

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS E INGENIERIA



**“DESARROLLO DE DISPOSITIVOS MUCOADHESIVOS EN IMPRESIÓN
3D PARA LA LIBERACIÓN DE NISTATINA POR CAVIDAD VAGINAL”**

T E S I S

**Que para obtener el grado de
QUÍMICO FARMACOBIOLOGO**

Presenta

Stefania Parra López

Directora de tesis

Dra. Ayla Carolina Vea Barragán

Co-directores:

Dra. Aracely Serrano López

Dr. José Manuel Cornejo Bravo

Tijuana B.C, enero de 2025

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS E INGENIERÍA
COORDINACIÓN DE EXTENSIÓN Y VINCULACIÓN

FOLIO No. 066

Tijuana, Baja California, a 14 de noviembre de 2024

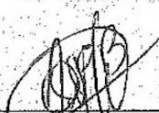
C. STEFANIA PARRA LOPEZ
PASANTE DE QUÍMICO FARMACOBIOLOGO
PRESENTE:

El tema de trabajo y/o tesis para su examen profesional, en la opción de **Tesis** es propuesto por los académicos **Dra. Ayla Vea Barragan, el Dr. José Manuel Cornejo Bravo y la Dra. Aracely Serrano Medina** quienes serán la responsable de la calidad del trabajo que usted presente, referido al tema; "**Desarrollo de dispositivos mucoadesivos en impresión 3D para la liberación de Nistatina por cavidad vaginal**", el cual deberá usted desarrollar, de acuerdo con el siguiente orden:

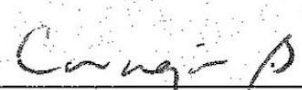
RESUMEN

- I. INTRODUCCIÓN
- II. ANTECEDENTES
- III. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL
- IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN
- V. CONCLUSIONES
- VI. TRABAJO A FUTURO
- VII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS
- VIII. APÉNDICES







Dra. Ayla Vea Barragán
Directora de Tesis



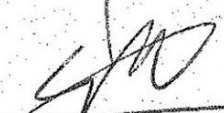
Dr. José Manuel Cornejo Bravo
Co- Director de Tesis



Dra. Aracely Serrano Medina
Co- Directora de Tesis



M.C. Roberto Alejandro Reyes Martínez
Director



Dra. Ana Alejandra Ramírez Rodríguez
Subdirectora

AGRADECIMIENTOS

Este logro es tan suyo como mío; a mi familia. Mis padres Juan y Monica, a mis hermanos Julio y Marco, a mis tías Rosy y Alicia, y a mi nana Micaela; por su amor, sacrificio y apoyo incondicional. Su fe inquebrantable en mí ha sido la luz que me ha guiado en los momentos más oscuros y la fuerza que me ha impulsado a no rendirme nunca.

A ti, mi niña, te agradezco por tu valentía, por cada risa y sacrificio que tejó un lazo con el futuro. Eres mi raíz y mis alas, sin ti, no habría llegado aquí. Sé que el viaje que nos queda por recorrer será aún más grandioso. Como lo llevo en mi piel, con esfuerzo, disciplina, perseverancia, estrategia y corazón todo se vuelve *más que un sueño*.

A las grandes amistades que me dio la universidad: María Fernanda, te agradezco por ser mi cómplice en este proyecto y acompañarme en cada paso; Fernando, Nadia, Itzel, Mildred y Fidel. Gracias a todos por volverse mucho más que amigos, por ser esa compañía que hizo de esta experiencia algo inolvidable. Recordaré estos momentos con una sonrisa en el corazón.

A mi directora de tesis, la Dra. Ayla Carolina Veá Barragán por su paciencia y todo el conocimiento que me compartió a lo largo de este proyecto, por motivarme a seguir aprendiendo y explorando más allá de lo que consideraba posible.

RECONOCIMIENTOS INSTITUCIONALES

A la Universidad Autónoma de Baja California, por el valioso apoyo otorgado a través de la 23ª Convocatoria Interna de Proyectos de Investigación, durante el periodo 2024-1.

A la Facultad de Ciencias Químicas e Ingeniería de la Universidad Autónoma de Baja California, por su respaldo en la presentación de un trabajo libre durante el XXXII Congreso de Educación Químico Farmacéutico Biológico y la XXVII Reunión de Estudiantes de Farmacia, organizados por el Instituto Politécnico Nacional.

Al Laboratorio de Biofarmacia, por la confianza depositada y por abrirme las puertas de sus instalaciones para la realización de este proyecto.

A mi comité de tesis, integrado por la Dra. Ayla Carolina Veja Barragán, Dra. Aracely Serrano Medina, Dr. José Manuel Cornejo Bravo y la Dra. Alondra Montañez Ríos.

A la M.C. María Elena Miranda Pascual, por su destacada colaboración en el diseño e impresión de los dispositivos mucoadhesivos de PLA flexible que hicieron posible el desarrollo de este proyecto.

ÍNDICE

CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN	11
1.1. Antecedentes	14
1.2. Justificación	16
1.3. Hipótesis	17
1.4. Objetivos	17
1.4.1. Objetivo general	17
1.4.2. Objetivos específicos	17
CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO	18
2.1. Candidiasis Vaginal	19
2.2. Nistatina	19
2.3. Quitosano	20
2.3.1. Propiedades fisicoquímicas	21
2.3.2. Propiedades biológicas	22
2.4. Goma Arábica	24
2.4.1. Propiedades fisicoquímicas	24
2.4.2. Propiedades biológicas	25

2.5.	Películas mucoadhesivas	26
2.5.1.	Formulación de películas	27
2.6.	Mucosa vaginal	29
2.6.1.	Películas mucoadhesivas vaginales	30
2.7.	Mucoadhesión	31
2.7.1.	Teoría de la absorción	32
2.7.2.	Teoría electrónica	32
2.7.3.	Teoría de la humectación	33
2.7.4.	Teoría de la fractura	33
2.7.5.	Teoría de la difusión	34
CAPÍTULO III. PROCEDIMIENTO ESXPERIMENTAL		35
3.1.	Materiales	36
3.2.	Procedimientos experimentales	37
3.2.1.	Preparación de películas mucoadhesivas sin fármaco	37
3.2.2.	Preparación de películas mucoadhesivas con nistatina	38
3.2.3.	Grado de hinchamiento	39
3.2.4.	Cinética de hinchamiento	40

3.2.5.	Cinética de liberación del fármaco	41
CAPÍTULO VI. RESULTADOS Y DISCUSIONES		42
4.1.	Preparación de películas mucoadhesivas sin fármaco	43
4.2.	Preparación de películas mucoadhesivas cargadas con nistatina	44
4.3.	Grado de hinchamiento	45
1.1.	Cinética de hinchamiento	48
1.2.	Cinética de liberación del fármaco	50
CAPÍTULO V. CONCLUSIONES		53
CAPÍTULO IV. TRABAJO A FUTURO		56
CAPÍTULO IIV. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS		58
CAPÍTULO IIV. APÉNDICES		63
8.1.	Curva de calibración	64

Lista de abreviaturas

CVV	Candidiasis vulvovaginal
CVVR	Candidiasis Vulvovaginal Recurrente
QT	Quitosano
GA	Goma Arábica
PLA	Ácido Poliláctico
pH	Potencial de Hidrógeno
W	Peso
mg	Miligramos
ml	Militros
Nys	Nistatina
3D	Tridimensional
°C	Grado Celsius
rpm	Revoluciones por minuto

cm	Centímetros
cm ²	Centímetros cuadrados
mm	Milímetros
U.I.	Unidades internacionales
Q	Hinchamiento
IR	Infrarrojo
UV	Ultravioleta
PC	Policarbofil
V	Volumen
% (w/w)	Porcentaje peso/peso
% (w/v)	Porcentaje peso/volumen
nm	Nanómetros
ATR- FTIR	Espectroscopia Infrarroja por Transformada de Fourier con Reflectancia Total Atenuada

