fármaco). El espectro del blanco comparado con el espectro del quitosano en estado sólido muestra ciertos desplazamientos de los picos representativos. La banda amplia entre 2800 cm<sup>-1</sup> y 3500 cm<sup>-1</sup> es resultado de la presencia de humedad residual contenida en la Glicerina (Dhanikula & Panchagnula, 2004). Los picos a 1637.7 cm<sup>-1</sup> y 1549.7 cm<sup>-1</sup> pueden ser atribuidos al enlace entre los grupos -OH de la parte negativa del TPP con los grupos amino del biopolímero quitosano (Nasution et al., 2018). Además, el pico ubicado a 1151.5 cm<sup>-1</sup> se asocia al P=O del reticulante.



**Figura 33.** Espectro FTIR- ATR de la película polimérica Blanco (sin CLX).

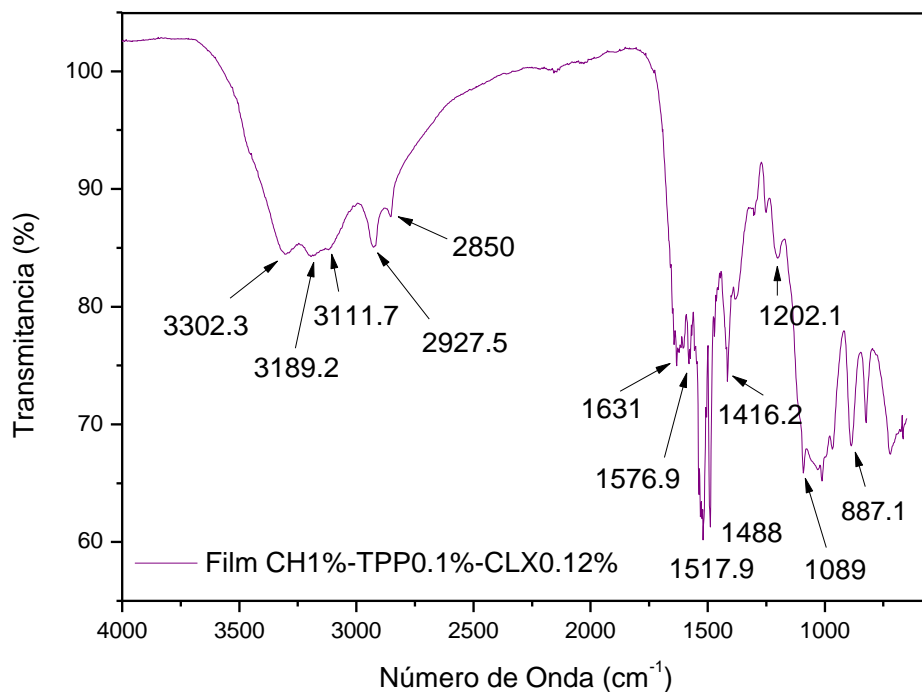
**Tabla 14.** Bandas y picos característicos en el espectro FTIR-ATR de la película polimérica Blanco (sin CLX en su composición) reticulada con TPP 0.1%.

Tipo de Vibración	Número de onda (cm <sup>-1</sup> )
Estiramiento N-H / -OH	3274.2
Estiramiento asimétrico del CH <sub>2</sub>	2928.1
Estiramiento simétrico del CH <sub>2</sub>	2877.7
Estiramiento del C=O de la amida	1637.7
Flexión N-H de la amina	1549.7
Estiramiento P=O	1151.5
Estiramiento R-O-P-O	1058.4

Finalmente, el consolidado de los picos y bandas ya identificados se puede observar en el espectro de la película preparada y cargada (ver Figura 34), esta al ser comparada con el espectro del film blanco muestra ciertos desplazamientos de los picos representativos. Al añadir CLX, la absorción se produjo a un menor número de onda en la región 3180-3305  $\text{cm}^{-1}$  indicando que existe interacción de tipo puente de hidrógeno entre los grupos hidroxilo y amino del quitosano, y los grupos amino del fármaco CLX (Khan, Mujahid, Gul, & Hussain, 2019; Ortega, 2017). Los picos 3349.5  $\text{cm}^{-1}$  y 3274.2  $\text{cm}^{-1}$  se desplazaron a 3302.3  $\text{cm}^{-1}$  y 3189.2  $\text{cm}^{-1}$  respectivamente. Mientras que el pico ubicado a 3302.3  $\text{cm}^{-1}$  le corresponde a la frecuencia de estiramiento vibracional de N-H de las aminas primarias (Ortega, 2017) y O-H presentes en el quitosano; la vibración de estiramiento debido al doble enlace del grupo C=O de la amida en la película biopolimérica se desplazó a 1631  $\text{cm}^{-1}$ . De la misma manera, el pico debido a la flexión del N-H se desplazó de 1549.7  $\text{cm}^{-1}$  a 1576.9  $\text{cm}^{-1}$ .

**Tabla 15.** *Bandas y picos característicos en el espectro FTIR-ATR de la película polimérica cargada con CLX 0.12%.*

<b>Tipo de Vibración</b>	<b>Número de onda (<math>\text{cm}^{-1}</math>)</b>
Estiramiento N-H / -OH	3302.3, 3189.2
Estiramiento asimétrico del $\text{CH}_2$ / C-H del alqueno aromático	2927.5
Estiramiento simétrico del $\text{CH}_2$	2850
Estiramiento del C=O de la amida / C=N biguanida	1631
Flexión N-H de la amina / Flexión aromática C=C	1576.9
Estiramiento P=O	1202.1
Estiramiento R-O-P-O / Vibración Ar-Cl	1089
Estiramiento P-O / Vibración CH del Ar	887.1

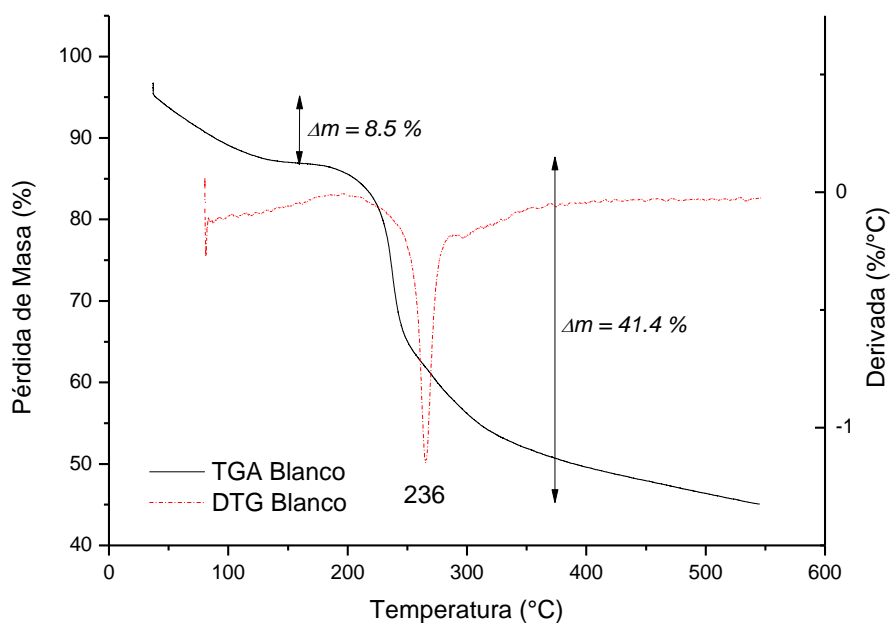


**Figura 34.** Espectro FTIR-ATR de la película biopolimérica con CLX 0.12%.

#### 4.3.4.2. Análisis termogravimétrico: TGA y DTG

Una característica importante del quitosano es la presencia de grupos polares en su estructura química, además las moléculas de agua se absorben en el biopolímero durante la formación de los puentes de hidrógeno (Mukherjee et al., 2018). La Figura 35 muestra el termograma de la película Blanco donde se aprecian dos etapas en que se pierde masa significativamente. La primera pérdida másica se observa entre 35-150 °C y esta se debe a la evaporación de la humedad, es decir, a la pérdida de moléculas de agua unidas al quitosano (Safdar et al., 2019; Tripathi, Mehrotra, & Dutta, 2009), este primera variación de masa equivale a 8.5%. Finalmente, la siguiente pérdida considerable de masa es de 41.4% y se da aproximadamente entre 200-400 °C debido

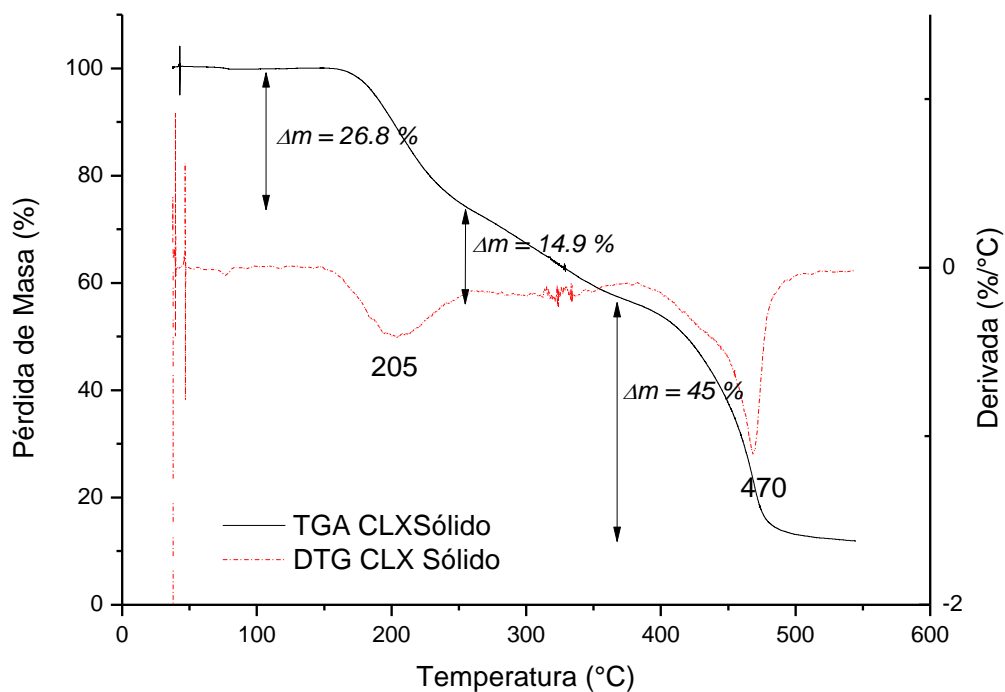
a la degradación de la película de quitosano (eliminación de compuestos volátiles (Mukherjee et al., 2018) y ruptura de enlaces glicosídicos (Moeini et al., 2018)).



