



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA

Facultad de Ciencias Químicas e Ingeniería

Tesis de Maestría en Ciencias (MyDCI)

“Complejos de biopolímeros electrohilados como sistema de liberación sostenida de antimicrobianos en la cavidad bucal”

Presenta:

Q.F.B. STEPHANIE MICHELLE BOJORQUEZ CUEVAS

Director:

DRA. ARACELY SERRANO MEDINA

Co-dirección:

Dr. JOSÉ MANUEL CORNEJO BRAVO

Tijuana B.C, Mayo 2022

Hoja de aprobación

Universidad Autónoma de Baja California FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS E INGENIERÍA

Folio No.324
Tijuana, B.C., a 04 de Mayo del 2022

C. Stephanie Michelle Bojórquez Cuevas
Pasante de: Maestría en Ciencias
Presente

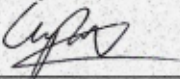
El tema de trabajo y/o tesis para su examen profesional, en la
Opción TESIS

Es propuesto, por las C. Dra. Aracely Serrano Medina y
Dr. José Manuel Cornejo Bravo

Quienes serán las responsables de la calidad del trabajo que usted presente,
referido al tema "Complejos de biopolímeros electrohilados como sistema de
liberación sostenida de antimicrobianos en la cavidad bucal"

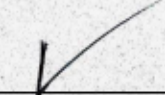
El cual deberá usted desarrollar, de acuerdo con el siguiente orden:

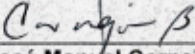
- I. INTRODUCCIÓN
- II. TEORÍA EN GENERAL
- III. PARTE EXPERIMENTAL
- IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN
- V. CONCLUSIONES
- VI. BIBLIOGRAFÍA


Dra. Ana Alejandra Ramirez Rodriguez
Sub-Directora


M.C. Roberto Alejandro Reyes Martinez
Director Provisional




Dra. Aracely Serrano Medina
Directora de Tesis


Dr. José Manuel Cornejo Bravo
Co-Director de Tesis

Dedicatoria

Para mi madre, a ti que siempre estuviste para mí, la mejor madre, consejera, amiga;

Irma Osiris Cuevas Sánchez.

Por siempre guiarme a tomar las mejores decisiones, y mostrar lo mejor de mí, por siempre estar ahí cuando necesitaba un consejo, a mí hermana, Raquel.

A cada una de esas personas que complementan mi vida y me esperan ver brillar agradezco de todo corazón su incondicional afecto y ánimos para hacer esto posible.

Agradecimiento De

Agradezco al universo por permitirme tener este logro más en mi vida, y a todas las personas que por más pequeña que fuera la contribución hicieron que este proyecto fuera posible.

Dra. Aracely Serrano Medina por difundir e inculcar el amor por la investigación, además de todo el apoyo brindado.

Dr. José Manuel Cornejo Bravo por apoyar en el proyecto y aconsejar el mejor camino a seguir.

Dr. Efraín Armenta Rojas quien, sin su apoyo y colaboración en todo momento, además de las enseñanzas de todas las metodologías empleadas, tiempo y disponibilidad, este trabajo no se hubiera podido llevar a cabo.

Dr. Luis Villarreal Gómez quien aportó el conocimiento y el equipo para realizar el electrohilado de las muestras y las pruebas de citotoxicidad, además de su disponibilidad y su ayuda en todas las dudas.

Dra. Lilia Hurtado quien prestó sus instalaciones, material y apoyo para realizar las pruebas microbiológicas de las muestras.

Además de mis compañeras **Alma Santuario** y **Bibiana Cota** que fungieron como pilares para la realización de este estudio, las cuales fueron aprendiendo a la par mía y actuaron como amigas y profesionales al mismo tiempo. De todo corazón gracias por todo el apoyo recibido.

También agradezco enormemente el apoyo de mi madre Irma quien a pesar de su fobia a los roedores decidió ayudarme al inicio de mi maestría, mostrándome su apoyo incondicional y lo mucho que me ama.

Muchas Gracias.

AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

Por el apoyo otorgado en cuanto equipo y salas de investigación por la Universidad Autónoma de Baja California.

A la Facultad de Ciencias Químicas e Ingeniería UABC Campus Tijuana por todo el conocimiento recibido y transmitido, así también el apoyo brindado en sus laboratorios de investigación, en especial al laboratorio de Biofarmacia, y a la Facultad de Medicina y Psicología UABC Campus Tijuana por el apoyo en el ámbito de investigación, por el préstamo de sus instalaciones y del Zooterio.

Como último quisiera agradecer al sistema de becas nacional por el apoyo sin el cual este proyecto de investigación no hubiera sido posible **CONACYT**.

Vita área de estudio

Stephanie Michelle Bojorquez Cuevas, nació en Los Angeles CA U.S.A., naturalizada en Tijuana Baja California México, el 19 de agosto de 1995. Hija del Sr. José Luis Bojorquez y la Sra. Irma Osiris Cuevas Sanchez. Terminó sus estudios de nivel medio superior en la Preparatoria Centro de bachillerato tecnológico industrial y de servicios No. 146 recibiendo su título de técnico en Producción industrial de alimentos.

En 2013 entra a la carrera de Químico Farmacobiólogo en la facultad de Ciencias Químicas e Ingeniería en la Universidad Autónoma de Baja California, campus Tijuana; durante sus estudios participó en el congreso nacional de ciencias farmacéuticas VIII presentando el trabajo “complejo eudragit-verapamilo de liberación controlada como tratamiento antihipertensivo” llevado a cabo en Tequila en septiembre de 2017, también hizo una participación con ponencia oral en el 8vo. Encuentro Estatal de Jóvenes Investigadores de BC 2021 del trabajo “Complejos de biopolímeros electrohilados como sistemas de liberación sostenida de antimicrobianos en la cavidad bucal”; participó en el congreso nacional de ciencias farmacéuticas LI presentando el trabajo “Trastornos neuropsiquiátricos asociados con la exposición a plaguicidas organofosforados en el noroeste de México.” Llevada a cabo en Puerto Vallarta 2018. Con una publicación internacional en el International Journal of Environmental Research and Public health No. 5 vol. 16 que lleva por nombre “Neuropsychiatric Disorders in Farmers Associated with Organophosphorus Pesticide Exposure in a Rural Village of Northwest México” publicado en 2019. Participó en el viaje de prácticas a la comunidad de Santa María Los Pinos del Valle de San Quintín B.C. del 2017-1 y 2 en el área de investigación. Egreso de licenciatura en 2018.

En 2019 se le otorga el reconocimiento como profesional autorizado con cédula ante el Gobierno de los Estados Unidos Mexicanos.

Contacto: michelle.bojorquez@uabc.edu.mx **Áreas de estudio:** toxicología; farmacología; microbiología, neuroquímica, estudio de nuevos fármacos, sistemas de liberación farmacéutica.

RESUMEN

La candidiasis orofaríngea es una de las enfermedades fúngicas más conocidas en el mundo. Las formulaciones de nistatina utilizadas para su tratamiento tienen varias desventajas, incluyendo un bajo tiempo de residencia y una baja biodisponibilidad en el sitio donde se encuentra la infección. El objetivo de este trabajo fue obtener y caracterizar películas de polielectrolitos de quitosano-goma arábica en diferentes proporciones cargadas con nistatina mediante la técnica "Solvent-Casting" para lograr un sistema mucoadhesivo con electrohilado de liberación controlada para la cavidad oral. Las películas obtenidas fueron caracterizadas para determinar la interacción entre los polímeros, sus características morfológicas, capacidad mucoadhesiva y cinética de liberación del fármaco. La topografía de las películas fue determinada por microscopía electrónica de barrido, mientras que la posible compatibilidad entre las fases de la mezcla de los biopolímeros fue evaluada mediante espectroscopia infrarroja de transformada de Fourier, calorimetría de escaneo diferencial y análisis termogravimétrico. Además, su actividad antimicrobiana de la película fue probada contra una cepa de la especie *Cándida* y la capacidad de mucoadhesión fue determinada en un modelo *in vitro*. Las películas obtenidas mostraron potencialidad para ser mucoadhesivas y una liberación sostenida que puede ser explicada por el modelo Korsemeyer-Peppas. Además, se encontró una actividad antimicrobiana significativa. Otro resultado fue la citotoxicidad de los films y sus componentes los cuales mostraron una actividad citotóxica de no tóxica hasta ligera. Estos resultados indican que estas películas basadas en complejos polielectrolitos formados por fibras electrohiladas son un sistema plausible de liberación controlada de nistatina para la cavidad oral.

Palabras clave: candidiasis orofaríngea, polielectrolitos de quitosano-goma arábica, liberación controlada de nistatina, electrohilado.

ABSTRACT

Oropharyngeal candidiasis is one of the best-known fungal diseases in the world. The nystatin formulations used for its treatment have several disadvantages, including a low residence time and low bioavailability at the site of infection. The objective of this work was to obtain and characterize chitosan-gum Arabic polyelectrolyte films in different proportions loaded with nystatin through the "Solvent-Casting" technique to achieve controlled release electrospinning mucoadhesive system for the oral cavity. The films obtained were characterized to determine the interaction between the polymers, their morphological characteristics, mucoadhesive capacity, and drug release kinetics. The topography of the films was determined by scanning electron microscopy, while the possible compatibility between the phases of the biopolymer mixture was evaluated by Fourier transform infrared spectroscopy, differential scanning calorimetry, and thermogravimetric analysis. Furthermore, the antimicrobial activity of the film was tested against one strain of *Candida* species, and the mucoadhesión capacity was determined in an in vitro model. The films obtained showed the potential to be mucoadhesive and a sustained release that can be explained by the Korsmeyer-Peppas model. Furthermore, significant antimicrobial activity was found. Another result was the cytotoxicity of the films and their components which showed a non-toxic to slight cytotoxic activity. These results indicate that these films based on polyelectrolyte

complexes formed by electro-spun fibers are a plausible system of controlled nystatin release for the oral cavity.

Key words: oropharyngeal candidiasis, chitosan-gum Arabic polyelectrolytes, controlled release of nystatin, electrospinning

ÍNDICE

Contenido	
Hoja de aprobación	2
Dedicatoria	3
Agradecimientos	4
Vita área de estudio	6
Resumen	8
Abstract	9
Lista de tablas	15
Lista de figuras	15
Abreviaturas	19
CAPÍTULO I	24
INTRODUCCIÓN	25
1.1 Antecedentes	28
1.2. Objetivos	42
1.2.1 Objetivo general	42
1.2.2 Objetivos específicos	42
1.3 Justificación	43

1.4	Hipótesis	43
CAPÍTULO II: TEORÍA GENERAL		44
2.1.	Características de la mucosa oral	45
2.1.1.	Epitelio bucal	45
2.1.2.	<i>Moco</i>	47
2.1.3.	<i>Saliva</i>	47
2.2.	Entrega local de fármacos en la cavidad oral	48
2.3.	Formulaciones mucoadhesivas	50
2.3.1.	<i>Mecanismos de bioadhesión</i>	51
a)	Teoría electrónica	51
b)	Teoría adsorción	51
c)	Teoría humectante	51
d)	Teoría de difusión	52
2.4.	Inhibición fúngica por el método Kirby-Bauer	52
2.5.	Métodos de obtención de estructuras tipo membranas	53
2.5.1.	<i>El Biomimetismo</i>	54
2.5.2.	<i>Membranas</i>	56
2.5.3.	<i>Andamios tridimensionales para la Ingeniería de Tejidos</i>	58
2.5.4.	Electrohilado	60
2.6.	Biocompatibilidad celular	64

2.7.	Biomateriales usados en aplicaciones biomédicas	65
2.7.1.	Quitosano	65
2.7.2.	<i>Poli ϵ-caprolactona</i>	67
2.7.3.	Nistatina	68
2.7.4.	Policarbofil (PCF)	69
2.7.5.	Polímero Natural Goma Arábica	71
CAPÍTULO III: PARTE EXPERIMENTAL		73
3.1	Materiales	74
3.2	Síntesis de los Films de Polielectrolitos	74
3.3	Recubrimiento de las películas con electrohilado mucoadhesivo	76
3.4	Determinación de la morfología de los films de PEC utilizando microscopía electrónica de barrido (SEM)	78
3.5	Espectroscopia infrarroja transformada de Fourier (FT-IR)	78
3.6	Calorimetría de escaneo diferencial y análisis termogravimétrico	79
3.7	Grado de hinchamiento	80
3.8	Contenido de fármaco	81
3.8.1.	<i>Construcción de curva de calibración</i>	82
3.9	Determinación de la cinética de liberación <i>in vitro</i> de NYS	82
3.10	Modelaje de la cinética de liberación	83
3.11	Determinación <i>in vitro</i> de la actividad antimicrobiana	83

3.12	Propiedades de mucoadhesión de las películas	84
3.13	Propiedades de adhesión del electrohilado y la película	84
3.14	Citotoxicidad <i>in vitro</i> de los films	85
3.15	Análisis estadístico	87
CAPÍTULO IV: RESULTADOS Y DISCUSIÓN		88
4.1.	Caracterización de los films de polielectrolitos	89
4.1.1	Características físicas de los films	89
4.1.2	<i>Recubrimiento mucoadhesivo por electrohilado</i>	90
4.1.2.	Morfología microscópica de los films	91
4.1.3.	<i>Espectroscopía FT-IR</i>	94
4.1.4.	<i>Análisis termogravimétrico y calorimetría de escaneo diferencial</i>	98
4.1.5.	Contenido de fármaco de los films	101
4.1.6.	Grado de hinchamiento de los films con y sin electrohilado	104
4.1.7.	<i>Estudios de liberación in vitro de NYS</i>	106
4.1.8.	<i>Modelaje de la cinética de liberación de NYS</i>	109
4.1.9.	Determinación <i>in vitro</i> de actividad antimicrobiana	114
4.1.10.	<i>Capacidad de adhesión de los films</i>	118
4.1.11.	Capacidad de adhesión del electrohilado y la película	122
4.1.12.	<i>Citotoxicidad in vitro de los films</i>	122
V. CONCLUSIONES		126

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Grosor y peso de los films sin y con electrohilado.	91
Tabla 2. Curva de calibración NYS.	101
Tabla 3. Contenido de fármaco de los films de PEC determinado experimentalmente y su equivalente en UI.	103
Tabla 4. Coeficientes de correlación cuadrados (R^2) y coeficientes obtenidos mediante la regresión de los datos de liberación utilizando los modelos matemáticos de Higuchi y Korsemeyer-Peppas.	109
Tabla 5. Actividad antimicrobiana de los films.	115
Tabla 6. Parámetros de adhesión de los films.	119
Tabla 7. Pruebas de mucoadhesividad para películas y capa electrohilada.	122

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Principales tejidos componentes de la mucosa oral.	46
Figura 2. Distintas Matrices Extracelulares MEC.	55
Figura 3. Andamio 3D en forma de lámina de poli (ϵ -caprolactona): a) Vista a escala real, b) Micrografía MEB del andamio.	58

Figura 4. Relación entre las técnicas de micro y nanofabricación con el desarrollo de la Ingeniería de tejido.	59
Figura 5. Esquema del equipo y proceso de <i>electrospinning en disposición vertical</i> . Detalle de la superficie de una membrana polimérica creada por la técnica.	62
Figura 6. Estructura química del quitosano. El quitosano es un copolímero con una unidad acetilada a la izquierda y una desacetilada a su derecha, donde $m > n$	67
<i>Figura 7.</i> Síntesis de la poli ϵ -caprolactona y unidad repetitiva.	68
<i>Figura 8.</i> Estructura molecular de la Nistatina Como se aprecia, la estructura molecular corresponde a un polieno cíclico. Se aprecia la presencia de largas cadenas alifáticas con instauraciones consecutivas tipos dienos y tetraenos, y su cadena sustituida con varios grupos hidroxilos, y un grupo amino.	69
<i>Figura 9.</i> Estructura molecular del polímero bioadhesivo policarbofil PCF, en su forma iónica (con Calcio Ca^{+2}). Se aprecia la presencia de los grupos funcionales laterales a su cadena polimérica principal que son los responsables de su capacidad adhesiva.	70
<i>Figura 10.</i> Estructura molecular de la goma arábica.	72
<i>Figura 11.</i> Enlaces químicos MTT y formazán.	86
<i>Figura 12.</i> Morfología macroscópica de los films. a) film CHI-GA 1-1, b) film CHI-GA 1-2, c) film CHI-GA 2-1, d) film CHI-GA 1-1 NYS, e) film CHI-GA 1-2 NYS, f) film CHI-GA 2-1 NYS.	89
<i>Figura 13.</i> Morfología macroscópica de los films con electrohilado y sin electrohilado. a) film CHI-GA 1-1 electrohilado y sin electrohilado, b) film CHI-GA	

1-2 electrohilado y sin electrohilado, c) film CHI-GA 2-1 electrohilado y sin electrohilado, d) film CHI-GA 1-1 NYS electrohilado y sin electrohilado, e) film CHI-GA 1-2 NYS electrohilado y sin electrohilado, f) film CHI-GA 2-1 NYS electrohilado y sin electrohilado 90

Figura 14. Micrografías electrónicas de los films. a) QUI-APG placebo; b) QUI-APG cargado con NYS; c) QUI-GA placebo; d. QUI-GA cargado con NYS. Las flechas indican cristales de fármaco precipitado. 93

Figura 15. Espectros FT-IR de NIS, QUI, GA. 96

Figura 16. Espectros FT-IR de films en diferentes proporciones con y sin cargado de NYS. 96

Figura 17. Espectros FT-IR de polímeros componentes del electrohilado, PCL, PCF y PCL/PCF. 97

Figura 18. Termogramas DSC de QUI, APG, NYS, sus mezclas físicas (PM) y films. 99

Figura 19. Termogramas DSC de QUI, GA, NYS, sus mezclas físicas (PM) y films. 100

Figura 20. Termograma TGA de QUI, APG, NYS, sus mezclas físicas (PM) y films. 100

Figura 21. Termogramas TGA de QUI, GA, NYS, sus mezclas físicas (PM) y films. 101

Figura 22. Curva de calibración NYS 102

Figura 23. Grado de hinchamiento (Q) de los films sin electrohilado 104

<i>Figura 24.</i> Grado de hinchamiento (Q) de los films con electrohilado.	105
<i>Figura 25.</i> Perfiles de liberación de NYS de los films no electrohilados.	107
<i>Figura 26.</i> Perfiles de liberación de NYS de los films con electrohilado.	108
<i>Figura 27.</i> Cinética de liberación de NYS de films no electrohilados ajustada al modelo de Korsemeyer-Peppas.	111
<i>Figura 28.</i> Cinética de liberación de NYS de films electrohilados ajustada al modelo de Korsemeyer-Peppas	112
<i>Figura 29.</i> cinética de liberación de NYS de films QUI-APG-NYS ajustada al modelo de Higuchi	113
<i>Figura 30.</i> Diámetro de Inhibición microbiana (cm) a las 72h de los films con y sin electrohilado, diferencia significativa * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, **** $p < 0.0001$.	116
<i>Figura 31.</i> Halo de inhibición de los films a diferentes proporciones con nistatina en caja Petri con agar Müller Hinton a) 1-1, b) 1-1 electrohilado, c) 1-2, d) 1-2 electrohilado, e) 2-1, f) 2-1 electrohilado..	117
<i>Figura 32.</i> Fuerza máxima (F_{max}) y trabajo de adhesión (W_{ad}) de los films. Diferencia significativa * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** indica $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$	120
<i>Figura 33.</i> Absorbancia de los pocillos comparados con el grupo control. Diferencia significativa * $p < 0.05$.	123
<i>Figura 34.</i> Microscopía de pocillos tras 24h de incubación a 400 μ m, a)1-1 CHIGA, b)1-1 CHIGA NYS, c)1-2 CHIGA, d)1-2 CHIGA NYS, e)2-1 CHIGA, f)2-1 CHIGA NYS, g) fibroblastos con fenol, h) fibroblastos con formazán.	124

ABREVIATURAS	
ALG	Alginato
C.	Candida
CHI	Quitosano
cm	Centímetros
CMC	Carboximetilcelulosa de sodio
COOH	Carboxilo
DBF	Película bucal de diazepam
DC	Corriente continua
DD	Grado de desacetilación
DEX-F	Dexametasona sodio fosfato
DSC	Calorimetría de escaneo diferencial

DTP	Ditiobis-(dihidrazida propanoico)
FT-IR	Espectroscopia infrarroja de transformada de Fourier
g	Gramos
GA	Goma arábica
GI	Gastrointestinal
HA-DTPH	Ácido hialurónico tiolado
HPMC	Hidroxipropilmetilcelulosa
kg	Kilogramos
Kv	Kilovolts
MEC	Componentes de la matriz extracelular
mg	Miligramos
mJ	Millijoules
ml	Mililitros

N	Newton
NH ₂	Amida
nm	Nanómetro
NYS	Nistatina
OH	Hidroxilo
PA	Poliamida
PAN	Poliacrilonitrilo
PCF	Policarbofil
PCL	Policaprolactona
PDS	Polidioxanona
PE	Polietileno
PEC	Complejo polielectrolito
pH	Potencial de hidrógenos

PLGA	Ácido poligalacturónico
PM	Physical mixture
PMMA	Polimetilmetacrilato
PNL	Propranolol
POE	Polióxido de etileno
PP	Polipropileno
PU	Poliuretano
PVA	Alcohol polivinílico
PVP	Polivinilpirrolidona
SEM	Espectroscopia electrónica de barrido
SF	Fibras de seda
SO ₄ H	Sulfato
TEA	Trietilamina

TGA	Análisis termogravimétrico
-----	----------------------------

TPP	Tripolifosfato
-----	----------------

UI	Unidades internacionales
----	--------------------------

μm	Micrómetro
----	------------

CAPÍTULO I.

INTRODUCCIÓN

La candidiasis es una infección fúngica, primaria o secundaria, causada por diversas especies de levaduras del género *Candida*. La distribución geográfica de la candidiasis es universal (Bhattacharya, Sae-Tia y Fries, 2020) y más de 70% de los casos reportados son causados por *C. albicans*, aunque otras especies como *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis* y *C. krusei* son cada vez más aislados (León *et al.*, 2020). Debido a que se encuentran entre las infecciones oportunistas bucales más frecuentes (Gaitán-Cepeda *et al.*, 2012), los factores que contribuyen a la aparición de la candidiasis son múltiples; están los fisiológicos (infancia, senectud, desnutrición, etc.), maceración, humedad, traumatismos, dermatosis previas, mal estado dental, enfermedades metabólicas (diabetes, obesidad), inmunosupresión y administración de antibióticos de amplio espectro (León *et al.*, 2020). Debido a que, en la cavidad oral, la coadhesión de *Candida albicans* con bacterias es crucial para su persistencia, se describió una amplia gama de interacciones sinérgicas con varias especies orales para mejorar la colonización en el huésped. Como colonizador frecuente de la mucosa oral, la respuesta inmune del huésped, en la cavidad bucal está orientada hacia un estado más tolerogénico y, por lo tanto, las defensas inmunitarias innatas locales juegan un papel central en el mantenimiento de *Candida* en su estado comensal. Específicamente, además de prevenir la adherencia de *Candida* a las células epiteliales, la saliva se enriquece con péptidos anticandidales, considerados parte de la inmunidad innata del huésped (Vila *et al.*, 2020).

En los países en desarrollo las enfermedades oportunistas son una causa importante de morbilidad y mortalidad infantil. Entre los factores que provocan estas patologías en

los niños figuran el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) y la inmunodeficiencia asociada a desnutrición, ligada estrechamente a condiciones sociales de alta marginación y limitado acceso a programas e instituciones de salud (Gaitán-Cepeda *et al.*, 2012). Durante décadas la nistatina ha sido el fármaco de elección para el tratamiento de la candidiasis orofaríngea. Es un antibiótico obtenido de *Streptomyces noursei*, que tiene un efecto fungicida contra *Candida*. El uso de nistatina ha demostrado disminuir o prevenir la adherencia de la levadura a las células epiteliales evitando su colonización y, por tanto, el riesgo de infección. Sin embargo, este fármaco no se absorbe en el tracto gastrointestinal y su administración sistémica es considerablemente tóxica y el uso está restringido a infecciones superficiales. La mayoría de los pacientes con candidiasis orofaríngea se tratan con nistatina en forma de suspensión oral, pastillas o comprimidos orales. Estas formulaciones requieren varias dosis al día debido a su corto tiempo de residencia en la mucosa oral. La baja biodisponibilidad se reduce aún más mediante la dilución con la saliva; otras desventajas incluyen un sabor desagradable, consistencia viscosa y baja solubilidad en agua del fármaco (Armenta-Rojas *et al.*, 2022).

El quitosano es un biopolímero natural derivado de la desacetilación de la quitina y se ha investigado con enfoques interdisciplinarios para múltiples aplicaciones. Los biomateriales de quitosano poseen propiedades únicas tales como biocompatibilidad, biodegradabilidad, no toxicidad, mucoadhesión y una amplia gama de actividad antibacteriana y antifúngica. Además, el quitosano es el único polisacárido catiónico en la naturaleza y puede modificarse químicamente a derivados, según el objetivo de la función y la aplicación. Las propiedades distintivas del quitosano y sus derivados han

despertado interés en las industrias farmacéuticas y los campos biomédicos en todo el mundo (Fakhri *et al.*, 2020).

La goma arábiga es un polisacárido aniónico natural que está compuesto principalmente por una cadena principal de galactanos con cadenas laterales de galactosa / arabinosa altamente ramificadas. La goma arábiga es un polielectrolito débil con grupos carboxilo, que son responsables de esta carga negativa a valores de pH superiores a 2.2. La goma arábiga se usa ampliamente en muchas aplicaciones porque exhibe alta solubilidad y baja viscosidad a altas concentraciones y posee buenas propiedades emulsionantes y microencapsulantes (Sakloetsakun *et al.*, 2016).

Existe un interés creciente en la preparación de materiales nanofibrosos electrohilados a partir de polímeros naturales. Aunque en varios estudios se han electrohilado biopolímeros como el quitosano y sus derivados, colágeno, gelatina, ácido hialurónico, fibroína de seda (SF), alginato y derivados de celulosa, la preparación de materiales fibrosos a partir de polímeros naturales solo mediante electrohilado sigue siendo un desafío. En los últimos años, la búsqueda de las condiciones adecuadas para la preparación satisfactoria de nanofibras electrohiladas que contienen quitosano o sus derivados ha sido objeto de intensos estudios. La posibilidad de preparación de nanofibras a partir de quitosano y sus derivados puede proporcionar grandes recursos para el desarrollo de materiales electrohilados biocompatibles con actividad antibacteriana para aplicaciones biomédicas, como materiales de cicatrización de heridas de nueva generación con alta eficacia, andamios de ingeniería de tejidos y sistemas de administración de fármacos (Ignatova, Manolova y Rashkov, 2013).

1.1 Antecedentes

El polisacárido natural, la quitina, conocido por ser el elemento estructural en el exoesqueleto o conchas de cangrejos y camarones, es el segundo material más abundante después de la celulosa que también se encuentra en las paredes celulares de los hongos. La investigación sobre la quitina fue limitada hasta la década de 1980 debido a su compleja estructura, difícil extracción e insolubilidad en soluciones acuosas. El quitosano es una biofuente contemporánea y el único polisacárido alcalino conocido obtenido mediante un proceso de purificación exhaustivo de la materia prima de la quitina, que consiste en un ciclo de despolimerización, desmineralización, desprotección, decoloración y finalmente desacetilación química. El quitosano es un antioxidante ecológico con propiedades antifúngicas y antibacterianas únicas, además de no presentar citotoxicidad y tener biocompatibilidad. El quitosano solo se puede disolver cuando el pH es inferior a 6.5, lo que limita su actividad antifúngica. De ahí que se hayan creado varios derivados del quitosano que podrían mejorar su solubilidad y propiedades antifúngicas. Los estudios han demostrado que la actividad antifúngica aumenta a medida que aumenta el grado de desacetilación y se reduce el peso molecular del quitosano (Bhatlekar *et al.*, 2020).

En los últimos años ha habido un interés creciente en la preparación de materiales nanofibrosos. Y en la actualidad, el electrohilado es reconocido como la técnica más eficiente para producir fibras poliméricas continuas de longitud significativa con diámetros en la nanoescala. En el electrohilado, las nanofibras se producen utilizando un campo eléctrico externo impuesto sobre una solución de polímero. Bajo la acción de

un campo eléctrico externo de alto voltaje, se extrae un chorro fino de la solución de polímero o de la masa fundida y se dirige a un colector. El punto de erupción se llama cono de Taylor. Los entrelazamientos de polímeros aumentan la viscosidad, lo que conduce a la formación de una fibra continua en lugar de gotas. La corriente de polímero extraída de la punta de la aguja sufre movimientos de batido provocados por repulsiones electrostáticas dentro de la corriente. El solvente se evapora rápidamente durante el vuelo, dejando una estera de nanofibras poliméricas en la placa colectora (Ignatova, Manolova y Rashkov, 2013; Edmans *et al.*, 2020). Este a si mismo funciona utilizando un alto voltaje (5–30 kV) para producir fibras de polímero, con diámetros que varían desde dos nanómetros hasta varios micrómetros de una solución de polímero. Hasta ahora, al menos 12 dispositivos médicos electrohilados se encuentran en las últimas etapas de aprobación regulatoria o de mercado, y la mayoría se utilizan como injertos quirúrgicos o para la regeneración de tejidos. La técnica es particularmente prometedora para la administración de fármacos debido a su versatilidad y la alta área de superficie de la malla de nanofibras resultante, que permite incorporar y liberar un compuesto activo a una velocidad controlada por difusión o degradación de las nanofibras (Ignatova, Manolova y Rashkov, 2013).

Actualmente se ha observado el manejo en pacientes diagnosticados con candidiasis oral, en el cual no ha cambiado desde las últimas décadas por lo tanto se ha invertido en buscar mejores maneras de dar un tratamiento más efectivo y con mejores resultados en cuestión de la facilidad del apego al tratamiento y sin las complicaciones que este presenta, esto conlleva a investigación de biofilms como método de liberación sostenida (Vera-González y Shukla, 2020), hasta la utilización de tecnologías más

modernas como es el electrohilado (Edmans *et al.*, 2020) junto con algunos polisacáridos (Espinosa-Andrews *et al.*, 2007) que potencian su eficacia antifúngica junto con la nistatina. Por lo tanto esto beneficiará al paciente y facilitará su manejo para la resolución pronta sin la necesidad de mantener un estricto régimen de tratamiento que pueda causar alguna repercusión de resistencia antifúngica a mediano o corto plazo (Bhattacharya, Sae-Tia y Fries, 2020) y mejorar la calidad del tratamiento.