Índice de Figuras

Figura 1. Estructura química de la nistatina	20
Figura 2. Estructura química del quitosano	21
Figura 3. Estructura química de la goma arábiga	24
Figura 4. Diagrama de elaboración de películas mucoadhesivas por el método de evaporación del disolvente (Adaptación de Notario-Pérez et al.2020).	28
Figura 5. Ilustración de la estructura vaginal y representación de la mucosa vaginal (Adaptación de Notario-Pérez et al.2020)	30
Figura 6. Dispositivo de PLA flexible impreso en 3D	36
Figura 7. Películas mucoadhesivas placebo tras evaporación del disolvente F1, F2 y F3	43
Figura 8. Películas mucoadhesivas cargadas con nistatina tras evaporación del disolvente	44
Figura 9. Grado de hinchamiento de las películas mucoadhesivas sin fármaco (F1, F2, F3) en soluciones amortiguadoras de pH 3-7	45
Figura 10. Grado de hinchamiento de las películas mucoadhesivas sin fármaco (F1, F2, F3) en soluciones amortiguadoras de pH 3-7	46
Figura 11. Cinética de hinchamiento de las películas FA, FB y FC a pH 4	48
Figura 12. Cinética de hinchamiento de las películas FA, FB y FC a pH 5	49
Figura 13. Cinética de liberación de las películas cargadas con nistatina en los diferentes medios estudiados, donde (A) pH 4 y (B) pH 5	50

Figura 14. Cinética de liberación de las películas FA, FB y FC a pH4	50
Figura 15. Cinética de liberación de las películas FA, FB y FC a pH 5	51
Figura 16. Curva de calibración de nistatina a pH 4	65
Figura 17. Curva de calibración de nistatina a pH 5	66

Índice de tablas

Tabla 1. Microorganismos sensibles a quitosano (tomada de Aranaz et al. 2021).	22
Tabla 2. Porcentaje peso/volumen de los reactivos utilizados para desarrollar cada formulación de las películas mucoadhesivas sin fármaco	38
Tabla 3. Porcentaje peso/volumen de los reactivos utilizados para desarrollar cada formulación de las películas mucoadhesivas con fármaco	38
Tabla 4. Proporciones peso/peso de las películas secas sin fármaco tras evaporación del disolvente	43

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

La candidiasis vulvovaginal es una infección de la mucosa vaginal causada por hongos del género *Cándida*, los cuales pueden volverse patógenos bajo condiciones específicas, siendo *Cándida albicans* la especie más prevalente. Se estima que aproximadamente el 75% de las mujeres presentan esta infección al menos una vez en la vida. Para el tratamiento de la candidiasis superficial, se ha demostrado que la nistatina, un agente antifúngico poliénico derivado de *Streptomyces noursei*, resulta altamente eficaz (1).

En las últimas décadas, se ha incrementado el uso de biopolímeros en el ámbito biomédico debido a sus múltiples propiedades, entre las que destacan la biodegradabilidad, biocompatibilidad, seguridad, disponibilidad y su capacidad para reducir el impacto económico. La incorporación de polímeros mucoadhesivos en formulaciones farmacéuticas ha permitido optimizar la eficacia terapéutica de fármacos de acción local, al facilitar una mayor disponibilidad del principio activo en la membrana diana durante periodos prolongados, lo que incrementa su efectividad (2).

Entre los biopolímeros más estudiados se encuentra el quitosano (QT), un polisacárido catiónico natural derivado de la desacetilación alcalina de la quitina, un componente presente en los exoesqueletos de los crustáceos. Este polímero presenta propiedades biológicas relevantes, como mucoadhesión, actividad antibacteriana, antifúngica, antioxidante, hemostática y antiséptica. Además, los grupos hidroxilo y amino presentes en su estructura permiten la realización de diversas reacciones químicas con otros compuestos activos, así como la formación de interacciones intermoleculares e intramoleculares. Por estas características, los sistemas terapéuticos basados en quitosano destacan por su capacidad para incorporar y liberar múltiples principios activos de manera simultánea o secuencial, lo que los convierte en herramientas versátiles en la fabricación de dispositivos farmacológicos (2).

Por otro lado, la goma arábiga (GA) se describe como un polisacárido aniónico natural compuesto principalmente por galactanos ramificados. A pH superiores a 2.2, sus grupos carboxilo adquieren cargas negativas, lo que le confiere propiedades como polielectrolito débil. La formación de complejos polielectrolíticos entre policationes y polianiones cargados en solución permite que estos polímeros se hinchen en medios acuosos, lo cual favorece un perfil de liberación controlada de los fármacos (2,3).

Asimismo, la tecnología de impresión 3D se ha posicionado como una herramienta innovadora en el campo farmacéutico. En comparación con los métodos tradicionales de fabricación de medicamentos, se ha identificado que la impresión tridimensional ofrece ventajas significativas, particularmente en el diseño de medicamentos personalizados. Esta tecnología permite la fabricación de formulaciones con estructuras complejas y perfiles de liberación adaptados a necesidades específicas. Además, su flexibilidad ha facilitado el desarrollo de una amplia variedad de productos farmacéuticos, tales como comprimidos de liberación inmediata y controlada, microagujas, implantes, películas dispersables y parches transdérmicos. Para garantizar la calidad y funcionalidad de los productos fabricados mediante esta técnica, se recomienda el uso de materiales termoplásticos bien caracterizados, como el acrilonitrilo butadieno estireno (ABS), el ácido poliláctico (PLA), la poliamida y el policarbonato, seleccionados de acuerdo con las características requeridas en el producto final (4).

En particular, los sistemas de liberación vaginal se benefician de esta tecnología al permitir el desarrollo de dispositivos mucoadhesivos que maximizan el tiempo de residencia en el sitio de acción, incrementan la eficacia y reducen los efectos secundarios sistémicos.

La vía vaginal se considera una alternativa prometedora para la administración de fármacos, ya que presenta varias ventajas, tales como una gran superficie, alta irrigación

sanguínea, la posibilidad de evitar el efecto de primer paso hepático y una relativamente alta permeabilidad. Se ha descrito que los fármacos atraviesan la pared vaginal principalmente por difusión pasiva, aunque en menor medida puede intervenir el transporte activo (5).

En función de lo anterior, se propone el desarrollo de dispositivos mucoadhesivos mediante impresión 3D, utilizando biopolímeros como quitosano y goma arábiga cargados con nistatina, para su inserción en la cavidad vaginal como tratamiento para la candidiasis. La combinación de estos biopolímeros con el polímero sintético ácido poliláctico (PLA), empleado como soporte estructural, permite la fabricación de películas mucoadhesivas con un perfil de liberación controlada. Adicionalmente, se resalta que la impresión 3D mejora la resistencia de las películas en el medio vaginal, favoreciendo un perfil de liberación sostenida en las mucosas.

1.1. Antecedentes

La impresión tridimensional (3D) ha emergido como una tecnología. Su aplicación en la fabricación de dispositivos para la liberación controlada de fármacos comenzó a ganar relevancia a partir de 2015, con la aprobación del primer producto farmacéutico impreso en 3D, lo que marcó un hito en el desarrollo de medicamentos personalizados. Desde entonces, el interés científico en este campo ha experimentado un crecimiento exponencial, con un notable aumento en el número de publicaciones y estudios dedicados a explorar las aplicaciones de esta tecnología en la administración de fármacos y su potencial terapéutico (6).

El uso de impresiones tridimensionales ha ganado popularidad entre las vías de administración vaginal. Según Karavasili, C, uno de los usos más relevantes ha sido en la braquiterapia vaginal, un tratamiento para el cáncer cervical, donde la personalización de los dispositivos aplicadores permite adaptarlos a las características anatómicas de cada paciente,

optimizando la eficacia terapéutica. La capacidad de imprimir en 3D estos dispositivos, ajustándolos a las necesidades individuales, representa una mejora significativa en comparación con las alternativas convencionales, mejorando tanto la precisión del tratamiento como la comodidad del paciente (6).

En paralelo, la impresión 3D ha facilitado la fabricación de dispositivos farmacológicos personalizados para la administración de antibióticos y otros fármacos. Un ejemplo de ello es la fabricación de moldes de ácido poliláctico (PLA) cargados con antibióticos, como el levofloxacin, para la producción de pesarios vaginales de silicona médica. Este enfoque no solo permite adaptar el dispositivo a la anatomía específica de cada paciente, sino que también ofrece una alternativa potencialmente bactericida (6).