**Figura 35.** TGA y DTG de la película polimérica Blanco (sin CLX).

Por otro lado, el termograma correspondiente a la Clorhexidina en estado sólido (Figura 36) presenta tres eventos de pérdida de masa (Boaro et al., 2019; Gooch, Johnston, & Johnston, 2008), por un lado la curva TGA muestra alta estabilidad en el rango de 35 a 170 °C seguida de un proceso de descomposición (Cortés, Sinisterra, Avila-Campos, Tortamano, & Rocha, 2001) que va de 170 a 250 °C donde se pierde un 26.8% de la masa. Mientras que, en el rango de temperatura de 250-350 °C la pérdida de masa se debe posiblemente debido al inicio de la degradación de la clorhexidina. Finalmente, en el rango 400-500 °C se pierde un porcentaje acumulado de 86.7%.

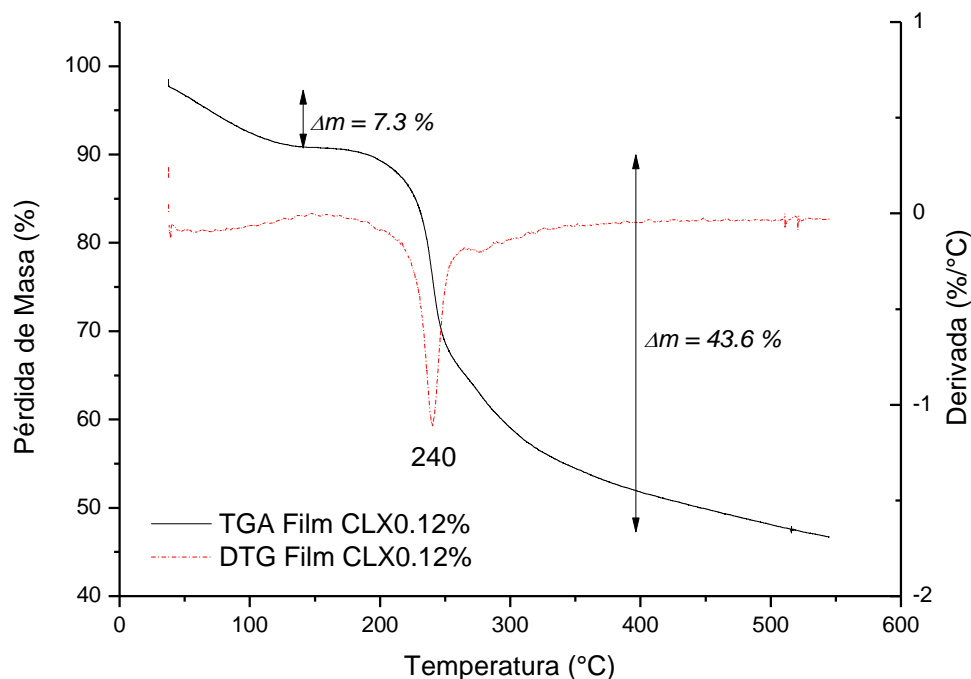




**Figura 36.** TGA y DTG del fármaco Clorhexidina.

Asimismo, la curva TGA de la película de quitosano cargada con CLX 0.12% (ver Figura 37) muestra pérdida de masa en solo dos rangos de temperatura de manera similar al comportamiento del blanco, posiblemente dado que la cantidad de fármaco en comparación con la del biopolímero es notoriamente inferior. En la primera etapa de 35 a 180 °C, la pérdida de masa de 7.3% y esta corresponde a la evaporación del agua presente en el film, mientras que en la segunda etapa, el 43.6% de masa es perdida de 200 a 400 °C correspondiente a la descomposición (Ambrogi et al., 2017) y oxidación del fármaco CLX residual (Onnainty et al., 2016). Sin embargo, esta última pérdida de masa ocurre a una temperatura ligeramente superior, desplazamiento de 236 °C en la película blanco a 240 °C en la película cargada. Lo que podría deberse a

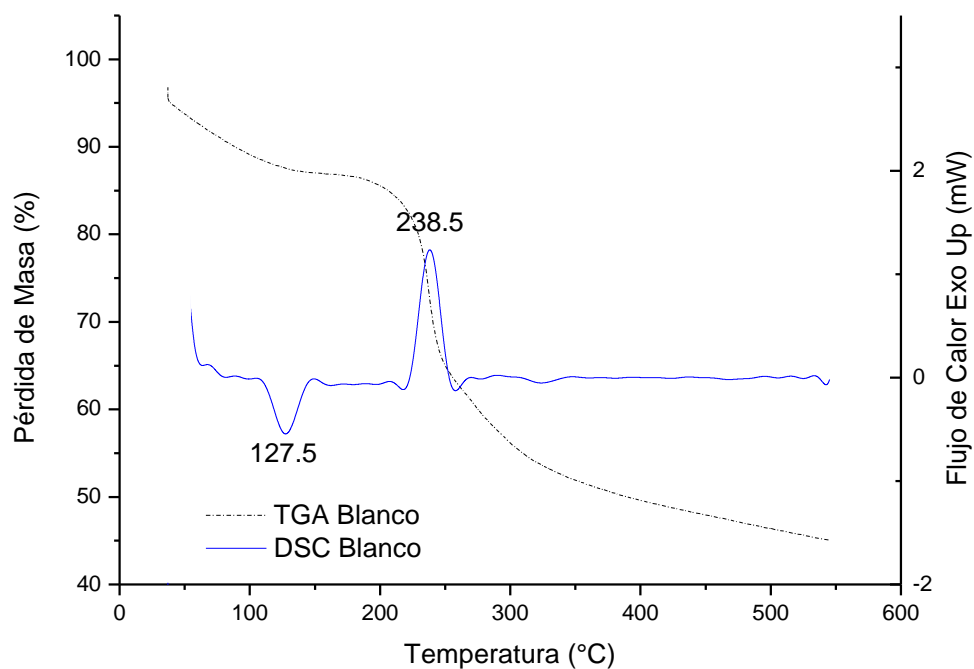
un mayor ordenamiento como consecuencia de la interacción existente entre el quitosano y la clorhexidina, confiriéndole un poco más de estabilidad al film cargado.



**Figura 37.** TGA y DTG de la película polimérica cargada con CLX 0.12%.

#### 4.3.4.3. Análisis termogravimétrico: TGA y DSC

En la Figura 38 se muestra el termograma TGA y DSC del Blanco. La película sin fármaco presenta un pico exotérmico a 238.5 °C donde se inicia la descomposición térmica del quitosano y usualmente se considera como punto de fusión del film polimérico (Tripathi et al., 2009; Wu et al., 2019). El pico endotérmico a 127.5 °C se le atribuye a la pérdida de agua, energía requerida para evaporar el agua presente en el film (Wu et al., 2019).