En los últimos años, se han realizado diversos trabajos acerca de la síntesis de polímeros bioconjugados, es decir donde se busca conjugar la presencia o propiedades de un polímero con relación a otro, y estos pueden ser de origen natural o de origen sintético o una mezcla de ambos. Otra área que se ha convertido de interés es la nanotecnología, donde la síntesis de micro/nano partículas a partir de éstos materiales bioconjugados pueden ser usados como vehículos en procesos de liberación de fármacos, así como también su empleo como agentes biomimético en la ingeniería de tejidos. Una de las áreas donde se requieren de estos sistemas bioconjugados es el área odontológica y de cirugía facial y bucal, dado que el tejido de la cavidad bucal está expuesto a una serie de microorganismos, así como también de posibles traumatismos. A continuación, se presentan los trabajos de investigación revisados más relevantes y que sirven de soporte para el presente trabajo:

Andreas Bernkop-Schnürch *et al.* y colaboradores, en el año 2000, realizaron la síntesis de un biopolímero conjugado poli (carbofil-L-cisteína), mediado por carbodiimida y carboximetilcelulosa de sodio (CMC). En solución acuosa el polímero fue capaz de generar enlaces inter e intramoleculares del tipo disulfuro. Además, corroboraron que la

velocidad del proceso de formación de estos enlaces se incrementa con el aumento de la concentración del polímero y cuando disminuye la concentración de protones (Bernkop-Schnürch y Thaler, 2000).

Dentro de los biopolímeros, uno de los más usados reportados en la literatura está el alginato, que no ha sido el único polímero natural modificado para ser tiolado, pues el quitosano también forma parte de esta innovación. Por ejemplo, cuatro tipos de quitosano tiolado han sido sintetizados, entre ellos está el trabajo de A.B. Schnürch, U.M. Brandt y A.E. Clausen quienes sintetizaron el conjugado quitosano-cisteína (Bernkop-Schnürch, Schwarz y Steininger, 1999) A.B. Schnürch y T.E. Hopf (2001) sintetizaron el conjugado quitosano-ácido tioglicólico (Bernkop-Schnürch y Hopf, 2001) de esta misma manera, (Bernkop-Schnürch, Hornof y Zoidl, 2003) sintetizaron quitosano-4-tiobutilamidina (quitosano-TBA) y K. Kafedjiiski y colaboradores en el 2005 sintetizaron el quitosano-tioetilamidina (TEA) (Kafedjiiski *et al.*, 2005)

Andreas Bernkop-Schnürch y col, en el año 2003 prepararon mediante la técnica emulsión por evaporación del solvente macropartículas del conjugado poli(ácido acrílico)- quitosano-cisteína con el propósito de estudiar la posibilidad de que éstas sean usadas como micropartículas mucoadhesivas en procesos de liberación de fármacos. Obtuvieron partículas esféricas y parcialmente porosas y observaron la formación de enlaces disulfuro entre las micropartículas bajo condiciones de pH fisiológico (Bernkop-Schnürch, Hornof y Zoidl, 2003).

Liu, Chanyun *et al.* y col. en el año 2015, modificaron otro biopolímero, como lo fue el ácido hialurónico para mejorar sus propiedades y ajustar su velocidad de degradación, para ello se usó ditiobis-(dihidrazida propanoico) (DTP) para modificar el ácido hialurónico para producir, después de la reducción con ditiotreitól, un ácido hialurónico tiolado (HA-DTPH), el cual se oxida con el aire o agentes oxidantes para formar enlaces disulfuro (Liu, et al., 2005), y este tipo de ácido hialurónico es muy usado para la regeneración de tejido maxilofacial y de la cavidad bucal.

Silvia Bubenikova y col, en el año 2017 funcionalizaron otro biopolímero como el alginato con un péptido que contenía un grupo 1 tiol terminal con el propósito de usarlo como polímero en ingeniería de tejido. Se estudió la capacidad del conjugado alginato-péptido de formar hidrogeles cuando éste es tratado con cationes Ca^{2+} . Lo que permite el desarrollo de materiales más complejos basados en la combinación de varios péptidos con el alginato. También se evaluó la biocompatibilidad del material bioconjugado mediante ensayos *in vitro* en células de fibroblastos de embriones de pollo y los resultados se compararon con los de alginato no modificado, y de esta manera corroboraron que la modificación no provoca afecciones en las células (Bubenikova, et al., 2012).

Zhao Yanyan y col., en el 2012 no solo mejoraron las propiedades mucoadhesivas del alginato agregando grupos tiol a su estructura, sino que también estudiaron la formación de estructuras 3-D para su uso en ingeniería de tejidos o como vehículo de moléculas bioactivas debido a su estructura porosa. Ellos realizaron la caracterizaron

por espectroscopia FT-IR, 1RMN y además estudiaron la estructura porosa mediante MEB (Zhao, et al., 2012).

Una investigación publicada también en 2012, por Yoon y Kim *et al.* proponen el uso de andamios, de manera alternativa a su aplicación en la regeneración de tejido, a la fabricación de andamios funcionales para la liberación controlada de fármacos. Su propuesta exhibe la manufactura de un andamio de PCL, utilizando para ello prototipado rápido deposición de material fundido, incrustando luego capas de nanofibras de PCL/ poli óxido de etileno/ rodamina-B (droga empleada) obtenidas por electrohilado, de manera que la liberación de la droga se controló con la variación del espesor de la capa de PCL (Yoon y Kim, 2012).

Mano y colaboradores plantean como la presencia de gradientes de porosidad aumenta la eficiencia del cultivo de células (hasta 70%, si se compara con andamios de porosidad homogénea) así como la distribución celular en el interior de andamio. Aluden esta respuesta a la dificultad de paso de las células a través del andamiaje incrementando sus tiempos de permanencia y de esta manera estimula la posibilidad de contacto célula-andamio, beneficiando en última instancia el proceso regenerativo tecidual. Indican asimismo que tamaños de poros superiores a 300 μm son recomendados para estimular la formación de nuevo hueso, así como para la vascularización del mismo (De Araújo, J. F. *et al.*, 2018). Estos argumentos, sustentan el interés de la presente investigación en dirigir el diseño de andamios, por una parte, a fabricar estructuras con capas de diferentes porosidades.

En la investigación realizada por Pérez-González et al. y colaboradores en el año 2019, estos autores lograron incorporar satisfactoriamente el fármaco dexametasona sodio fosfato (DEX-F) dentro de andamios contruidos a partir de poli(vinil pirrolidona) (PVP). Adicionalmente, usaron la técnica de electrohilado para construir sistemas de multicapas con polímeros de diferentes propiedades y características. Es así como una segunda capa fabricada por fibras de poli (caprolactona) (PCL) modificada con poli (carbofil) (PCF), presentó un carácter adherente a la mucosa bucal. Esto les permitió crear parches que exhiben excelentes propiedades mucoadhesivas a la vez que presentan buena estabilidad térmica lo cual es ideal para los procesos convencionales de esterilización por calor, lo cual es requisito indispensable en todos aquellos productos que se usan en el campo biomédico, odontológico y farmacológico (Pérez-González et al., 2019).

En el grupo de Armenta-Rojas, E. *et al.* y colaboradores, se desarrollaron y caracterizaron dos sistemas en forma de película para liberación de NYS con características de mucoadhesión y liberación sostenida. Los sistemas se basan en complejos poli electrolíticos entre quitosano y biopolímeros aniónicos: goma arábica y ácido poligalacturónico. La formación del complejo poli electrolítico se demostró usando FT-IR y DSC-TGA. Las películas obtenidas mostraron una cinética de liberación sostenida explicada por modelos fisicoquímicos de Peppas, mostrando una liberación inicial rápida del fármaco seguida de una liberación más lenta que podría ser beneficiosa en la aplicación oral, ya que es similar a administrar una dosis de carga que alcanza rápidamente concentraciones terapéuticas del fármaco y luego se mantiene mediante liberación sostenida. Todas las formulaciones evaluadas mostraron actividad

antimicrobiana comprobada antes cepas de *Candida*, este artículo, junto el de Pérez-González et al. fueron la base principal de este estudio(Armenta-Rojas *et al.*, 2022).

En el trabajo de Mohammadi, G *et al.* y colaboradores en el 2017 se formularon nanopartículas de PLGA cargadas con nistatina y PLGA-Glucosamina. Las nanopartículas de PLGA se funcionalizaron con glucosamina (PLGA-GlcN) para mejorar la adhesión de nanopartículas a las paredes celulares de *Candida Albicans*. (Mohammadi, G, *et al.*, 2017).

M Montenegro-Nicolini *et al.* y colaboradores en el 2017, publicaron un trabajo de revisión muy interesante donde consideran a la vía bucal como un sitio alternativo para la absorción de productos biológicos y fármacos. La mucosa bucal es una barrera que protege el tejido subyacente, pero es más permeable que otras vías alternativas como la piel. Esto hace que las películas o membranas bucales basadas en matrices poliméricas diseñadas para tener propiedades mucoadhesivas y generalmente formuladas con potenciadores de la permeabilidad puedan mejorar la biodisponibilidad. Convencionalmente, las películas bucales para productos biológicos se fabrican mediante disolución con disolventes, sin embargo, los desarrollos recientes han demostrado el potencial uso de la extrusión por fusión en caliente y, más recientemente, la impresión por el uso de geles tipo biotintas, las cuales son estrategias muy prometedoras (M Montenegro-Nicolini, *et al.*, 2017).

Otro problema considerado en la literatura es el tratamiento convencional de heridas en la cavidad bucal, lo cual requiere el uso de esteroides en forma de enjuagues bucales,

cremas o ungüentos, pero estos a menudo son ineficaces debido a tiempos inadecuados de contacto del fármaco con la lesión. En este trabajo se evaluó el rendimiento de nuevos parches mucoadhesivos para la administración dirigida de fármacos. Se produjeron y caracterizaron parches mucoadhesivos poliméricos electrohilados por sus buenas propiedades físicas y su citotoxicidad para evaluar el tiempo de residencia y aceptabilidad en un estudio *in vivo* de viabilidad en humanos (Colley, H. E., *et al.*, 2018).

Las membranas en base a biopolímeros se hacen cada vez más interesantes para ser estudiadas por su natural capacidad mucoadhesiva. En este trabajo se sintetizaron membranas de hidrogel de quitosano / alginato / tripolifosfato (Ch / Alg / TPP) sensibles al pH basadas en el complejo polielectrolítico de (Ch / Alg) y el agente de reticulación (TPP). Se analizó un efecto de la reticulación de TPP sobre la estructura molecular, cristalinidad, morfología, hinchamiento y comportamiento de liberación de fármaco modelo de la membrana Ch / Alg. Se estudió el comportamiento dinámico de hinchamiento de las membranas Ch / Alg y Ch / Alg / TPP en soluciones de diferente pH (1.0-9.0). A pH 7,4 o superior, los hidrogeles Ch / Alg y Ch / Alg / TPP mostraron un comportamiento de hinchamiento atípico, es decir, mostraron lo que los autores denominaron "efecto de sobreimpulso". (Gierszewska, M, *et al.*, 2018).

Otro tema que ha sido muy investigado, es la acomplejación de polianiones de alginato lineales con diferentes clases de reticulantes (cationes divalentes, policationes, tensioactivos cargados positivamente), para desentrañar sus efectos sobre la formación de nanopartículas. El objetivo de esa investigación fue definir las relaciones molares de agentes reticulante para el alginato en las que se forman las nanopartículas y revelar la

termodinámica subyacente y las interacciones moleculares mediante las técnicas de dispersión de luz dinámica y electroforética, calorimetría de titulación isotérmica y espectroscopia infrarroja. Las nanopartículas de alginato se formaron en un rango limitado de relaciones molares que era específico para cada reticulante, y tenían diferente tamaño y estabilidad. Los parámetros termodinámicos de la acomplejación de alginato con reticulantes mostraron que la formación de nanopartículas fue impulsada en todos los casos por la entropía, junto con una menor contribución entálpica (Mirtič, J., *et al.*, 2018).

Otro estudio a reportar es el de Kraisit y colaboradores, quienes prepararon y caracterizaron películas de mezcla mucoadhesiva de hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC)/ (PCF) saturadas con nanopartículas cargadas con clorhidrato de propranolol (PNL) para mejorar la permeabilidad de los fármacos que experimentan un metabolismo de primer paso. Se utilizó un método de reticulación iónica y una técnica de fusión de películas para preparar nanopartículas y películas de mezcla mucoadhesiva, respectivamente. Por lo tanto, la administración bucal de películas de estas mezclas mucoadhesivas que contienen nanopartículas cargadas con PNL podría ser un enfoque prometedor para los fármacos que se someten a un metabolismo de primer paso (Kraisit, P., *et al.*, 2018).

Un trabajo de revisión sobre los sistemas de administración de fármacos mucoadhesivos recoge información sobre la relevancia de este tipo de sistemas y que pueden aumentar el tiempo de residencia de los fármacos en el sitio de absorción/acción, dado que proporcionan una liberación sostenida de fármacos y minimizan la degradación de los fármacos en varios sitios del cuerpo. Destacan al

quitosano que es un polisacárido catiónico y que presenta propiedades mucoadhesivas y se ha utilizado ampliamente en el diseño de formas de dosificación mucoadhesivas. Sin embargo, su fuerza mucoadhesiva es limitada y su solubilidad en agua limitada a pH neutro y básico se consideran dos inconvenientes principales de su uso, pero que esto se puede superar realizando reacciones de modificación química del quitosano para abordar estos dos problemas, y sobre eso se logran aportes novedosos (M Ways, *et al.*, 2018)

Por otro lado, se estudió y caracterizó una película bucal de diazepam (DBF), lo cual es una formulación de diazepam compacta y fácil de administrar. Cuando se coloca sobre la mucosa bucal dentro de la mejilla, el diazepam DBF se adhiere firmemente y luego se disuelve rápidamente, administrando por vía transbucal y por vía gástrica. Al crear una película bucal es una alternativa conveniente para el tratamiento extrahospitalario de exacerbaciones convulsivas que se puedan tener en la cavidad bucal (Rogawski, M. A., *et al.*, 2019).

Siempre se ha conocido que la administración de una vacuna por vía oral es preferible a la vía parenteral debido a la facilidad de administración. Hasta la fecha, la mayoría de las vacunas orales disponibles se componen de patógenos vivos atenuados en oposición a las vacunas basadas en péptidos debido a su baja biodisponibilidad dentro del tracto gastrointestinal (GI). Debido a esto, el sistema de administración oral propuesto en esta investigación, basado en el uso de películas mucoadhesivas, ha mostrado un potencial prometedor como hospedador de administración de la llamada vacuna gastrointestinal viva. Actualmente se están llevando a cabo más estudios que involucran la supervivencia gastrointestinal *in vivo* y pruebas de inmunización en

ratones para evaluar la eficacia de este novedoso sistema de administración en comparación con las vías parenterales (Tan, E. W., *et al.*, 2019).

Por otro lado, la saliva es un fluido corporal multifacético que es indispensable para la salud bucal y el bienestar general de los seres humanos. Aunque se componen principalmente de agua (99.5%), las proteínas, los iones y las enzimas que la componen convierten a la saliva en una solución viscoelástica que realiza una variedad de tareas vitales. Este artículo de revisión ofrece una breve descripción del sistema de las glándulas salivales, así como de la composición, producción y funciones de la saliva. También aborda las aplicaciones actuales de la saliva con fines de diagnóstico, la relevancia clínica de la saliva en las enfermedades bucales y las opciones de tratamiento actuales, así de su influencia en los procesos de liberación de fármacos en el caso del uso de películas reparadoras de tejido bucal cargadas con dichas drogas (Roblegg, E., *et al.*, 2019).

Así mismo, el moco, compuesto principalmente por las glicoproteínas mucinas, es una sustancia reológica que recubre el epitelio intestinal y actúa como una barrera protectora contra una variedad de moléculas dañinas, infecciones microbianas y diferentes condiciones ambientales del lumen. Las alteraciones en la composición o estructura del moco podrían conducir a diversas enfermedades como la enfermedad inflamatoria intestinal o el cáncer colorrectal. Estudios recientes revelaron que una ingesta exógena de bacterias probióticas u otros componentes dietéticos (como péptidos bioactivos y probióticos) derivados de los alimentos influyen en las propiedades de la capa mucosa y modulan la expresión génica y la secreción de mucinas. Por lo tanto, el uso de dichos componentes para diseñar nuevos ingredientes

funcionales y luego alimentos, podría constituir un enfoque novedoso para preservar las propiedades del moco. Es por esto que Kebouchi y colaboradores en sus recientes investigaciones revelaron que una ingesta exógena de bacterias probióticas u otros componentes dietéticos (como péptidos bioactivos y probióticos) derivados de los alimentos influyen en las propiedades de la capa mucosa y modulan la expresión génica y la secreción de mucinas. Este tipo de probióticos pueden colocarse en una película que sirva como vehículo y puedan irse liberando paulatinamente en el tracto gastrointestinal. Así mismo estos autores mencionan sobre el papel de los ingredientes dietéticos en la mejora de la producción de moco/mucina y proporcionan nuevas sugerencias para futuras investigaciones sobre cómo los ingredientes dietéticos/probióticos pueden conformar los llamados alimentos funcionales a base de mantener o mejorar la salud intestinal (Kebouchi, M., *et al.*, 2020).

Los proveedores de atención médica deben estar informados sobre la anatomía de la cavidad bucal y de las implicaciones clínicas, para entender cuál es la correlación entre la salud bucal y enfermedades sistémicas que se presentan dentro de la cavidad bucal y de cómo repercuten hacia enfermedades que se puedan generar en el tracto gastrointestinal. Algunos autores sugieren que la evaluación clínica de la cavidad bucal debe comenzar con la evaluación de las regiones de la cabeza, la cara y el cuello, y de que es importante identificar cualquier asimetría o cambios causados por anomalías de la saliva, de glándulas, y de los ganglios linfáticos de la cabeza y el cuello. Esto es de relevancia para cuando investigadores quieren desarrollar algún prototipo que vaya a ser evaluado dentro de la cavidad bucal, sea una prótesis, implante o sistema de liberación de fármacos (Akintoye, S. O., *et al.*, 2020).

La mucosa se ha reconocido ahora como un sitio potencial para la administración local y sistémica de agentes terapéuticos. Los sistemas de administración de fármacos mucoadhesivos con perfiles de liberación personalizables han ganado recientemente un interés considerable entre los científicos de formulación para mejorar los resultados clínicos de los fármacos. El trabajo de revisión realizado por Kumar y colaboradores, resume el desarrollo actual en los métodos de procesamiento y los polímeros involucrados en los sistemas de administración de fármacos mucoadhesivos. Los sistemas de administración de fármacos mucoadhesivos son adecuados para fármacos que tienen un efecto localizado, experimentan un metabolismo presistémico extenso, una ventana de absorción estrecha y un índice terapéutico estrecho. Las características de los polímeros, como la carga superficial, los grupos de superficies hidrófilos, la humectabilidad, el peso molecular, la flexibilidad de la cadena, las conformaciones moleculares, etc., son fundamentales para evaluar el grado de mucoadhesividad y la respuesta al tratamiento (Kumar, A, *et al.*, 2020).

Se empleó la técnica de moldeo por evaporación del solvente para preparar los insertos tipo parches usando alcohol polivinílico (PVA) como polímero formador de la película al mezclarlo con alginato de sodio, que sería el polímero bioadhesivo. Se investigó el efecto de la adición de carboximetilcelulosa, carbopol, polivinilpirrolidona o metilcelulosa a este sistema. La caracterización del estado sólido de los parches indicó la compatibilidad del fármaco con el componente de la película. Todas las películas evaluadas tenían parámetros bioadhesivo aceptables y resistencia al plegado que dependía de la composición de la película. Los estudios de liberación *in vitro* reflejaron

la cinética de difusión de la matriz para la película y también para formulaciones líquidas (Wafa, H. G., *et al.*, 2021).

1.2. Objetivos

1.2.1 Objetivo general

Preparar un sistema altamente mucoadhesivo para la liberación controlada de nistatina en la cavidad oral, mediante la obtención de películas de complejos de polielectrolitos, recubiertas con fibras electrohiladas de polímeros bioadhesivos en diferentes proporciones.

1.2.2 Objetivos específicos

1. Preparar películas de complejos de polielectrolitos (quitosano y goma arábiga) por la técnica "Solvent-casting" en proporción 1:1, 1:2 y 2:1, con películas no cargadas y cargadas con nistatina.
2. Caracterizar las películas por SEM, TGA, DSC y FTIR.
3. Electro hilar polímeros mucoadhesivos sobre las películas (no cargadas y cargadas)
4. Estudiar el efecto antifúngico en cepas de *Cándida* de las películas.
5. Estudiar la capacidad mucoadhesiva de las películas usando un texturómetro empleando mucosa sublingual de cerdo.
6. Estudiar la citotoxicidad de las películas mucoadhesivas.

1.3 Justificación

La micosis bucal por candidiasis es un padecimiento que aflige en su mayoría a personas inmunocomprometidas y neonatos; el tratamiento actual a base de enjuagues no permanece en el sitio de acción por mucho tiempo, impidiendo llegar a dosis terapéuticas adecuadas debido a las características de la nistatina, además de su desagradable sabor, su administración constante durante cortos periodos de tiempo y las dosis elevadas que se emplean para poder atacar la infección bucal debido a su nula absorción plantea la proposición de un sistema de liberación sostenido mucoadhesivo que sea retenido en el sitio de la infección, de manera que sea cómoda para los pacientes y más efectivo.

1.4 Hipótesis

Se obtendrá una proporción adecuada para mejorar las características de liberación de los films de CHI-GA y así mismo las características mucoadhesivas y de maleabilidad al recubrirlos con una capa mucoadhesiva de electrohilado.

CAPÍTULO II: TEORÍA GENERAL

2.1. Características de la mucosa oral

La cavidad oral se encuentra recubierta por una membrana mucosa que consiste de dos capas: un epitelio y tejido conectivo subyacente. Esta mucosa es nombrada e identificada de acuerdo a su localización y son descritas actualmente tres tipos: masticatoria, de revestimiento y mucosa especializada. La mucosa masticatoria tiene un grosor de 100 a 200 μm , es aproximadamente el 25% del total y su ubicación anatómica es que está en el paladar duro y la encía, esta se encuentra unida estrechamente por la lámina propia al hueso y su epitelio se encuentra queratinizado para resistir la fricción con la comida durante la masticación. La mucosa de revestimiento (60%) cubre la parte interior de los labios, carrillos, paladar blando, el suelo de la boca y la parte inferior de la lengua, tiene un espesor de 500 a 800 μm , su epitelio no se encuentra queratinizado y su lámina propia está estructurada para la movilidad por lo que está unida de una forma más laxa a las estructuras inferiores. Por su parte, la mucosa especializada (15%) se encuentra en la superficie de la lengua y es la responsable de la captación de sabores. El término "bucal", se refiere a los labios superior e inferior así como a la mucosa de la mejilla, y es por ello que representan un tercio de la superficie de la mucosa oral total (Akintoye y Mupparapu, 2020).

2.1.1. Epitelio bucal

El epitelio bucal se compone de múltiples capas de células en diferentes etapas de maduración entre las células más profundas y las superficiales (Figura 1). Las células basales pueden dividirse y mantener una población epitelial celular constante debido a

que migran hacia la superficie conforme avanzan en su estado de maduración. La homeostasis del tejido depende de la diferenciación seguida por la migración y la descamación de las células superficiales (Jose, Rajagopal y Thankam, 2021). Las células de la capa intermedia (espinosas) acumulan lípidos y citoqueratinas de bajo peso molecular que no les permiten agregarse para formar filamentos. Una porción intracelular de lípidos se envasa en pequeños orgánulos llamados recubrimientos, gránulos de membrana o gránulos laminares. Estos gránulos migran a la superficie apical de la célula donde se fusionan con su membrana, la membrana celular y el contenido de lípidos se excretan al espacio extracelular (Nanci, *et al.*, 2013).

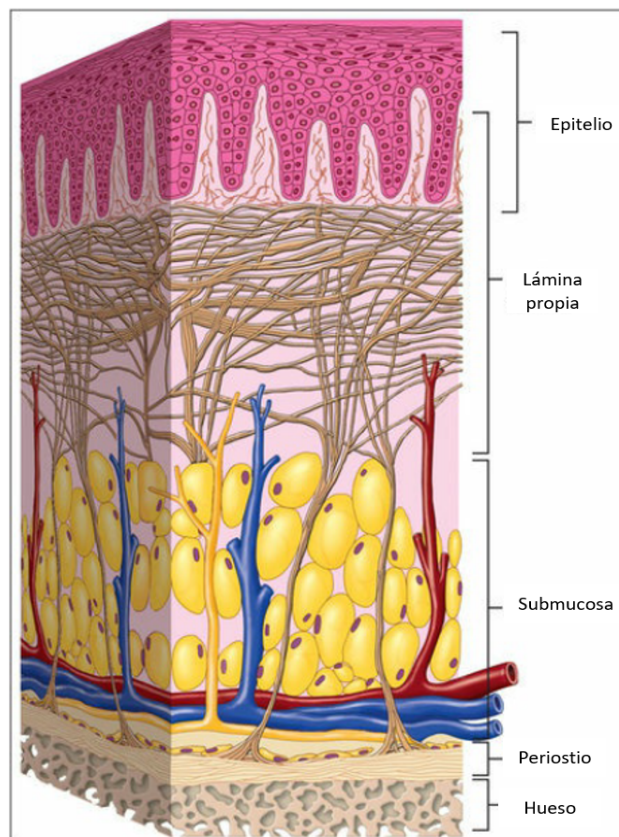


Figura 1. Principales tejidos componentes de la mucosa oral (Nanci *et al.*, 2013).

2.1.2. Moco

El epitelio bucal a su vez se encuentra cubierto por moco, que es una secreción viscosa y adherente sintetizada por células especializadas llamadas caliciformes. Las funciones del moco incluyen la lubricación de las mucosas para el paso de objetos, mantener el epitelio hidratado, funcionar como barrera principal contra agentes patógenos o sustancias nocivas y formar una capa de gel permeable que permita el intercambio de gases y nutrientes hacia el epitelio subyacente (Singh *et al.*, 2002). La composición principal del moco es agua (>95%) y glucoproteínas de muy alto peso molecular ($2-14 \times 10^6$ g/mol) llamadas mucinas, también se encuentran en menor proporción proteínas, lípidos y mucopolisacáridos como IgA, lisozima, lactoferrina, lípidos, polisacáridos y iones, los cuales componen menos del 1% (Kebouchi *et al.*, 2020).

2.1.3. Saliva

Por su parte, dentro de la cavidad oral está presente la saliva, esta se compone principalmente de agua (99.5%), además de enzimas como lisozima, α -amilasa, proteínas, glicoproteínas y electrolitos. Normalmente su pH está entre 5.6-7. Una de las proteínas que contiene es una mucina MG1 que llegan a poseer un alto peso molecular que puede unirse a la superficie de la mucosa oral con el fin de mantener la hidratación, proporcionar lubricación, concentrar anticuerpos y prevenir la fijación de microorganismos (Roblegg, Coughran y Sirjani, 2019). La saliva humedece la boca, inicia la digestión y protege los dientes contra las caries ya que controla el crecimiento

de la microbiota bacteriana de la cavidad oral y tiene un papel importante en la remineralización de los dientes debido a que es alta en calcio y fosfato. Protege los dientes formando una "película protectora". Esto significa una capa de proteína en la saliva de los dientes, que contiene compuestos antibacterianos (Cross y Ruhl, 2018).

2.2. Entrega local de fármacos en la cavidad oral

Existen dos tipos de estrategias principales de entrega de fármacos en la cavidad oral, a través de la mucosa queratinizada o de la mucosa no queratinizada. La selección de una de estas depende de las diferencias anatómicas y de permeabilidad que existe entre estos sitios. La mucosa queratinizada tal como las encías o el paladar duro no es considerada útil para la administración sistémica de fármacos, por lo que únicamente son utilizados para aplicación local en el tratamiento de enfermedades localizadas en estas regiones anatómicas (Harris y Robinson, 1992). Esto se debe a que el entregar el fármaco directamente en el sitio requerido sin una absorción sistémica se asocian con una menor incidencia de efectos adversos e interacciones con otros medicamentos (Klinge y Sawyer, 2013).

La entrega de fármacos a través de la mucosa no queratinizada a su vez puede subdividirse en dos: sublingual (la administración de fármacos a través de la mucosa en el piso de la boca) y la bucal (la entrega de fármacos a través de la mucosa del interior de las mejillas para aplicación sistémica o local). La mucosa sublingual es mucho más permeable y delgada que la mucosa bucal, su capacidad de absorción permite alcanzar niveles terapéuticos rápidamente en sangre, por lo que esta vía es utilizada para

aplicaciones sistémicas en el tratamiento de padecimientos agudos (Takx *et al.*, 2015). La mucosa bucal es sustancialmente menos permeable que la sublingual y no permite el mismo grado de absorción, por lo tanto, la mucosa bucal es una ruta preferida para el tratamiento de padecimientos crónicos cuando se requiere una liberación sostenida ya que así se pueden superar las desventajas de una administración sistémica convencional (Rogawski y Heller, 2019).

La aplicación local de fármacos representa una estrategia más eficiente que la sistémica para el tratamiento de padecimientos orales. Un alto porcentaje de las patologías de la boca son crónicas y por lo tanto requieren un tratamiento prolongado y en su mayoría pueden ser tratadas de manera local sin necesidad de una aplicación sistémica. Por lo tanto, la entrega local de fármacos es mucho más efectiva ya que una menor cantidad del principio activo puede ser efectiva para tratar el padecimiento, reduciendo los efectos adversos. Sin embargo, una limitante a considerar es la limitada área superficial y tiempo de exposición de la mucosa bucal (Madhav *et al.*, 2009).

Además, las propiedades organolépticas de los fármacos o sistemas de liberación como el sabor o consistencia pueden ser un obstáculo en tratamientos prolongados, por lo que esta aplicación es considerada apropiada para principios activos con alto potencial terapéutico, ya que solo una pequeña cantidad del mismo puede ser entregada (Kaminsky, Bostwick y Guthrie, 2015).