La técnica de deposición fundida también ha sido utilizada en la fabricación de anillos vaginales personalizados, cargados con hormonas como la progesterona. En este contexto, los filamentos de ácido poliláctico se combinan con una dispersión sólida de progesterona/PEG 4000, lo que permite la impresión de dispositivos con una liberación controlada del fármaco. Estos avances subrayan el potencial de la impresión 3D para el diseño de sistemas de liberación de fármacos personalizados y adaptados a las necesidades específicas de los pacientes (7).

Además, la impresión 3D ha sido explorada en la fabricación de moldes para cáscaras de supositorios, como se demuestra en el estudio de Tagami et al.(8), en el que se utilizó un polímero soluble en agua para crear moldes que favorecen la liberación controlada del fármaco. La capacidad de modificar tanto los espacios internos como externos de los moldes, junto con la variación en la concentración del fármaco, permite un control preciso sobre la liberación del medicamento. Este enfoque resalta las ventajas de la impresión 3D en la producción de

formulaciones farmacéuticas personalizadas, abriendo nuevas posibilidades para el desarrollo de tratamientos más efectivos y adaptados a las características individuales de los pacientes.

En los últimos años, se han desarrollado formulaciones terapéuticas innovadoras para tratar infecciones fúngicas por *Candida albicans* y *Candida glabrata*. Una de las estrategias más prometedoras se basa en el uso de quitosano como material para la elaboración de películas. Estas formulaciones, que contienen fármacos antifúngicos como la nistatina, han demostrado propiedades destacadas en términos de hidratación y liberación rápida del fármaco. Las propiedades mecánicas de estas películas son también relevantes, ya que presentan una elasticidad y características cercanas a las de los tejidos blandos, lo que las hace adecuadas para su aplicación en mucosas. Estos avances en la tecnología de formulaciones basadas en quitosano ofrecen nuevas perspectivas para el tratamiento de infecciones fúngicas, especialmente en aplicaciones terapéuticas locales (9).

1.2. Justificación

Siendo la Candidiasis vaginal una de las enfermedades de mayor recurrencia en las mujeres de edad fértil, es importante desarrollar nuevas formas farmacéuticas que faciliten la farmacoterapia del paciente.

Para garantizar una adecuada retención en el sitio de acción, es necesario desarrollar un sistema capaz de adherirse a la mucosa vaginal y liberar el fármaco de manera sostenida en esa zona. Una estrategia consiste en preparar películas mediante el método de evaporación de solvente, utilizando polímeros naturales combinados con un polímero bioadhesivo incorporando la tecnología de la impresión 3D cómo optimizar la adherencia del sistema a la mucosa vaginal, asegurando una liberación controlada y prolongada del fármaco en el sitio objetivo.

1.3. Hipótesis

Se propone que las películas preparadas por el método evaporación de solvente y utilizando la impresión 3D, presentan características bioadhesivas y son capaces de mantener la liberación de nistatina en la mucosa vaginal.

1.4. Objetivos

1.4.1. Objetivo general

Elaborar películas mucoadhesivas a partir de los biopolímeros poli-electrolíticos quitosano, goma arábica y policarbofil en diferentes proporciones junto a las impresiones 3D y evaluar su capacidad como sistema bioadhesivo en la liberación de nistatina en la mucosa vaginal.

1.4.2. Objetivos específicos

1. Preparar complejos de polímeros naturales en forma de películas a partir de diferentes proporciones.
2. Evaluar y realizar prueba de grado de hinchamiento de películas preparadas.
3. Evaluar el comportamiento de la cinética de hinchamiento de las películas preparadas.
4. Realizar el proceso de cargado de fármaco de nistatina en las películas preparadas.
5. Estudiar liberación del fármaco de nistatina de las películas elaboradas a pH diferentes.

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

2.1. Candidiasis Vaginal

La candidiasis es una infección fúngica causada por *Candida albicans* un hongo oportunista polimórfico. *Candida* es parte de la flora normal en muchas mujeres, identificada en el 10% de las mujeres asintomáticas. Por lo tanto, la vulvovaginitis candidiásica requiere tanto la presencia de *Candida* en la vagina, así como la presencia de las características clínicas: eritema vulvar y vaginal, excoriaciones, secreción espesa blanca adherente e hinchazón (1).

Los factores predisponentes para la candidiasis vulvovaginal (CVV) incluyen el uso de antibióticos de amplio espectro, que alteran la microbiota vaginal; debido a la diabetes los altos niveles de glucosa que favorecen la colonización por *Cándida*; los elevados niveles de hormonas reproductivas, que incrementan el contenido de glucógeno en el epitelio vaginal y potencian la adherencia del hongo. Además, alteraciones en la microbiota local y una posible predisposición genética, vinculada a mutaciones en receptores de la inmunidad innata como TLR2 y polimorfismos en NLRP3, también contribuyen al desarrollo de CVV y su forma recurrente (CVVR) (1).

2.2. Nistatina

La nistatina es un fármaco antimicótico poliénico que posee una actividad fungicida y fungistática de amplio espectro contra una serie de levaduras y hongos, en particular las especies de *Cándida* (10).

Posee un peso molecular de 926,1 g/mol, polvo sólido de color amarillo claro a tostado. Se descompone gradualmente a 160°C, su punto de fusión es de 250°C. La solubilidad de nistatina es dependiente al solvente, 28°C, en metanol 11.2 mg/ml, etanol 1.2 mg/ml,

solubilidad en medios acuosos ácidos, ya que su valor de pKa es de aproximadamente 6,5. Cuando alrededor del 50% de todos los grupos amino están protonados, el quitosano se vuelve soluble (2).

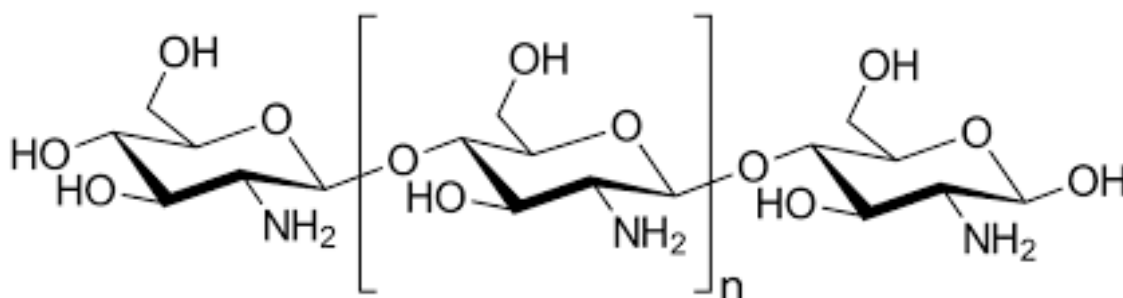


Figura 2. Estructura química del quitosano

2.3.1. Propiedades fisicoquímicas

La solubilidad del polímero depende del grado de acetilación y del peso molecular. El QT es soluble en medios ácidos acuosos mediante la protonación de aminas primarias (2).

La viscosidad del quitosano depende del peso molecular del polímero y del grado de desacetilación y disminuye a medida que se reduce el peso molecular del quitosano. La viscosidad de corte aumenta con el grado de desacetilación del quitosano. Esto se explica debido a la naturaleza del quitosano, ya que este polímero es un polielectrolito catiónico debido a la protonación de la amina en medios ácidos. Por lo tanto, cuanto mayor sea el DD, se espera una mayor expansión de la cadena, ya que se encuentran más unidades de glucosamina en la cadena del polímero, lo que lleva a una mayor densidad de carga en esta muestra (2).

Los grupos reactivos que se encuentran en el quitosano son un grupo amino primario y grupos hidroxilo primarios y secundarios. Estos grupos funcionales permiten un gran número de modificaciones, produciendo polímeros con nuevas propiedades y comportamientos(12).

2.3.2. Propiedades biológicas

El quitosano, sus derivados y los quitoooligosacáridos ejercen actividad antimicrobiana contra diferentes microorganismos, incluidas bacterias, hongos filamentosos y levaduras. La tabla 1 muestra algunos ejemplos de microorganismos sensibles al quitosano.