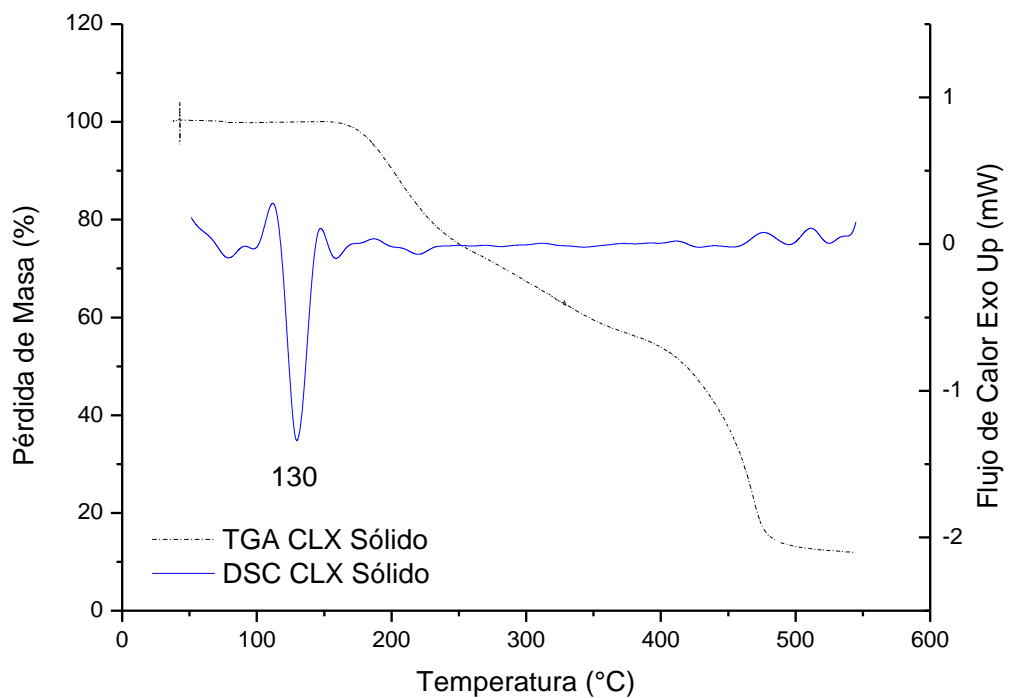


**Figura 38.** TGA y DSC de la película polimérica Blanco.

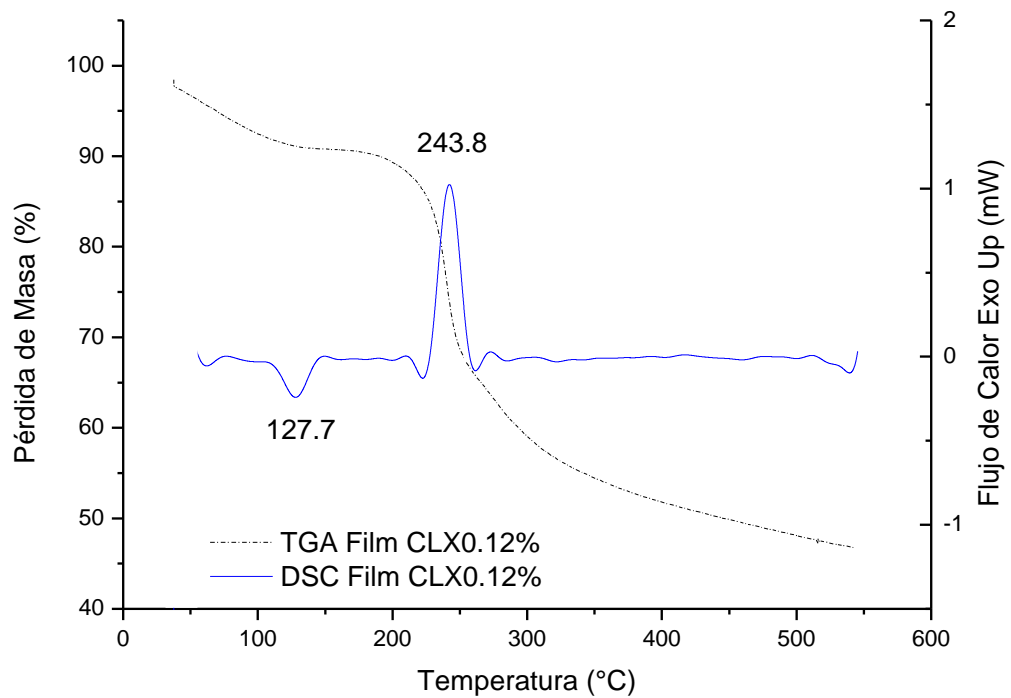
De la misma manera, en la Figura 39 se muestra el gráfico obtenido del análisis termogravimétrico del fármaco CLX puro en estado sólido empleado para la preparación de las películas cargadas. En este caso, el pico endotérmico agudo característico del fármaco CLX ubicado a 130 °C corresponde a su punto de fusión (Auda et al., 2017; Balasankar Meera Priyadarshini et al., 2017).

Finalmente, la Figura 40 muestra el resultado obtenido al analizar la película polimérica cargada con el fármaco (CLX al 0.12%). A simple vista, el gráfico se asemeja al blanco, mostrando los picos (endotérmico y exotérmico) ligeramente desplazados a la derecha. Haciendo una comparación entre las curvas DSC del blanco y la película cargada se observa un pequeño desplazamiento de sus picos principales,

uno de 127.5 a 127.7 °C y el otro de 238.5 a 243.8 °C, esto puede deberse a la incorporación del fármaco a la matriz (Safdar et al., 2019) mediante interacciones electrostáticas puente de hidrógeno presentes entre los grupos NH<sub>2</sub> y OH del quitosano y los NH del fármaco (Khan et al., 2019).



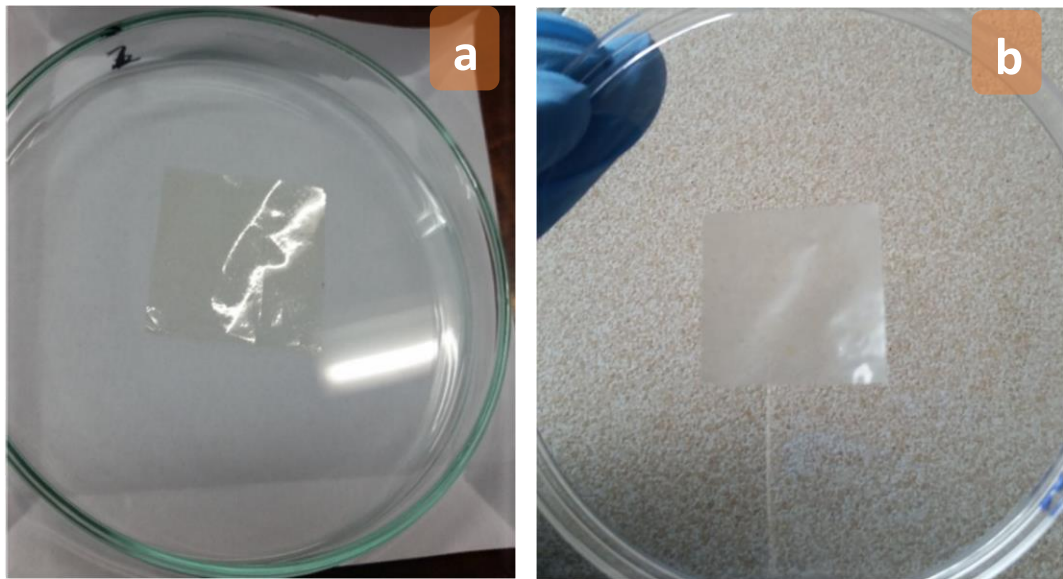
**Figura 39.** TGA y DSC del fármaco Clorhexidina.



**Figura 40.** TGA y DSC de la película polimérica cargada con CLX 0.12%.

#### 4.3.4.4. Microscopía electrónica de barrido (SEM)

En la Figura 41 se pueden apreciar las películas preparadas de CHT-TPP y CHT-TPP-CLX una vez secas y cortadas a 2cm x 2cm, donde es posible notar que la película Blanco es transparente y presenta una superficie más lisa que refleja la luz incidente en comparación a la película cargada con el fármaco clorhexidina 0.12% que se ve opaca y mate. Estas diferencias en la apariencia pueden evidenciar el éxito del proceso de cargado.



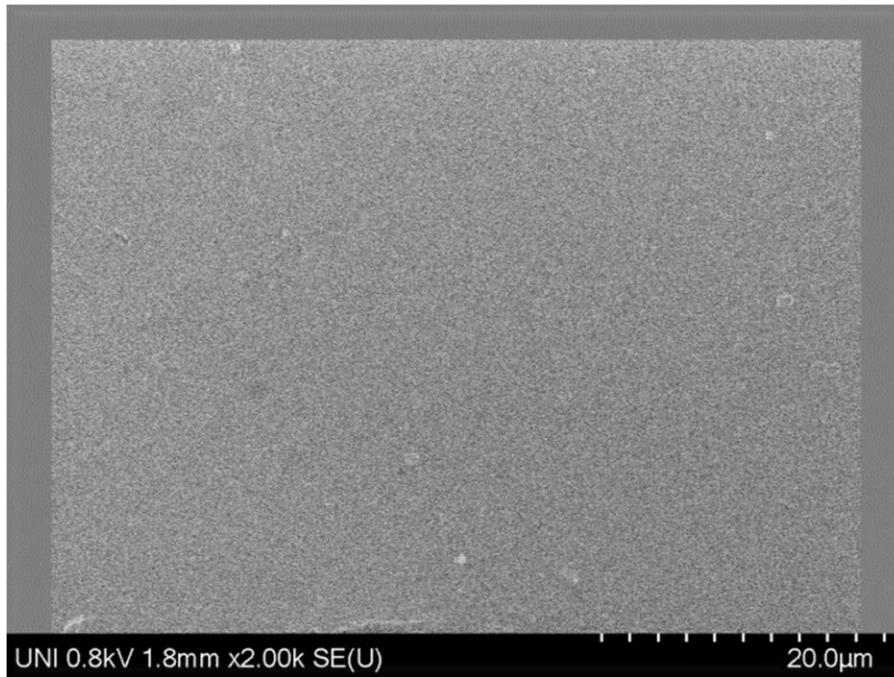
**Figura 41.** (a) Película CHT-TPP (blanco sin fármaco) seca y reticulada. (b) Película CHT-TPP-CLX seca y reticulada.

Por otro lado, la imagen SEM de la película denominada Blanco (ver Figura 42), muestra una apariencia uniforme y lisa que coincide con el aspecto de la película preparada. Esta observación podría indicar que la característica plana y homogénea en la morfología de la película se debe al entrecruzamiento electrostático entre el CHT y TPP. La interacción puente de hidrógeno entre la superficie de la película de quitosano con el tripolifosfato de sodio, interacciones entre los grupos amino del biopolímero y el oxígeno del grupo fosfato perteneciente al entrecruzante, es prácticamente homogénea (no presenta imperfecciones o irregularidades superficiales en los films) (Carlos Salazar, 2013).

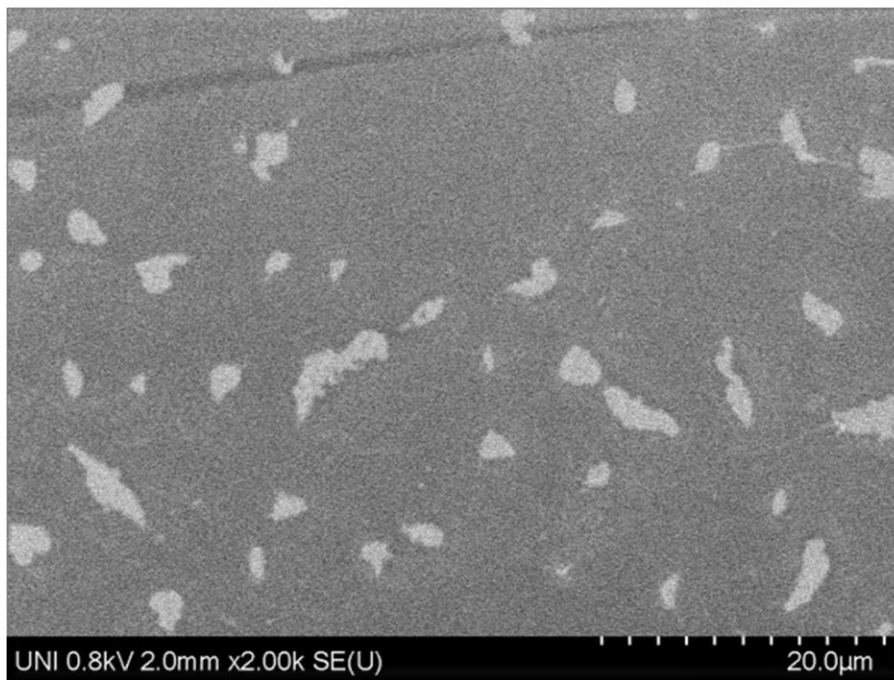
Sin embargo, las imágenes SEM restantes (Figuras 43, 44 y 45) presentaron rugosidades que también se manifiestan en el aspecto del film al mostrarlo sin brillo y opaco. La apariencia granular de las películas cargadas es una posible consecuencia

de la cristalización del fármaco, ocasionando la formación de poros profundos en la superficie durante el proceso de cargado, esto se asemejaría más a una matriz heterogénea.