2.3. Formulaciones mucoadhesivas

Las formas farmacéuticas convencionales existentes no tienen la capacidad de liberar el principio activo a un ritmo constante en el sitio de acción. Su principal desventaja es una baja biodisponibilidad que depende de los mecanismos fisiológicos de eliminación de la cavidad oral como el efecto de dilución por parte de la saliva y el estrés mecánico. Al ser constantemente eliminadas estas tienen un tiempo de residencia insuficiente, distribución impredecible y una gran liberación inicial seguida de una rápida disminución en las concentraciones por debajo de las terapéuticas (Ranade, *et al.*, 1991). Por estas razones se han desarrollado recientemente sistemas de liberación adhesivos que tienen diversas ventajas sobre los sistemas convencionales incluyendo: contacto directo entre el fármaco y la mucosa, un mayor tiempo de residencia sin interferir con las actividades fisiológicas como comer, hablar o beber y una liberación constante en el sitio de acción (Ways, Lau y Khutoryanskiy, 2018).

Las formas farmacéuticas mucoadhesivas son un nuevo tipo de formulaciones que presentan las propiedades antes mencionadas. En la década de 1980 Ishida y colaboradores fueron unos de los primeros investigadores en desarrollar un sistema mucoadhesivo para la administración de insulina a través de la mucosa bucal en perros (Ishida *et al.*, 1981).

2.3.1. Mecanismos de bioadhesión

Los mecanismos de bioadhesión y métodos para evaluar esta propiedad han sido estudiados y compilados por Peppas y Buri. Existen cuatro teorías clásicas que explican este fenómeno.

a) Teoría electrónica

El polímero y el moco suelen tener diferentes características adhesivas electrónicas. Cuando estas dos superficies entran en contacto, una doble capa de carga eléctrica se forma en la interfaz y luego la adherencia se desarrolla debido a la fuerza de atracción de la transferencia de electrones a través de la doble capa (Smart, J.D. *et al.*, 2005).

b) Teoría adsorción

En la teoría de adsorción, un polímero bioadhesivo se adhiere a la superficie del moco por fuerzas secundarias tales como fuerza de Van Der Waals, puentes de hidrógeno o interacciones hidrofóbicas. Para un polímero bioadhesivo con un grupo carboxilo, el enlace de hidrógeno se considera que es la fuerza dominante en la interfaz. Por otro lado, las interacciones hidrofóbicas pueden explicar el hecho de que un bioadhesivo se puede unir a un sustrato hidrófobo más estrechamente que a una superficie hidrófila (Roy, S., *et al.*, 2010).

c) Teoría humectante

Sobre todo, aplicable a los sistemas bioadhesivos líquidos, la teoría de humectación hace hincapié en el íntimo contacto entre el adhesivo y el moco. Por lo tanto, una superficie humedecida es controlada por similitud estructural, grado de

entrecruzamiento del polímero adhesivo, o el uso de un agente tensoactivo (Smart, J.D. *et al.*, 2005) (Roy, S., *et al.*, 2010).

d) **Teoría de difusión**

La esencia de esta teoría es que las cadenas del adhesivo y el sustrato se interpenetran una a la otra a una profundidad suficiente para crear unión adhesiva semipermanente. La tasa de penetración depende en los coeficientes de difusión, tanto de la interacción de polímeros y el coeficiente de difusión se sabe que dependerá del peso molecular y el grado de entrecruzamiento. Además, la movilidad del segmento, flexibilidad del polímero bioadhesivo, glicoproteína del moco, y la naturaleza expandida de ambas redes son parámetros importantes que deben ser considerados (Singh, J., *et al.*, 2013).

La mucoadhesión es un fenómeno complejo y se han sugerido varias etapas en su formación. El primer paso es la apertura, humidificación y disolución del polímero mucoadhesivo en la interfase. El siguiente paso es la interacción física o mecánica entre el polímero y la superficie mucosa del tejido, lo que resulta en una interpenetración. A continuación, surgen interacciones químicas como enlaces iónicos y covalentes, puentes de hidrógeno, así como interacciones de Van der Waals. Los puentes de hidrógeno e interacciones hidrofóbicas son las más deseables en los sistemas, ya que los enlaces covalentes o iónicos podrían causar daño irreversible en la mucosa.

2.4. Inhibición fúngica por el método Kirby-Bauer

Dentro de la microbiología, este es un método tradicional usando discos de papel y estandarizado que evalúa directamente a los patógenos antimicrobianos y los microorganismos, debido a que ambos están en contacto con el mismo medio de cultivo y la idea es analizar cuál es el efecto que tiene el fármaco o la droga usada sobre un comportamiento microbiano dinámico. Es así como se puede saber la susceptibilidad del microorganismo, o en el caso del estudio de materiales cargados con fármacos, de conocer cuál es la resistencia que pueden presentar los microorganismos a dicho fármaco. La única limitante que se tiene esta técnica es que los resultados *in vitro* de este análisis en general no se pueden extrapolar a los resultados *in vivo* (McLeod, S. D., *et al.*, 1996).

Este método ha sido objeto de modificaciones, por lo que también se le conoce como método modificado de Kirby-Bauer. Aquí se sustituyen los discos de papel usados en el método convencional por perforaciones en el medio de cultivo tipo gel (agar) los cuales se hacen con un sacabocados, y dentro de los mismos es que se añaden las soluciones a ser estudiadas. Esta modificación del método, trae ciertas ventajas como que el contacto de la solución con el medio agar que contiene el patógeno es más directo y efectivo a diferencia de la baja absorción del papel en el método tradicional, y que en muchas oportunidades el papel inoculado se despegaba del medio de cultivo, en este caso de la modificación se elimina este problema (Bhatta D.R., *et al.*, 2007).

2.5. Métodos de obtención de estructuras tipo membranas

Antes de empezar a mencionar detalles sobre alguna de las técnicas usadas para obtener membranas, donde se destaca la técnica de electrohilado o “electrospinning”, es importante mencionar el aporte que han tenido las membranas dentro del desarrollo de estructuras para la Ingeniería de tejidos. Uno de los primeros términos que se tienen que mencionar es la biomimética (Grayson, W.L., *et al.*, 2009) (Wu, s., *et al.*, 2014).

2.5.1. El Biomimetismo

La biomimética es un concepto de gran relevancia para aplicaciones de bioingeniería, y particularmente en la medicina regenerativa e ingeniería de tejido, donde esta definición se refiere a la imitación (o mimetismo), de los componentes de la matriz extracelular (MEC) natural existente en todos los órganos y tejidos de los mamíferos (Ingber, D.E., *et al.*, 2006) (Von der Mark, K., *et al.*, 2010).

La MEC, es una estructura tridimensional conformada por una mezcla compleja de proteínas estructurales, glicoproteínas, y proteoglicanos, dicho arreglo es específico para cada tipo de tejido u órgano. Estas proteínas otorgan soporte estructural, resistencia mecánica, sitios de adhesión celular, modulan diversos procesos como la angiogénesis, vasculogénesis, migración, proliferación y orientación celular, inflamación, respuestas inmunes y la curación de heridas. Se considera el medio ambiente de las células (Sell. S., *et al.*, 2007; Levett, P.A., *et al.*, 2014).

En la figura siguiente se observa la matriz extracelular presente en distintos tejidos, evidenciando su especificidad en función del tejido en particular:

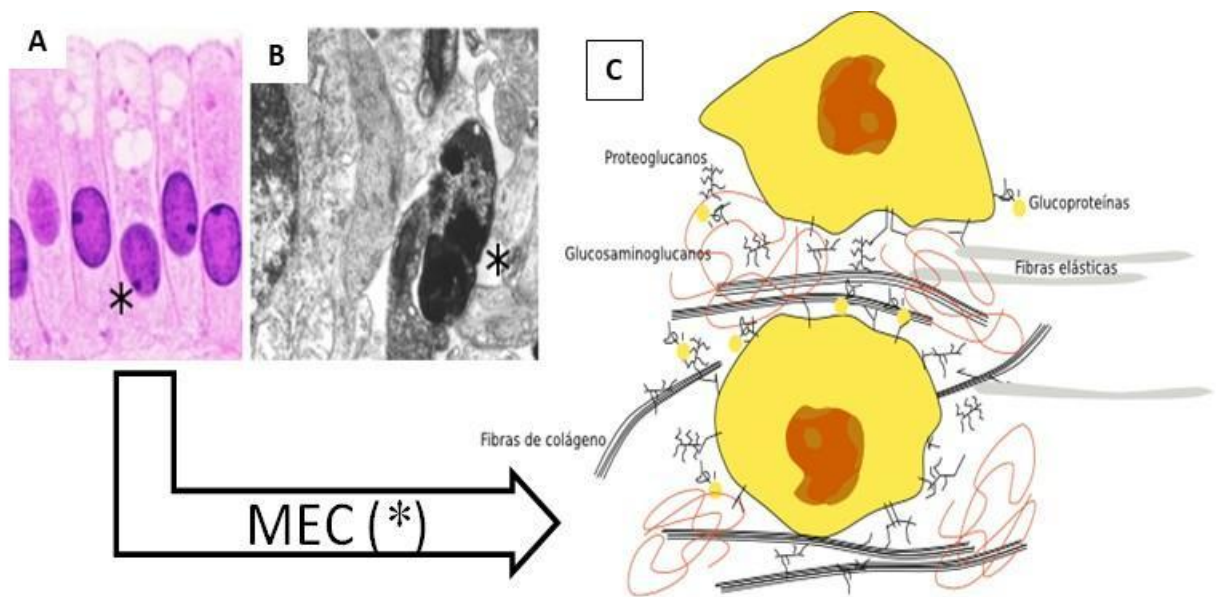


Figura 2. Distintas Matrices Extracelulares MEC (los asteriscos indican la MEC): A) Células epiteliales (no existe sustancia intercelular, prácticamente), B) Tejido nervioso donde la MEC existe en ínfima proporción, C) Sencillo esquema ilustrativo de la estructura de la MEC, la cual varía de acuerdo al tejido tanto en sus constituyentes como en su proporción (Simon-Assmann, P., *et al.*, 1995).

La matriz extracelular representa la acumulación compuesta de moléculas estructurales y funcionales secretadas que son suficientes y necesarias para la organización, viabilidad y plasticidad fenotípica de la población de células residentes de cada tejido y órgano. De hecho, la matriz extracelular es responsable y responde a las necesidades estructurales, mecánicas, metabólicas y funcionales en constante cambio de estas células; en otras es un componente dinámico y fundamental para todos los tejidos y órganos, considerándose el andamio natural que permite la morfogénesis,

mantenimiento, y reconstrucción de tejidos y órganos dañados (Swinehart y Badylak, 2016).

Cuando un biomaterial es empleado con fines de reparación tisular, y es capaz de imitar una o varias funcionalidades mecánicas y biológicas de la matriz extracelular natural, se considera biomimético; de esta manera se facilita el reclutamiento y cultivo celular, su adhesión, proliferación, diferenciación y génesis del nuevo tejido. Empleando materiales poliméricos en forma de andamios tridimensionales esto se hace más promisorio debido a su biocompatibilidad, bioactividad y posibilidad de formación de redes tridimensionales integradas (Jacob, M. P., *et al.*, 2003) (Nawaz, M., *et al.*, 2018).

2.5.2. Membranas

En el sentido más general, una membrana puede definirse como una barrera imperfecta, o como una interfase entre dos fases que restringe el transporte de varias sustancias de una fase a otra de una manera bastante específica (Piskin, *et al.*, 1986). Entre otra de las definiciones sobre membrana se encuentra la propuesta por Yoshito Ikada quien establece que, una membrana se define como un material bidimensional a través del cual algunas sustancias pueden penetrar selectivamente, añadiendo que nuestro cuerpo comprende muchos tipos de membrana como la membrana celular, la membrana basal, la membrana peritoneal y la piel (Ikada, *et al.*, 1991). Y más recientemente se encuentra la definición propuesta por (Baker, *et al.*, 2004) quien define a una membrana como una estructura, cuya propiedad clave es controlar la tasa de permeación de especies químicas entre dos ambientes.

La tecnología de membranas ha cobrado gran importancia en las aplicaciones biomédicas, aumentando su producción de manera tal, que se asemeja prácticamente a la producción de todas las aplicaciones de membranas en el área industrial (Stamatialis, *et al.*, 2008). Esta tecnología es utilizada en diversas áreas de la medicina, donde se destacan: producción órganos artificiales, regeneración de tejidos, dispositivos de diagnóstico, recubrimiento para dispositivos médicos (Stamatialis, *et al.*, 2008), en administración controlada de fármacos donde el objetivo es moderar la tasa de permeabilidad de un fármaco desde un reservorio hasta el cuerpo y en aplicaciones de separación donde el objetivo es permitir que un componente de una mezcla permee libremente la membrana, mientras que impide la permeabilidad de otros componentes (Baker, *et al.*, 2004).

Existen dos clases diferentes de membranas, a saber, las membranas biológicas (biomembranas) y las membranas sintéticas. Entre las biomembranas que existen en el cuerpo humano y otros organismos vivos se encuentran, las membranas celulares, membranas epiteliales, membranas de orgánulos intracelulares, las cuales no sólo proporcionan una barrera entre el mundo vivo y el inanimado, sino que también ayudan en tareas como asumir nutrientes, eliminar residuos, regular el metabolismo entre otros. Por otra parte, las membranas sintéticas, pueden consistir en una gran variedad de materiales, incluyendo principalmente polímeros naturales y sintéticos, metales y cerámicas, vidrio, carbonos o combinaciones de estos materiales con productos naturales como el colágeno, albúmina y demás (Piskin, *et al.*, 1986).

Las membranas de poliméricas tienen un gran campo de estudio, en especial en el área de la biomedicina puesto que haciendo uso de los distintos tipos de polímeros sintéticos o de biopolímeros naturales: colágeno, alginato, celulosa y quitosano (Shahram Mehdipour-Ataei, *et al.*, 2015), se logran formular membranas con excelente biodegradabilidad y biocompatibilidad, e incluso con mucoadhesividad; las cuales son propiedades altamente requeridas en la administración de fármacos, separación de biomoléculas, órganos artificiales, así como en la ingeniería de tejidos (Athiyanathil Sujith, *et al.*, 2015).

2.5.3. Andamios tridimensionales para la Ingeniería de Tejidos

La mayoría de las técnicas existentes de ingeniería de tejido se basan en el uso de andamios. Estos son macroestructuras porosas tridimensionales, que actúan como soporte para el anclaje celular inicial, y subsecuente formación del tejido tanto *in vitro* como *in vivo* (Zhang, D., *et al.*, 2008). La siguiente figura muestra un andamio que pareciera macroscópicamente que es una lámina o membrana en 2D, pero si vemos su morfología interior a través de la microscopia electrónica, se puede constatar que se trata de una estructura tridimensional 3D, porosa, para ingeniería de tejidos.

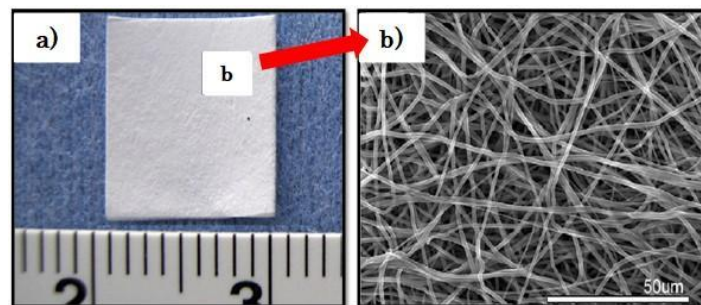


Figura 3. Andamio 3D en forma de lámina de poli (ϵ -caprolactona): a) Vista a escala real, b) Micrografía MEB del andamio (tomado de Park, J. Y., *et al.*, 2008).

Las dimensiones celulares se ubican dentro de la escala micrométrica, desde cerca de 10 μm hasta 100 μm en diámetro; las proteínas son aún más pequeñas, estando desde el rango de los nanómetros (ej., integrinas con 10 nm) hasta los cientos de nanómetros (Ej., proteoglicanos y proteínas fibrosas de la MEC, con diámetros desde 50-150 nm, dependiendo del tipo de tejido) (De Souza, R. S., *et al.*, 2011).

Los procesos y comportamientos celulares toman lugar en esta escala micro y nanométrica; los avances en micro y nanotecnología han permitido el desarrollo de la ingeniería de tejido, en unión con otras disciplinas (Katz, E., *et al.*, 2007).

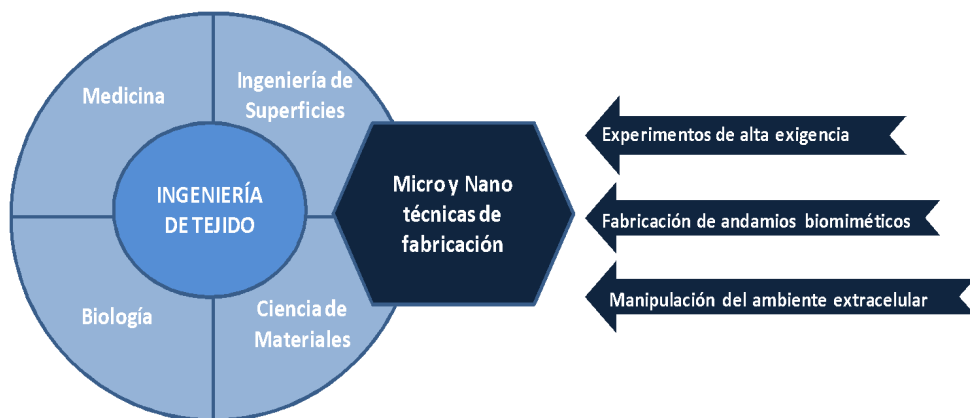


Figura 4. Relación entre las técnicas de micro y nanofabricación con el desarrollo de la Ingeniería de tejido.

Cuando un implante hace el primer contacto con el ambiente del receptor, las proteínas son las primeras entidades biológicas para interactuar con la superficie del biomaterial.

Las células no interactúan con superficies desnudas, de modo que la presencia de moléculas específicas es primordial para una correcta adhesión y proliferación celular, dada sobre la superficie de un determinado sustrato; son las proteínas los elementos claves creando un puente entre superficies no biológicas de materiales y entidades biológicas, como las células (Gao, Z., *et al.*, 2016) (McMullen, M. E., *et al.*, 2005).

Para poder entender los sistemas que se contemplan en esta investigación, es necesario conocer la definición de lo que son las membranas y los aportes que estas pueden aportar en diversas aplicaciones biotecnológicas.

2.5.4. Electrohilado

Esta técnica ha existido en la literatura desde hace más de 100 años (Tucker, N., *et al.*, 2012). A finales de los años 1800, Lord Rayleigh estudió los principios fundamentales del *electrospinning*, calculando la cantidad de carga máxima que una gota de un líquido podía aguantar antes de que las fuerzas electrostáticas sobrepasaran la tensión superficial de la gota, y se liberara un fino chorro del líquido a partir de la gota colgante (Figen, A. K., *et al.*, 2020).

Esta técnica fue patentada por Formhals en 1934, en donde un arreglo experimental era descrito para la producción de fibras poliméricas empleando fuerza electrostática (Tucker, N., *et al.*, 2012)

En 1960, Taylor estudió la deformación y desintegración de gotas de agua en un campo eléctrico, determinando que, al aumentar el potencial aplicado, se promueve la

formación de un menisco cónico en la gota colgante (cono de Taylor), asociado a un ángulo crítico (Subbiah, T., *et al.*, 2005).

Desde 1980 hasta la actualidad, ha incrementado el interés por esta técnica debido al auge de la nanotecnología e ingeniería de tejido. Derivándose de “*electrostatic spinning*”, el término “*electrospinning*” empezó a emplearse a partir de 1994 aproximadamente. Esta técnica permite producir micro/nanofibras a través de un chorro de solución polimérica eléctricamente cargada, o de polímero en estado fundido. Las fibras obtenidas a través del *electrospinning* se denominan fibras *electrospun* (Islam, M. S., *et al.*, 2019).

El equipo de electrohilado en su forma más básica, consiste en una pipeta para contener la solución polimérica (cuya punta debe ser un capilar muy delgado a través del cual descenderá el polímero), dos electrodos (punta-placa), y una fuente de voltaje de corriente continua (DC) en el rango de los kilovoltios (kV) (Beachley, V., *et al.*, 2009).

Inicialmente, la solución polimérica es sostenida por su tensión superficial en forma de una gota en la punta del capilar o aguja empleada; mientras el voltaje aumenta, se induce una carga en la superficie del fluido y se distorsiona la gota. Por encima de un voltaje crítico, se supera la tensión superficial de la gota colgante inyectándose un chorro que reduce su espesor a lo largo del recorrido, de la punta del capilar hacia el colector, simultáneamente ocurre la evaporación del solvente de la solución polimérica (Veleirinho, B., *et al.*, 2008).

El resultado del proceso es una red tridimensional de fibras dispuestas sobre la superficie del colector, con alta relación área/volumen, porosas, e interconectadas entre sí, de diseños topológicos convenientes imitando la morfología de la MEC (Whited, B. M., *et al.*, 2014). El electrohilado es un método de un solo paso, requiriendo un equipo de bajo costo y relativamente fácil manejo, ajustable al ambiente de laboratorio para producir a baja y gran escala (Persano, L., *et al.*, 2013) (Yu, M., *et al.*, 2017).

Seguidamente, se presenta un esquema sencillo del montaje experimental o requerimientos del proceso de electrohilado:

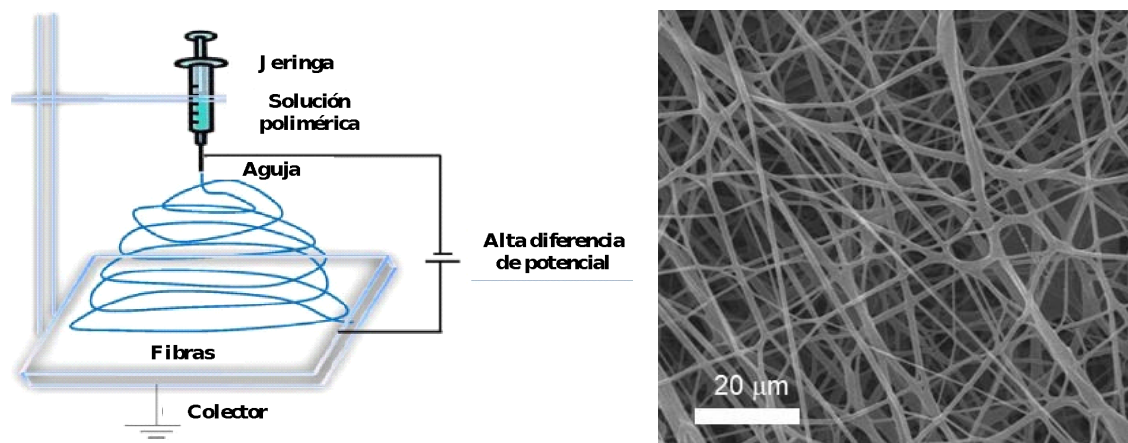


Figura 5. Esquema del equipo y proceso de *electrospinning en disposición vertical*. Detalle de la superficie de una membrana polimérica creada por la técnica (Islam, *et al.*, 2019).

Existen importantes características dentro del proceso de electrohilado (Islam, M. S., *et al.*, 2019) (Persano, L., *et al.*, 2013) (Yu, M., *et al.*, 2017):

- El solvente empleado y su presión de vapor deben ser adecuados, para disolver el polímero, y para que su evaporación sea lo suficientemente rápida para que la fibra mantenga su integridad al alcanzar el colector, más no tan rápida como para permitir que la fibra endurezca antes de que alcance el rango micro/nanométrico.
- La viscosidad y tensión superficial del solvente no debe ser muy alta, previniendo que el chorro formado no sea tan pequeño y así, ocurra el drenaje libre de la solución polimérica desde el capilar.
- La fuente de poder debe ser adecuada para superar la viscosidad y tensión superficial de la solución para formar y sostener el chorro desde el capilar.
- La distancia entre el capilar y el colector puesto a tierra, debe ser suficientemente amplia como para que el solvente se evapore a tiempo y las fibras se formen; además, de que no se creen chispas entre los electrodos.

De acuerdo a la literatura, cerca de 100 polímeros naturales y sintéticos, primordialmente en solución, se han empleado satisfactoriamente para generar fibras ultrafinas empleando esta técnica. Por ejemplo: colágeno, elastina, quitosano, quitina, seda, caseína, fibrinógeno, alginato, ácido hialurónico, poliamidas (PA), polipropileno (PP), polietileno (PE), poliacrilonitrilo (PAN), polióxido de etileno (POE), polimetilmetacrilato (PMMA), poliuretano (PU), polivinil alcohol (PVA), polidioxanona (PDS), Nylon-6, polianilina y aramidas, los típicamente empleados en aplicaciones biomédicas son poliésteres hidrofóbicos biodegradables como el PGA, PLGA, PCL, y PLA (Pham, Q. P., *et al.*, 2006).

También, han sido empleadas mezclas de polímeros donde se combinan propiedades características de los materiales empleados, permitiendo obtener micro/nanofibras con mejores tiempos de degradación, resistencia, y bioactividad, en comparación a aquellas producidas empleando sólo un polímero en solución (Park, J. S., *et al.*, 2011).

Mezclas empleadas han sido: colágeno/quitosano, colágeno/elastina, fibrina de seda/quitina, PCL/PLGA, PCL/PLA, PCL/Quitosano, PCL/Colágeno, PANI/POE, POE/Quitosano, PLA/Gelatina de pez, PVA/Quitosano, entre muchas otras (Rieger, K. A., *et al.*, 2016).

Variando los parámetros del proceso, modificando los elementos o configuración de ellos, pueden obtenerse distintas morfologías en las fibras (Li, Z., *et al.*, 2013) (Long, Y. Z., *et al.*, 2019).

2.6. Biocompatibilidad celular.

Biocompatibilidad celular, implica que el biomaterial usado no debería provocar una respuesta inflamatoria o tóxica en el órgano receptor, sino promover la armonía y correcta integración de las células en el tejido-implante. Una respuesta inflamatoria inicial es considerada normal, pero cuando se torna prolongada, no es deseable ya que indica incompatibilidad o necrosis del tejido por incompatibilidad. Si el biomaterial es biodegradable se debe garantizar que los productos de degradación deben ser no-tóxicos, permitiendo su metabolización y eliminación del cuerpo (Daneshmandi, L., *et al.*, 2021).

Una de las formas de estudiar la biocompatibilidad celular respecto a un biomaterial, es a través del ensayo MTT, lo cual se considera una prueba fácil y rápida para la evaluación de la citotoxicidad y se utilizó en este trabajo para evaluar la citotoxicidad de las membranas (Van Meerloo, J., *et al.*, 2011). La prueba MTT se utiliza para evaluar los efectos de los polímeros de su superficie y composición sobre la actividad metabólica de las células como respuesta a la interacción a nivel de la interfase biomaterial-célula. Estos resultados van acompañados de análisis estadísticos de los resultados para determinar la viabilidad celular (% de control). Teniendo en cuenta que las células en proliferación son metabólicamente más activas que las células que no proliferan (en reposo), estos resultados también pueden interpretarse como el posible impacto de los polímeros en la etapa de proliferación celular. Esto es probablemente una indicación de que los polímeros pueden influir favorablemente o no en la actividad lisosomal y mitocondrial de las células, es de allí su gran potencial para conocer la citocompatibilidad (Zhu, D., *et al.*, 2019).

2.7. Biomateriales usados en aplicaciones biomédicas

2.7.1. Quitosano

El quitosano es un compuesto macromolecular natural, en específico, un copolímero polisacárido catiónico (Do Nascimento, *et al.*, 2017) formado por unidades aleatorias de N-acetil D-glucosamina y D-glucosamina, estructura mostrada en la Figura 6, unidas entre sí por enlaces glicosídicos $\beta(1\rightarrow4)$ (Ravi Kumar, *et al.*, 2015) y dada su estructura de polisacárido, se da la formación de enlaces de hidrógeno inter e intramoleculares que le aportan rigidez a la estructura, convirtiéndolo en un material semicristalino.

Es generalmente, producto de la desacetilación parcial de la quitina, el cual después de la celulosa, es el segundo polímero más abundante de la naturaleza y se encuentra presente principalmente en los exoesqueletos de los crustáceos e insectos (Do Nascimento, *et al.*, 2017).

De las propiedades que definen el comportamiento, características y funcionalidad para el área en que este biopolímero puede ser utilizado se encuentran: el peso molecular y el grado de desacetilación (DD). Los cuales afectan las propiedades físicas como químicas, que involucran resistencia mecánica, solubilidad, flexibilidad, tamaño de poros, biodegradabilidad, actividad antimicrobiana, entre otras (Tsaih, *et al.*, 2003). Sin embargo, de estas propiedades el DD juega un papel muy importante.

Dado que el quitosano es un copolímero producto de las dos especies descritas antes, el DD permite determinar si el biopolímero es quitina o quitosano mediante la representación de la proporción de unidades de N-acetil-D-glucosamina con respecto al número total de unidades en el biopolímero. A saber, si se tiene un DD mayor a 40% o 55% se define que el compuesto es quitosano (Li Baoqiang, *et al.*, 2015). El DD define también la solubilidad, así como el área de aplicación siendo que, en principio quitosanos con un DD superior a 60% son solubles en una solución acuosa ácida (Tsaih, *et al.*, 2003) y quitosanos con un grado de desacetilación que oscile entre valores del 80 a 95% son empleados en el área de la biomedicina.

En cuanto a nivel biomédico se refiere, este biopolímero natural presenta características atractivas y versátiles debido a sus diversas modificaciones químicas en grupos amino y propiedades biológicas como: biodegradabilidad, biocompatibilidad, actividad antibacteriana y capacidad hemostática, que le confieren aplicaciones en

campos biomédicos, tales como administración de fármacos, andamiaje en ingeniería de tejidos y apósitos para el tratamiento de heridas (Li Baoqiang, *et al.*, 2015).

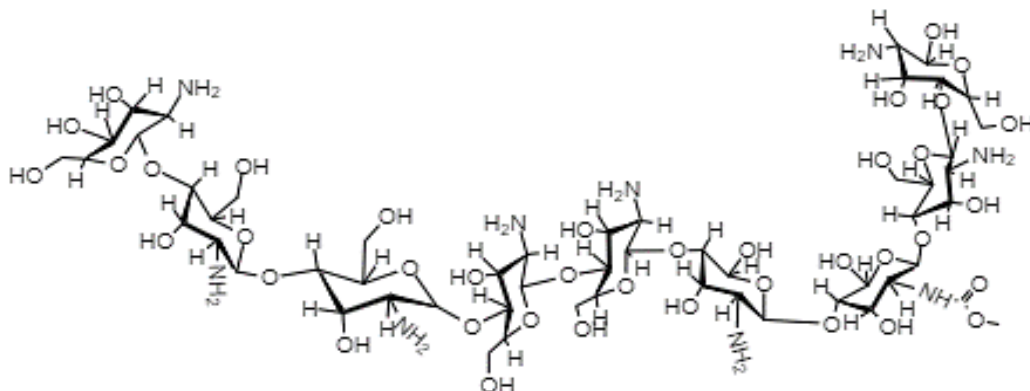


Figura 6. Estructura química del quitosano. El quitosano es un copolímero con una unidad acetilada a la izquierda y una desacetilada a su derecha, donde $m > n$ (Do Nascimento, *et al.*, 2017).