Material	Microorganismo	Inhibición
Quitosano	<i>Aeromonas hydrophila</i> , <i>Edwardsiella ictaluri</i> <i>Flavobacterium columnare</i> <i>Candida albicans</i>	Completa 0.4% (E I, F C) 0.8% (A. H)
Quitosano	Bacterias grampositivas (como <i>Bacillus cereus</i> , <i>S. aureus</i> , <i>Bacillus megaterium</i> , <i>Lactobacillus</i> <i>plantarum</i> , <i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Lactobacillus brevis</i> , y <i>Lactobacillus</i> <i>bulgaricus</i>)	Efecto fuerte y seguro
Quitosano	Bacterias gramnegativas (como <i>Salmonella</i> <i>typhimurium</i> , <i>E. coli</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Pseudomonas fluorescens</i> , <i>Vibrio</i> <i>parahaemolyticus</i> , <i>Enterobacter aerogenes</i> y <i>Vibrio cholerae</i>)	Efecto fuerte y seguro
Clorohidrato de quitosano	<i>Cándida krusei</i> <i>Cándida albicans</i> <i>Cándida glabrata</i>	Efecto fuerte

Tabla 1. Microorganismos sensibles a quitosano (tomada de Aranaz et al. 2021).

Se tienen varias teorías sobre el mecanismo microbicida del quitosano. Algunos estudios apuntan a la reducción de la permeabilidad de la membrana celular debido al recubrimiento de polímero en la superficie de las células que bloquea el acceso celular a los nutrientes. Este proceso ocurre debido a la interacción de los grupos $-NH_2$ de las cadenas de QT con los grupos $-COO^-$ en las membranas celulares externas de los microorganismos (12)

Otra teoría está dirigida hacia la capacidad de este biopolímero por unirse a metales. Se sugiere que los grupos aminos protonados con capaces de quelar iones divalentes como Ca^{2+} y Mg^{2+} presentes en la pared celular de los microorganismos previniendo la producción de toxinas e inhibe el crecimiento bacteriano. De igual manera, se tiene la hipótesis de que el QT de bajo peso molecular es capaz de penetrar la célula y la membrana celular hacia el citoplasma y en consecuencia afectar la síntesis de ADN/ARN o de proteínas (13).

Los factores intrínsecos que afectan la actividad antimicrobiana del quitosano se deben a las características del polímero, como: peso molecular, grado de acetilación, viscosidad del polímero o concentración del polímero y el disolvente utilizado. Los grupos aminos del quitosano se protonan en valores de pH inferiores a su pka (6.5), por lo que, a un pH más ácido, mayor será el espectro anti microbica (2).

Se ha demostrado que el QT tiene propiedades antioxidantes. Al contener un amino y varios grupos hidroxilo, estos pueden reaccionar con los radicales libres que exhiben capacidad eliminadora. La actividad antioxidante es más notable en muestras de bajo peso molecular que en muestras de alto peso molecular, ya que las cadenas más cortas forman menos enlaces de hidrógeno intramoleculares y, por lo tanto, los grupos reactivos son más accesibles, lo que contribuye a la actividad eliminadora de radicales. Por esto mismo, el QT ha comprobado tener actividad antiinflamatoria, ya que el proceso inflamatorio está fuertemente relacionado con la generación de radicales libres. Esta actividad parece ser más notable cuando el peso molecular del quitosano se reduce y los quitoooligosacáridos exhiben una mayor actividad En cuanto al efecto del grado de acetilación, la actividad antioxidante parece disminuir cuando este parámetro aumenta (12).

2.4. Goma Arábica

La goma arábica, también conocida como goma de acacia, es una sustancia natural derivada principalmente de los exudados que se forman en los troncos y ramas de *Acacia senegal* y *Acacia seyal*. El exudado se produce cuando los árboles están sometidos a estrés, ya sea por sequía, suelos pobres o daños físicos, lo que induce la formación de esta goma que se solidifica en forma de lágrimas de color ámbar tras varias semanas (14).

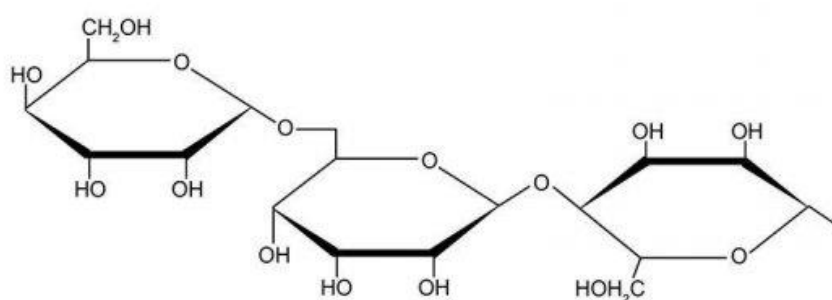


Figura 3. Estructura química de la goma arábica

2.4.1. Propiedades fisicoquímicas

La GA tiene una estructura química compleja, compuesta principalmente por polisacáridos y proteínas. Los estudios han demostrado que su estructura incluye una columna vertebral de galactopiranososa β -1,3-enlazada, con cadenas laterales formadas por diferentes monosacáridos, como galactopiranososa, arabinofuranosa, ramnopiranososa y glucopiranososa. Además, contiene sales minerales de calcio, magnesio y potasio que contribuyen a sus propiedades (15).

La GA se puede dividir en tres fracciones principales: arabinogalactano, complejo arabinogalactano-proteína y glicoproteínas, cada una con características únicas en términos de peso molecular y contenido proteico. El arabinogalactano, que constituye la mayor parte de la goma, se distingue por su bajo peso molecular, mientras que el complejo arabinogalactano-proteína tiene una mayor masa molecular y es responsable de las propiedades emulsionantes. En general, la GA tiene un alto contenido en carbohidratos (alrededor del 97%) y un bajo contenido en proteínas (menos del 3%) (16).

Este biopolímero se caracteriza por su alta solubilidad en agua y baja viscosidad, lo que la convierte en un excelente emulsionante y estabilizante. Su naturaleza anfifílica, derivada de su estructura de polisacáridos y proteínas, le permite formar emulsiones estables al reducir la tensión interfacial entre agua y aceite. es altamente higroscópica, lo que la hace ideal para estabilizar productos sensibles a la humedad, y presenta una buena estabilidad térmica (3).

La GA ha sido reconocida como un polielectrolito, particularmente en el campo de la encapsulación de compuestos bioactivos y la formulación de nanopartículas. Su comportamiento como polielectrolito se debe a la presencia de grupos carboxilo en su estructura, que se disocian en soluciones acuosas a pH cercano a la neutralidad, generando una carga negativa significativa en la molécula. Esto permite que interactúe electrostáticamente con polímeros cargados positivamente, como el QT, para formar complejos polielectrolíticos (3).

2.4.2. Propiedades biológicas

La GA posee propiedades antioxidantes que han sido ampliamente estudiadas debido a su capacidad para combatir el estrés oxidativo. Esta propiedad resulta especialmente relevante en la prevención de enfermedades crónicas como la diabetes, enfermedades cardiovasculares y trastornos neurodegenerativos. La actividad antioxidante de la goma se debe, en parte, a la

presencia de ciertos aminoácidos, como lisina, tirosina e histidina, los cuales pueden neutralizar especies reactivas de oxígeno y reducir el daño oxidativo en las células (3,15).

Otro aspecto importante de la goma arábiga es su potencial actividad antimicrobiana. Se ha sugerido que su capacidad para inhibir el crecimiento de bacterias y hongos puede estar relacionada con la presencia de compuestos fenólicos, taninos y otros componentes bioactivos. Este efecto antimicrobiano podría estar relacionado con su capacidad para crear un ambiente hostil para los microorganismos, al modificar las condiciones osmóticas o químicas del entorno. Además, la goma arábiga actúa como un prebiótico, favoreciendo el crecimiento de bacterias beneficiosas, como *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, que compiten con los microorganismos patógenos por los nutrientes y el espacio ecológico en el intestino, contribuyendo así indirectamente a la reducción de infecciones (13).

2.5. Películas mucoadhesivas

Las películas farmacéuticas son formulaciones poliméricas utilizadas como plataforma de liberación para la administración de fármacos de moléculas pequeñas y macroscópicas para acción local o sistémica (17).