Asimismo, en las películas CHT-TPP-CLX cargadas con fármaco a diferentes concentraciones (0.08%, 0.12% y 0.16%) se observan superficies irregulares con presencia de aglomerados, lo cual podría ser consecuencia de la repulsión de cargas entre el fármaco y la matriz polimérica, dado que el quitosano es un biopolímero catiónico con grupos  $\text{NH}_3^+$  y el fármaco CLX, a su vez, es una biguanida bicatiónica que también tiene grupos  $\text{NH}_3^+$  en su estructura (Ortega, 2017). Las imágenes de las películas preparadas muestran al fármaco CLX con una apariencia granular y también se encuentra en forma de hojuelas. Las protuberancias de diferentes tamaños y formas que se observan son posiblemente originadas en el proceso de cargado dado que estas rugosidades se incrementan conforme lo hace el porcentaje de CLX en su composición, a consecuencia de la interacción electrostática ocurrida principalmente entre los grupos amino protonados del CHT y la densidad de carga negativa presente la estructura del fármaco CLX.

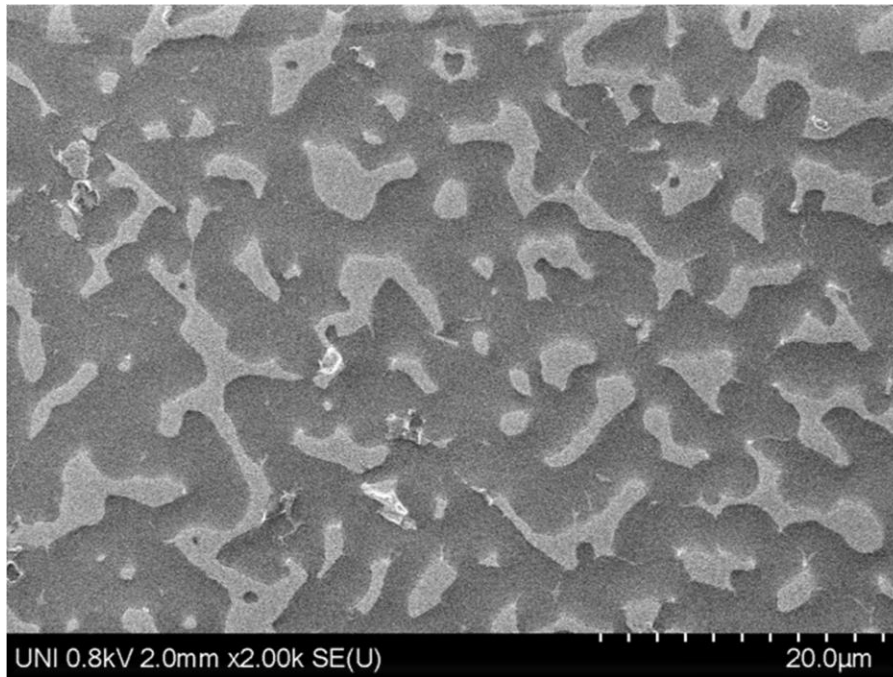


**Figura 42.** SEM de la película de CHT-TPP (Blanco sin CLX).

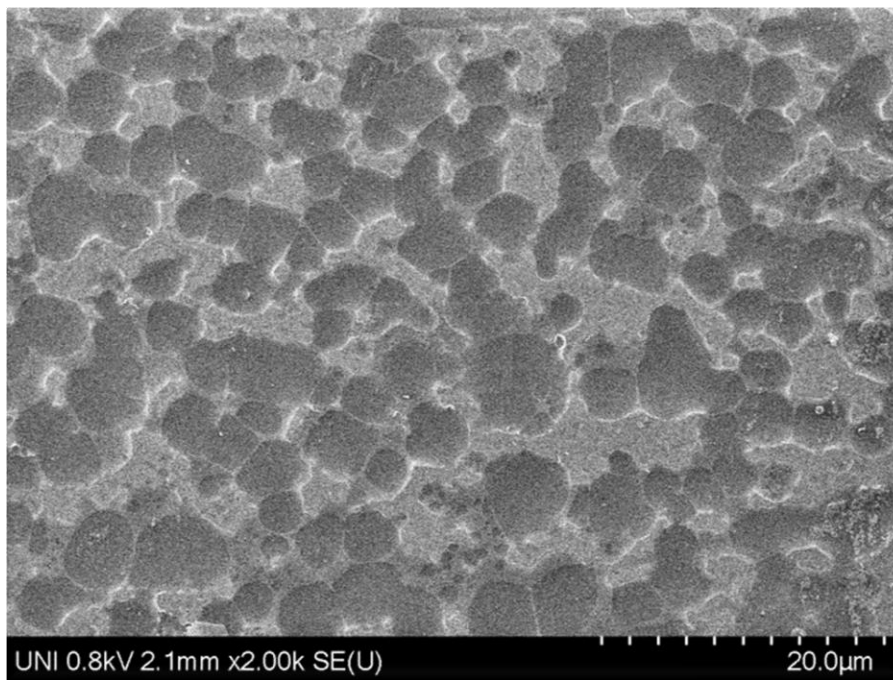


**Figura 43.** SEM de la película de CHT-TPP-CLX al 0.08%.





**Figura 44.** SEM de la película de CHT-TPP-CLX al 0.12%.



**Figura 45.** SEM de la película de CHT-TPP-CLX al 0.16%.

#### 4.4. Ensayo microbiológico: método de difusión en agar (Bauer-Kirby)

Para este estudio, los ensayos microbiológicos fueron realizados por triplicado (las Figuras 46 y 47 muestran las placas A, B y C) obteniendo resultados coherentes entre sí. Asimismo, todas las pruebas se llevaron a cabo cerca de un mechero Bunsen con la finalidad de asegurar la asepticidad del ambiente de trabajo. Las zonas de inhibición formadas alrededor de los discos biopoliméricos de la Tabla 16 ( $\varphi = 6$  mm), fueron medidas después del periodo de incubación usando luz reflejada. El diámetro de cada zona de inhibición (circunferencia formada alrededor del disco), se midió siguiendo una línea recta entre los alrededores del halo de inhibición (donde se reduce la densidad fúngica) pasando a través del centro del disco y se realizó tomando el promedio de tres puntos aleatorios (Kloster et al., 2018; Tapia Castañeda, 2019).

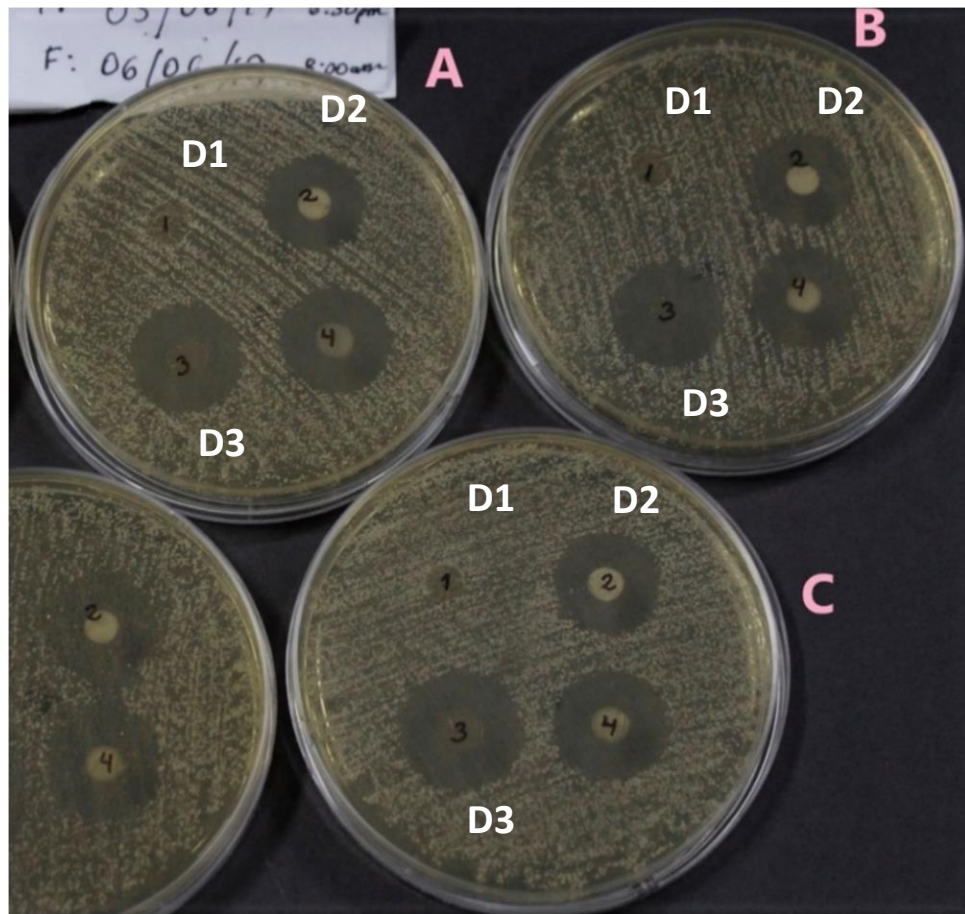
**Tabla 16.** Especificaciones técnicas de las películas del estudio microbiológico.