2.7.2. Poli ϵ -caprolactona (PCL)

La poli ϵ -caprolactona (PCL) es un poliéster de tipo alifático y carácter hidrófobo. Se trata de un polímero semicristalino, dúctil y semirrígido a temperatura ambiente, posee buenas propiedades físicas y su excepcional capacidad para la formación de mezclas, ha incentivado la inversión a favor de su investigación para sus aplicaciones como biomaterial. El tiempo de degradación estimado del homopolímero es aproximadamente 2 años, por lo que suelen sintetizarse en forma de copolímeros (de ϵ -caprolactona y D-L-lactida, por ejemplo) para incrementar la velocidad de degradación. La PCL se usa como adhesivo, compatibilizador, modificador y en fabricación de películas, en el campo de la agricultura se emplea en contenedores de plantación de árboles, sistemas de liberación de drogas y matrices para controlar la liberación de pesticidas, herbicidas y fertilizantes; así como en

aplicaciones médicas (Mohamed, R.M., 2016) (Lyu, J. S., *et al.*, 2019). En la figura siguiente se aprecia la estructura química de este poliéster alifático semicristalino.

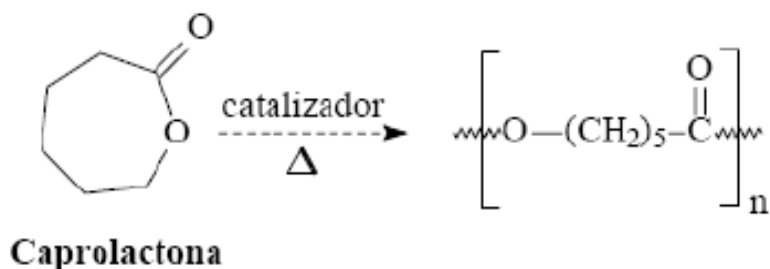


Figura 7. Síntesis de la poli ϵ -caprolactona y unidad repetitiva (Lyu, J. S., *et al.*, 2019).

2.7.3. Nistatina

La nistatina es un compuesto orgánico de la familia de los polienos, y como fármaco es probablemente el agente más popular para tratar las infecciones micóticas superficiales causadas por *C. albicans*. Tiene actividad fungicida y fungistática dependiendo de la concentración administrada. No se absorbe cuando se administra por vía oral y es demasiado tóxico para uso parenteral, a diferencia de su contraparte la anfotericina B (que se usa ampliamente por vía sistémica para una variedad de infecciones fúngicas). Está disponible en forma de crema, tabletas, suspensión, enjuague bucal, gel o pastilla. Cuando se presenta en la forma de pomada esta contiene perfumes y otros agentes y no es adecuada para uso intraoral, pero se ha utilizado para el tratamiento de la queilitis angular. Las tabletas de nistatina, pastillas y tabletas vaginales se usan comúnmente para el tratamiento de la candidiasis oral.

Este último es muy eficaz cuando se usa por vía oral siempre que se convenza al paciente de que los tome; sin embargo, el sabor amargo de las tabletas para afecciones vaginales da como resultado una mala aceptación por parte de la paciente (Hollinger, M. A., *et al.*, 2002). Estas buenas propiedades antifúngicas pero limitadas propiedades fisicoquímicas para su disolución para poder ser usada en diversos tipos de medios terapéuticos, hacen que sea necesario pensar en poder encapsular esta molécula en vehículos (como polímeros) que permitan su aplicación, sobre todo a nivel de la cavidad bucal.

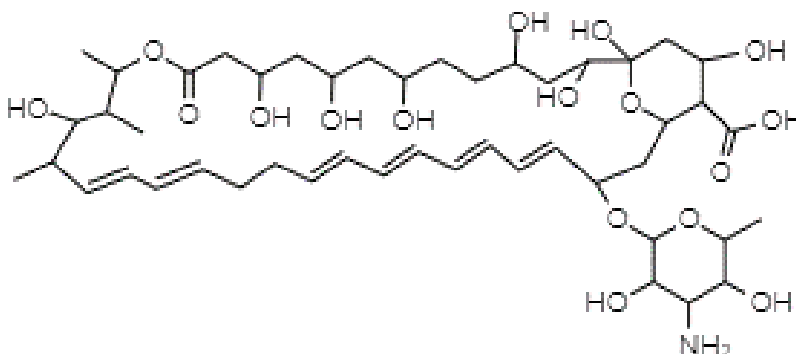


Figura 8. Estructura molecular de la Nistatina Como se aprecia, la estructura molecular corresponde a un polieno cíclico. Se aprecia la presencia de largas cadenas alifáticas con insaturaciones consecutivas tipos dienos y tetraenos, y su cadena sustituida con varios grupos hidroxilos, y un grupo amino (Hollinger, M. A., 2002).

2.7.4. Policarbofil (PCF)

El policarbofilo (PCF), un tipo de polímero farmacéutico con altas propiedades bioadhesivas, se ha utilizado ampliamente en el campo de los sistemas de administración de fármacos controlados. Pero también se puede usar como espesante

altamente eficiente, agente bioadhesivo, coadyuvante de suspensión y estabilizador de emulsión cuando se dispersa en agua u otros disolventes polares. Estas excepcionales ventajas de este polímero se deben a su naturaleza altamente hidrófila. El enlace de hidrógeno juega un papel importante en la mayoría de los comportamientos de adhesión y se convierte en la principal fuerza de adhesión que generan sus cadenas. Esto es lo que ha permitido que el PCF sea usado en los sistemas de administración de fármacos oculares, administración de fármacos a través de la mucosa nasal, administración de fármacos de la mucosa vaginal, administración de fármacos de la mucosa bucal, y para los sistemas de administración de fármacos de liberación controlada (Serra, L., *et al.*, 2009).

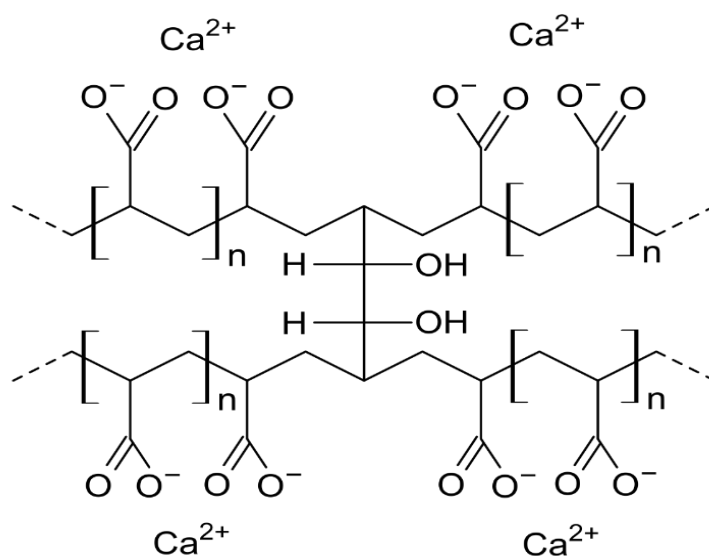


Figura 9. Estructura molecular del polímero bioadhesivo Policarbofil PCF, en su forma iónica (con Calcio Ca^{+2}). Se aprecia la presencia de los grupos funcionales laterales a su cadena polimérica principal que son los responsables de su capacidad adhesiva (Zhu, Z. *et al.*, 2013).

Dado que las uniones de polímeros bioadhesivos como el PCF a organismos biológicos se produce principalmente a través de la interpenetración seguida de una unión secundaria. Y el enlace secundario se crea principalmente por el enlace de hidrógeno que está bien aceptado que los polímeros que poseen grupos funcionales hidrófilos como: carboxilo (COOH), hidroxilo (OH), grupos sulfato (SO₄H) y amida (NH₂). Por lo general, las interacciones secundarias (se refiere principalmente a los enlaces de hidrógeno) juegan un papel importante en la formación de una red más fuerte (que se genera por las interacciones inter e intra-moleculares a través de toda la cadena del polímero PCF) (Madsen, F., *et al.*, 1998), como se muestra en la figura 9 anterior.

2.7.5. Polímero Natural Goma Arábica

La goma arábica (GA) o goma de acacia es el exudado de los árboles *Acacia senegal* y *Acacia seyal*, pertenecientes a la familia Leguminosae (ver la figura 10). Es un heteropolisacárido complejo, ramificado, neutro o ligeramente ácido y compuesto por unidades de β-d-galactopiranosilo enlazadas 1,3. También se han detectado como componentes de este polímero L-arabinosa, L-ramnosa y ácido D-glucurónico. Las cadenas laterales están compuestas de dos a cinco unidades de β-d-galactopiranosilo con enlaces 1,3, que se unen a la cadena principal mediante enlaces 1,6. Algunas fuentes informan que esta goma es una mezcla de polisacáridos y glicoproteínas. Las piezas de GA de color naranja claro o blanco pálido son solubles en agua. La distribución geográfica de estas plantas va desde el oeste de África hasta la península india. La mayor parte de la AG se extrae de las tierras áridas de Sudán, Chad, Nigeria,

Senegal y Etiopía. Sudán es el mayor exportador y representa hasta el 80% del comercio, seguido de Nigeria (Ali B.H., *et al.*, 2009).

En la GA ha encontrado una amplia utilidad en la industria alimentaria. Por sus atributos emulsionantes, estabilizantes, espesantes y aglutinantes, se incorpora en formulaciones alimentarias que van desde helados, jaleas, caramelos, refrescos, bebidas, jarabes y chicles. Las propiedades filmógenas lo hacen ideal para revestimientos y esmaltes de confitería. La capacidad de mejorar la vida útil de los sabores lo hace atractivo como aditivo alimentario (Islam, A. M., *et al.*, 1997).

La calidad de GA se evalúa en función de parámetros como color, olor, contenido de humedad y cenizas, viscosidad, pH, rotación específica, taninos y concentración de varios metales. Los minerales que se encuentran generalmente son Ca, Na, K, P y trazas de Pb, Co, Cu, Zn, Ni, Cd, Cr y Mn. Si la calidad de GA se ajusta bien a los estándares internacionales, solo entonces se exportan (Islam, A. M., 1997).

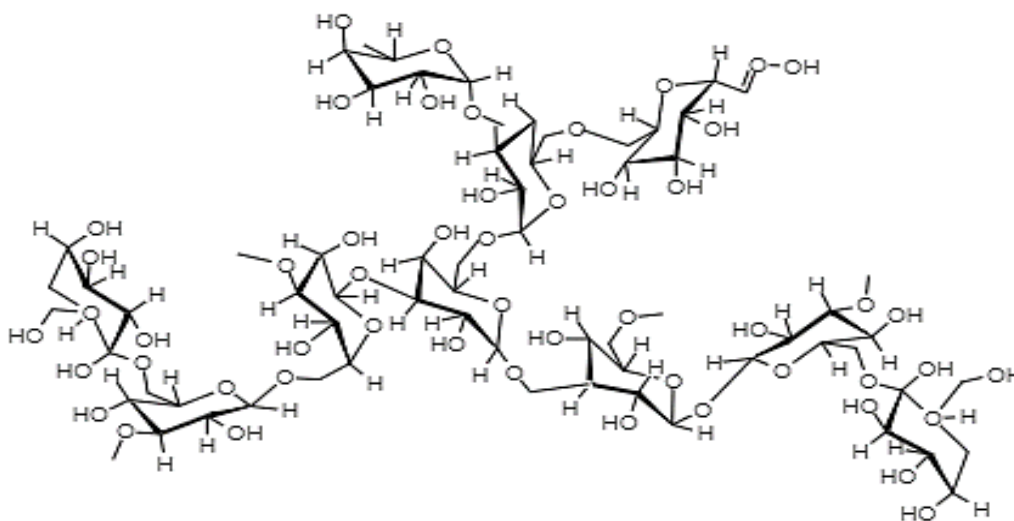


Figura 10. Estructura molecular de la Goma Arábica (Islam 1997).

CAPÍTULO III: PARTE EXPERIMENTAL

3.1 Materiales

- Quitosano de bajo peso molecular (50-190 KDa) 75-85% desacetilación (Sigma-Aldrich), CHI;
- Goma Arábica (Spectrum), GA;
- Policaprolactona (Sigma-Aldrich) PCL;
- Noveon® AA-1 polycarbofil (Lubrizol advanced materials);
- Nistatina +85% (Acros Organics BVBA)
- Fosfato de potasio monobásico (Fermont)
- Fosfato de potasio dibásico (Mallinckrodt)
- Agar Muller-Hinton (BBL)
- *Candida albicans* ATCC 14053.
- MTT (MERK)
- Suero fetal bovino (Corning)
- Dimetil sulfoxido (aldrich)
- Tripsina (sigma)
- MEM (himedia)
- Penicilina (sigma)
- Azul de tetrazolium bromo tiazol (sigma)
- ATCC CCL-1, Línea celular NCTC Clone 929 [L cell, L-929, derivative of Strain L] "PASE CERO", Organismo: mus musculus, Morfología: fibroblastos.

3.2 Síntesis de los Films de Polielectrolitos

Film CHI-GA 1-1:

Los Films de PEC fueron preparados utilizando la técnica "Solvent-Casting" (Kilicarslan *et al.*, 2018). Se preparó una solución de quitosano al 5%, para ello se añadió 750 mg del biopolímero CHI en 15 mL de agua desionizada en agitación continua de 25 rpm por 5 min a temperatura ambiente hasta disolverlo por completo, pero para garantizar

su disolución total se agregó 160 μ L de ácido acético glacial al 0.1%; por otra parte, una cantidad equivalente de GA se disolvió en 15 mL de agua desionizada en agitación continua de 25 rpm por 5 min a temperatura ambiente. De esta manera se formó la polimezcla en solución CHI-GA 1:1.

Film CHI-GA 1-2:

Los Films de PEC fueron preparados utilizando la técnica “Solvent-Casting” (Kilicarslan *et al.*, 2018). Se preparó una solución de quitosano al 5% añadiendo 500 mg del polímero en 15 mL de agua desionizada en agitación continua de 25 rpm por 5 min a temperatura ambiente hasta disolverlo por completo, pero para garantizar su disolución total se agregó 160 μ L de ácido acético de ácido acético glacial al 0.1%; por otra parte, 1000 mg de GA se disolvió en 15 mL de agua desionizada en agitación continua de 25 rpm por 5 min a temperatura ambiente. De esta manera se formó la polimezcla en solución CHI-GA 2:1.

Film CHI-GA 2-1:

Los Films de PEC fueron preparados utilizando la técnica “Solvent-Casting” (Kilicarslan *et al.*, 2018). Se preparó una solución de quitosano al 5% añadiendo 1000 mg del polímero CHI en 15 mL de agua desionizada en agitación continua de 25 rpm por 5 min a temperatura ambiente hasta disolverlo por completo, pero para garantizar su disolución total se agregó 160 μ L de ácido acético de ácido acético glacial al 0.1%; por otra parte, 500 mg de GA se disolvió en 15mL de agua desionizada en agitación

continua de 25 rpm por 5 min a temperatura ambiente. De esta manera se formó la polimezcla en solución CHI-GA 1:2.

Los Films PEC placebo fueron obtenidos por la adición gradual de la solución del polianión quitosano en agitación utilizando un homogeneizador 5000 rpm por 10 minutos.

En el caso de los films cargados con NYS, después de la adición de la solución del polianión, se añadió una solución de NYS (25 mg en 20 mL de etanol) y se mantuvo en agitación a 5000 rpm por 10 minutos.

Las mezclas obtenidas fueron transferidas a placas de vidrio silanizado de 10x10 cm, y se colocaron en un horno a 40°C por 48 h. Los films obtenidos fueron retirados con sumo cuidado de las placas y se inspeccionaron macroscopicamente en busca de imperfecciones, como por ejemplo burbujas de aire. Los films se mantuvieron a temperatura ambiente hasta el momento de su análisis.

3.3 Recubrimiento de las películas con electrohilado mucoadhesivo

La policaprolactona PCL fue el polímero usado para hacer el recubrimiento de las membranas formadas de CHI-GA en las diferentes composiciones, y se usó la técnica de electrohilado para hacer dicho recubrimiento.

Para determinar el grosor de la capa de recubrimiento se realizaron pruebas piloto con 0.5 mL, 1 mL y 1.5 mL de PCL al 10% disuelto en cloroformo, y fue colocada esa solución en la jeringa usada para el electrohilado. Debido al grosor y a la poca interacción con el film debido a su rigidez de los recubrimientos de 1 mL y 1.5 mL fueron descartados y se procedió a recubrir los films con 0.5 mL de la solución de polímero para el electrohilado.

La solución de 10% PCL (p/p) y 1.25% PCF (p/p) se obtuvo disolviendo por separado los compuestos, PCL se disolvió en cloroformo durante 24 h a una temperatura constante de 40 °C, mientras PCF se disolvió en metanol a temperatura ambiente durante 24 h, para asegurar una mezcla homogénea la solución de PCF se agregó lentamente al PCL por goteo y posterior a la adhesión se dejó en agitación y temperatura continúa hasta su utilización.

Las condiciones de electrohilado fueron con una humedad del 33 % a una temperatura de 26 °C con una distancia punta-colector de 15 cm, un voltaje de 20 KV y un flujo de hilado de 0.80 mL/h según (Pérez-González et al., 2019).

El colector metálico y plano del equipo de electrohilado fue recubierto con una capa de aluminio, posteriormente los films de las mezclas CHI-GA fueron previamente cortados en dimensiones de 1x1 cm fueron adheridos al colector con un poco de metanol, se dejó evaporar el metanol y posteriormente se eliminó la electroestática existente dentro de la cámara de electrohilado, prosiguiendo con la colocación del colector en su base,

una vez colocado se le conectó su terminal eléctrica al igual que se le colocó una a la punta de la jeringa, se cerró todo herméticamente con las condiciones anteriormente mencionadas y se prosiguió al electrohilado. Para retirar el film electrohilado de la placa colectora se hizo uso de una espátula, posteriormente se retiró el excedente de cada film.

3.4 Determinación de la morfología de los films de PEC utilizando microscopía electrónica de barrido (SEM)

El análisis de la morfología de los films de PEC fueron determinados utilizando un microscopio electrónico de barrido (JIB-4500, Jeol, Japón). Los films fueron colocados en un portamuestras metálico y dada su baja densidad electrónica se cubrieron con una capa de oro para poder ser observados al microscopio (Wang, Khor y Lim, 2001). Se tomaron imágenes de los films placebo y cargados de NYS de las formulaciones en una vista de la superficie y de canto para determinar la variación en el grosor de los films.

3.5 Espectroscopia infrarroja transformada de Fourier (FT-IR)

Es una técnica espectroscópica fundamental para el análisis y la caracterización de los compuestos orgánicos, entre los que se encuentran los polímeros sintéticos o naturales (pero también se puede usar para caracterizar moléculas inorgánicas). A través de ella se pueden dilucidar sus estructuras químicas, considerando las vibraciones moleculares de los grupos funcionales (IR), pero también se pueden estimar procesos

de oxidación o de degradación, interacciones entre átomos, reacciones de modificación química, etc.

Es por ello que, con el propósito de determinar la presencia de los grupos funcionales característicos de los sistemas en estudios, se obtuvieron los espectros de FT-IR para los polímeros, el recubrimiento de electrohilado, el fármaco, los films placebo y films cargados con NYS (FT-IR Nicolet™ iS™ 5, 400–4000 cm^{-1} , 16 escaneos) todas las muestras se evaluaron en estado sólido.

3.6 Calorimetría de escaneo diferencial y análisis termogravimétrico

La calorimetría de escaneo diferencial (DSC, por sus siglas en inglés), es una técnica que usa el calor como fuente para producir cambios en un material. Puede ser un material orgánico como los polímeros, o inorgánico, una mezcla de ellos, también pueden ser cristales de un compuesto orgánico, etc. Se emplea para determinar la temperatura de cambio de fase que puede ser de carácter primario como lo son las temperaturas de cristalización y de fusión, o las temperaturas de carácter secundario como la transición vítrea, o las temperaturas de transición conformacional. Esto permite determinar si el material tiene carácter cristalino, semicristalino o amorfo.

En el caso de la Termogravimetría (TGA, por sus siglas en inglés), esta técnica, también se apoya en el suministro de calor, para generar cambios en una muestra de carácter orgánico, inorgánico, incluso metálico, sobre su resistencia térmica a los procesos de descomposición, permitiendo determinar a partir de cuál valor o rango de

temperatura se inician estos procesos, y cuando cuesta energéticamente el mismo, entre otras cosas.

Para confirmar la formación de los PEC, se llevaron a cabo estudios de calorimetría de escaneo diferencial (DSC) y análisis termogravimétrico (TGA) (SDT Q600, TA Instruments, EUA). Se pesaron entre 1.5 y 3 mg de los polímeros, sus mezclas físicas, NYS, los films placebo y los films cargados de NYS. Las muestras se colocaron en celdas calibradas de aluminio y el escaneado fue realizado a 10 °C/min en un rango de 20 a 400 °C bajo atmósfera de nitrógeno.

3.7 Grado de hinchamiento

Este proceso de cambio de volumen de una muestra que se pone en contacto con el agua o alguna solución acuosa, permite analizar cómo la red de cadenas moleculares del polímero que conforma la muestra, en este caso de las membranas obtenidas, está unida a través de enlaces covalentes, los cuales son interacciones fuertes, que dan lugar a mallas entrecruzadas, que no permiten la separación de las cadenas poliméricas, y le proporciona a la muestra la posibilidad de “hincharse” frente al medio acuoso; y de no ser disuelto, manteniendo un arreglo estructural bien definido, en tres dimensiones, que vendría a ser lo que se denomina estabilidad dimensional. Este hinchamiento es debido a la presencia en la estructura de grupos solubles en agua (-OH, -COOH, -CONH₂, -CONH, SO₃H), que les asocia un carácter hidrófilo a las redes poliméricas; estos grupos además son ideales para mejorar las propiedades de

adhesividad como la mucoadhesividad que es una de las propiedades de interés en este trabajo.

La capacidad de hinchamiento de los films PEC fue por el método gravimétrico. Se obtuvieron secciones de 1x1 cm de las películas placebo, cargadas con NYS y estas mismas con el recubrimiento de electrohilado. Tres muestras en forma cuadrada de cada película se pesaron individualmente y se les permitió hincharse en 5ml de una solución amortiguadora de fosfatos pH 6.8 a 37 °C. El peso de las películas se determinó a diferentes intervalos de tiempo (0, 1, 5, 10, 15, 30 min, 1, 2, 3 h). La absorción de la solución se calculó utilizando la siguiente ecuación:

$$Q = \frac{P_t - P_0}{P_0}$$

donde Q es la capacidad de absorción de agua de la película, P_t es el peso de la muestra hinchada después del tiempo t y P_0 es el peso original.

3.8 Contenido de fármaco

Se tomaron secciones de los films de 1x1 cm de diferentes áreas. Las secciones de film se disolvieron en 100 mL de solución amortiguadora de fosfatos pH 6.8 hasta desintegrarse por completo a temperatura ambiente, la solución fue filtrada y se determinó el contenido de NYS espectrofotométricamente. Las muestras obtenidas se analizaron para determinar su contenido de NYS a una longitud de onda de 306 nm basada en la literatura (Llabot *et al.*, 2007) y confirmada con un barrido en un espectrofotómetro UV-Vis. La concentración del fármaco se calculó en función de la

absorbancia (Abs) observada para construir la curva de calibración adecuada construida con la misma solución.

3.8.1. Construcción de curva de calibración

Para la construcción de la curva de calibración para la determinación de fármaco en los films, se prepararon soluciones de NYS a concentraciones conocidas (25, 12.5, 6.25, 3.125, 1.5625 y 0.78125 µg/mL) en solución amortiguadora de fosfatos. Utilizando el software Origin 2018 se realizó una prueba de regresión lineal para determinar el ajuste de los datos (R^2) y la ecuación que explica la misma. Utilizando la ecuación obtenida es posible calcular el contenido de NYS.

3.9 Determinación de la cinética de liberación in vitro de NYS

Se tomaron secciones de los films cargados de NYS de 1x1 cm de diferentes áreas con y sin electrohilado, cada muestra fue pesada y colocada en un vaso de precipitados que contenía 100 mL de solución amortiguadora de fosfatos pH 6.8, previamente calentado a 37 °C. En diferentes intervalos de tiempo (1min, 5min, 10min, 15min, 30min, 1h, 2h, 3h, 4h, 6h, 8h, 12h y 24 h) se tomó una muestra de 5 mL del medio de liberación y se reemplazó por un volumen igual de solución amortiguadora fresca. Las muestras fueron probadas para el contenido de NYS espectrofotométricamente como se describió anteriormente.

La fracción de fármaco liberada fue determinada mediante la siguiente fórmula

$$F_t = \frac{M_t}{M_\infty}$$

Dónde: M_t =Cantidad de fármaco liberado a un tiempo y M_∞ =Cantidad total de fármaco liberado.

3.10 Modelaje de la cinética de liberación

El modelaje de la cinética de liberación se llevó a cabo mediante el programa Origin pro 2018, donde se probaron los modelos cinéticos de Higuchi y Korsemeyer-Peppas para determinar la ecuación que mostró un mejor ajuste al perfil obtenido en las pruebas *in vitro*.

3.11 Determinación *in vitro* de la actividad antimicrobiana

Se probó la actividad antibacteriana de las películas placebo y conteniendo NYS con y sin electrohilado utilizando placas de Agar Müller-Hinton adicionado con 2 % de glucosa y 0.5 mg/mL de azul de metileno (Sims *et al.*, 2006) inoculadas con *Candida albicans* ATCC 14053 de la siguiente manera: se utilizaron tres círculos de 6 mm por triplicado de los films con nistatina y electrohilado para cada formulación que fueron transferidos a la superficie de cada placa de agar inoculado y fueron incubadas a 37 °C. En una caja de cada formulación se colocó un placebo de la formulación y un sensidisco cargado con 0.07 mg de nistatina. Se midieron los diámetros de la zona de inhibición a las 72 h.

3.12 Propiedades de mucoadhesión de las películas

La mucoadhesividad como una propiedad necesaria a determinar en este estudio, se realizó mediante un texturómetro (CT3, Brookfield, Canadá). La adherencia de cada film con y sin electrohilado se determinó midiendo la fuerza necesaria para separar cada formulación de un disco de mucosa sublingual de cerdo recién extirpada. Un disco de cada película de 1 cm de diámetro fue adherido en la punta de una sonda de geometría cilíndrica con ayuda de cinta adhesiva doble y se colocaron estos discos de mucosa sublingual de cerdo previamente hidratadas por 5 min en solución amortiguadora de fosfatos pH 6.8 directamente debajo utilizando el accesorio adecuado.

El tiempo de contacto entre los films y la mucosa fue de 120 s en los films sin electrohilado y 40 s en los electrohilados, posteriormente la sonda se retiró a una velocidad de 1.0 mm/s. La adhesividad de las películas se hizo basado en determinar la fuerza necesaria para separar la película de la superficie de la mucosa, lo cual se estimó a través del análisis de la fuerza máxima ($F_{\max}$; N), y el trabajo de adhesión (W_{ad} ; (N-mm) se calculó a partir del área bajo la curva (Tejada *et al.*, 2017).

3.13 Propiedades de adhesión del electrohilado y la película

La mucoadhesividad se evaluó utilizando un texturómetro (CT3, Brookfield, Canadá). La adherencia de las películas con electrohilado se determinó utilizando cinta de doble cara. Se adhirió un disco de 1 cm de diámetro de cada película a la punta de la sonda con cinta adhesiva de doble cara, dejando libre el lado electrohilado. En la plataforma

en lugar de la mucosa sublingual de cerdo, se agregó cinta adhesiva doble para interactuar con el lado electrohilado.

El tiempo de contacto entre las películas electrohiladas y la cinta adhesiva fue de 30 s, después de lo cual se retiró la sonda a una velocidad de 1.0 mm/s. La adhesividad de los films se calculó a partir de la determinación de la fuerza requerida para separar el film de la capa electrohilada, la cual se estimó mediante el análisis de la fuerza máxima (F_{max} ; N), y el trabajo de adhesión (W_{ad} ; (N-mm) se calculó a partir del área bajo la curva.

3.14 Citotoxicidad *in vitro* de los films

Las pruebas de citotoxicidad mediante el uso de geles agar enriquecidos con la adición de sangre, permiten el estudio de las posibles acciones degradativas originadas por los componentes citotóxicos en las partículas de hidrogel, es también una medida no compleja que permite determinar la biocompatibilidad en este tipo de sistemas.

La prueba de citotoxicidad celular se realizó empleando ATCC CCL-1, Línea celular NCTC Clone 929 [L cell, L-929, derivative of Strain L] "PASE CERO", Organismo: mus musculus, Morfología: fibroblastos, Nivel BSL: 1, los films con y sin nistatina se agregaron a los pocillos cortados circulares con un diámetro de 6mm, los compuestos puros como nistatina (dimetil sulfóxido) y quitosano (ácido acético glacial) se realizaron en una dilución al 5% p/v.

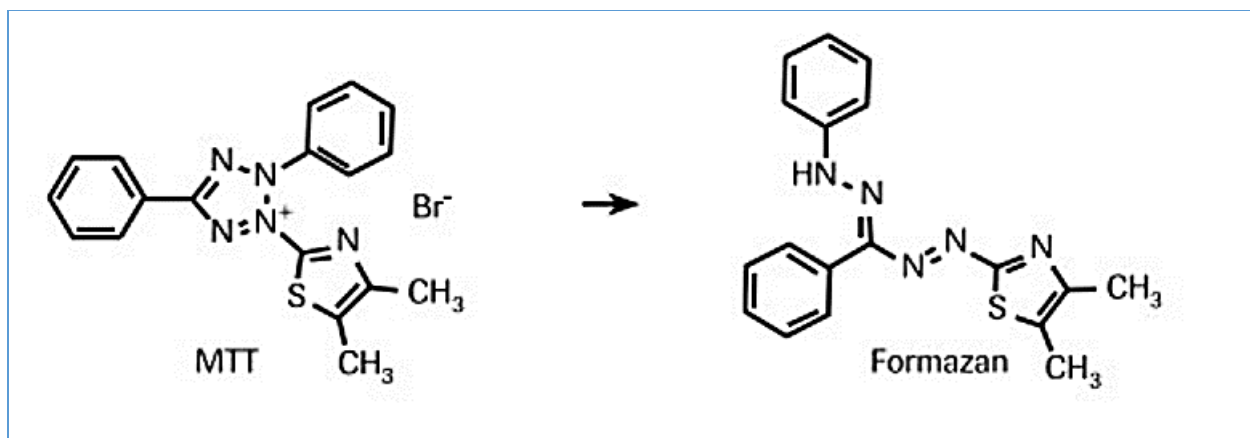


Figura 11. Enlaces químicos MTT y Formazán (Van Meerloo, J., 2011).