Los polímeros aniónicos son de los más utilizados en estas formulaciones, debido a la gran mucoadhesión que poseen y menor toxicidad. Esto principalmente por la presencia de grupos carboxilo y sulfato, que al entrar en contacto con un medio cuyo valor de pH es mayor que el del polímero, dan como resultado una carga superficial negativa a la película mucoadhesiva. El uso de polímeros semisintéticos, como el carbopol, ha ganado popularidad, debido a sus grandes propiedades mucoadhesivas por la formación de fuertes interacciones y enlaces de hidrógeno con la mucina (17).

De igual manera, los polímeros catiónicos exhiben una fuerte interacción iónica con las estructuras aniónicas del moco, como los grupos de ácido siálico. Siendo el quitosano el principal polímero utilizado, este forma interacciones entre los grupos amino primario y el ácido siálico y sulfónico de moco, además de formar puentes de hidrógeno entre los grupos hidroxilo-amino, favoreciendo de esta manera la mucoadhesión (17).

El glicerol, un plastificante ampliamente utilizado en la elaboración de películas mucoadhesivas, actúa como un agente que incrementa la movilidad segmental de las cadenas poliméricas al debilitar las interacciones intermoleculares. Como consecuencia, se observa una reducción en la temperatura de transición vítrea y en la resistencia a la tracción, así como un aumento en la elongación, lo cual facilita el procesamiento y confiere a las películas una mayor flexibilidad. Además, el glicerol contribuye a mejorar la estabilidad dimensional de las películas en un amplio rango de temperaturas, optimizando sus propiedades mecánicas y durabilidad. Estudios recientes sugieren que, además de su función como plastificante, el glicerol puede conferir propiedades bioadhesivas a las películas (17,18).

2.5.1. Formulación de películas

Existen diversos métodos para la preparación de películas mucoadhesivas, la más popular es por evaporación de disolvente debido a su sencillo proceso. Este método se basa en la preparación de una mezcla homogénea del principio activo con los polímeros o excipientes en un medio adecuado de dispersión, posteriormente se transfiere un volumen apropiado de la solución al molde donde se secará la formulación, dando lugar a la evaporación del disolvente permitiendo que las moléculas poliméricas se entrelazan entre sí formando una película, como se ilustra en la Figura 4 (17,19).

Es fundamental garantizar la homogeneidad de la película, cuando se preparan películas que contienen dos o más polímeros de solubilidades diferentes, se utiliza una mezcla de solventes para lograr la disolución de ambos polímeros. Si la solución tiene una alta viscosidad y se acumulan muchas burbujas en ella, la solución se debe sonicar para eliminarlas y garantizar la homogeneidad de la película (20).

Los moldes utilizados comúnmente tienden a ser de aluminio, vidrio, teflón, polietileno, plástico o silicona. Estos moldes pueden utilizarse para obtener las películas del tamaño final directamente, o el molde pueda dar como producto una película grande que se corta en varias películas con el tamaño final (20).

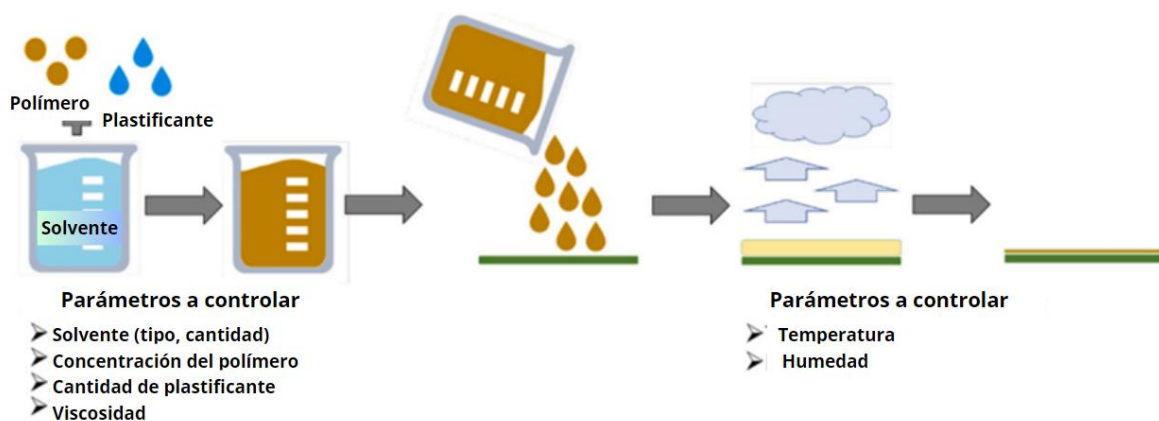


Figura 4. Diagrama de elaboración de películas mucoadhesivas por el método de evaporación del disolvente (Adaptación de Notario-Pérez et al.2020).

La elección del disolvente es crucial para controlar la velocidad de evaporación. El secado lento favorece la formación de películas más homogéneas, sin embargo, un excesivo periodo de secado da entrada a proliferación bacteriana en la solución. El uso de solventes orgánicos no es la mejor opción para películas de aplicación en mucosas, debido al gran riesgo

de residuos pudieron llegar a absorberse. Temperaturas altas favorecen un secado rápido, sin embargo, hay que tomar en cuenta la estabilidad de los componentes de la formulación (20).

2.6. Mucosa vaginal

La mucosa vaginal está formada por cuatro capas diferentes, una capa superficial de epitelio escamoso estratificado no queratinizado, que se sitúa sobre una lámina propia con abundante vascularización, la capa fibromuscular con dos capas de músculo liso y la capa adventicia externa como se describe en la Figura 5. El grosor de esta capa epitelial varía en respuesta a la estimulación hormonal, que normalmente es de 200 a 300 μm . Las características del moco cervical varían según las distintas fases del ciclo menstrual, volviéndose más gruesa bajo la influencia de los estrógenos y más delgada bajo la acción de los progestágenos. Además, esta capa actúa como la principal barrera para la permeabilidad y absorción (19–21).

La superficie mucosa está recubierta por una pequeña cantidad de líquido mucoso ácido, compuesto principalmente por una mezcla de moco cervical (que aporta mucina) y fluido trasudado de los tejidos. También contiene pequeñas cantidades de secreciones de las glándulas vestibulares, células del huésped y restos de orina. El pH bajo de este fluido (3,5-4,5) se debe a la presencia de ácido láctico, que se produce por la descomposición del glucógeno generado por el huésped, a través de la acción de los lactobacilos que forman parte del microbiota natural. Factores como la menstruación y el semen pueden elevar temporalmente el pH (22).

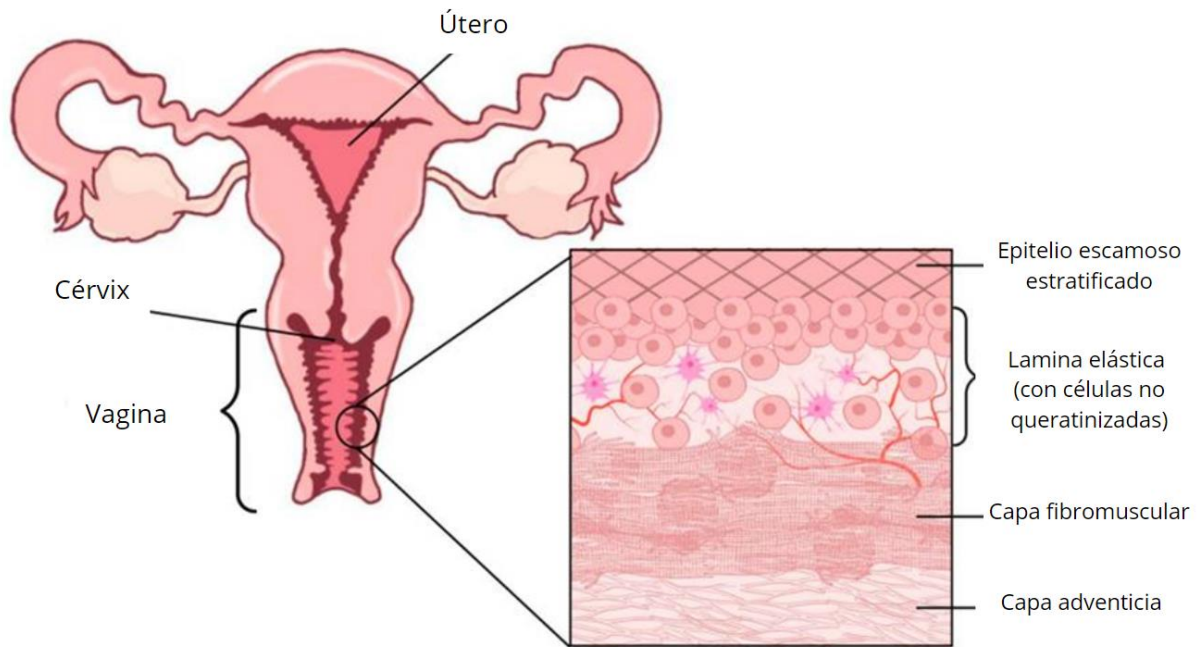


Figura 5. Ilustración de la estructura vaginal y representación de la mucosa vaginal (Adaptación de Notario-Pérez et al.2020)

2.6.1. Películas mucoadhesivas vaginales

La administración vaginal se ha considerado como una vía para la administración de fármacos debido a la alta extensión de tejido vascularizado en la mucosa que permite la absorción de principios activos, evitando el metabolismo hepático de primer paso (23).