Nombre	Descripción	Especificaciones			
		Volumen de preparación (mL)	CLX (%)	TPP (%)	Ác. Acético (%)
D1	Blanco	25	-	0.1	1
D2	Film-35	35	0.12	0.1	1
D3	Film-25	25	0.12	0.1	1
D5	Film-45	45	0.12	0.1	1
D6	Disco embebido con solución Ácido Acético	-	-	-	1
D7	Disco embebido con solución CLX disuelta en Ácido Acético	-	0.12	-	1

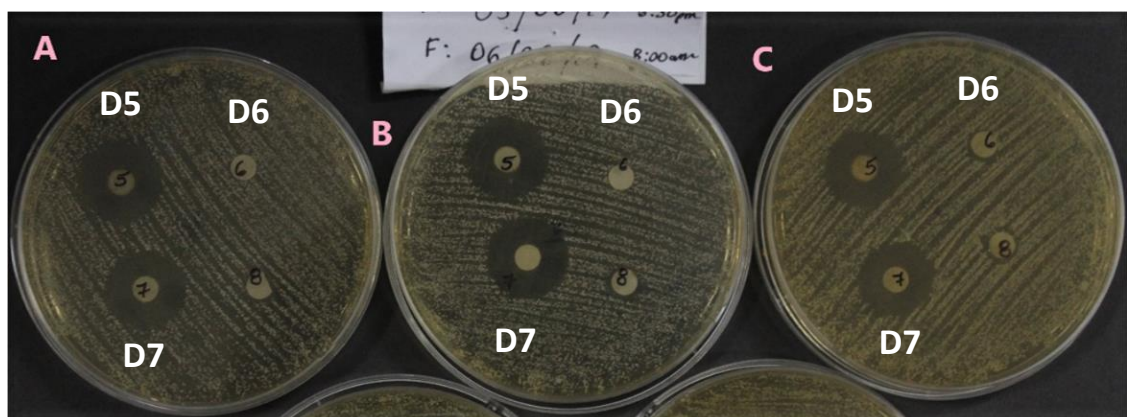
El estudio del disco D3 conteniendo el fármaco CLX al 0.12% con un volumen de preparación de 25 mL, mostró halos bien definidos indicando que la película preparada presentó actividad antifúngica significativa contra el hongo *Candida albicans*. La zona de inhibición obtenida fue de un tamaño considerable de 22.7 mm de diámetro en promedio, de la misma manera, ocurrió con los discos D2 y D5 que también mostraron inhibición del crecimiento de la levadura, aunque estos tuvieron un diámetro menor de 20.3 mm y 21.7 mm, respectivamente. A pesar de contar con volúmenes de preparación superiores, y en consecuencia mayor cantidad de fármaco en su composición, la acción antifúngica fue óptima para el disco D3.

Si bien la acción antifúngica del fármaco Clorhexidina ya se conoce, el análisis de D7 corroboró que el microorganismo *C. albicans* es sensible a la acción de la clorhexidina y a su vez, evidenció que el medicamento fue liberado con éxito a partir de la matriz biopolimérica utilizada hacia el medio inoculado con el hongo. En contraste, la película polimérica D1 sin fármaco en su composición (blanco), no fue capaz de inhibir por sí misma el crecimiento de la levadura *Candida*, este disco no generó un halo de diámetro considerable. Por otro lado, un resultado similar se obtuvo con D6 (disco embebido en solución de ácido acético), demostrando así que la solución de ácido acético 1% que es utilizada para la disolución del fármaco no presenta actividad antifúngica por sí sola.

Cabe mencionar que el tamaño del halo de inhibición depende principalmente de la capacidad de difusión del fármaco probado en el medio de agar inoculado (Estrada-Villegas, Del Rio-De Vicente, Argueta-Figueroa, & Gonzalez-Perez, 2020). Los diámetros obtenidos y sus promedios se muestran a detalle en la Tabla 17.



**Figura 46.** Actividad antimicrobial de las películas de CHT preparadas contra el hongo *Candida albicans* (por triplicado) para los discos D1, D2 y D3.



**Figura 47.** Actividad antimicrobial de las películas de CHT preparadas contra el hongo *Candida albicans* (por triplicado) para los discos D5, D6 y D7.

**Tabla 17.** *Diámetros de los halos de inhibición obtenidos por el método difusión en agar de Bauer-Kirby.*

<b>Disco</b>	<b>Diámetro (mm)</b>			
	<b>Placa "A"</b>	<b>Placa "B"</b>	<b>Placa "C"</b>	<b>Promedio</b>
<b>D1</b>	8	8	7	7.7
<b>D2</b>	20	20	21	20.3
<b>D3</b>	23	22	23	22.7
<b>D5</b>	22	22	21	21.7
<b>D6</b>	7	6	7	6.7
<b>D7</b>	21	21	20	20.6

## CONCLUSIONES

Se obtuvieron con éxito las películas preparadas a base del biopolímero quitosano, reticuladas con tripolifosfato de sodio, usando glicerina como plastificante, y cargadas con el fármaco clorhexidina a manera de sistema de liberación. Se probó la eficacia de esta como fungicida frente al hongo *Candida albicans*.

- La caracterización del quitosano empleado en este estudio abarcó la determinación de su grado de desacetilación de 71.04% usando el método de valoración conductimétrica, y la determinación de su peso molecular de 698.13 kDa se realizó por el método de la viscosimetría.
- Se prepararon películas de quitosano al 1% w/v cargadas con clorhexidina 0.12% utilizando glicerina al 10% v/v a modo de plastificante y estas fueron reticuladas con tripolifosfato de sodio 0.1% w/v. Para la preparación de los films se empleó el método casting usando placas Petri de acrílico como molde y el secado se llevó a cabo a 37 °C.
- Se caracterizaron las películas biopoliméricas cargadas con fármaco mediante el uso de métodos instrumentales. La técnica FTIR mostró picos y bandas característicos que confirmaron la presencia del fármaco en la matriz

biopolimérica, los estudios termogravimétricos TGA y DSC mostraron pérdidas de masa en temperaturas correspondientes a la pérdida de agua y a la degradación propia del quitosano y del fármaco. Mientras que, un estudio de su morfología usando SEM evidenció cambios en la superficie de la película cargada con respecto al blanco sin fármaco.

- Se determinó que el estudio del grado de hinchamiento presentó una cinética que sigue un comportamiento de segundo orden, es decir, la cinética se explica con la relajación de las cadenas biopoliméricas.
- La liberación *in vitro* utilizando como medio de liberación el agua desionizada, a temperatura controlada obtuvo como resultado 80-94% de fármaco liberado en la primera hora de exposición al medio seleccionado. Los perfiles de liberación mostraron que, a mayor volumen de preparación del film le corresponde menor liberación de CLX, lo que se explica considerando que una película de mayor volumen de preparación a pesar de presentar una mayor cantidad de CLX contenida en las películas de volumen 35 mL y 45 mL, también involucra un mayor camino por recorrer para la salida del fármaco en comparación con el film de 25 mL. Además, se encontró que una mayor cantidad de fármaco es liberado conforme la temperatura de liberación se incrementa, es decir, a 37 °C y 47 °C se produce un aumento en el movimiento de las cadenas del polímero favoreciendo la liberación, lo que no ocurre con la misma intensidad a 27 °C. Del mismo modo, respecto al incremento en el grado de reticulación de los films, se halló que la liberación de fármaco se incrementó en la película reticulada con la solución de tripolifosfato de potasio de menor concentración, esto se puede explicar debido a que las redes formadas entre el

polímero y el entrecruzante son mayores conforme se incrementa la concentración de TPP, manifestándose en un impedimento de salida del fármaco para una película reticulada con TPP 0.5% que para un film reticulado con TPP 0.1%.

- Se analizaron cuatro modelos cinéticos para el estudio de liberación siendo el más adecuado el modelo de Korsmeyer-Peppas. Donde se tomó como base el coeficiente de determinación más elevado para la película CHT-TPP-CLX,  $R^2$  de 0.97406. La constante de difusión obtenida,  $n = 0.37884$ , en el estudio cinético del film CLX 0.12% mostró que la liberación se produce siguiendo un comportamiento Fickiano, indicando que su cinética de liberación está predominada por la difusión.
- La acción fungicida de la película de quitosano CLX 0.12% contra el hongo *Candida albicans* quedó evidenciada mediante el método de difusión en agar de Bauer-Kirby. Las pruebas realizadas mostraron un halo de inhibición con un diámetro promedio de 22.7 mm.



## RECOMENDACIONES

Si bien este trabajo de investigación abrió un puente entre la química biopolimérica y el campo farmacéutico bucal, se recomienda continuar la búsqueda de más formas para aprovechar las propiedades del quitosano y aplicarlas a fin de mejorar los efectos positivos de su utilización ya existentes en la actualidad.

Esta tesis solo abarcó un inicio del estudio, sin embargo, para llegar a una real aplicación en la medicina oral aún queda un amplio camino por recorrer. Sin ir muy lejos, el siguiente paso para complementar este trabajo de investigación podría involucrar el uso de saliva sintética como medio de liberación a fin de poder observar el comportamiento del vehículo de liberación biopolimérico en un entorno más cercano al real antes de pasar a realizar ensayos *in vivo*.