Se pre-incubaron células fibroblásticas a una concentración de 10^4 células/mL en medio de cultivo con 10 $\mu\text{g/mL}$ en microplacas (96 pozos, fondo plano) donde se agregaron los films y las diluciones de los compuestos puros. Se incubaron durante 24h a $+37^\circ\text{C}$, 5% de CO_2 . Después del período de incubación se añadió 10 μL del reactivo MTT (concentración final 0,5 mg/mL) a cada pozo. Posteriormente se incubó la microplaca durante 2-4 h en una atmósfera humidificada ($+37^\circ\text{C}$, 5-6,5% CO_2). Por último, se añadió 100 μL de la solución de solubilización en cada pozo. En los pocillos se retiraron los films y se procedió a centrifugar 5 min x 8,000 rpm y se procedió a usar sobrenadante para la lectura de la placa la cual se leyó entre 570/690 nm por el método de ELISA.

El % de viabilidad celular se calculó usando la fórmula:

$$\text{Cell viability \%} = (\text{Af} * 100) / \text{Ao}$$

Donde Af= absorbancia final, Ao= absorbancia inicial

3.15 Análisis estadístico

Todas las pruebas fueron realizadas por triplicado para garantizar la veracidad de los resultados. Los resultados se expresaron como media $\pm$ DE. Las pruebas se llevaron a cabo utilizando el software Graphpad Prism 8 y Origin 2018, para determinar la significancia estadística de los estudios se consideró una $P < 0.05$.

CAPÍTULO IV: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Caracterización de los films de polielectrolitos

4.1.1 Características físicas de los films

Los films placebo, véase figura 12, obtenidos de CHI-GA en proporción 1-1 obtuvo una apariencia consistente, maleable y no muy quebradizo, el film en proporción 1-2 obtuvo una apariencia cristalina amarillenta debido al quitosano, este film resultó ser muy quebradizo, por lo tanto, poco flexible. El film en proporción 2-1 tuvo una consistencia más resistente y sólida, además de un color más amarillo y una textura más rugosa, fácil de cortar. Finalmente, los films de CHI-GA cargados con NYS, fueron muy similares al placebo, con una apariencia más opaca y un color más intenso, sin embargo todas las formulaciones muestran una uniformidad macroscópica entre fases como se puede apreciar en la figura 12.

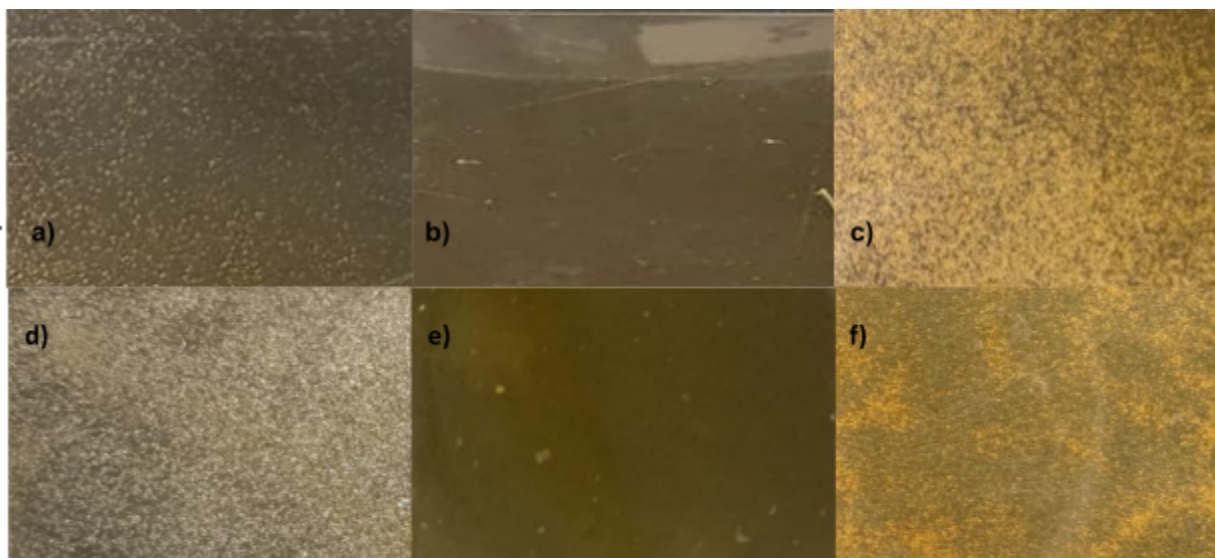


Figura 12. Morfología macroscópica de los films. a) film CHI-GA 1-1, b) film CHI-GA 1-2, c) film CHI-GA 2-1, d) film CHI-GA 1-1 NYS, e) film CHI-GA 1-2 NYS, f) film CHI-GA 2-1 NYS.

Estudios previos han reportado resultados similares en cuanto a coloración y textura de los films (Kaur y Kaur, 2012; Abruzzo *et al.*, 2013; Castro-Ruiz, *et al.*, 2014). Respecto a la textura de los films, la flexibilidad y apariencia homogénea de los films es atribuida a residuos de polímeros que no reaccionaron para formar PEC (Kassem *et al.*, 2015), estas características son deseables para una aplicación bucal, ya que la formulación debe ser capaz de adaptarse a las diferentes estructuras bucales sin romperse.

4.1.2 Recubrimiento mucoadhesivo por electrohilado

Los films electrohilados (figura 13) adquirieron un aumento de grosor de 0.03 mm (tabla 1) con la adición de 0.5 mL de PCL y PCF, en cuanto a la mejora de las características físicas de los films ayudo con la fragilidad, en especial con la proporción 1-2 que era notablemente más quebradizo al ser manipulado. La capa de electrohilado es suave al tacto como algodón, al estirar la capa electrohilada hasta romperse se pueden observar las fibras del electrohilado, las cuales se disponen de manera aleatoria, como si fuese un copo plano de algodón.

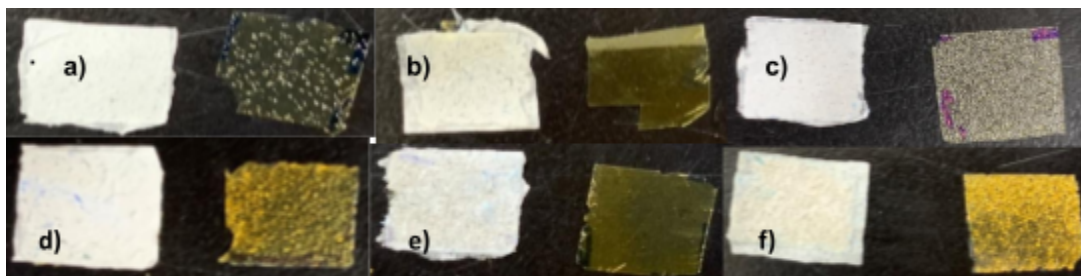


Figura 13. Morfología macroscópica de los films con electrohilado y sin electrohilado. a) film CHI-GA 1-1 electrohilado y sin electrohilado, b) film CHI-GA 1-2 electrohilado y sin electrohilado, c) film CHI-GA 2-1 electrohilado y sin electrohilado, d) film CHI-GA 1-1 NYS electrohilado y sin electrohilado, e) film CHI-GA 1-2 NYS electrohilado y sin electrohilado, f) film CHI-GA 2-1 NYS electrohilado y sin electrohilado.

Tabla 1. Grosor y peso de los films sin y con electrohilado.

Grosor de los films placebo (mm)		Peso (mg)	Grosor con electrohilado (mm)		Peso (mg)	Grosor de los films cargados con NYS (mm)		Peso (mg)	Grosor de los films cargados con NYS con electrohilado (mm)	
1-1	0.12	17.1	1-1	0.15	19.3	1-1	0.20	18	1-1	0.23
1-2	0.18	12.5	1-2	0.21	15.4	1-2	0.16	16.8	1-2	0.2
2-1	0.11	14.3	2-1	0.14	17.6	2-1	0.24	15.5	2-1	0.27

4.1.2. Morfología microscópica de los films

La microscopía electrónica de barrido (SEM por sus siglas en inglés) es una herramienta muy poderosa que permite el estudio estructural y morfológico a nivel microscópico y nanométrico de por ejemplo la superficie de los materiales de cualquier naturaleza, incluso material biológico. La muestra sólida es barrida por un haz de electrones muy fino, que permite una alta resolución. En la SEM las muestras que conducen electricidad son las más sencillas de estudiar (metales, algunos cerámicos, etc), lo cual no es el caso de los materiales poliméricos los cuales poseen baja densidad electrónica, por lo que, para su observación bajo el equipo de microscopia

electrónica de barrido, se hace necesario cubrir las muestras de polímeros con una película ultradelgada de un material conductor, como por ejemplo el oro, paladio, etc. Este recubrimiento se debe hacer previamente a introducirlo dentro de la cámara del equipo que es donde se registrará la observación esperada de la topografía superficial de la muestra.

Entonces, a través de la microscopía electrónica de barrido MEB, se pudo entonces observar la topografía superficial de todos los films obtenidos, y las micrografías superficiales se muestran en la figura 14.

La morfología microscópica de todos los films obtenidos fue evaluada mediante SEM, las micrografías de la superficie y de canto se muestran en la figura 3. Los films placebo de las diferentes proporciones mostraron una superficie lisa, sin poros aparentes y un grosor homogéneo, en el caso de las diferentes formulaciones cargadas con NYS, fue posible observar en la superficie de los films cristales de nistatina, en el caso del film 1-2 con NYS se puede observar una pequeña grieta debido al corte realizado para tomar la microscopía y la fragilidad mostrada de este film.

Como se puede observar en la figura 3 g) y h), puede verse que la mezcla de los polímeros PCL y PCF presenta una formación de fibra no homogénea, con porosidad considerable y un patrón variable con un diámetro promedio de $2.029 \pm 0.428 \mu\text{m}$ en esta capa mucoadhesiva relativamente gruesa sin embargo es conveniente para esta investigación ya que proporciona un mayor tiempo de residencia en la cavidad oral, normalmente los sistemas mucoadhesivos de liberación bucal deben estar en el rango de $1\mu\text{m}$ a $1.6\mu\text{m}$, como se puede observar en el estudio presentado por (Pérez-González et al., 2019).

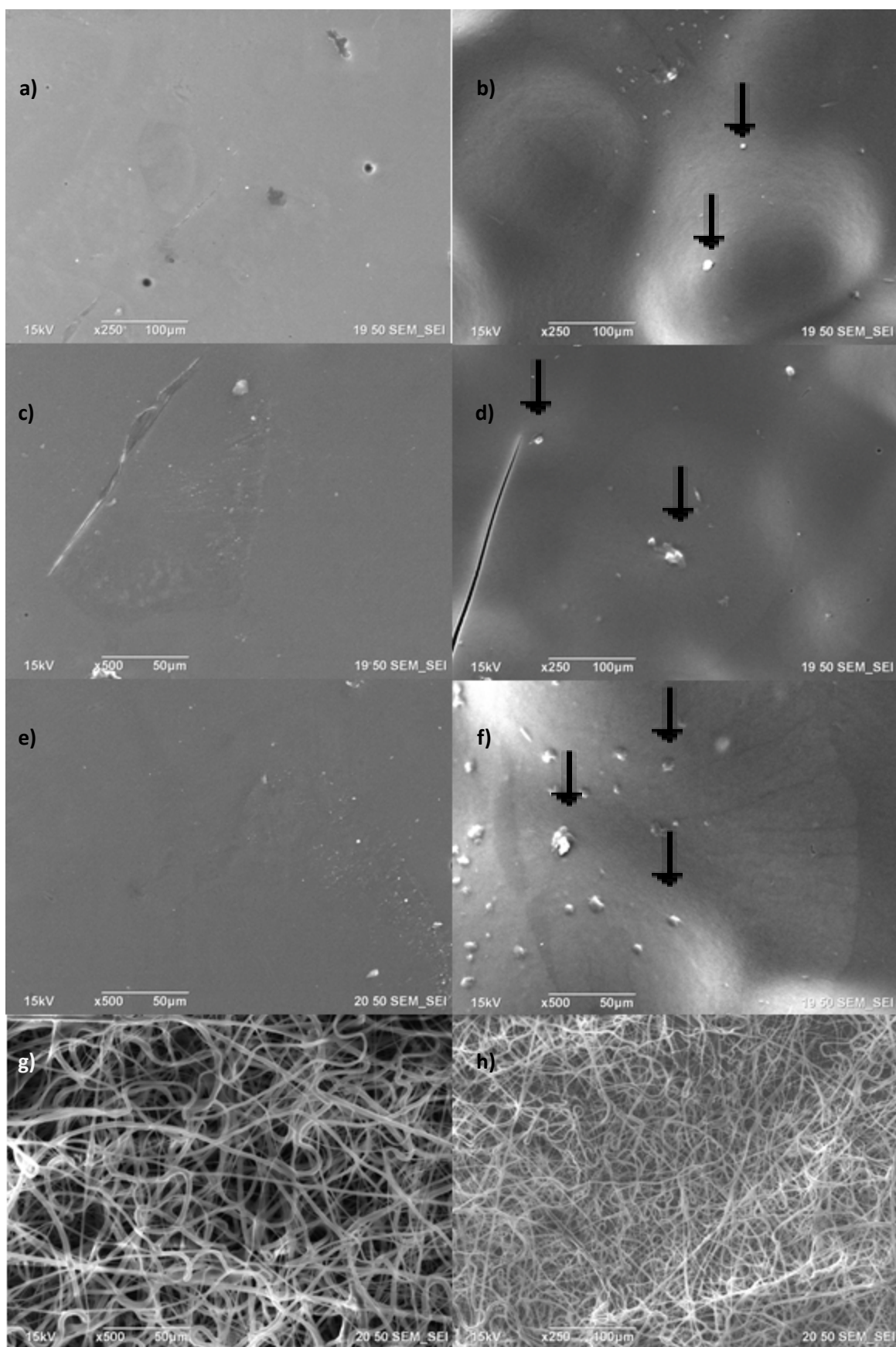


Figura 14. Micrografías electrónicas de los films. a) CHI-GA 1-1 placebo, b) CHI-GA 1-1 cargado con NYS, c) CHI-GA 1-2 placebo, d) CHI-GA 1-2 cargado con NYS, e) CHI-GA 2-1, f) CHI-GA 2-1 cargado con NYS, g) electrohilado x500, h) electrohilado 250 x. Las flechas indican cristales de nistatina precipitado.

4.1.3. Espectroscopía FT-IR

En los espectros de la figura 15, se pueden observar los espectros para los polímeros bases para el bio-film y el fármaco. Las señales principales de NYS fueron a 1703.39 cm^{-1} corresponde a las vibraciones de estiramiento del enlace C=O de un grupo éster, la banda amplia encontrada a 3373.82 cm^{-1} es debido al solapamiento de los grupos –OH y –NH (Mohammadi *et al.*, 2017). Las bandas del Quitosano a 1645.08 cm^{-1} y 1376.39 cm^{-1} corresponden a los grupos –NH de amida I y amida II respectivamente (Yang *et al.*, 2018). Las señales a 1601.28 cm^{-1} y 1412.4 cm^{-1} corresponden a las vibraciones de estiramiento de los grupos –C- y –COOH de la goma arábica. En el caso de los films QUI-GA las señales a 1644 cm^{-1} y 1579.99 cm^{-1} del CHI se superpusieron, mientras que los picos a 1601.28 cm^{-1} y 1412.4 cm^{-1} de GA se ensancharon y cambiaron a 1555.41 cm^{-1} y 1412.4 cm^{-1} respectivamente.

En la figura 16 se muestra como las proporciones de los films acentúan los picos y ensanchan las bandas características dependiendo sea el caso, como en la proporción 2-1 donde las bandas características de quitosano logran verse más acentuadas, como por ejemplo las bandas de O-H de la GA en el rango de los 3000 cm^{-1} , quedando opacadas debido a la proporción de los compuestos. Para los films con proporción 1-2 se ven opacadas los picos característicos de las aminas debido a la cantidad de O-H

en la GA y los picos -C- y COOH , para la proporción 1-1 se logran identificar los grupos amino levemente en el área de los 3000 cm^{-1} y en la zona de los 1600 a 1100 cm^{-1} se logra apreciar levemente el pico del COOH de la GA sin embargo en comparación con los compuestos puros en las aminas I y II del CHI se aprecia una amplitud en la intensidad de las bandas máximas en el quitosano indicando que los polianiones interactuaron entre sí como informaron previamente (Tsai *et al.*, 2002; Bhatlekar *et al.*, 2020). Para los films con NYS no se observó un cambio considerable en los picos vistos en los placebos, esto debido a la pequeña cantidad de fármaco presente con respecto a los demás componentes del film.

Para el compuesto PCF, figura 17, se apreciaron las principales señales a 3029.02 cm^{-1} característicos de los O-H y 2940.67 cm^{-1} de un C-H , otra banda se detectó a 1700.01 cm^{-1} correspondiente a C=O y una banda a 1233.83 cm^{-1} correspondiente a un C-O . las señales de PCL marcó un pico característico a 2941.1 cm^{-1} correspondiente a C-H_2 , un pico a 1712.34 cm^{-1} de C=O y por último pico característico a 1201.36 cm^{-1} del grupo C-O . La mezcla de PCL y PCF muestra los picos característicos de los compuestos a 2943.31 cm^{-1} correspondiente a C-H_2 , un pico a 1724.11 cm^{-1} de C=O y por último pico característico a 1165.68 cm^{-1} del grupo C-O lo que indica que no existe interacción química entre los compuestos (Pendekal y Tegginamat, 2012).

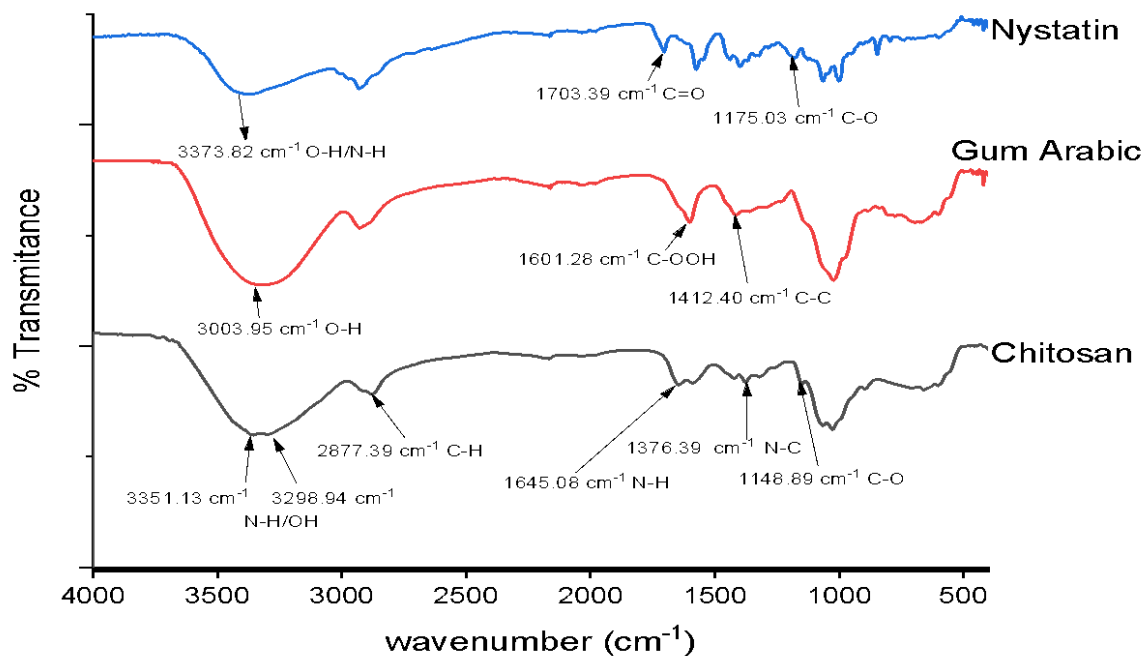


Figura 15. Espectros FT-IR de NYS, QUI, GA.

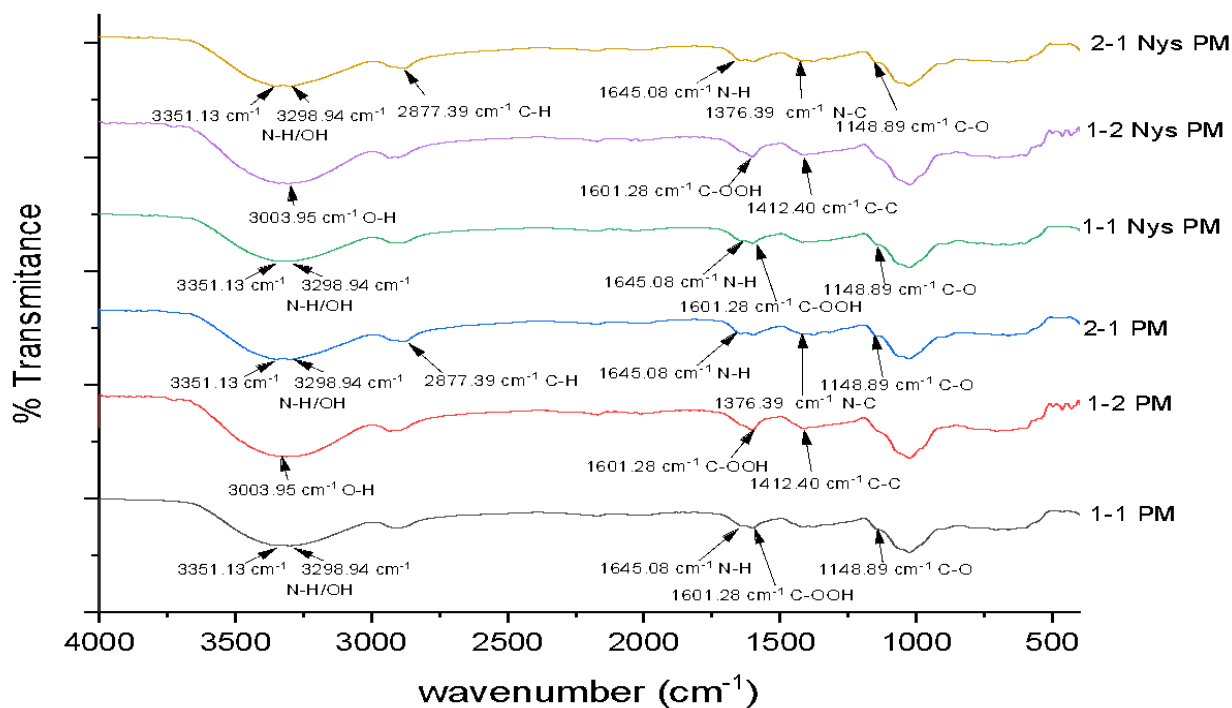


Figura 16. Espectros FT-IR de films en diferentes proporciones con y sin cargado de NYS.

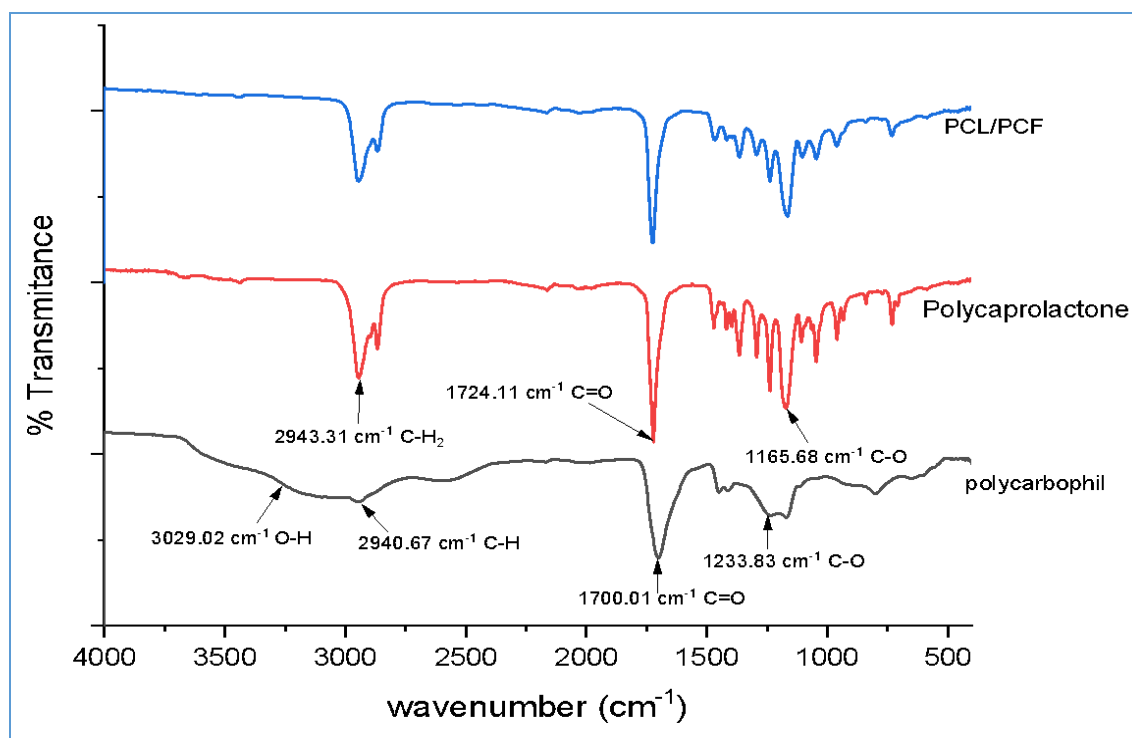


Figura 17. Espectros FT-IR de polímeros componentes del electrohilado, PCL, PCF y PCL/PCF.

4.1.4. Análisis termogravimétrico y calorimetría de escaneo diferencial

Las figuras 18-21, muestran los termogramas de QUI, APG, GA, NYS, su mezcla física, PCL, PCF, PCL/PCF y las proporciones de films electrohilados. Todos los materiales mostraron un proceso endotérmico inicial con pérdida de peso correspondiente a la evaporación de agua presente a temperaturas de 50-130°C. QUI y GA mostraron eventos térmicos cercanos a los 300 °C la NYS mostró dos picos endotérmicos a 160 y 470 °C. En los polímeros CHI, GA, se pueden observar los picos de los compuestos por sí solos denotando su similitud, por esto mismo no se observó en la mezcla con ambos los picos por separado debido al comportamiento térmico similar de ambos polímeros. Los films de PEC mostraron el mismo número de picos que las mezclas físicas, sin embargo, aparecieron reducidos en intensidad y a una temperatura menor lo que denota la generación del PEC y su interacción (Leclercq, Boustta y Vert, 2012). Por otro lado, los picos mostrados en las diferentes proporciones del film mostraron también la misma cantidad de picos en una temperatura menor de 240-256 °C, sin embargo, dependiendo qué polímero estaba en mayor proporción este obtenía un pico respectivo con mayor intensidad al compararse con los compuestos puros.

En la curva termogravimétrica PCF, se pueden visualizar procesos de descomposición de dos etapas, 202 (vítrea)–231°C (cristalización) y 413°C (fusión) (Ganguly *et al.*, 2018). La primera es atribuida a la descomposición parcial mostrada en porcentaje en el TGA a 250°C de la base polimérica de PCF. Por otro lado, PCL se mantiene estable durante el proceso hasta su etapa de descomposición 400°C –415°C (Pendekal y Tegginamat, 2012).

Los andamios creados con ambos polímeros presentan una estabilidad térmica similar a la base polimérica de PCL debido a la proporción en la que se encuentra en la mezcla de ambos, pero también dos etapas una pequeña curvatura a los 204 °C referente a PCF y otro evento térmico a los 376 °C similar a la etapa de descomposición presente en PCL.

Para las diferentes proporciones electrohiladas se observan los primeros picos respectivos del film a los 240-256°C, el siguiente pico se muestra a los 313 °C referente a la primera fase de descomposición de PCF, este mismo se muestra desplazado a la derecha debido al momento en el que comienza a interaccionar con el calor después de la pérdida de la capa del film y por último el pico referente a PCL y PCF en su última etapa de descomposición a los 416°C.

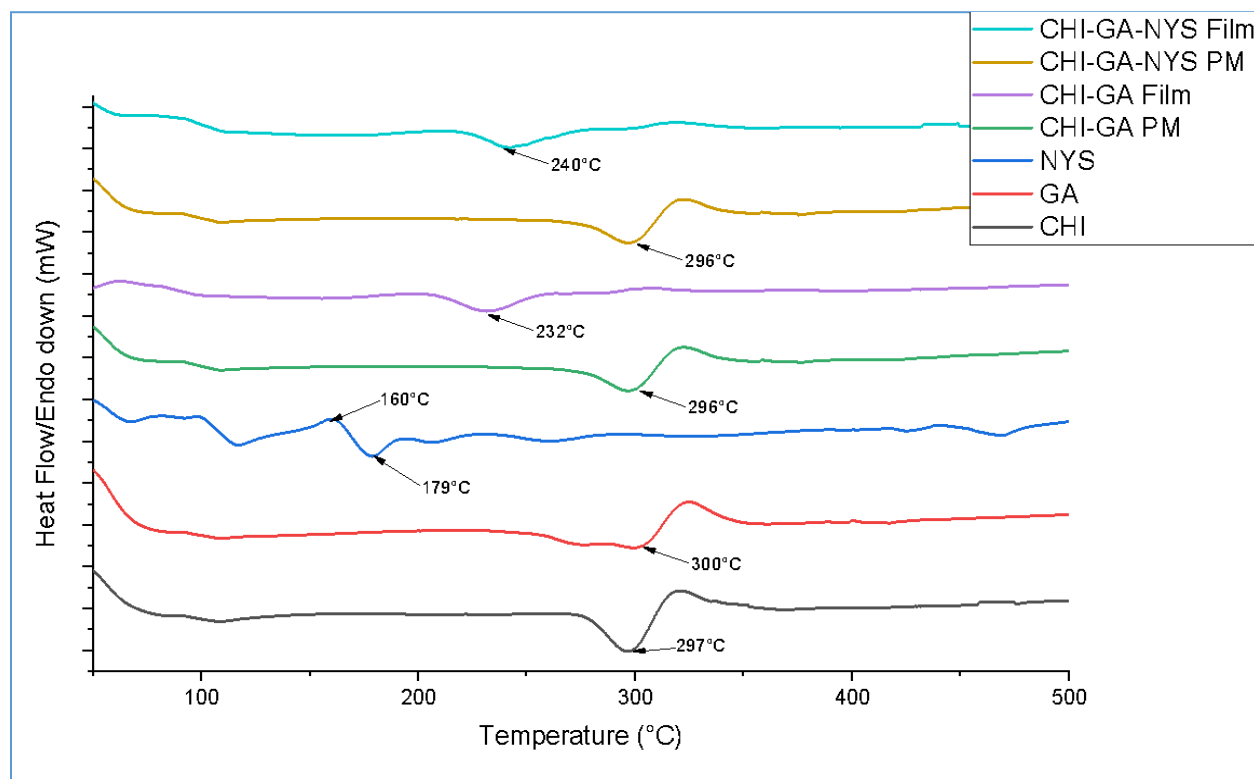


Figura 18. Termogramas DSC de QUI, GA, NYS, sus mezclas físicas (PM) y films.