El acceso de los fármacos a la circulación sanguínea tras la permeación de la mucosa se realiza a través de las venas vaginales del plexo útero-vaginal, que acaba drenando hacia la vena cava inferior a través de la vena pudenda (22).

Los principales portadores vaginales convencionales como las cremas u óvulos tienen un tiempo de retención limitado en la cavidad vaginal después del momento de aplicación, proveniente de una fuga prematura de la forma farmacéutica y por tanto resultados terapéuticos

ineficientes. Las formas de dosificación mucoadhesivas pueden ser diseñadas para permitir una retención prolongada en el lugar de aplicación, facilitando una liberación controlada del fármaco y optimizando así el resultado terapéutico (23,24).

2.7. Mucoadhesión

La bioadhesión se describe como la capacidad de un sistema transportador de fármacos para adherirse a una ubicación biológica específica. Dicha superficie biológica puede estar constituida por tejido epitelial o la mucosa de un tejido. Cuando la adhesión se produce sobre la capa mucosa, este fenómeno es conocido como mucoadhesión, proceso caracterizado por la interacción entre la superficie de mucina y el material polimérico (17,24).

La mucoadhesión es un fenómeno multifactorial que involucra dos etapas principales: el establecimiento del contacto inicial y la posterior consolidación de la adhesión. En la fase de contacto, la formulación entra en contacto con la mucosa y se produce la humectación, un proceso crítico en el que la capacidad del material para hidratarse y distribuir las fuerzas interfaciales influye significativamente en la adhesión inicial. En la etapa de consolidación, la adhesión se ve prolongada por interacciones fisicoquímicas, así como el entrelazamiento químico, entre la formulación, el moco y la mucosa para prolongar la adhesión (17).

Las mucinas son glicoproteínas de gran tamaño, caracterizadas por una región proteica central a la que se unen numerosas cadenas de oligosacáridos. Estos carbohidratos, compuestos principalmente por hexosas, hexosaminas y ácido siálico, confieren a las mucinas su alta hidrofilia y desempeñan un papel crucial en sus propiedades biológicas. La región proteica, rica en aminoácidos con grupos hidroxilo, actúa como un almacén para la unión covalente de las cadenas de oligosacáridos (25).

La bibliografía propone cinco teorías del proceso de mucohesión que describen las múltiples etapas de interacción como diferentes fases de un mismo proceso caracterizado por múltiples pasos de interacción entre la mucosa y la forma farmacéutica (17,24,25).

2.7.1. Teoría de la absorción

La teoría de la adhesión postula que la unión entre un polímero y una mucosa se establece a través de la formación de enlaces químicos en la interfaz. Estos enlaces pueden ser de tipo primario (covalentes, metálicos o iónicos) o secundario (puentes de hidrógeno, hidrofóbicos y Van der Waals). Si bien los enlaces primarios son más fuertes, los secundarios, particularmente las fuerzas de Van der Waals, son preferibles en aplicaciones de mucoadhesión debido a su carácter no permanente. A pesar de ser más débiles, las fuerzas de Van der Waals, cuando actúan en conjunto, contribuyen significativamente a la adhesión. Por otro lado, los enlaces covalentes también promueven significativamente la absorción, este proceso se conoce como “quimisorción” (26).

2.7.2. Teoría electrónica

Esta teoría propone que la adhesión entre el moco y el polímero mucoadhesivo se debe a la transferencia de electrones, provocada por sus distintas propiedades eléctricas. El contacto entre las glicoproteínas mucosas y el material mucoadhesivo induce una transferencia electrónica, dando lugar a la formación de una interfaz con una doble capa eléctrica. Según esta teoría, la fuerza de adhesión mucoadhesiva está directamente relacionada con la intensidad de las fuerzas de atracción electrostática generadas en la doble capa eléctrica que se forma entre el polímero (cargado positivamente) y la membrana mucosa (de carga negativa) (24,27).

2.7.3. Teoría de la humectación

Esta teoría describe que la mucoadhesión se produce cuando un material con propiedades gelificantes acuosas entra en contacto con un gel acuoso, dando lugar a un movimiento de agua para lograr el equilibrio osmótico entre ambas partes, esto provoca la deshidratación de la capa mucosa y la consolidación entre polímero-mucosa. Las irregularidades presentes en la mucosa favorecen la penetración de los polímeros mucoadhesivos. La capacidad adhesiva del material depende de sus características de humectabilidad (26).

2.7.4. Teoría de la fractura

La teoría de la fractura establece que la fuerza necesaria para separar dos superficies adheridas, como un material mucoadhesivo y una membrana mucosa, depende de la resistencia del enlace adhesivo entre ambas. Factores como la longitud de las cadenas poliméricas y el grado de reticulación influyen en la energía requerida para romper el enlace. Esta teoría se aplica principalmente a materiales mucoadhesivos rígidos o semirrígidos, y se basa en suposiciones como que el desprendimiento ocurre en la interfaz de las superficies. Sin embargo, presenta limitaciones al no considerar la capacidad de las cadenas poliméricas para penetrar en el sustrato mucoso (25,27).

2.7.5. Teoría de la difusión

La teoría de la difusión sugiere que la adhesión entre una forma de dosificación y una superficie mucosa ocurre mediante la interpenetración de las cadenas poliméricas de las macromoléculas en la red de glicoproteínas del moco. Este proceso de difusión bidireccional, que depende de factores como el gradiente de concentración y el tiempo de contacto, da lugar a una capa de interpenetración cuya extensión determina la fuerza adhesiva. La efectividad de la adhesión está influenciada por la longitud de las cadenas poliméricas, la movilidad de las macromoléculas y el grado de reticulación. Para una adhesión óptima, las cadenas poliméricas deben ser lo suficientemente largas y flexibles para penetrar el sustrato mucoso (25,27).

CAPÍTULO III

PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

3.1. Materiales

En la preparación de las películas mucoadhesivas se utilizaron: quitosano de bajo peso molecular desacetilado (Sigma-Aldrich), goma arábiga (Spectrum), Noveon AA-1 Policarbofilo (Lubrizol), glicerol (Sigma-Aldrich), ácido acético (Fermont), Nistatina +85% (Acros Organics BVBA).

Para la preparación de soluciones amortiguadoras pH 4 y 5, se utilizaron reactivos de grado analítico (Sigma-Aldrich): bifosfato de sodio, fosfato sódico, cloruro de sodio, ácido acético y acetato de sodio.

En la elaboración de los dispositivos impresos en 3D, se utilizaron filamentos de ácido poliláctico (PLA) natural flexible de 1.75 mm (Flashforge). Se fabrican utilizando la impresora SainSmart x Creality Ender-3 3D Printer, estos dispositivos sirven como soporte para las películas mucoadhesivas, realizando la impresión con una capa de PLA flexible. Han sido diseñados específicamente para retener 1.5 ml de las formulaciones líquidas y estas piezas presentaban un área de 19.14 cm² y un grosor de 0.5 mm, como se muestra en la figura no.