Otro punto por considerar en investigaciones futuras una vez conocido comportamiento del sistema de liberación es ajustar la concentración de clorhexidina de la etapa de preparación, tal que se libere una cantidad determinada de dicho medicamento en un tiempo previsto, esto implicaría un nivel de control superior que podría ser de gran utilidad en su uso potencial a nivel industrial.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abruzzo, A., Bigucci, F., Cerchiara, T., Saladini, B., Gallucci, M. C., Cruciani, F., ... Luppi, B. (2013). Chitosan/alginate complexes for vaginal delivery of chlorhexidine digluconate. *Carbohydrate Polymers*, *91*(2), 651–658. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.08.074>
- Ahmed, T. A., & Aljaeid, B. M. (2016). Preparation, characterization, and potential application of chitosan, chitosan derivatives, and chitosan metal nanoparticles in pharmaceutical drug delivery. *Drug Design, Development and Therapy*, *10*, 483–507. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S99651>
- Ali, A., & Ahmed, S. (2018). A review on chitosan and its nanocomposites in drug delivery. *International Journal of Biological Macromolecules*, *109*, 273–286. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.12.078>
- Ambrogi, V., Pietrella, D., Nocchetti, M., Casagrande, S., Moretti, V., De Marco, S., & Ricci, M. (2017). Montmorillonite–chitosan–chlorhexidine composite films with antibiofilm activity and improved cytotoxicity for wound dressing. *Journal of Colloid and Interface Science*, *491*, 265–272. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2016.12.058>
- Auda, S. H., Mahrous, G. M., Ibrahim, M. A., Shazly, G. A., & Salem-Bekhit, M. M. (2017). Novel chlorhexidine dermal patches, preparation characterization and antimicrobial evaluation. *Polymer Bulletin*, *74*(10), 3995–4007. <https://doi.org/10.1007/s00289-017-1935-0>
- Aycan, D., Yayla, N. A., & Aydin, Y. A. (2020). Chitosan polyvinyl alcohol blend films for ibuprofen encapsulation: Fabrication, characterization and kinetics. *Polymer Degradation and Stability*, *181*, 109346. <https://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2020.109346>
- Aziz, S. B., Hamsan, M. H., Brza, M. A., Kadir, M. F. Z., Muzakir, S. K., & Abdulwahid, R. T. (2020). Effect of glycerol on EDLC characteristics of chitosan:methylcellulose polymer blend electrolytes. *Journal of Materials Research and Technology*, *9*(4), 8355–8366. <https://doi.org/10.1016/j.jmrt.2020.05.114>
- Balan, B., & Krishna, G. (2018). MC Naushad, et al: Antimicrobial activity of calcium

hydroxide In vitro study of antimicrobial activity of calcium hydroxide mixed with different vehicles against *E. feacalis* and *C. albicans*. *Manipal Journal of Dental Sciences*, 3(2), 22–28.

- Bavarsad, N., Kouchak, M., Varmaziar, M., & Sadeghi-Nejad, B. (2015). Preparation, characterization and evaluation of antifungal efficacy of chitosan/soy phosphatidylcholine topical films containing griseofulvin. *Jundishapur Journal of Natural Pharmaceutical Products*, 10(2). <https://doi.org/10.17795/jjnpp-27562>
- Beattie, W. H., & Booth, C. (1963). Intrinsic viscosity–molecular weight relationship for cis-1,4-polyisoprene. *Journal of Applied Polymer Science*, 7(2), 507–514. <https://doi.org/10.1002/app.1963.070070209>
- Biernasiuk, A., Szyma-Ska, J., Kustra, A., Korona-Glowniak, I., & Malm, A. (2018). In vitro susceptibility of oral candida albicans isolates to chlorhexidine. *Acta Poloniae Pharmaceutica - Drug Research*, 75(3), 795–802.
- Boaro, L. C. C., Campos, L. M., Varca, G. H. C., dos Santos, T. M. R., Marques, P. A., Sugii, M. M., ... Parra, D. F. (2019). Antibacterial resin-based composite containing chlorhexidine for dental applications. *Dental Materials*, 35(6), 909–918. <https://doi.org/10.1016/j.dental.2019.03.004>
- Boutsiouki, C., Frankenberger, R., Lücker, S., & Krämer, N. (2019). Inhibition of secondary caries in vitro by addition of chlorhexidine to adhesive components. *Dental Materials*, 35(3), 422–433. <https://doi.org/10.1016/j.dental.2018.12.002>
- Carlos Salazar, M. (2013). Estudio de Liberación Controlada de Antocianinas a partir de películas de Quitosano Despolimerizado y reticulado con Tripolifosfato de Sodio. <https://doi.org/10.18389/dearq13.2013.14>
- Caroni, J. G., de Almeida Mattos, A. V., Fernandes, K. R., Balogh, D. T., Renno, A. C. M., Okura, M. H., ... Pavinatto, A. (2021). Chitosan-based glycerol-plasticized membranes: bactericidal and fibroblast cellular growth properties. *Polymer Bulletin*, 78(8), 4297–4312. <https://doi.org/10.1007/s00289-020-03310-4>
- Cercenado, E., & Saavedra-Lozano, J. (2009). El antibiograma. Interpretación del antibiograma: conceptos generales (I). *Anales de Pediatría Continuada*, 7(4), 214–217. [https://doi.org/10.1016/S1696-2818\(09\)71927-4](https://doi.org/10.1016/S1696-2818(09)71927-4)
- Chronopoulou, L., Nocca, G., Castagnola, M., Paludetti, G., Ortaggi, G., Sciubba, F., ... Palocci, C. (2016). Chitosan based nanoparticles functionalized with peptidomimetic derivatives for oral drug delivery. *New Biotechnology*, 33(1), 23–31. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2015.07.005>
- Ciro, Y., Rojas, J., Yarce, C. J., & Salamanca, C. H. (2019). Production and characterization of glutathione-chitosan conjugate films as systems for localized release of methotrexate. *Polymers*, 11(12). <https://doi.org/10.3390/polym11122032>
- Cortés, M. E., Sinisterra, R. D., Avila-Campos, M. J., Tortamano, N., & Rocha, R. G.

- (2001). The chlorhexidine:β-cyclodextrin inclusion compound: Preparation, characterization and microbiological evaluation. *Journal of Inclusion Phenomena*, 40(4), 297–302. <https://doi.org/10.1023/A:1012788432106>
- Czechowska-Biskup, R., Wach, R. A., Rosiak, J. M., & Ulański, P. (2018). Procedure for determination of the molecular weight of Chitosan by viscometry. *Progress on Chemistry and Application of Chitin and Its Derivatives*, 23, 45–54. <https://doi.org/10.15259/PCACD.23.04>
- Dash, S., Murthy, P. N., Nath, L., & Chowdhury, P. (2010). Kinetic modeling on drug release from controlled drug delivery systems. *Acta Poloniae Pharmaceutica - Drug Research*, 67(3), 217–223.
- Daud, N. M., Tapsir, Z., Idris, A., Nasution, A. K., & Saidin, S. (2019). Synthesis and characterization of chlorhexidine/calcium phosphate/poly(lactic-co-glycolic acid) bone cement. *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*, 532(1). <https://doi.org/10.1088/1757-899X/532/1/012026>
- Dellinger, T. M., & Livingston, H. M. (2003). Oral candidiasis. *Annals of Pharmacotherapy*, 37(10), 1529. <https://doi.org/10.1345/aph.1D125>
- Dhanikula, A. B., & Panchagnula, R. (2004). Development and characterization of biodegradable chitosan films for local delivery of paclitaxel. *The AAPS Journal*, 6(3), 88–99. <https://doi.org/10.1208/aapsj060327>
- Dra. Torres, M., Dr. Alvarez, M., & Dra. Acosta, A. (2009). La clorhexidina, bases estructurales y aplicaciones en la odontología. *Gaceta Médica Espirituana*, 11(1), 1–8. <https://doi.org/S1608-89212015000300008>
- Duttagupta, D. S., Jadhav, V. M., & Kadam, V. J. (2015). *Chitosan : A Propitious Biopolymer for Drug Delivery*. 369–381.
- Dynes, J. J., Lawrence, J. R., Korber, D. R., Swerhone, G. D. W., Leppard, G. G., & Hitchcock, A. P. (2006). Quantitative mapping of chlorhexidine in natural river biofilms. *Science of the Total Environment*, 369(1–3), 369–383. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2006.04.033>
- Escobar Sierra, D., Ossa Orozco, C., & Alexander Ospina, W. (2013). Optimización de un protocolo de extracción de quitina y quitosano desde caparzones de crustáceos. *Scientia et Technica*, 18(1), 260–266. <https://doi.org/10.22517/23447214.7555>
- Estrada-Villegas, G. M., Del Rio-De Vicente, J. I., Argueta-Figueroa, L., & Gonzalez-Perez, G. (2020). UV-initiated crosslinking of electrospun chitosan/poly(ethylene oxide) nanofibers doped with ZnO-nanoparticles: Development of antibacterial nanofibrous hydrogel. *MRS Communications*, 10(4), 642–651. <https://doi.org/10.1557/mrc.2020.74>
- Ganji, F., Vasheghani-Farahani, S., & Vasheghani-Farahani, E. (2010). Theoretical description of hydrogel swelling: A review. *Iranian Polymer Journal (English Edition)*, 19(5), 375–398.