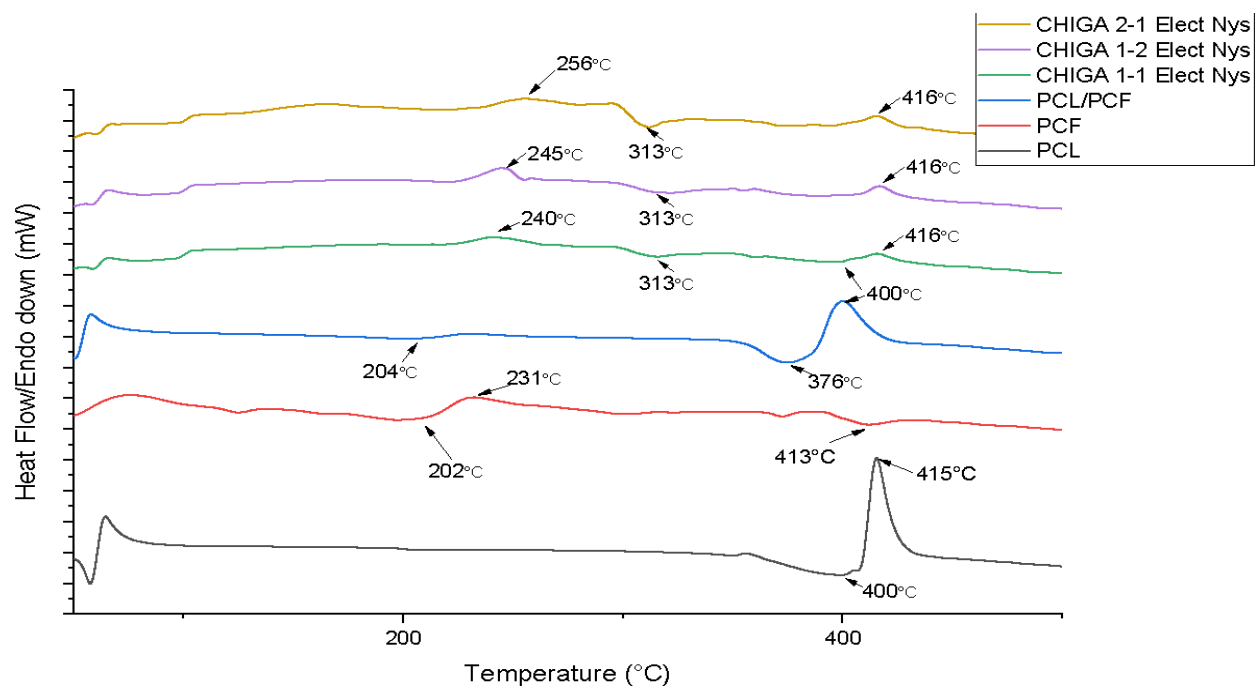


Figura 19. Termogramas DSC de PCL, PCF, PCL/PCF y films a diferentes proporciones.

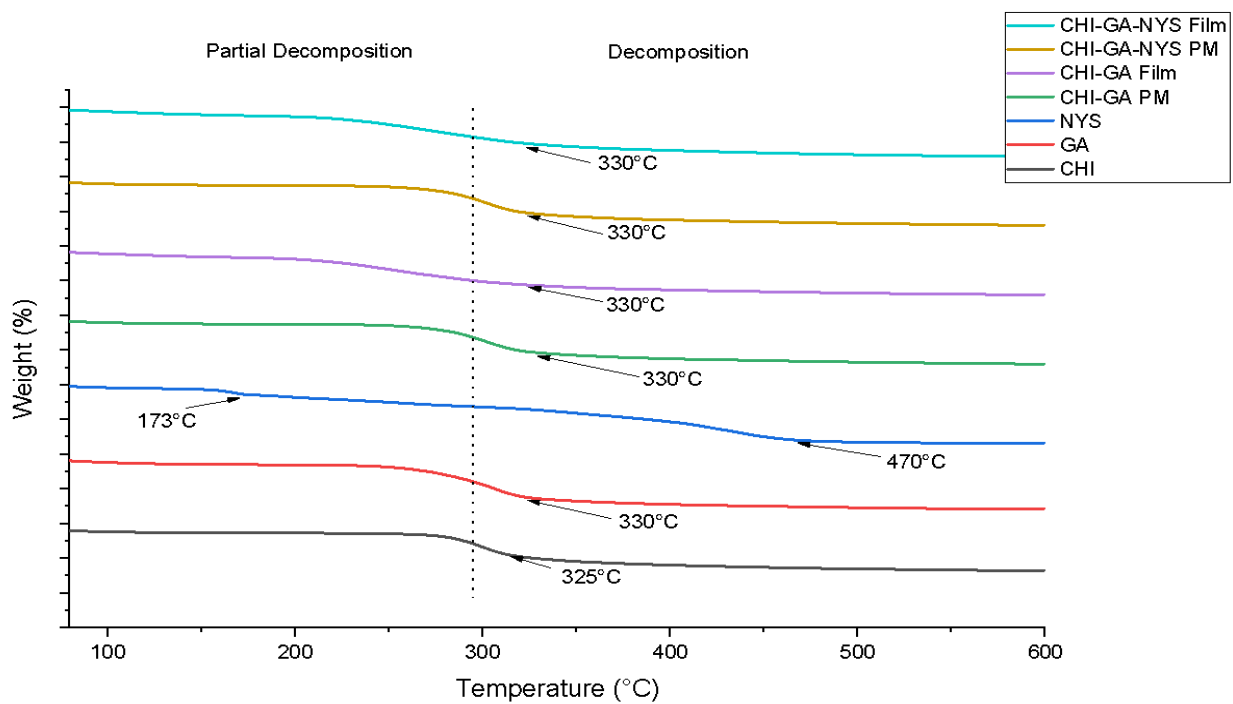


Figura 20. Termograma TGA de QUI, GA, NYS, sus mezclas físicas (PM) y films.

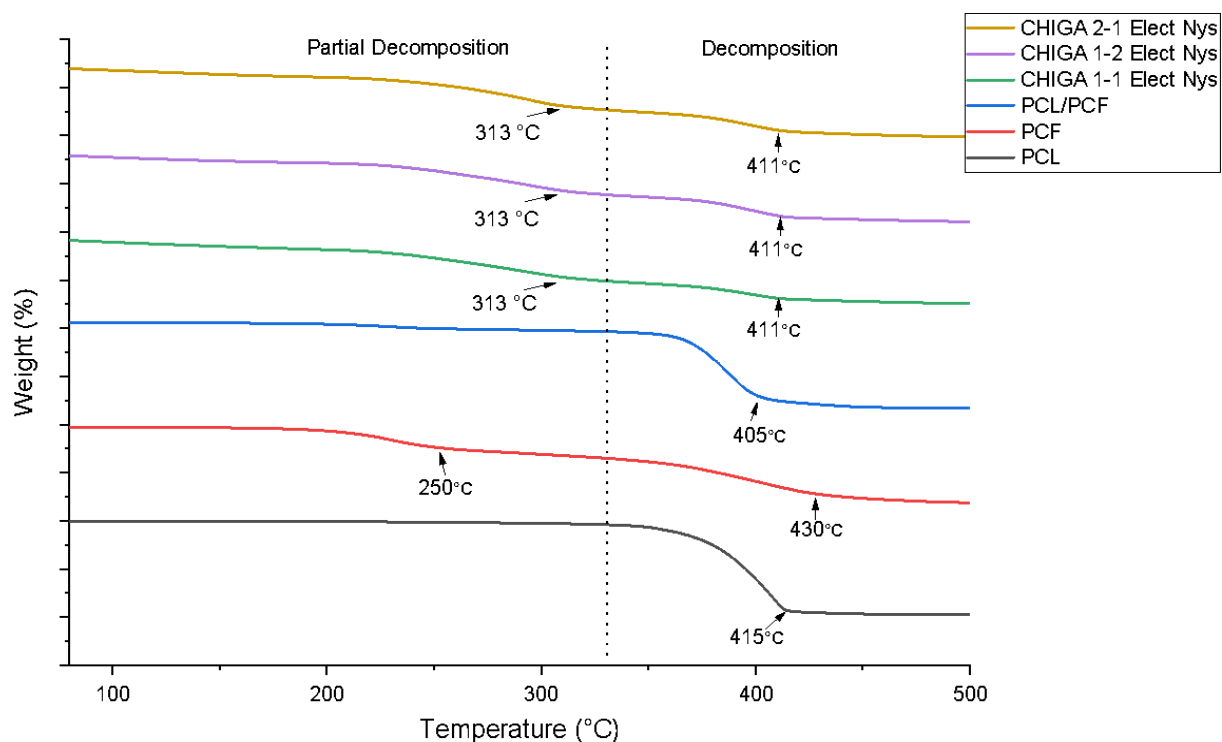


Figura 21. Termogramas TGA de PCL, PCF, PCL/PCF y films a diferentes proporciones.

4.1.5. Contenido de fármaco de los films

Utilizando las absorbancias de las soluciones de concentración conocida se construyó la siguiente curva de calibración en Origin 2018, figura 22:

Tabla 2. Curva de calibración NYS

Concentración de NYS ($\mu\text{g/mL}$)	Absorbancia (306 nm)
25.00	0.5930 ± 0.0205

12.50	0.3077±0.005 5
3.13	0.0880±0.005 6
1.56	0.0437±0.005 5
0.7810	0.0210±0.002 6

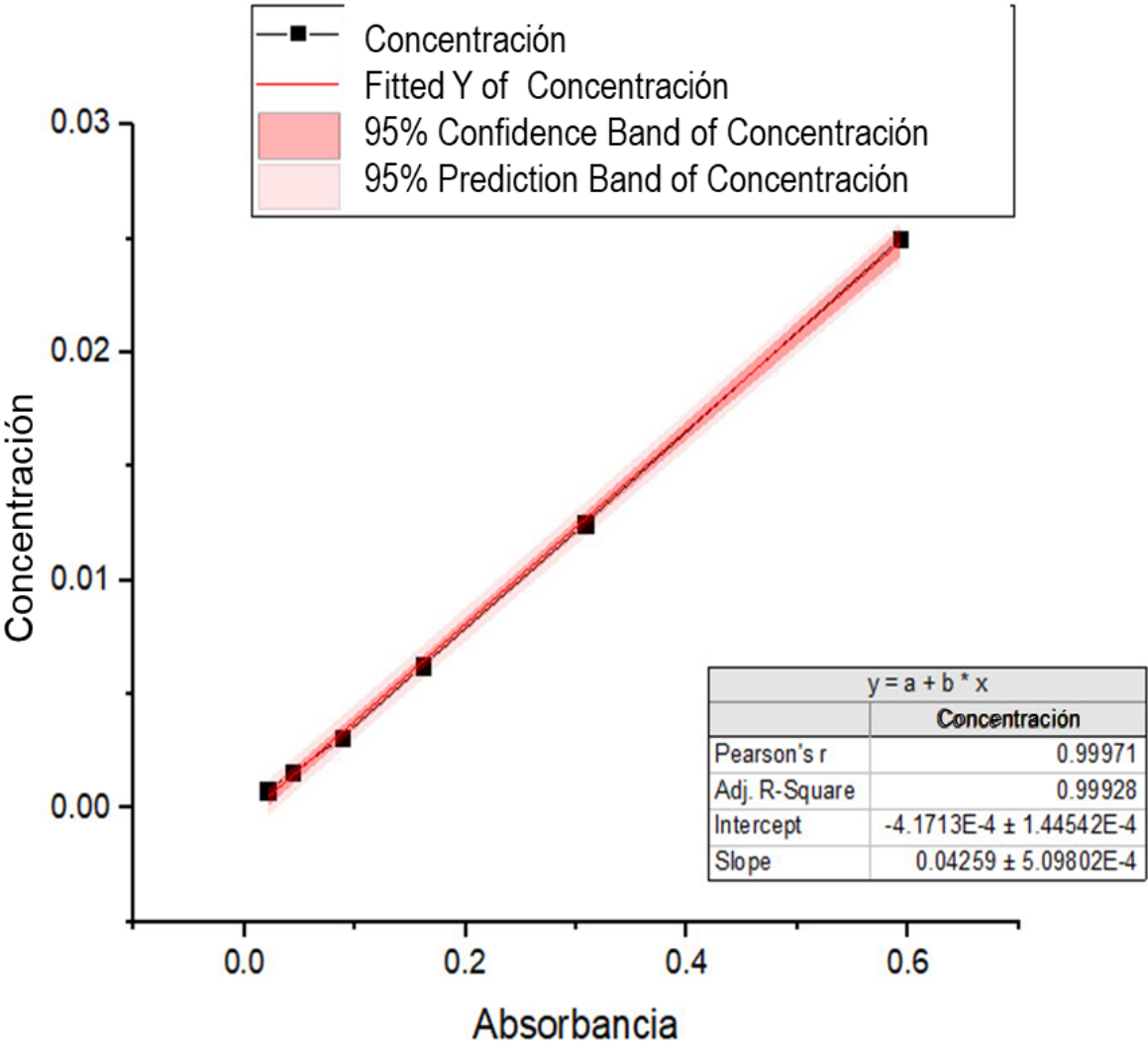


Figura 22. Curva de calibración NYS

La curva resultante mostró un buen ajuste con una R^2 ajustada de 0.9992, por lo que la ecuación para calcular la concentración de NYS fue:

$$C_{NYS} = 0.04259 * ABS$$

Donde C_{NYS} es la concentración de NYS en la solución amortiguadora de fosfatos y ABS es la absorbancia registrada por el espectrofotómetro a 306 nm.

Utilizando esta ecuación fue calculado el contenido de fármaco de los films (Tabla 3), donde no se evidenció una diferencia apreciable entre las formulaciones ($P=0.9107$).

1 UI equivale a 0.0002059 y se recomienda un tratamiento de NYS 60,000 a 40,000 cada 6 horas por 7 a 14 días (Puerto *et al.*, 2001) un film debería contener 121418.164 UI debido a sus 25 mg de fármaco.

Tabla 3. Contenido de fármaco de los films de PEC determinado experimentalmente y su equivalente en UI.

Formulación	CHI-G A 1-1	CHI-G A 1-2	CHI-G A 2-1	CHI-G A 1-1 elect	CHI-G A 1-2 elect	CHI-G A 2-1 elect	p
Contenido de fármaco (mg/cm ²)	0.2555± 0.04912	0.2754± 0.0246	0.2257± 0.0921	0.2470± 0.04837	0.2243± 0.03865	0.2527± 0.09038	0.9107
Contenido de fármaco en UI/cm ²	1241.09 ±0.0491	1337.62 ±0.0246	1096.29 ±0.0921	1199.61 ±234.92	1089.36 ±187.71	1227.29 ±438.95	

4.1.6. Grado de hinchamiento de los films con y sin electrohilado

Mediante la técnica de pesado se determinaron los siguientes grados de hinchamiento para los films con y sin electrohilado (Figura 23, Figura 24).

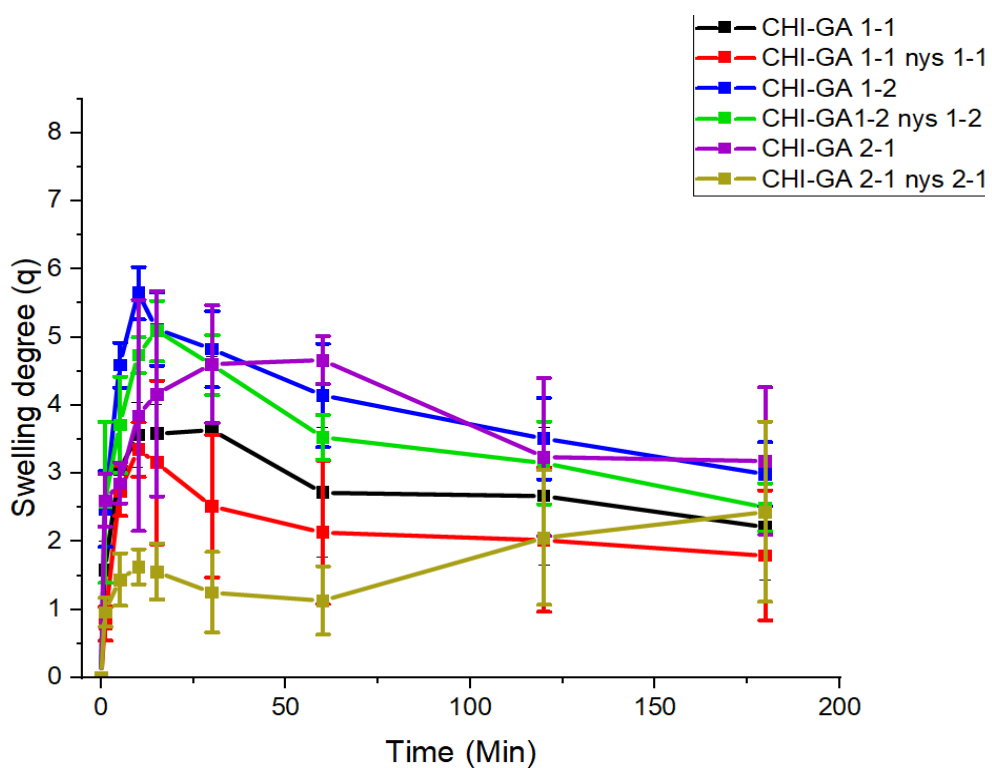


Figura 23. Grado de hinchamiento (Q) de los films sin electrohilado.

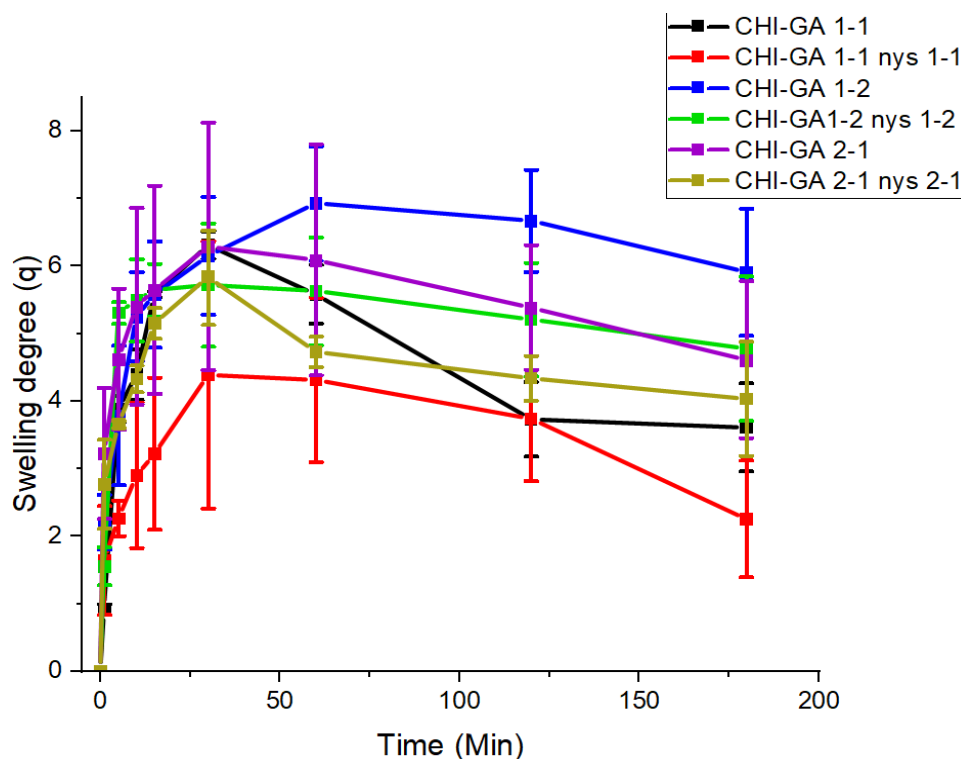


Figura 24. Grado de hinchamiento (Q) de los films con electrohilado.

Los films actuaron de tal manera que el peso disminuyó en los que contenían fármaco esto debido a su liberación al estar en contacto con el buffer de fosfato pH 6.8, como se puede visualizar en la gráfica de films electrohilado el hinchamiento del film más quebradizo que fue el de 2-1 con Nys se vio mejorado debido a la capa de recubrimiento del electrohilado, manteniéndolo más consistente y dándole la oportunidad de hincharse sin perder tanta masa al ser pesado, adquiriendo así mismo todos los films electrohilados esta característica ya que los gráficos muestran curvaturas más amplias y que descienden gradualmente sin muchos picos de disminución repentina, como se puede observar en la gráfica de los films sin electrohilado.

Todas las proporciones probadas tuvieron una gran capacidad de captación de agua durante el periodo evaluado, sin embargo, como era esperado, el film con doble proporción de GA obtuvo los resultados más altos en esta prueba, y gracias al electrohilado se logró visualizar su incremento gradual y mejorar la pérdida de masa en las primeras horas.

Pasada la marca de 15 min, los films sin electrohilado comenzaron a perder masa gradualmente en comparación de los films con electrohilado que comenzaron a perder masa pasando la marca de 30 min.

4.1.7. Estudios de liberación in vitro de NYS

Las liberaciones de los films con electrohilado (Figura 26) aumentaron lento y gradualmente en las primeras 6 horas, después de este tiempo al compararlo con los films no electrohilado (Fig.25) el resultado de la proporción 2-1 fue un poco menor debido al recubrimiento de electrohilado que no se despegó pasando las 24 h y el área de superficie en contacto no era la total del film. las proporciones CHI-GA 1-2 y 1-1 del film electrohilado tuvieron liberaciones en el penúltimo punto un poco más baja sin embargo al llegar a las 24 horas tuvieron la misma liberación que los films no electrohilado por lo que se sospecha que la capa de electrohilado se desprende dejando interactuar todas las áreas del film llegando al punto máximo de liberación a las 24 horas.

La curva muestra que en la etapa inicial el proceso de liberación fue rápido de NYS en todos los films, con y sin electrohilado en la primera hora, esto puede deberse a la

presencia del fármaco en la superficie de los films ya que las micrografías SEM confirmaron que la NYS se encontraba dispersa y en la superficie de los films. Posteriormente a esta liberación ambas formulaciones mostraron un perfil de liberación moderado.

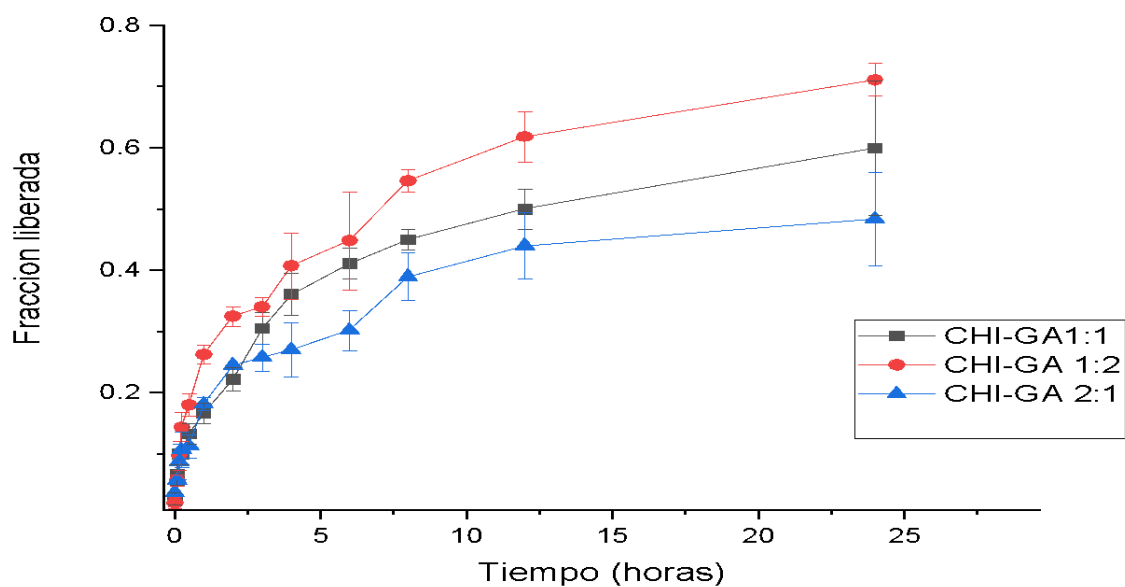


Figura 25. Perfiles de liberación de NYS de los films no electrohilados.

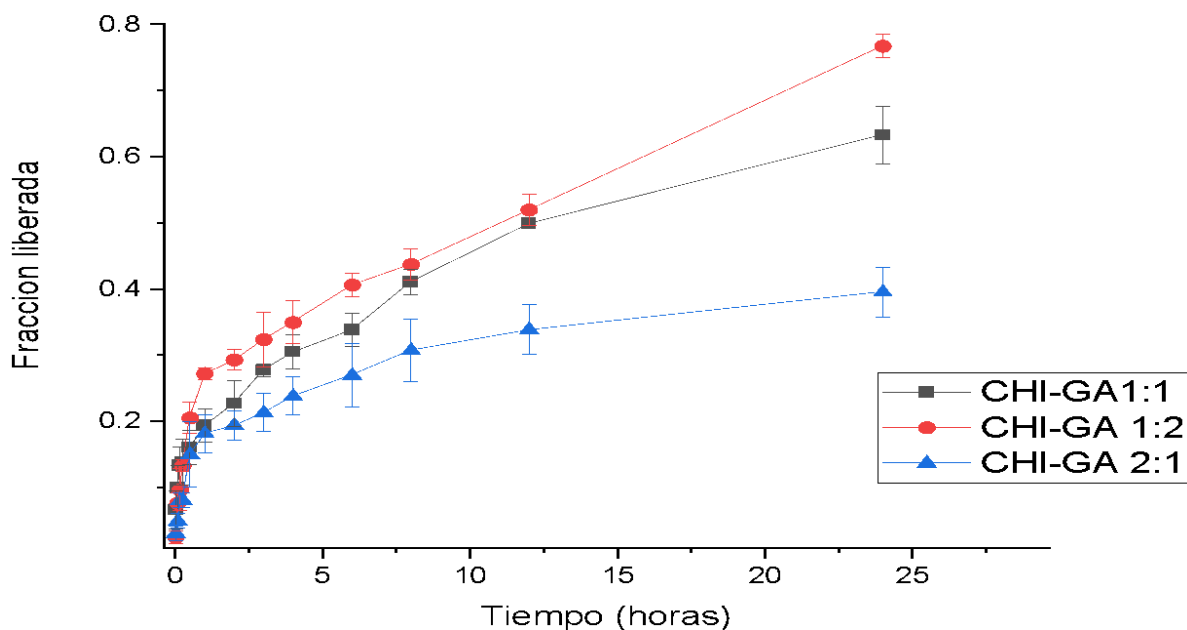


Figura 26. Perfiles de liberación de NYS de los films con electrohilado.

Este comportamiento podría abrir las ventanas y potencialidad de estos sistemas para la aplicación bucal ya que una liberación rápida inicial podría ayudar a alcanzar niveles terapéuticos del fármaco mientras que la segunda etapa de la liberación permitiría mantener los niveles por encima de la concentración mínima inhibitoria. La proporción 1-1 con electrohilado mostró un porcentaje de liberación del 52%, el 1-2 obtuvo un porcentaje de 71% y la proporción 2-1 obtuvo 34%, esto debido a las cantidades de GA presente en cada proporción.

El porcentaje de liberación en las muestras sin electrohilado fueron para el film 1-1 de 56%, para la proporción 1-2 59% y para la proporción 2-1 fue de 41% mostraron un perfil similar de liberación entre los electrohilados y los que no, para el film de

proporción 1-2 fue el que obtuvo mejor proceso de liberación ya que fue rápida y constante hasta alcanzar mayores concentraciones en 24 horas con respecto a las diferentes proporciones, el film 2-1 mostró un menor desempeño debido a su rigidez entre sus enlaces poliméricos, mientras que la proporción 1-1 se mantuvo en un intermedio como se esperaba.

4.1.8. Modelaje de la cinética de liberación de NYS

Los datos obtenidos de los perfiles de liberación del fármaco fueron probados con la ecuación de Higuchi ($F = K_H t^{\frac{1}{2}}$) y el modelo de Korsemeyer-Peppas ($F = k_{K-P} t^n$) y se compararon algunos parámetros cinéticos como la constante de liberación (k), coeficiente de determinación (R^2), exponente de liberación (n). Un valor mayor de R^2 y uno menor de RSS indicaron un mejor ajuste de los datos al modelo teórico (tabla 4).

Tabla 4. Coeficientes de correlación cuadrados (R^2) y coeficientes obtenidos mediante la regresión de los datos de liberación utilizando los modelos matemáticos de Higuchi y Korsemeyer-Peppas.

Modelo		1-1 CHI-GA	1-2 CHI-GA	2-1 CHI-GA	1-1 CHI-GA electrohilado	1-2 CHI-GA electrohilado	2-1 CHI-GA electrohilado
Higuchi	K	0.16176	0.18369	0.14377	0.15142	0.17264	0.11059
	R^2 Ajustada	0.97871	0.93395	0.77683	0.8764	0.89354	0.80804
	RSS	18.0085	112.6309	27.77873	33.52541	217.81662	51.19681

Korsemeyer-Peppas	K	0.18163	0.22545	0.17401	0.19259	0.23124	0.14357
	n	0.42819	0.39425	0.35165	0.35149	0.36374	0.34484
	R ² Ajustada	0.99115	0.97436	0.96479	0.97816	0.97178	0.97811
	RSS	6.85996	40.0789	3.89546	5.38433	52.92302	5.35221

En las curvas de las figuras 27-29, se pueden observar los perfiles de liberación de cada formulación ajustados a cada modelo matemático, se muestra el intervalo de confianza (IC) al 95% para la predicción de la curva.