Figura 6. Dispositivo de PLA flexible impreso en 3D

3.2. Procedimientos experimentales

3.2.1. Preparación de películas mucoadhesivas sin fármaco

En la preparación de las películas mucoadhesivas, se emplean diversas proporciones de biopolímeros, como se detalla en la Tabla 2. El proceso de formulación se realiza siguiendo el procedimiento descrito a continuación:

1. Se calcula la cantidad de quitosano necesaria para preparar las películas según las proporciones establecidas, disolviéndolo en una solución de ácido acético al 1%. La mezcla resultante se somete a un baño de agua a 50 °C durante 5 minutos para garantizar una solución homogénea. Para las películas con proporciones de 2:1, 1:1 y 1:2, se preparan soluciones al 3.33% (p/v), 5% (p/v) y 6.66% (p/v), respectivamente, como se detalla en la Tabla 2.
2. Se pesa la cantidad requerida de goma arábica para preparar soluciones con concentraciones de 5% (p/v), 6.66% (p/v) y 3.33% (p/v), utilizando agua destilada como disolvente. Las mezclas se someten a agitación magnética en un baño de agua a 50 °C durante 5 minutos, hasta obtener una solución homogénea. Las proporciones correspondientes se presentan en la Tabla 2.
3. Posteriormente preparadas las soluciones anteriores, se miden volúmenes iguales de ambas soluciones para preparar las formulaciones. La solución de GA es vertida sobre la solución de QT hasta integrar lo más posible, después se coloca la mezcla en un baño de agua a 40°C.
4. Se continúa en agitación magnética por 5 minutos y simultáneamente se añade policarbofil (PC) y glicerol correspondiente como se muestra en la Tabla 2. Finalmente, la solución final se homogeniza (KIMEMATRICIA Polytron) a 5 000 rpm durante 15 minutos.

Formulación	Proporción	Polímero			
		QT	GA	PC	Glicerol
<i>F1</i>	1:1	5%	5%	0.11%	8.79 %
<i>F2</i>	1:2	3.33%	6.66%		
<i>F3</i>	2:1	6.66%	3.33%		

Tabla 2. Porcentaje peso/volumen de los reactivos utilizados para desarrollar cada formulación de las películas mucoadhesivas sin fármaco

Una vez obtenida la solución final, se miden 1.5 ml de las formulaciones, previamente preparadas, con una micropipeta y se coloca el contenido en los dispositivos impresos en 3D de PLA flexible diseñados para la inserción vaginal. Mediante la técnica de evaporación del disolvente, las formulaciones se introducen dentro de un horno de vacío (VWR modelo 1400E) a 40°C durante 24 hrs.

3.2.2. Preparación de películas mucoadhesivas con nistatina

Con respecto a la elaboración de las películas mucoadhesivas cargadas con Nistatina, estas son preparadas a partir de las soluciones de QT y GA, siguiendo el procedimiento previamente descrito y de acuerdo con las proporciones que se muestran en la Tabla 3.

Formulación	Proporción	QT	GA	PC	Glicerol	Nys
<i>FA</i>	1:1	5%	5%	0.11%	8.79%	1.4%
<i>FB</i>	1:2	3.33%	6.66%			
<i>FC</i>	2:1	6.66%	3.33%			

Tabla 3. Porcentaje peso/volumen de los reactivos utilizados para desarrollar cada formulación de las películas mucoadhesivas con fármaco

Por otro lado, se determinan las cantidades requeridas de Nistatina y glicerol para cada una de las formulaciones. El fármaco se incorpora lentamente al glicerol, utilizando una espátula y aplicando agitación manual hasta obtener una mezcla homogénea. Seguidamente, esta mezcla se añade a la solución de QT/GA mientras se mantiene bajo agitación magnética durante 10 minutos, para asegurar su completa integración.

La bibliografía refiere que los óvulos vaginales contienen 100,000 U.I. de nistatina esto es equivalente aproximadamente a 20 mg del fármaco (28). Por ello, los dispositivos están diseñados para retener 1.5 ml de la formulación, que contienen, teóricamente, 21 mg de nistatina. Utilizando la técnica de evaporación de disolvente, las formulaciones son colocadas dentro de un horno de vacío (VWR modelo 1400E) a 40°C durante 24 hrs. Posteriormente las películas mucoadhesivas se protegen de la luz en papel aluminio.

3.2.3. Grado de hinchamiento

En la prueba de grado de hinchamiento son preparadas películas mucoadhesivas sin fármaco y cargadas con nistatina a las proporciones 1:1, 1:2 y 2:1 tal como lo describen los apartados Tabla 2 y Tabla 3, respectivamente. Sin embargo, en esta prueba las muestras no se agregaron en los dispositivos de PLA flexible diseñados para la inserción vaginal. En su lugar, se vierten 30 ml de la solución final sobre una placa de vidrio de 10cm x 10cm. Siguiendo la metodología establecida para la preparación de las películas, las muestras son colocadas en un horno de vacío (VWR modelo 1400E) a 40°C durante 24 hrs.

Posteriormente, estas son cortadas en cuadrados de 1cm² con ayuda de una hoja de bisturí. A continuación, se pesan para registrar su peso inicial y se colocan estas formulaciones en volúmenes de 50 ml de soluciones amortiguadoras que van de pH 3-7. Se dejan por 24 horas

a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo, las formulaciones se retiran de las soluciones amortiguadoras, con ayuda de papel absorbente, se elimina el exceso de líquido. Posteriormente, se pesan para obtener su peso final y determinar el grado de hinchamiento utilizando la siguiente fórmula:

$$Q = (W_1 - W_0)/W_0 \quad \text{Ecuación 1}$$

Donde:

Q= Hinchamiento

W₀: Peso inicial de la muestra seca

W₁: Peso final de la muestra

3.2.4. Cinética de hinchamiento

La cinética de hinchamiento llevado a cabo en películas placebo y cargadas con nistatina. Añadiendo que antes de ser cargado con la formulación, el dispositivo de PLA flexible debe ser pesado para registrar su peso y continuar con la metodología establecida.

Las formulaciones son pesadas en una balanza analítica para registrar su peso inicial, las películas sin fármaco y cargadas con nistatina en proporciones de QT:GA: 1:1, 1:2 y 2:1. Estas son colocadas en 100 ml de solución amortiguadora pH 4 y pH 5, seguidamente depositado en un baño de temperatura con oscilación (equipo VWR® modelo 1217) a 50 rpm y 37°C, con el objetivo de simular los fluidos vaginales, las condiciones de temperatura y movimiento humano.

Las formulaciones son pesadas a los intervalos de tiempo establecidos: 0.5, 1, 2, 4, 6, 8, 12 y 24 hrs. Finalmente, el hinchamiento se determina por diferencia de pesos, en base a la Ecuación 1.

3.2.5. Cinética de liberación del fármaco

Se analizaron formulaciones cargadas con nistatina preparadas previamente. Antes de vaciar las formulaciones sobre los dispositivos de PLA flexible, estos son pesados para registrar su peso cero. Posteriormente, se realiza una segunda medición tras el proceso de carga de la película para calcular el contenido teórico de nistatina incorporado. Este cálculo se basa en la proporción de pesos, considerando que el peso total de la película tras la evaporación del disolvente contiene un 9.34% de nistatina.

Las películas cargadas con nistatina se colocan en un baño de temperatura a 37°C con movimientos oscilatorio (equipo VWR® modelo 1217) a 50 rpm en soluciones amortiguadoras pH 4 y pH 5 simulando los fluidos vaginales, la temperatura y el movimiento del cuerpo humano. Se asignan los siguientes tiempos de muestreo: 0.15, 0.30, 0.45, 1, 2, 4, 8, 12 y 24 h, tomando alícuotas de 5 ml a cada intervalo de tiempo y reponiendo el volumen del medio retirado con la solución amortiguadora correspondiente.

Las muestras se analizan por espectroscopía UV-Visible (Beckman Coulter Du 520) a una longitud de onda de 406 nm utilizando como blanco el medio correspondiente. Para calcular la fracción liberada de nistatina a diferentes tiempos de muestreo, se prepararon curvas de calibración para las diferentes condiciones pH 4 y pH 5, estos resultados se muestran en el apéndice 8.1.