- Garcia-Cuesta, C., Sarrion-Pérez, M. G., & Bagán, J. V. (2014). Current treatment of oral candidiasis: A literature review. *Journal of Clinical and Experimental Dentistry*, 6(5), e576–e582. <https://doi.org/10.4317/jced.51798>
- García, E. (2020). Preparación y caracterización de membranas semipermeables basadas en quitosano. *Universidad de Los Andes*, (March), 12–86. <https://doi.org/10.13140/RG.2.2.26061.31205>
- Gierszewska-Drużyńska, M., & Ostrowska-Czubenko, J. (2012). MECHANISM OF WATER DIFFUSION INTO NONCROSSLINKED AND IONICALLY CROSSLINKED CHITOSAN MEMBRANES Magdalena Gierszewska-Drużyńska , Jadwiga Ostrowska-Czubenko. *Progress on Chemistry and Application of Chitin and Its Derivatives [PCACD]*, XVII(December), 59–66.
- Gierszewska, M., Ostrowska-Czubenko, J., & Chrzanowska, E. (2018). Characteristics of ascorbic acid release from TPP-crosslinked Chitosan/Alginate polyelectrolyte complex membranes. *Progress on Chemistry and Application of Chitin and Its Derivatives*, 23, 76–87. <https://doi.org/10.15259/PCACD.23.07>
- Gooch, J., Johnston, A. W., & Johnston, A. F. (2008). *Broad Spectrum Antimicrobial Purification Material and Methods for Purifying Fluids*. United States.
- Greenstein, G., Berman, C., & Jaffin, R. (1986). Chlorhexidine: An Adjunct to Periodontal Therapy. *Journal of Periodontology*, 57(6), 370–377. <https://doi.org/10.1902/jop.1986.57.6.370>
- Juliano, C., Cossu, M., Pigozzi, P., Rassa, G., & Giunchedi, P. (2008). Preparation, in vitro characterization and preliminary in vivo evaluation of buccal polymeric films containing chlorhexidine. *AAPS PharmSciTech*, 9(4), 1153–1158. <https://doi.org/10.1208/s12249-008-9153-6>
- Karpiński, T. M., & Szkaradkiewicz, A. K. (2015). Chlorhexidine - Pharmacobiological activity and application. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, 19(7), 1321–1326.
- Kasaai, M. R. (2007). Calculation of Mark – Houwink – Sakurada ( MHS ) equation viscometric constants for chitosan in any solvent – temperature system using experimental reported viscometric constants data. 68, 477–488. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2006.11.006>
- Khan, M. A., Mujahid, M., Gul, I. H., & Hussain, A. (2019). Electrochemical study of magnetic nanogel designed for controlled release of chlorhexidine gluconate. *Electrochimica Acta*, 295, 113–123. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2018.10.098>
- Kim, H. J., Son, J. S., Kim, K. H., & Kwon, T. Y. (2016). Antimicrobial activity of glass ionomer cement incorporated with chlorhexidine-loaded zeolite nanoparticles. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 16(2), 1450–1453. <https://doi.org/10.1166/jnn.2016.11915>
- Kloster, A. P., Neto, N. L., da Costa, S. A., Oliveira, T. M., de Oliveira, R. C., & Machado, M. A. A. M. (2018). In vitro antimicrobial effect of bioadhesive oral

- membrane with chlorhexidine gel. *Brazilian Dental Journal*, 29(4), 354–358. <https://doi.org/10.1590/0103-6440201801743>
- Küstner, E. C. (2003). Antisépticos en medicina bucal: la clorhexidina. *Jano*, 59(1458), 35–38.
- Lago, M. A., De Quirós, A. R. B., Sendón, R., Sanches-Silva, A., Costa, H. S., Sánchez-Machado, D. I., ... Losada, P. P. (2011). Compilation of analytical methods to characterize and determine chitosan, and main applications of the polymer in food active packaging. *CYTA - Journal of Food*, 9(4), 319–328. <https://doi.org/10.1080/19476337.2011.603844>
- Lau, S., Kahar, A. W. M., & Yusrina, M. D. (2021). Effect of glycerol as plasticizer on the tensile properties of chitosan / microcrystalline cellulose films. *AIP Conference Proceedings*, 2339(May). <https://doi.org/10.1063/5.0044825>
- Losada, L. D. (2004). Universidad Complutense de Madrid Un. In *La teisis doctoral en teorico y empirico*. Retrieved from <https://core.ac.uk/download/pdf/33103547.pdf>
- Ma, G., Qian, B., Yang, J., Hu, C., & Nie, J. (2010). Synthesis and properties of photosensitive chitosan derivatives(1). *International Journal of Biological Macromolecules*, 46(5), 558–561. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2010.02.009>
- Ma, X., Qiao, C., Wang, X., Yao, J., & Xu, J. (2019). Structural characterization and properties of polyols plasticized chitosan films. *International Journal of Biological Macromolecules*, 135, 240–245. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.05.158>
- Ma, X., Qiao, C., Zhang, J., & Xu, J. (2018). Effect of sorbitol content on microstructure and thermal properties of chitosan films. *International Journal of Biological Macromolecules*, 119, 1294–1297. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.08.060>
- Maluf, C. V., Peroni, L. V., Menezes, L. R., Coutinho, W., Lourenço, E. J. V., & Telles, D. de M. (2020). Evaluation of the physical and antifungal effects of chlorhexidine diacetate incorporated into polymethyl methacrylate. *Journal of Applied Oral Science*, 28, 1–9. <https://doi.org/10.1590/1678-7757-2019-0039>
- Martins, A. F., de Oliveira, D. M., Pereira, A. G. B., Rubira, A. F., & Muniz, E. C. (2012). Chitosan/TPP microparticles obtained by microemulsion method applied in controlled release of heparin. *International Journal of Biological Macromolecules*, 51(5), 1127–1133. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2012.08.032>
- Mayer, F. L., Wilson, D., & Hube, B. (2013). *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. *Virulence*, 4(2), 119–128. <https://doi.org/10.4161/viru.22913>
- Mazancová, P., Némethová, V., Trel'ová, D., Kleščíková, L., Lacík, I., & Rázga, F. (2018). Dissociation of chitosan/tripolyphosphate complexes into separate components upon pH elevation. *Carbohydrate Polymers*, 192, 104–110.

<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.03.030>

- Moeini, A., Cimmino, A., Dal Poggetto, G., Di Biase, M., Evidente, A., Masi, M., ... Malinconico, M. (2018). Effect of pH and TPP concentration on chemico-physical properties, release kinetics and antifungal activity of Chitosan-TPP-Ungeremine microbeads. *Carbohydrate Polymers*, 195, 631–641. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.05.005>
- Muadcheingka, T., & Tantivitayakul, P. (2015). Distribution of *Candida albicans* and non-*albicans* *Candida* species in oral candidiasis patients: Correlation between cell surface hydrophobicity and biofilm forming activities. *Archives of Oral Biology*, 60(6), 894–901. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2015.03.002>
- Mukherjee, D., Srinivasan, B., Anbu, J., Azamthulla, M., Banala, V. T., & Ramachandra, S. G. (2018). Improvement of bone microarchitecture in methylprednisolone induced rat model of osteoporosis by using thiolated chitosan-based risedronate mucoadhesive film. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 44(11), 1845–1856. <https://doi.org/10.1080/03639045.2018.1503297>
- Nasution, T. I., Asrosa, R., Nainggolan, I., Balyan, M., Indah, R., & Wahyudi, A. (2018). Sodium tripolyphosphate cross-linked chitosan based sensor for enhancing sensing properties towards acetone. *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*, 309(1). <https://doi.org/10.1088/1757-899X/309/1/012083>
- Onnainty, R., Onida, B., Páez, P., Longhi, M., Barresi, A., & Granero, G. (2016). Targeted chitosan-based bionanocomposites for controlled oral mucosal delivery of chlorhexidine. *International Journal of Pharmaceutics*, 509(1–2), 408–418. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2016.06.011>
- Ortega, J. (2017). *Películas a Base De Quitosano Y Almidon Adicionadas Con Gluconato De Clorhexidina*. 127.
- Ortiz, T., Rapado, M., & Peniche, C. (2021). Hidrogeles superabsorbentes basados en poliacrilamida para aplicación agrícola: estudio de hinchamiento. *Revista Cubana de Química*, 33(2), 46–68. Retrieved from <https://orcid.org/0000-0003-2563-0132>
- Palareti, G., Legnani, C., Cosmi, B., Antonucci, E., Erba, N., Poli, D., ... Tosetto, A. (2016). Comparison between different D-Dimer cutoff values to assess the individual risk of recurrent venous thromboembolism: Analysis of results obtained in the DULCIS study. *International Journal of Laboratory Hematology*, 38(1), 42–49. <https://doi.org/10.1111/ijlh.12426>
- Panpaliya, N. P., Dahake, P. T., Kale, Y. J., Dadpe, M. V., Kendre, S. B., Siddiqi, A. G., & Maggavi, U. R. (2019). In vitro evaluation of antimicrobial property of silver nanoparticles and chlorhexidine against five different oral pathogenic bacteria. *Saudi Dental Journal*, 31(1), 76–83. <https://doi.org/10.1016/j.sdentj.2018.10.004>
- Patil, S., Rao, R. S., Majumdar, B., & Anil, S. (2015). Clinical appearance of oral *Candida* infection and therapeutic strategies. *Frontiers in Microbiology*, 6(DEC),