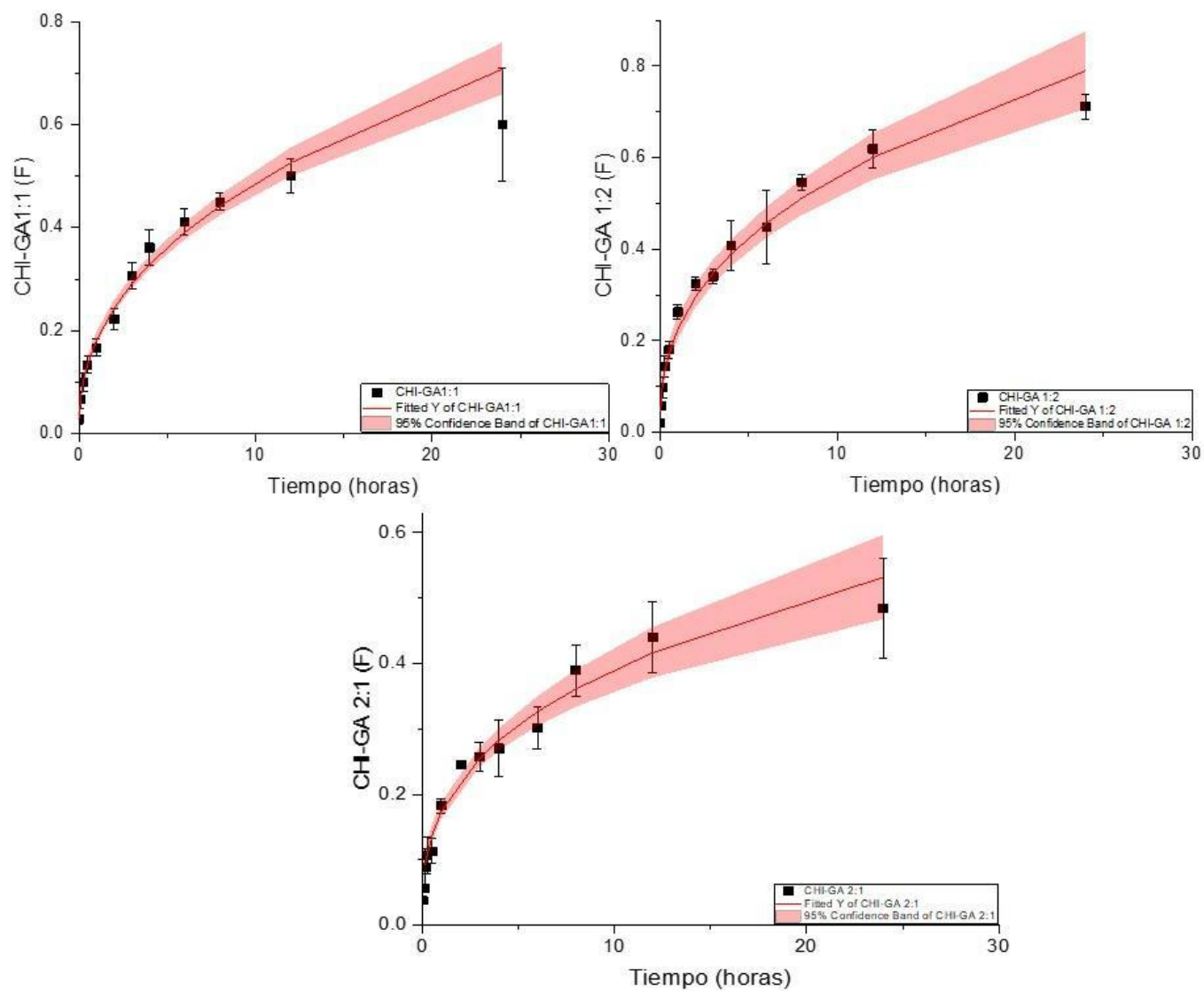


Figura 27. Cinética de liberación de NYS de films no electrohilados ajustada al modelo de Korsmeyer-Peppas.

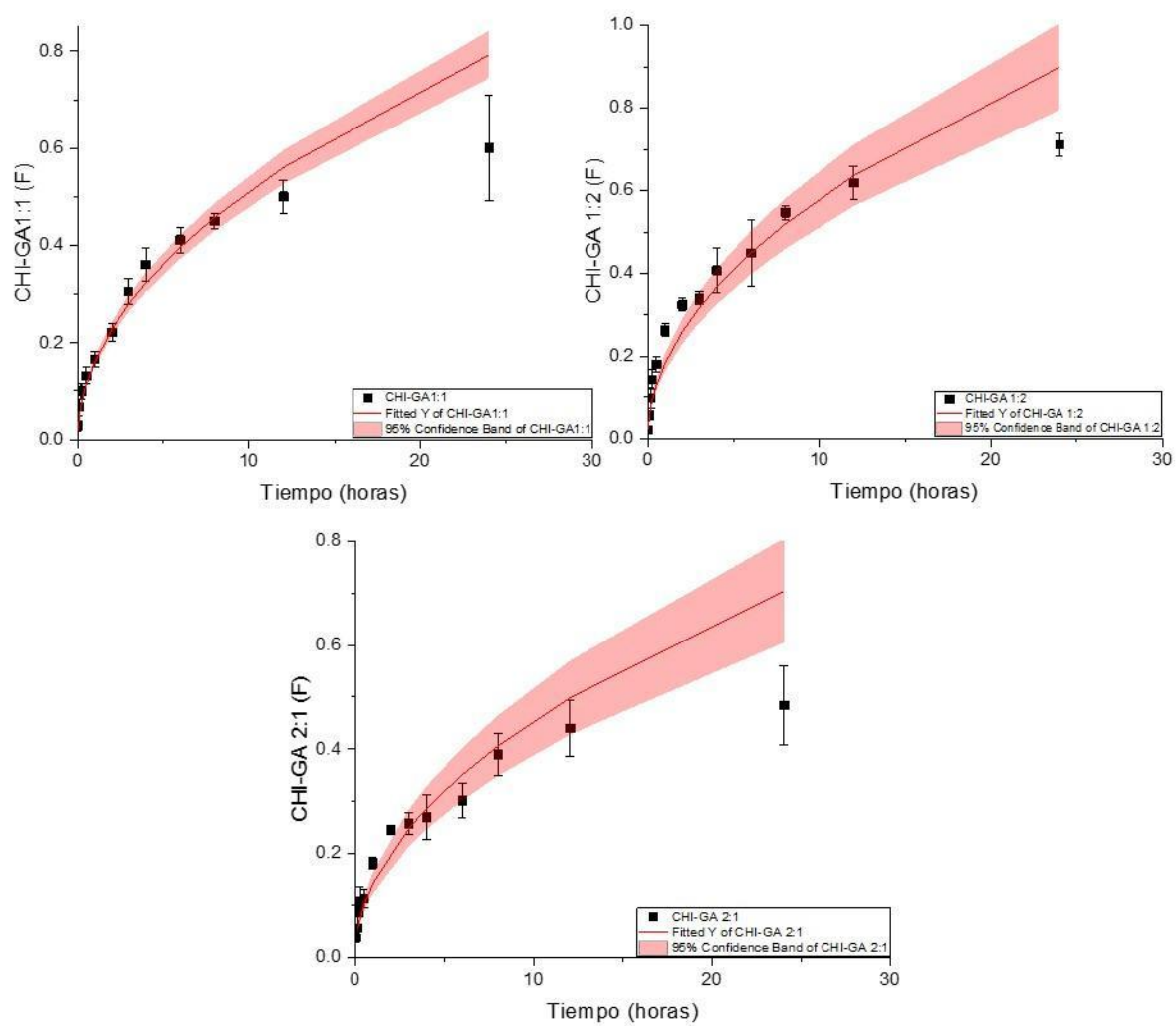


Figura 28. Cinética de liberación de NYS de films electrohilados ajustada al modelo de Korsmeyer-Peppas.

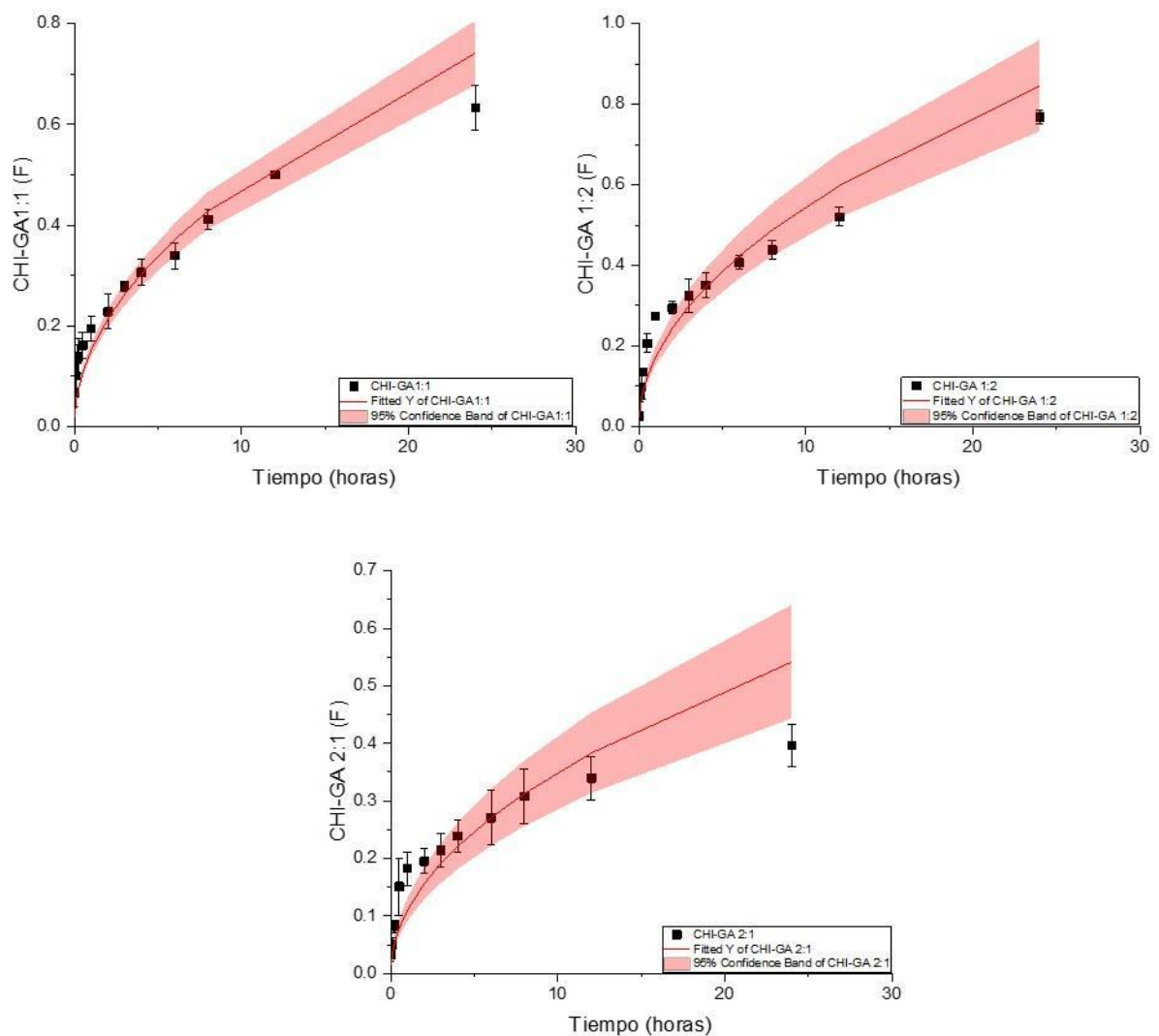


Figura 29. Cinética de liberación de NYS de films QUI-APG-NYS ajustada al modelo de Higuchi.

La literatura indica que el modelo de Higuchi se usa para cuando se busca describir una proporcionalidad directa entre la fracción acumulada del fármaco liberado contra el tiempo en un estado pseudo estacionario. Por lo tanto se considera a la liberación como un proceso de transferencia de masa en el sistema de liberación al medio (Paul, *et al.*, 2011); por otro lado el modelo de Korsmeyer-Peppas se basa en la ley de Fick,

y es útil cuando el mecanismo de liberación es controlado adicionalmente por la relajación de las cadenas de los polímeros y por lo tanto es aplicado frecuentemente a perfiles de liberación de sistemas poliméricos (Korsmeyer *et al.*, 1983). De acuerdo al modelo Korsmeyer-Peppas, el valor de la constante “n” indica el mecanismo específico de liberación, valores menores a 0.5 pueden deberse a la difusión del fármaco de modo parcial a través de una matriz que lo contiene y se encuentra hinchada dejando volumen disponible para el proceso difusional, es así como los poros son los que ayudan a que esto ocurra, como fue observado en todas las proporciones de los films con y sin electrohilado.

De acuerdo a lo observado en los ajustes de los perfiles de liberación de los films, el modelo de Korsmeyer-Peppas fue el que mostró un mejor ajuste, con una R^2 de mayor a 0.96 y 97 en las formulaciones, sin embargo, el mejor resultado de ajuste fue la proporción 1-1 placebo que obtuvo 0.99. Este ajuste indica que la liberación de NYS no depende únicamente de la difusión del fármaco al medio, sino también de la hidrofiliidad de los polielectrolitos.

4.1.9. Determinación *in vitro* de actividad antimicrobiana

La actividad antimicrobiana de los films fue monitoreada durante un periodo de 72h (Tabla 5). La inhibición antimicrobiana de los films cargados con nistatina mostraron inhibición a la cepa de *Cándida albicans* ATCC 14053 sin embargo la que obtuvo una diferencia menor con el sensidisco cargado con nistatina fue la proporción 1-2 CHIGA como se muestra en la figura 30, en cuanto a los resultados de inhibición de los films

electrohilados bajo un poco el halo de inhibición en el film 1-2 CHIGA quedando a la par de la proporción 1-1 CHIGA la cual no se vio afectada por el electrohilado, en cuanto a la proporción 2-1 CHIGA la cual si descendió significativamente quizá por la rigidez de esa proporción y el electrohilado que pudiera haber interferido en la liberación del fármaco a través del agar (figura 31).

Tabla 5. Actividad antimicrobiana de los films.

	1-1 CHI-GA	1-2 CHI-GA	2-1 CHI-GA	F	P	1-1 CHI-GA electrohila do	1-2 CHI-GA electrohila do	2-1 CHI-GA electrohila do	F	P
<i>Candida albicans</i> ATCC 14053	1.5441±0.2 351	1.667±0.15 00	1.596±0.20 42	96.4 8	<0.000 1	1.533± 0.2236	1.544± 0.2404	1.389± 0.1167	87.6 8	<0.000 1

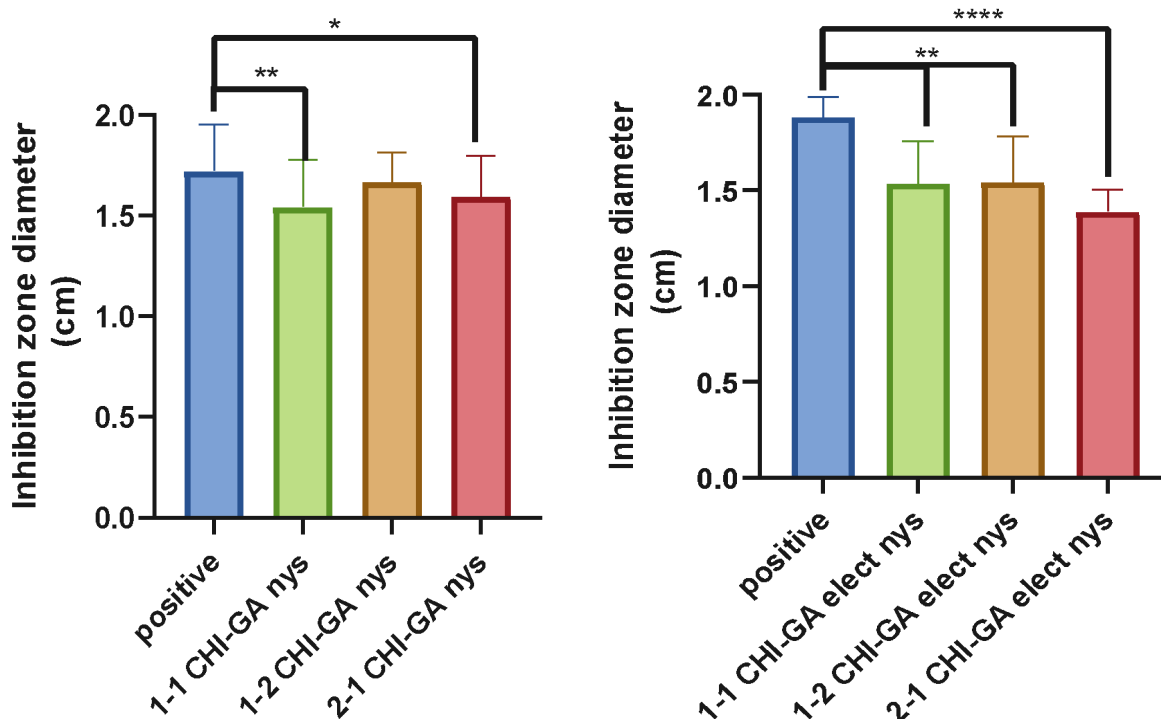


Figura 30. Diámetro de Inhibición microbiana (cm) a las 72h de los films con y sin electrohilado, positive (Nystatin) diferencia significativa * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, **** $p < 0.0001$.

La actividad antimicrobiana de GA y QUI ha sido descrita previamente por otros autores (Goy, Morais y Assis, 2016; Baien *et al.*, 2020), sin embargo, únicamente para el QUI se ha propuesto un mecanismo de acción para tal efecto. Los autores refieren que la principal causa de la lisis celular ocasionada por QUI son las interacciones electrostáticas entre sus grupos amino con carga positiva ($R-NH_3^+$) y las cargas negativas de las membranas microbianas (Rabea *et al.*, 2003; Goy, De Britto y Assis, 2009).

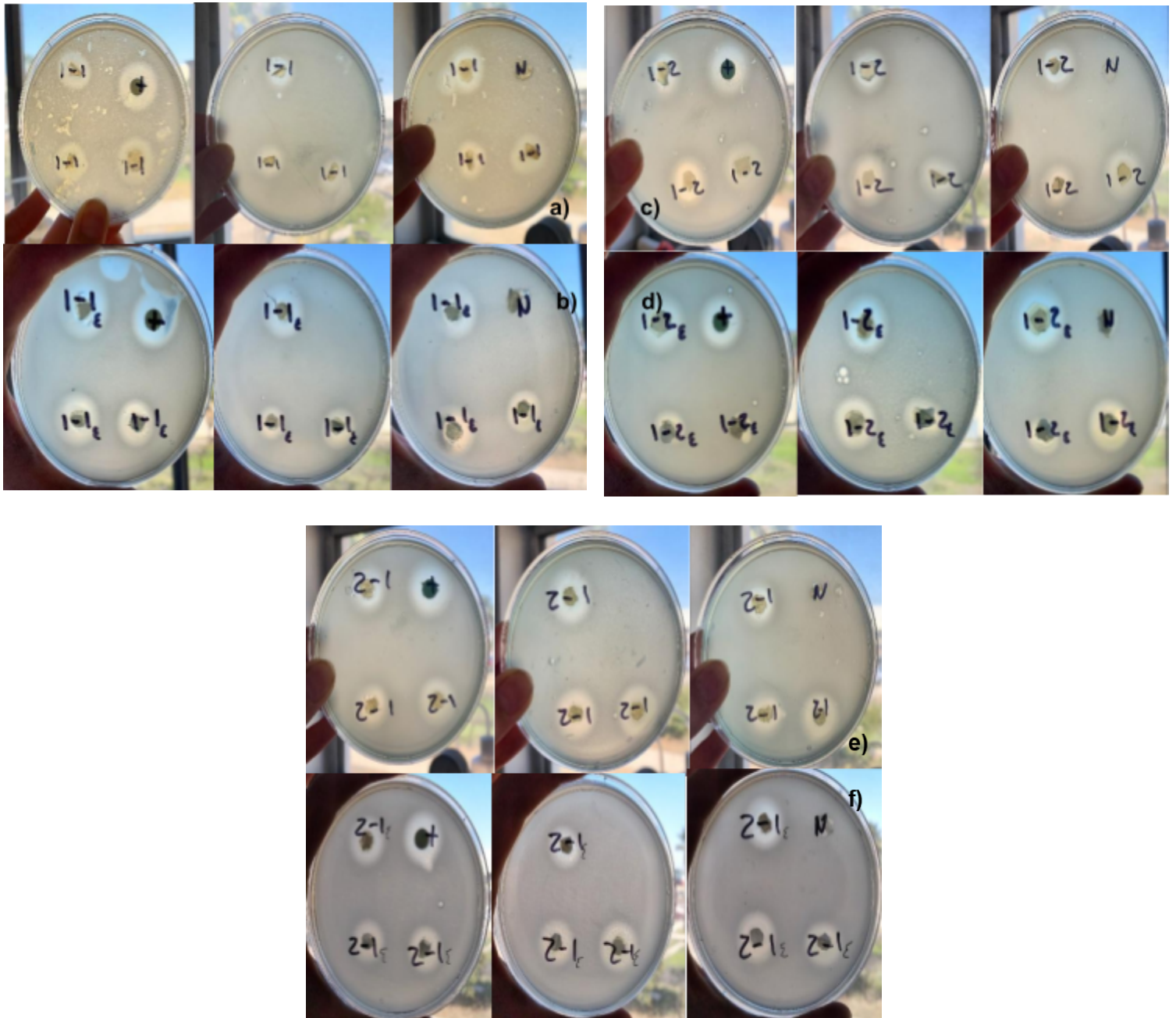


Figura 31. Halo de inhibición de los films a diferentes proporciones con nistatina en caja Petri con agar Müller Hinton realizado por triplicado a) 1-1, b) 1-1 electrohilado, c) 1-2, d) 1-2 electrohilado, e) 2-1, f) 2-1 electrohilado.

4.1.10. *Capacidad de adhesión de los films*

Para entender cómo ocurre la bioadhesión hay que tener en cuenta que esta consiste en la unión de una macromolécula natural o sintética hacia un epitelio, y que esta unión no solo se presenta de un único modo, sino que puede prolongarse por distintas interacciones entre las que se encuentran las electrostáticas y formación de puentes de hidrógeno. Como es sabido en los sistemas naturales la presencia de agua puede plastificar el sistema y permite que las moléculas mucoadhesivas se relajen y se unan a la mucosa a través de fuerzas van der Waals y puentes de hidrógeno. Y como efecto contrario se tiene lo que se denomina fuerza de desprendimiento, la cual está definida como la fuerza máxima para producir una fractura entre la película a la mucosa (polímero/mucosa), y experimentalmente esta se puede determinar como el trabajo de adhesión la cual es el área bajo la curva obtenida de fuerza/distancia.

Se realizó la prueba de bioadhesión obteniendo los siguientes resultados de fuerza de desprendimiento (N) y trabajo de adhesión (mJ). A partir de la inspección visual, los films mostraron capacidad mucoadhesiva en el modelo probado (Figura 32). Se encontró una diferencia significativa para $F_{\max}$ entre los films electrohilados, en cuanto al trabajo de adhesión se encontró diferencia significativa en los films placebo con respecto a los electrohilados, para las proporciones si se encontró diferencia significativa con respecto a los electrohilados lo que refiere a una mejora en el trabajo de adhesión al Electrohilar los films (Tabla 6, Figura 32).

Tabla 6. Parámetros de adhesión de los films.

Formulación	$F_{\max}$ (N)	W_{ad} (mJ)
1-1 CHIGA	0.17 ± 0.046	377.67 ± 64.29
1-2 CHIGA	0.15 ± 0.023	528.67 ± 48.69
2-1 CHIGA	0.05 ± 0.012	461 ± 79.04
1-1 ELECT CHIGA	0.26 ± 0.023	876.33 ± 94.05
1-2 ELECT CHIGA	0.18 ± 0.020	731 ± 52.92
2-1 ELECT CHIGA	0.09 ± 0.012	659.67 ± 36.3
1-1 CHIGA NYS	0.13 ± 0.042	646 ± 26.06
1-2 CHIGA NYS	0.14 ± 0.020	699.5 ± 34.87
2-1 CHIGA NYS	0.07 ± 0.023	506.67 ± 29.30
1-1 ELECT CHIGA NYS	0.17 ± 0.023	762 ± 88.66
1-2 ELECT CHIGA NYS	0.26 ± 0.023	837.3 ± 35
2-1 ELECT CHIGA NYS	0.16 ± 0.020	696 ± 86.76

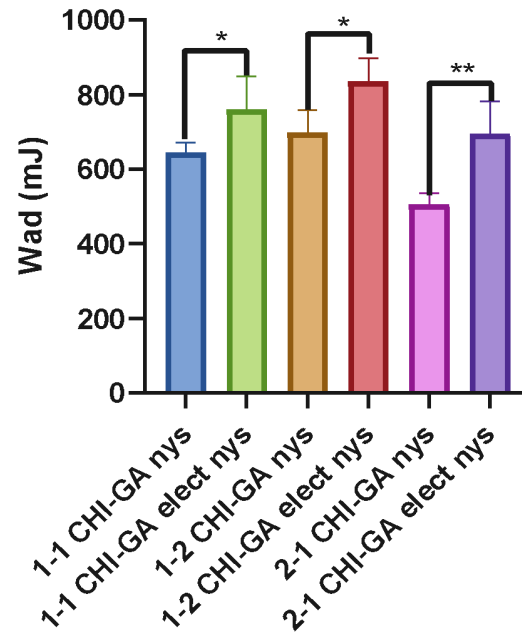
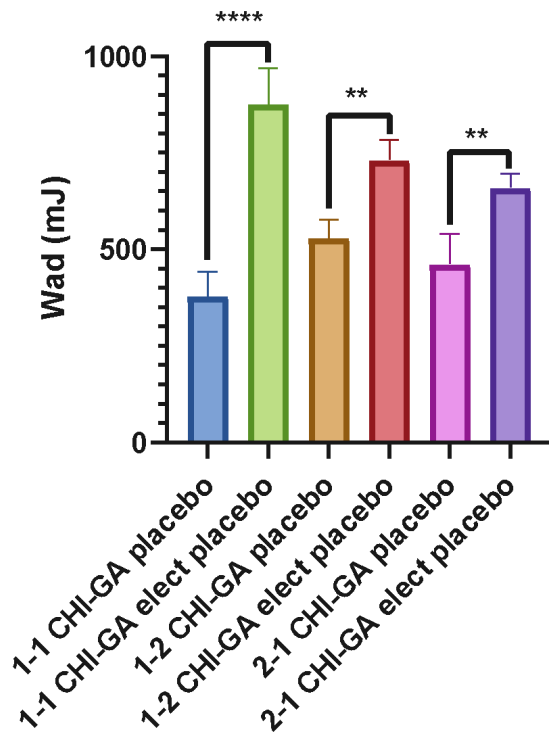
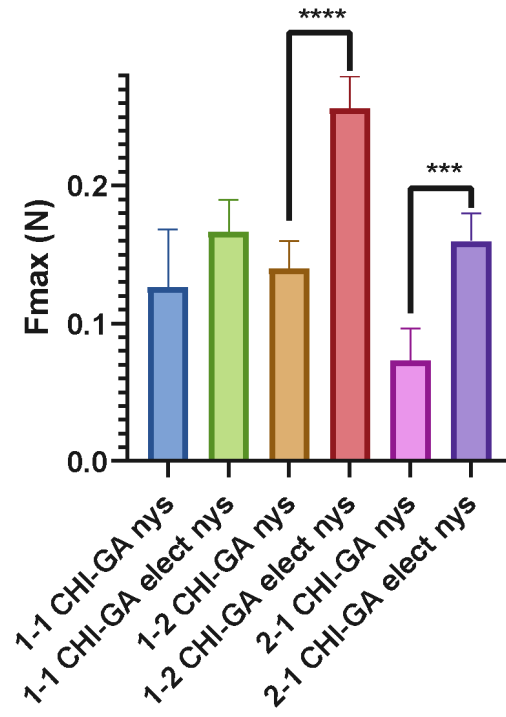
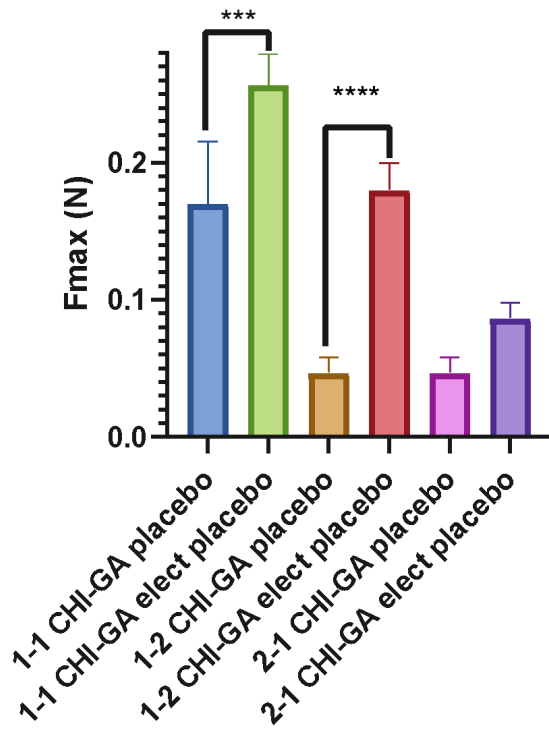


Figura 32. Fuerza máxima ($F_{\max}$) y trabajo de adhesión (W_{ad}) de los films. Diferencia significativa * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$.

La capacidad de adhesión de los films podría deberse a la presencia de cargas positivas de los grupos funcionales amino del quitosano, ya que estas pueden interactuar a través de interacciones del tipo electrostático con las cargas negativas de los residuos de ácido siálico y sulfato de mucina de las mucosas (Smart, *et al.*, 2005). La capacidad de captación de agua de los films permite que las cadenas de los polímeros tengan una mayor movilidad, esto facilita su inter difusión a la capa mucosa; siendo este uno de los mecanismos conocidos responsables de la mucoadhesión (Peppas y Sahlin, 1996). En general, una mayor capacidad de hinchamiento de la formulación se correlaciona con su capacidad de mucoadhesión ya que esto promueve la rápida expulsión de agua por el tejido y la apertura de las cadenas de polímeros para la interpenetración (Kharenko, Larionova y Demina, 2008). En este caso, se obtuvo una diferencia representativa en la $F_{\max}$ de las formulaciones 1-1 y 1-2 de films con electrohilado, lo cual coincide con el grado de hinchamiento, el trabajo de adhesión también mostró diferencias significativas entre los electrohilados y los films no electrohilados, adicionalmente se observó que la adición del fármaco a la formulación no redujo de manera significativa la capacidad de adhesión.

4.1.11. Capacidad de adhesión del electrohilado y la película

La bioadhesión mostrada entre la capa electrohilada y la película se muestra en la siguiente tabla donde el resultado de la fuerza de desprendimiento es (N) y el trabajo de adhesión es (mJ)(tabla 7).

Tabla 7. Pruebas de mucoadhesividad para películas y capa electrohilada.

	$F_{\max}$ (N)	W_{ad} (mJ)
Film/Electrohilado	1.08 ± 0.317	622.6 ± 397.129

Demostrando que las películas tienen una interacción con la capa electrohilada.

4.1.12. Citotoxicidad in vitro de los films

Los films debido a su contenido de nistatina y a su naturaleza termolábil y fotosensible no fue posible la esterilización con UV o temperatura, por lo que se decidió realizar el proceso de esterilización con gas (óxido de etileno), pasando el tiempo de incubación en y después de la adición del MTT se procedió a retirar los films y a centrifugar el contenido de los pocillos para retirar los fragmentos de films que pudieron quedar en el contenido y así no interferir con la lectura de IR (figura 35). Lo que se pudo observar bajo el microscopio fueron células sanas (figura 34), en la figura 33 se puede observar

que las absorbancias más significativas con respecto a su contraparte con nistatina fueron las formulaciones 1-1 y 1-2 CHIGA, en cuanto a la formulación 2-1 esta no señaló diferencia significativa según ANOVA, el control de nistatina fue la única que señaló citotoxicidad moderada según ANOVA con una diferencia significativa de $*p<0.05$, debido a que precipita el colesterol en las célula modificando su estabilidad estructural causando daño (Fisher, P, Bryson, 1997), para el control de quitosano llega a señalar citotoxicidad celular ligera debido a sus grupos amino que presenta su estructura molecular sin estar en forma de complejo (Rodrigues *et al.*, 2012). Se podría decir que los films con nistatina y sin nistatina producen una citotoxicidad ligera a no tóxica.

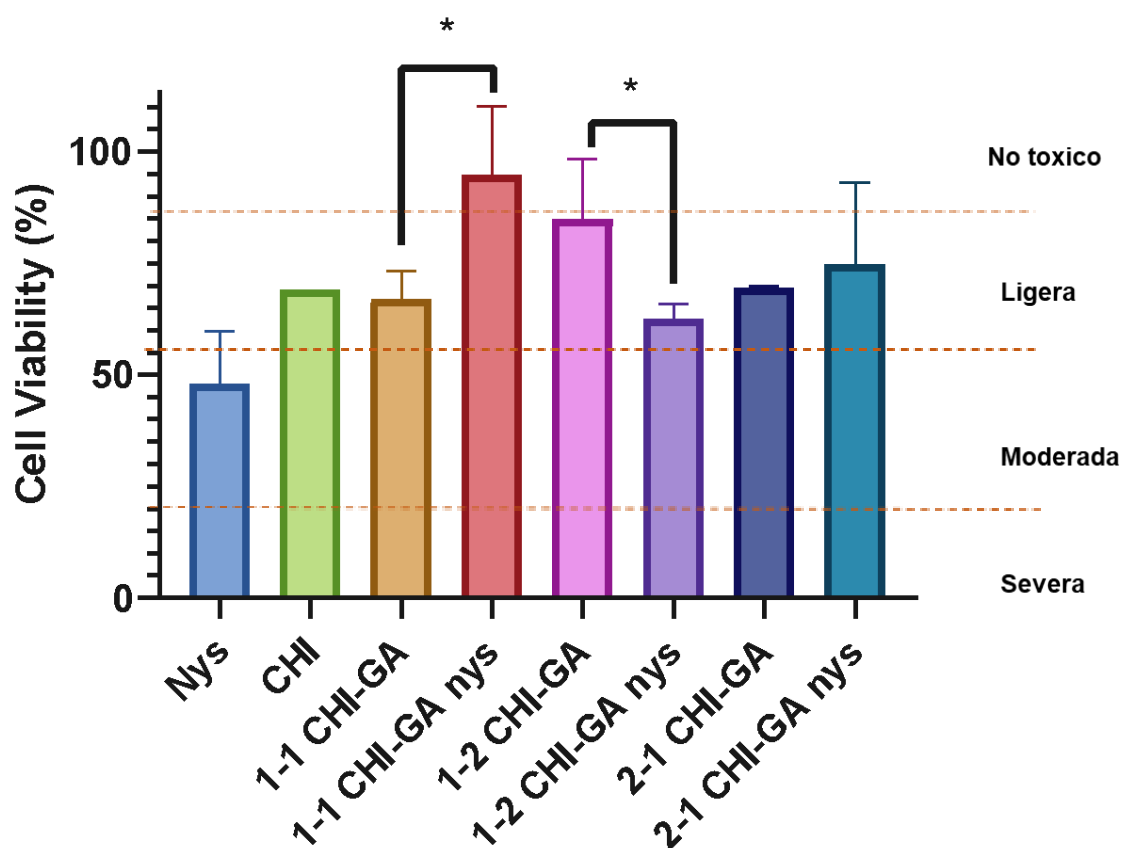


Figura 33. Absorbancia de los pocillos comparados con el grupo control. Diferencia significativa $*p<0.05$.

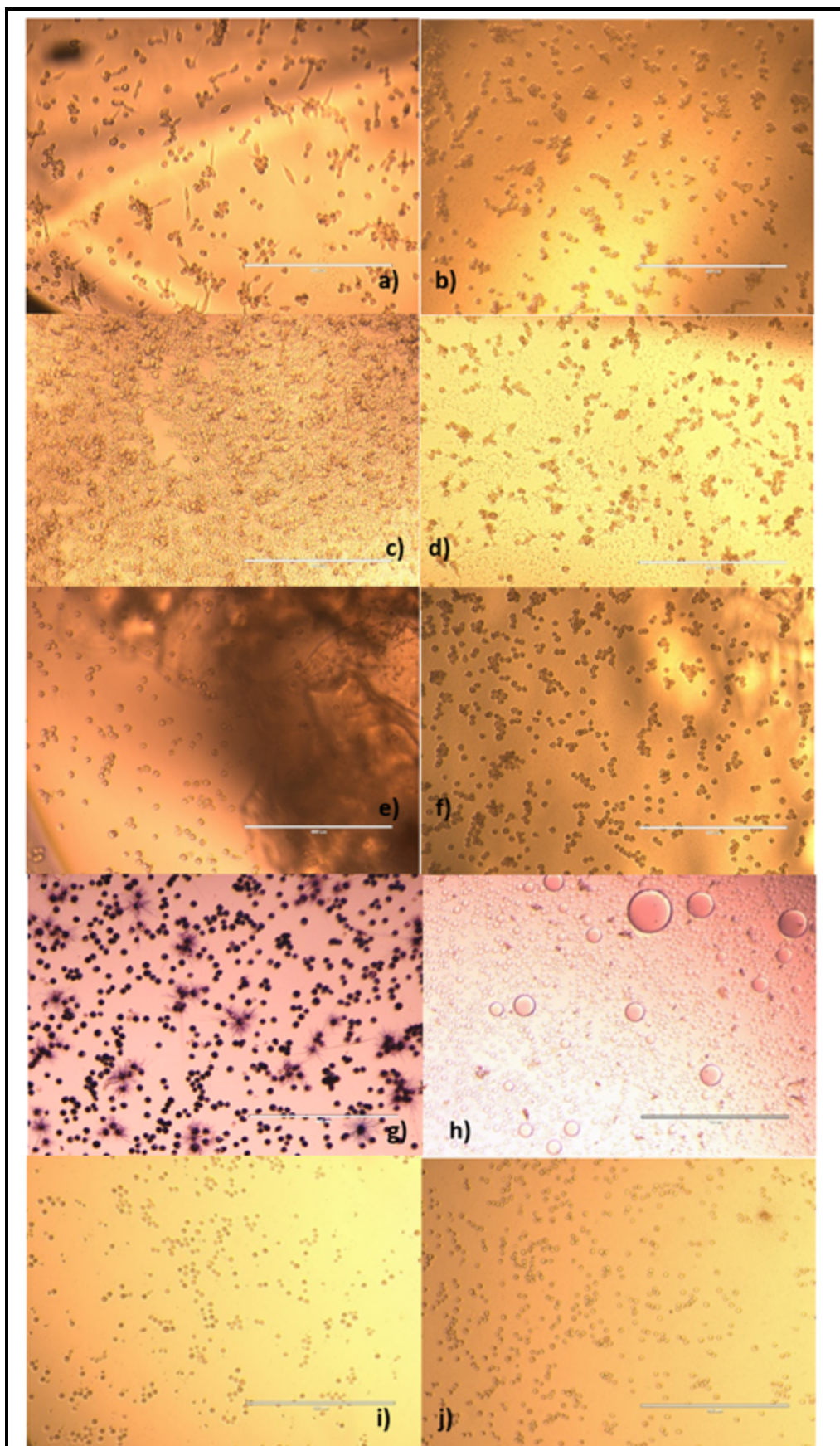


Figura 34. Microscopia de pocillos tras 24h de incubación a 400 μm , a) 1-1 CHIGA, b) 1-1 CHIGA NYS, c) 1-2 CHIGA, d) 1-2 CHIGA NYS, e) 2-1 CHIGA, f) 2-1 CHIGA NYS, g) fibroblastos con fenol, h) fibroblastos con formazan, i) fibroblastos con CHI, j) fibroblastos con NYS.

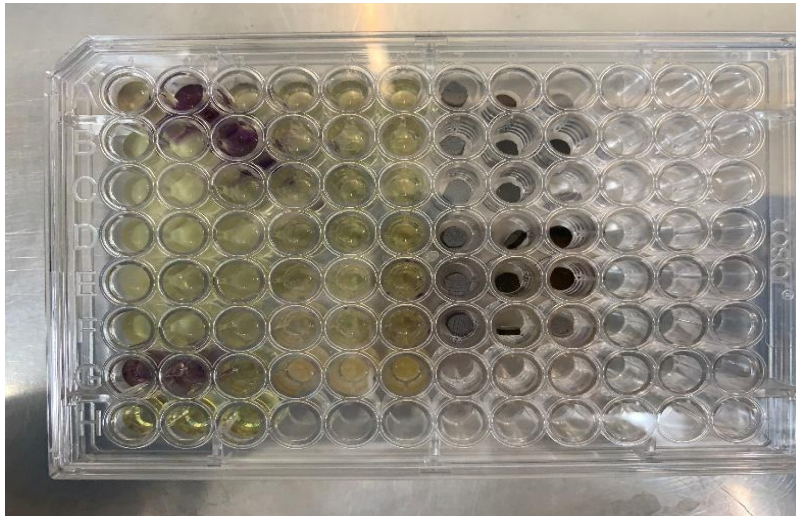


Figura 35. Placa de 96 pocillos con las muestras de films, fila 1-3 de A-H

V. CONCLUSIONES

En la presente investigación se desarrollaron y caracterizaron tres proporciones de un sistema en forma de films a base de complejos de polielectrolitos de QUI y GA para la liberación de NIS con una capa mucoadhesiva de electrohilado de PCL y PCF, la capa mucoadhesiva mostró mejorar la adhesión presentada de los films y se observó un comportamiento de liberación sostenida en las tres proporciones en condiciones similares a las bucales.

La formación de los complejos de polielectrolitos y el comportamiento de la capa mucoadhesiva de electrohilado fueron estudiadas y evidenciadas mediante las pruebas de FT-IR y DSC-TGA, donde respecto al FT-IR el cambio en el número de onda de las señales de grupos funcionales característicos de los polímeros y la reducción de los picos correspondientes a la degradación de los mismos en los termogramas DSC-TGA fueron consideradas las pruebas principales de la interacción de los polielectrolitos en los films, en cuanto a la capa mucoadhesiva los termogramas mostraron una diferencia mínima en la mezcla de los polímeros donde se deduce que estos no generan interacción química entre sí, también visualizado en el FT-IR.

Los films obtenidos mostraron una liberación sostenida en dos etapas explicada por el modelo de Korsemeyer-Peppas con y sin electrohilado donde existió una liberación rápida inicial del fármaco seguida de una velocidad menor siendo esta fase un poco más acentuada en los films con la capa mucoadhesiva. Esta cinética de liberación podría ser benéfica para la aplicación oral ya que es similar a la administración de liberación rápida que se ocupa para llegar a dosis terapéuticas seguida de una liberación lenta para mantenerse dentro de esta ventana terapéutica.

La proporción CHI-GA 1-2 mostró tener el mejor grado de hinchamiento el cual también

se correlaciona con el resultado de las pruebas de adhesión, las diferentes proporciones del film mostraron una capacidad de mucoadhesión mejorada con la capa mucoadhesiva, la fuerza máxima se mejoró en la proporción CHI-GA 1-2, para el trabajo de adhesión este varió en las diferentes proporciones sin embargo todas mostraron mejoría al agregar la capa mucoadhesiva de electrohilado, donde esta propiedad no fue modificada significativamente por la presencia del fármaco.

Las pruebas de citotoxicidad evidenciaron que tras la interacción de 24h, que los films con y sin nistatina no presentan citotoxicidad importante ya que se encuentra entre lecturas no tóxicas a ligeramente tóxicas por lo que plantear emplearlas como sistema de liberación prolongado en el área bucal no representaría un problema para los pacientes.

Las formulaciones cargadas con NYS mostraron actividad antimicrobiana contra *C. albicans* ATCC 14053 utilizada; adicionalmente se observó un efecto inhibitorio mayor semejante a la inhibición mostrada por el sensidisco en la formulación CHI-GA 1-2.

Con los resultados obtenidos se pretende presentar la proporción CHI-GA 1-2 como el prototipo que presenta las mejores características como sistema de liberación bucal de nistatina para el tratamiento de *C. albicans*.

VI. BIBLIOGRAFÍA

1. Abruzzo, A. *et al.* (2013) "Chitosan/alginate complexes for vaginal delivery of chlorhexidine digluconate", *Carbohydrate Polymers*, 91(2), pp. 651–658. DOI: 10.1016/j.carbpol.2012.08.074.
2. Akintoye, S. O. y Mupparapu, M. (2020) "Clinical Evaluation and Anatomic Variation of the Oral Cavity", *Dermatologic Clinics*, 38(4), pp. 399–411. DOI: 10.1016/j.det.2020.05.001.
3. Armenta-Rojas, E. (2021) "Nystatin-loaded Polyelectrolyte Complex Films as a Mucoadhesive Drug Delivery System for Potential Buccal Application Nystatin-loaded Polyelectrolyte Complex Films as a Mucoadhesive Drug Delivery System for Potential Buccal Application", (August). DOI: 10.33263/BRIAC124.43844398.
4. Baien, S. H. *et al.* (2020) "Antimicrobial and Immunomodulatory Effect of Gum Arabic on Human and Bovine Granulocytes Against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*", *Frontiers in Immunology*, p. 3119.
5. Bernkop-Schnürch, A., Schwarz, V. y Steininger, S. (1999) "Schnürch - polymer with thiol groups.pdf", *Pharmaceutical Research*, pp. 876–881.
6. Bernkop-Schnürch, A. y Hopf, T. E. (2001) "Synthesis and *in vitro* evaluation of chitosan-thioglycolic acid conjugates", *Scientia Pharmaceutica*, 69(2), pp. 109–118. doi: 10.3797/scipharm.aut-01-12.
7. Bernkop-Schnürch, A., Hornof, M. y Zoidl, T. (2003) "Thiolated polymers - Thiomers: Synthesis and *in vitro* evaluation of chitosan-2-iminothiolane conjugates", *International Journal of Pharmaceutics*, 260(2), pp. 229–237. doi:

10.1016/S0378-5173(03)00271-0.

8. Bernkop-Schnürch, A. y Thaler, S. C. (2000) "Polycarbophil-cysteine conjugates as platforms for oral polypeptide delivery systems", *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 89(7), pp. 901–909. doi: 10.1002/1520-6017(200007)89:7<901::AID-JPS7>3.0.CO;2-0.
9. Bhatlekar, T. *et al.* (2020) "Chitosan – A naturally occurring viable alternative to Nystatin as an anti-fungal agent incorporated in heat polymerized denture base resin", 07(11), pp. 5903–5915.
10. Bhattacharya, S., Sae-Tia, S. y Fries, B. C. (2020) "Candidiasis and mechanisms of antifungal resistance", *Antibiotics*, 9(6), pp. 1–19. DOI: 10.3390/antibiotics9060312.
11. Castro-Ruiz, J. M. (2014) "Diseño de un sistema bioadhesivo de clorhexidina empleando pullulan como matriz para uso en mucosa oral", *Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm.*, 45(1), pp. 35–36. DOI: 10.15446/rcciquifa.v45n1.58016.
12. Cross, B. W. y Ruhl, S. (2018) "Glycan recognition at the saliva – oral microbiome interface", *Cellular Immunology*. Academic Press Inc., pp. 19–33. DOI: 10.1016/j.cellimm.2018.08.008.
13. Edmans, J. G. *et al.* (2020) "Mucoadhesive electrospun fiber-based technologies for oral medicine", *Pharmaceutics*, 12(6), pp. 1–21. DOI: 10.3390/pharmaceutics12060504.
14. Espinosa-Andrews, H. *et al.* (2007) "Gum arabic-chitosan complex coacervation", *Biomacromolecules*, 8(4), pp. 1313–1318. DOI: 10.1021/bm06111634.

15. Fakhri, E. *et al.* (2020) "Chitosan biomaterials application in dentistry", *International Journal of Biological Macromolecules*, 162, pp. 956–974. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2020.06.211.
16. Fisher, p, Bryson, V. (1997) "Toxicity of Nystatin and its Methyl Ester Toward Parental and Hybrid Mammalian Cells", 13(9), pp. 105–112.
17. Gaitán-Cepeda, L. A. *et al.* (2012) "Candida bucal en niños mexicanos con VIH/SIDA, desnutrición o marginación social", *Revista Panamericana de Salud Publica/Pan American Journal of Public Health*, 31(1), pp. 48–53. DOI: 10.1590/S1020-49892012000100007.
18. Ganguly, S. *et al.* (2018) "Mechanically robust dual responsive water dispersible-graphene based conductive elastomeric hydrogel for tunable pulsatile drug release", *Ultrasonics Sonochemistry*, 42(October 2017), pp. 212–227. DOI: 10.1016/j.ultsonch.2017.11.028.
19. Goy, R. C., De Britto, D. y Assis, O. B. G. (2009) "A review of the antimicrobial activity of chitosan", *Polimeros*, 19(3), pp. 241–247. DOI: 10.1590/S0104-14282009000300013.
20. Goy, R. C., Morais, S. T. B. y Assis, O. B. G. (2016) "Evaluation of the antimicrobial activity of chitosan and its quaternized derivative on *E. Coli* and *S. aureus* growth", *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 26(1), pp. 122–127. DOI: 10.1016/j.bjp.2015.09.010.
21. Harris, D. y Robinson, J. R. (1992) "Drug delivery via the mucous membranes of the oral cavity", *Journal of Pharmaceutical Science*, 81(1), pp. 1–10. DOI: 10.1038/nrd3087.

22. Ignatova, M., Manolova, N. y Rashkov, I. (2013) "Electrospun Antibacterial Chitosan-Based Fibers", *Macromolecular Bioscience*, 13(7), pp. 860–872. DOI: 10.1002/mabi.201300058.
23. Ishida, M. *et al.* (1981) "New mucosal dosage form of insulin.", *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 29(3), pp. 810–816. DOI: 10.1248/cpb.29.810.
24. Jose, M., Rajagopal, V. y Thankam, F. G. (2021) "Oral tissue regeneration: Current status and future perspectives", en *Regenerated Organs*. Elsevier, pp. 169–187. DOI: 10.1016/b978-0-12-821085-7.00009-9.
25. Kafedjiiski, K. *et al.* (2005) "Synthesis and *in vitro* evaluation of a novel thiolated chitosan", *Biomaterials*, 26(7), pp. 819–826. doi: 10.1016/j.biomaterials.2004.03.011.
26. Kaminsky, B. M., Bostwick, J. R. y Guthrie, S. K. (2015) "Alternate Routes of Administration of Antidepressant and Antipsychotic Medications", *Annals of Pharmacotherapy*, 49(7), pp. 808–817. DOI: 10.1177/1060028015583893.
27. Kassem, A. A. *et al.* (2015) "Preparation and evaluation of periodontal films based on polyelectrolyte complex formation", *Pharmaceutical Development and Technology*, 20(3), pp. 297–305. DOI: 10.3109/10837450.2013.862262.
28. Kaur, A. y Kaur, G. (2012) "Mucoadhesive buccal patches based on interpolymer complexes of chitosan-pectin for delivery of carvedilol", *Saudi Pharmaceutical Journal*, 20(1), pp. 21–27. DOI: 10.1016/j.jsps.2011.04.005.
29. Kebouchi, M. *et al.* (2020) "Importance of digestive mucus and mucins for designing new functional food ingredients", *Food Research International*. Elsevier Ltd, p. 108906. DOI: 10.1016/j.foodres.2019.108906.

30. Kharenko, E. A., Larionova, N. I. y Demina, N. B. (2008) "Mucoadhesive Drug Delivery Systems: Quantitative Assessment of Interaction Between Synthetic and Natural Polymer Films and Mucosa", *Pharmaceutical Chemistry Journal*, 42(7), pp. 392–399. DOI: 10.1007/s11094-008-0132-8.
31. Kilicarslan, M. *et al.* (2018) "Preparation and evaluation of clindamycin phosphate loaded chitosan/alginate polyelectrolyte complex film as mucoadhesive drug delivery system for periodontal therapy.", *European Journal of pharmaceutical sciences: official journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences*, 123, pp. 441–451. DOI: 10.1016/j.ejps.2018.08.007.
32. Klinge, S. A. y Sawyer, G. A. (2013) "Effectiveness and Safety of Topical versus Oral Nonsteroidal Anti-inflammatory Drugs: A Comprehensive Review", *The Physician and Sportsmedicine*, 41(2), pp. 64–74. DOI: 10.3810/psm.2013.05.2016.
33. Korsmeyer, R. W. *et al.* (1983) "Mechanisms of solute release from porous hydrophilic polymers", *International Journal of Pharmaceutics*, 15(1), pp. 25–35. DOI: 10.1016/0378-5173(83)90064-9.
34. Leclercq, L., Boustta, M. y Vert, M. (2012) "Polymer Degradation as a Tool To Study Polyelectrolyte Complex Formation and Stability", *en*, pp. 59–72. DOI: 10.1021/bk-2012-1114.ch005.
35. León, M. G. F. De *et al.* (2020) "Epidemiological data of candidiasis in a tertiary hospital in the State of Mexico", *Dermatologia Revista Mexicana*, 64(2), pp. 109–114.
36. Llabot, J. M. *et al.* (2007) "HPLC method for the determination of nystatin in

- saliva for application in clinical studies”, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 45(3), pp. 526–530. DOI: 10.1016/j.jpba.2007.06.014.
37. Madhav, N. V. S. *et al.* (2009) “Orotransmucosal drug delivery systems: A review”, *Journal of Controlled Release*, 140(1), pp. 2–11. DOI: 10.1016/j.jconrel.2009.07.016.
38. Mohammadi, G. *et al.* (2017) “Preparation, physicochemical characterization and anti-fungal evaluation of the Nystatin-loaded Eudragit RS100/PLGA nanoparticles”, *Journal of Drug Delivery Science and Technology*. DOI: 10.1016/j.jddst.2017.02.004.
39. Nanci, A. (2013) “Oral Mucosa”, en *Ten Cate’s Oral Histology*. Elsevier, pp. 278–310. DOI: 10.1016/B978-0-323-07846-7.00012-4.
40. Paul, D. R. (2011) “Elaborations on the Higuchi model for drug delivery”, *International Journal of Pharmaceutics*, 418(1), pp. 13–17. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2010.10.037.
41. Pendekal, M. S. y Tegginamat, P. K. (2012) “Development and characterization of chitosan-polycarbophil interpolyelectrolyte complex-based 5-fluorouracil formulations for buccal, vaginal and rectal application”, *DARU, Journal of Pharmaceutical Sciences*, 20(1), pp. 1–11. DOI: 10.1186/2008-2231-20-67.
42. Peppas, N. A. y Buri, P. A. (1985) “Surface, interfacial and molecular aspects of polymer bioadhesion on soft tissues”, *Journal of Controlled Release*, 2(C), pp. 257–275. DOI: 10.1016/0168-3659(85)90050-1.
43. Peppas, N. A. y Sahlin, J. J. (1996) “Hydrogels as mucoadhesive and bioadhesive materials: a review”, *Biomaterials*, 17(16), pp. 1553–1561. DOI:

10.1016/0142-9612(95)00307-X.

44. Pérez-González, G. L. *et al.* (2019) "Development, characterization, and *in vitro* assessment of multilayer mucoadhesive system containing dexamethasone sodium phosphate", *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials*, 0(0), pp. 1–13. DOI: 10.1080/00914037.2020.1798433.
45. Puerto, J. *et al.* (2001) "Candidiasis orofaríngea", *Revista de Diagnóstico Biológico*, 50(4), pp. 177–181.
46. Rabea, E. I. *et al.* (2003) "Chitosan as antimicrobial agent: Applications and mode of action", *Biomacromolecules*, 4(6), pp. 1457–1465. DOI: 10.1021/bm034130m.
47. Ranade, V. V. (1991) "Drug Delivery Systems 5A. Oral Drug Delivery", *The Journal of Clinical Pharmacology*, 31(1), pp. 2–16. DOI: 10.1002/j.1552-4604.1991.tb01881.x.
48. Roblegg, E., Coughran, A. y Sirjani, D. (2019) "Saliva: An all-rounder of our body", *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. Elsevier B.V., pp. 133–141. DOI: 10.1016/j.ejpb.2019.06.016.
49. Rodrigues, S. *et al.* (2012) "Biocompatibility of Chitosan Carriers with Application in Drug Delivery", *Journal of Functional Biomaterials*, 3(3), pp. 615–641. DOI: 10.3390/jfb3030615.
50. Rogawski, M. A. y Heller, A. H. (2019) "Diazepam buccal film for the treatment of acute seizures", *Epilepsy & Behavior*, 101, p. 106537. DOI: 10.1016/j.yebeh.2019.106537.
51. Sakloetsakun, D. *et al.* (2016) "Chitosan–gum arabic polyelectrolyte complex

- films: physicochemical, mechanical and mucoadhesive properties”, *Pharmaceutical Development and Technology*, 21(5), pp. 590–599. DOI: 10.3109/10837450.2015.1035727.
52. Sims, C. R. *et al.* (2006) “Correlation between Microdilution, E-test, and Disk Diffusion Methods for Antifungal Susceptibility Testing of Posaconazole against *Candida* spp”, *Journal of Clinical Microbiology*, 44(6), pp. 2105 LP – 2108. DOI: 10.1128/JCM.02591-05.
53. Singh, P. K. *et al.* (2002) “A component of innate immunity prevents bacterial biofilm development”, *Nature*, 417(6888), pp. 552–555. DOI: 10.1038/417552a.
54. Smart, J. D. (2005) “The basics and underlying mechanisms of mucoadhesion”, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 57(11), pp. 1556–1568. DOI: 10.1016/j.addr.2005.07.001.
55. Armenta-Rojas, E. *et al.* (2022) “Nystatin-loaded polyelectrolyte complex films as a mucoadhesive drug delivery system for potential buccal application”, *Biointerface Research in Applied Chemistry*, 12(4), pp. 4384–4398. doi: 10.33263/BRIAC124.43844398.
56. Swinehart, I. T. y Badylak, S. F. (2016) “Extracellular matrix bioscaffolds in tissue remodeling and morphogenesis”, *Developmental Dynamics*, 245(3), pp. 351–360. doi: 10.1002/dvdy.24379.
57. Takx, R. A. P. *et al.* (2015) “Sublingual Nitroglycerin Administration in Coronary Computed Tomography Angiography: a Systematic Review”, *European Radiology*, 25(12), pp. 3536–3542. DOI: 10.1007/s00330-015-3791-3.

58. Tejada, G. *et al.* (2017) "Formulation and *in-vitro* efficacy of antifungal mucoadhesive polymeric matrices for the delivery of miconazole nitrate", *Materials Science and Engineering C*. DOI: 10.1016/j.msec.2017.05.034.
59. Tsai, G. J. *et al.* (2002) "Antimicrobial activity of shrimp chitin and chitosan from different treatments and applications of fish preservation", *Fisheries Science*, 68(1), pp. 170–177. DOI: 10.1046/j.1444-2906.2002.00404.x.
60. Vera-González, N. y Shukla, A. (2020) "Advances in Biomaterials for the Prevention and Disruption of Candida Biofilms", *Frontiers in Microbiology*, 11(September). DOI: 10.3389/fmicb.2020.538602.
61. Vila, T. *et al.* (2020) "Oral candidiasis: A disease of opportunity", *Journal of Fungi*, 6(1), pp. 1–28. DOI: 10.3390/jof6010015.
62. Wang, L., Khor, E. y Lim, L.-Y. (2001) "Chitosan–alginate–CaCl₂ system for membrane coat application", *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 90(8), pp. 1134–1142. DOI: 10.1002/JPS.1067.
63. Ways, T. M. M., Lau, W. M. y Khutoryanskiy, V. V. (2018) "Chitosan and its derivatives for application in mucoadhesive drug delivery systems", *Polymers*. MDPI AG. DOI: 10.3390/polym10030267.
64. Yang, J. *et al.* (2018) "Chitosan-Sodium Phytate Films with a Strong Water Barrier and Antimicrobial Properties Produced via One-Step-Consecutive-Stripping and Layer-by-Layer-Casting Technologies.", *Journal of agricultural and food chemistry*, 66(24), pp. 6104–6115. DOI: 10.1021/acs.jafc.8b01890.
65. Yoon, H. y Kim, G. H. (2012) "Layer-by-layered electrospun micro/nanofibrous

mats for drug delivery system”, *Macromolecular Research*, 20(4), pp. 402–406.

DOI: 10.1007/s13233-012-0047-9.