1–10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01391>

- Pavoni, J. M. F., dos Santos, N. Z., May, I. C., Pollo, L. D., & Tessaro, I. C. (2021). Impact of acid type and glutaraldehyde crosslinking in the physicochemical and mechanical properties and biodegradability of chitosan films. *Polymer Bulletin*, 78(2), 981–1000. <https://doi.org/10.1007/s00289-020-03140-4>
- Pemula, P. D. (2017). *Estudio “in vitro” de la cinética de hinchamiento y liberación de Venlafaxina a partir de hidrogeles de quitosano utilizando Genipina como agente reticulante*. 110265, 110493.
- Povea, B., Rigñack, C., Rivero, B., Covas, P., Povea, M. B., Rigñack, J. C., ... Peniche, C. (2008). Síntesis y caracterización de hidrogeles biocompatibles interpenetrados de quitosana y poli(acrilamida). *Revista CENIC. Ciencias Químicas*, 39(2), 70–74.
- Priyadarshi, R., Sauraj, Kumar, B., & Negi, Y. S. (2018). Chitosan film incorporated with citric acid and glycerol as an active packaging material for extension of green chilli shelf life. *Carbohydrate Polymers*, 195, 329–338. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.04.089>
- Priyadarshini, B. M., Selvan, S. T., Lu, T. B., Xie, H., Neo, J., & Fawzy, A. S. (2016). Chlorhexidine Nanocapsule Drug Delivery Approach to the Resin-Dentin Interface. *Journal of Dental Research*, 95(9), 1065–1072. <https://doi.org/10.1177/0022034516656135>
- Priyadarshini, Balasankar Meera, Mitali, K., Lu, T. B., Handral, H. K., Dubey, N., & Fawzy, A. S. (2017). PLGA nanoparticles as chlorhexidine-delivery carrier to resin-dentin adhesive interface. *Dental Materials*, 33(7), 830–846. <https://doi.org/10.1016/j.dental.2017.04.015>
- Rahim, M., & Mas Haris, M. R. H. (2021). Green biocomposites of chitosan dispersed in natural rubber matrices, and their urea controlled-release application. *Materials Today Chemistry*, 19, 100401. <https://doi.org/10.1016/j.mtchem.2020.100401>
- Ramachandran, V. S. (2021). Comparative Evaluation of Antimicrobial Effect of Mangosteen, Triphala, Chitosan and 2% Chlorhexidine on Mono- and Dual-Species Biofilms of *Enterococcus faecalis* and *Candida albicans*: An In Vitro Study. *European Endodontic Journal*, (1). <https://doi.org/10.14744/eej.2021.70783>
- Rodr, N., Negr, A. V., & Alarc, H. (2010). Preparación De Partículas De Quitosano Reticuladas Con Tripolifosfato Y Modificadas Con Polietilenglicol. *Revista de La Sociedad Química Del Perú*, 76(4), 336–354.
- Rogério dos Santos Alves; Alex Soares de Souza, et all. (2014). Obtención de hidrogeles de quitosano a partir del micelio de *Aspergillus niger* y su estudio en la liberación controlada de cefalexina. *Igarss 2014*, (1), 1–5.
- Rosu, M. C., & Bratu, I. (2014). Promising psyllium-based composite containing TiO<sub>2</sub> nanoparticles as aspirin-carrier matrix. *Progress in Natural Science: Materials International*, 24(3), 205–209. <https://doi.org/10.1016/j.pnsc.2014.05.007>



- Rueda, S. (2017). *Inhibición del crecimiento de Porphyromonas Gingivalis, con 4 antisépticos orales: Clorhexidina 0.12%, Aceites Esenciales, Perborato de Sodio 78.7 G. y Cloruro de Cetilpiridinio*. Universidad Central del Ecuador.
- Safdar, R., Gnanasundaram, N., Iyyasami, R., Appusamy, A., Papadimitriou, S., & Thanabalan, M. (2019). Preparation, characterization and stability evaluation of ionic liquid blended chitosan tripolyphosphate microparticles. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 50, 217–225. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2019.01.027>
- Salazar, M. C., & Negrón, A. V. (2013). Preparación Y Caracterización De Películas De Quitosano Despolimerizado Y Reticulado Con Tripolifosfato De Sodio. *Revista de La Sociedad Química Del Perú*, 79(3), 195–208.
- Salazar, M. J. C. (2015). Desenvolvimento de nanopartículas de quitosana-gelatina e quitosana-colágeno visando a liberação de fármacos. *Dissertação (Mestrado Em Química), Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos.*, 112. Retrieved from <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/75/75133/tde-22052015-092217/>
- Samaranayake, L. P. (1992). Oral mycoses in HIV infection. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology*, 73(2), 171–180. [https://doi.org/10.1016/0030-4220\(92\)90191-R](https://doi.org/10.1016/0030-4220(92)90191-R)
- Scheibler, E., da Silva, R. M., Leite, C. E., Campos, M. M., Figueiredo, M. A., Salum, F. G., & Cherubini, K. (2018). Stability and efficacy of combined nystatin and chlorhexidine against suspensions and biofilms of *Candida albicans*. *Archives of Oral Biology*, 89(February), 70–76. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2018.02.009>
- Schipper, N. G. M., Vårum, K. M., Stenberg, P., Ocklind, G., Lennernäs, H., & Artursson, P. (1999). Chitosans as absorption enhancers of poorly absorbable drugs. 3: Influence of mucus on absorption enhancement. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 8(4), 335–343. [https://doi.org/10.1016/S0928-0987\(99\)00032-9](https://doi.org/10.1016/S0928-0987(99)00032-9)
- Sedghi, R., Shaabani, A., Mohammadi, Z., Samadi, F. Y., & Isaei, E. (2017). Biocompatible electrospinning chitosan nanofibers: A novel delivery system with superior local cancer therapy. *Carbohydrate Polymers*, 159, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.12.011>
- Şenel, S., İkinci, G., Kaş, S., Yousefi-Rad, A., Sargon, M. F., & Hincal, A. A. (2000). Chitosan films and hydrogels of chlorhexidine gluconate for oral mucosal delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, 193(2), 197–203. [https://doi.org/10.1016/S0378-5173\(99\)00334-8](https://doi.org/10.1016/S0378-5173(99)00334-8)
- Serrato Rodríguez, J., & Ruiz Marines, A. (2017). Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. *Mundo Nano. Revista Interdisciplinaria En Nanociencia y Nanotecnología*, 9(17), 49. <https://doi.org/10.22201/ceiich.24485691e.2016.17.58151>

- Shabnam, H., Mohammad, Z. K., Seyed, H. E., & Behnam, B. (2018). A novel binary chlorhexidine-chitosan irrigant with high permeability, and long lasting synergic antibacterial effect. *Nanochem Res*, 3(1), 92–98. <https://doi.org/10.22036/ncr.2018.01.010>
- Shafiei, M., Jafarizadeh-Malmiri, H., & Rezaei, M. (2019). Biological activities of chitosan and prepared chitosan-tripolyphosphate nanoparticles using ionic gelation method against various pathogenic bacteria and fungi strains. *Biologia*. <https://doi.org/10.2478/s11756-019-00299-8>
- Shino, B., Peedikayil, F. C., Jaiprakash, S. R., Ahmed Bijapur, G., Kottayi, S., & Jose, D. (2016). Comparison of Antimicrobial Activity of Chlorhexidine, Coconut Oil, Probiotics, and Ketoconazole on *Candida albicans* Isolated in Children with Early Childhood Caries: An in Vitro Study. *Scientifica*, 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/7061587>
- Silva, M. M., Calado, R., Marto, J., Bettencourt, A., Almeida, A. J., & Gonçalves, L. M. D. (2017). Chitosan nanoparticles as a mucoadhesive drug delivery system for ocular administration. *Marine Drugs*, 15(12), 1–16. <https://doi.org/10.3390/md15120370>
- Singh, A., Verma, R., Murari, A., & Agrawal, A. (2014). Oral candidiasis: An overview. *Journal of Oral and Maxillofacial Pathology*, 18(5), 81–85. <https://doi.org/10.4103/0973-029X.141325>
- Singh, M., Singh, S., Salgar, A. R., Prathibha, N., Chandrahari, N., & Swapna, L. A. (2019). An in vitro comparative evaluation of antimicrobial efficacy of propolis, morinda citrifolia juice, sodium hypochlorite and chlorhexidine on enterococcus faecalis and *Candida albicans*. *Journal of Contemporary Dental Practice*, 20(1), 40–45. <https://doi.org/10.5005/jp-journals-10024-2473>
- Sweet, S. (1997). Selection and pathogenicity of *Candida albicans* in HIV infection. *Oral Diseases*, 3(S1), S88–S95. <https://doi.org/10.1111/j.1601-0825.1997.tb00383.x>
- Syaubari, Safwani, S., & Riza, M. (2018). Synthesis of biodegradable plastic from tapioca with N-Isopropylacrylamid and chitosan using glycerol as plasticizer. *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*, 345(1). <https://doi.org/10.1088/1757-899X/345/1/012049>
- Tapia Castañeda, V. (2019). Efecto antifúngico, in vitro, entre el extracto hidroalcohólico de hojas y tallos de *Piper aduncum* (Matico) sobre *Candida Albicans*. *Uladech Católica*.
- Tokajuk, G., Niemirowicz, K., Deptuła, P., Piktel, E., Cieśluk, M., Wilczewska, A. Z., ... Bucki, R. (2017). Use of magnetic nanoparticles as a drug delivery system to improve chlorhexidine antimicrobial activity. *International Journal of Nanomedicine*, 12, 7833–7846. <https://doi.org/10.2147/IJN.S140661>
- Tripathi, S., Mehrotra, G. K., & Dutta, P. K. (2009). Physicochemical and bioactivity of cross-linked chitosan-PVA film for food packaging applications. *International*

- Journal of Biological Macromolecules*, 45(4), 372–376.  
<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2009.07.006>
- Varan, N. Y. (2017). Characterization of chitosan particles via attenuated total reflection fourier transform infrared spectroscopy, conductometric titration, viscosity average molecular weight and X-ray photoelectron spectroscopy. *Asian Journal of Chemistry*, 29(4), 825–828.  
<https://doi.org/10.14233/ajchem.2017.20324>
- Vieira, A. P. M., Arias, L. S., de Souza Neto, F. N., Kubo, A. M., Lima, B. H. R., de Camargo, E. R., ... Monteiro, D. R. (2019). Antibiofilm effect of chlorhexidine-carrier nanosystem based on iron oxide magnetic nanoparticles and chitosan. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 174, 224–231.  
<https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2018.11.023>
- Vijayasri, K., & Tiwari, A. (2019). Radiation Degraded Chitosan: Efficiency and Investigation of Adsorption of Arsenic (V) from Aqueous Solution. *Analytical Chemistry Letters*, 9(2), 182–195.  
<https://doi.org/10.1080/22297928.2019.1608855>
- Wang, W., Bo, S., Li, S., & Qin, W. (1991). Determination of the Mark-Houwink equation for chitosans with different degrees of deacetylation. *International Journal of Biological Macromolecules*, 13(5), 281–285.  
[https://doi.org/10.1016/0141-8130\(91\)90027-R](https://doi.org/10.1016/0141-8130(91)90027-R)
- Wu, C., Sun, J., Lu, Y., Wu, T., Pang, J., & Hu, Y. (2019). In situ self-assembly chitosan/ε-polylysine bionanocomposite film with enhanced antimicrobial properties for food packaging. *International Journal of Biological Macromolecules*, 132, 385–392. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.03.133>