Una vez determinadas las concentraciones de nistatina (mg/ml) en el medio a los diferentes tiempos de muestreo, y utilizando el contenido teórico de nistatina en cada película, se calcula la fracción liberada del fármaco.

CAPITULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIONES

4.1. Preparación de películas mucoadhesivas sin fármaco

Las películas mucoadhesivas se obtienen a partir de las formulaciones descritas en el apartado 3.2. Como resultado, se producen películas compuestas por distintas proporciones de los biopolímeros quitosano (QT) y goma arábica (GA), identificadas como F1, F2 y F3. Una vez completado el proceso de evaporación del disolvente, las películas secas presentan las proporciones específicas detalladas en la Tabla 4.

Formulación	Proporción	Polímero			
		QT	GA	PC	Glicerol
<i>F1</i>	1:1	17.16%	17.16%	0.82%	64.89 %
<i>F2</i>	1:2	11.47%	22.70%		
<i>F3</i>	2:1	22.70%	11.47%		

Tabla 4. Proporciones peso/peso de las películas secas sin fármaco tras evaporación del disolvente

Visualmente las películas presentan una apariencia de color blanco translucido, como se muestra en la Figura 7, además de ser flexibles, adhesivas al tacto, resultando difícil distinguirse entre ellas.



Figura 7. Películas mucoadhesivas placebo tras evaporación del disolvente F1, F2 y F3

4.2. Preparación de películas mucoadhesivas cargadas con nistatina

De acuerdo con los procedimientos descritos en el punto 3.4 se obtuvieron películas mucoadhesivas en distintas proporciones de QT y GA cargadas con nistatina, las cuales son identificadas como: FA, FB y FC. La Tabla 5 muestra las proporciones de sus componentes pasado el proceso de evaporación del disolvente.

Formulación	Proporción	Polímero				Fármaco
		QT	GA	PC	Glicerol	Nys
<i>FA</i>	1:1	15.56%	15.56%	0.75%	58.93 %	9.35%
<i>FB</i>	1:2	10.39%	20.58%			
<i>FC</i>	2:1	20.58%	10.39%			

Tabla 5. Proporciones peso/peso de las películas mucoadhesivas con nistatina secas tras evaporación del disolvente

En comparación con las películas placebo estas formulaciones muestran un color amarillo ámbar. Además de ser flexibles y adhesivas al tacto. En la figura 8 se muestran las formulaciones FA, FB y FC visualmente las formulaciones desarrolladas no se pueden distinguir entre sí.

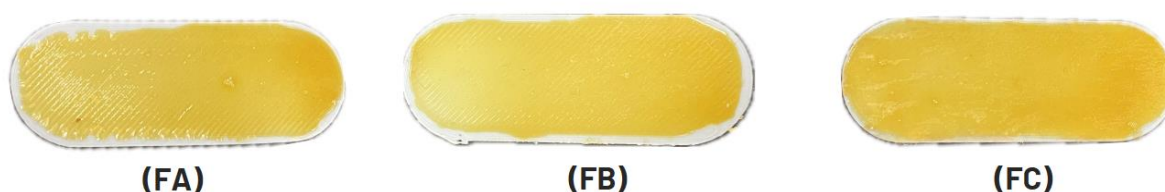


Figura 8. Películas mucoadhesivas cargadas con nistatina tras evaporación del disolvente

4.3. Grado de hinchamiento

Se evaluó el comportamiento de hinchamiento de las formulaciones en un rango de pH de 3 a 7, con el objetivo de comparar cómo varía la absorción de agua bajo diferentes soluciones amortiguadoras.

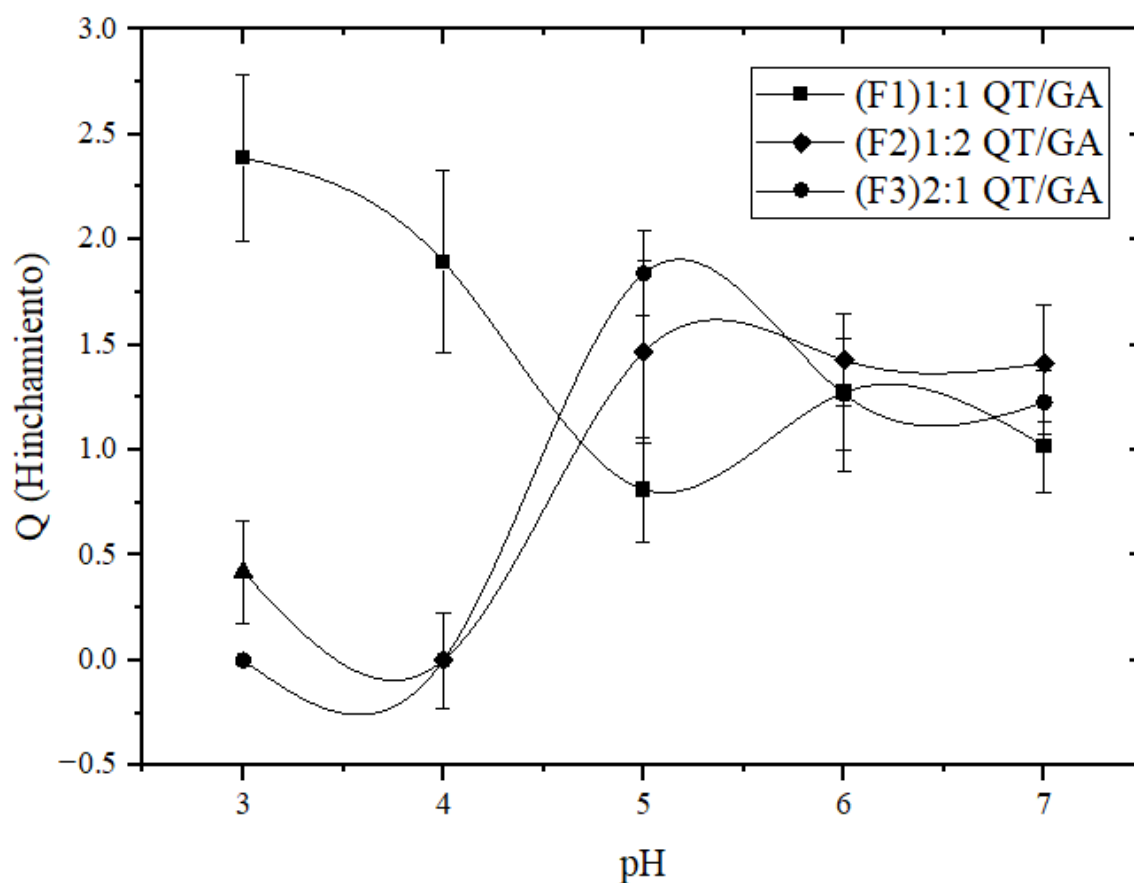


Figura 9. Grado de hinchamiento de las películas mucoadhesivas sin fármaco (F1, F2, F3) en soluciones amortiguadoras de pH 3-7

La Figura 9 muestra el comportamiento de las formulaciones sin fármaco en diferentes soluciones amortiguadoras. La formulación F1 destaca por su mayor grado de hinchamiento en los rangos de pH 3 y 4, donde su tamaño aumenta 2.4 y 1.8 veces, respectivamente. Sin embargo, conforme el pH aumenta de 5 a 7, el hinchamiento de esta formulación comienza a disminuir progresivamente. Las películas de la formulación F3 no presentan hinchamiento a

pH 3 y 4, en comparación con las otras formulaciones. Sin embargo, alcanzan la máxima de expansión a pH 5, duplicando su tamaño inicial. Aunque en el pH 6 y 7 el hinchamiento se estabiliza, mostrando un aumento de 1.5 veces su tamaño inicial. Por su parte, las películas F2 muestran comportamiento similar al de las F3 a pH 3 y 4. Sin embargo, alcanzan su máxima de expansión a pH 5, con un aumento de aproximado de 1.8 veces su tamaño. Posteriormente pH 6 y pH 7 el tamaño se estabiliza en torno a 1.25 veces su tamaño original.

El resultado del análisis de grado de hinchamiento de las películas mucoadhesivas cargadas con nistatina, se muestra en la Figura 10, observando un comportamiento diferente entre las formulaciones evaluadas en función del pH del medio.

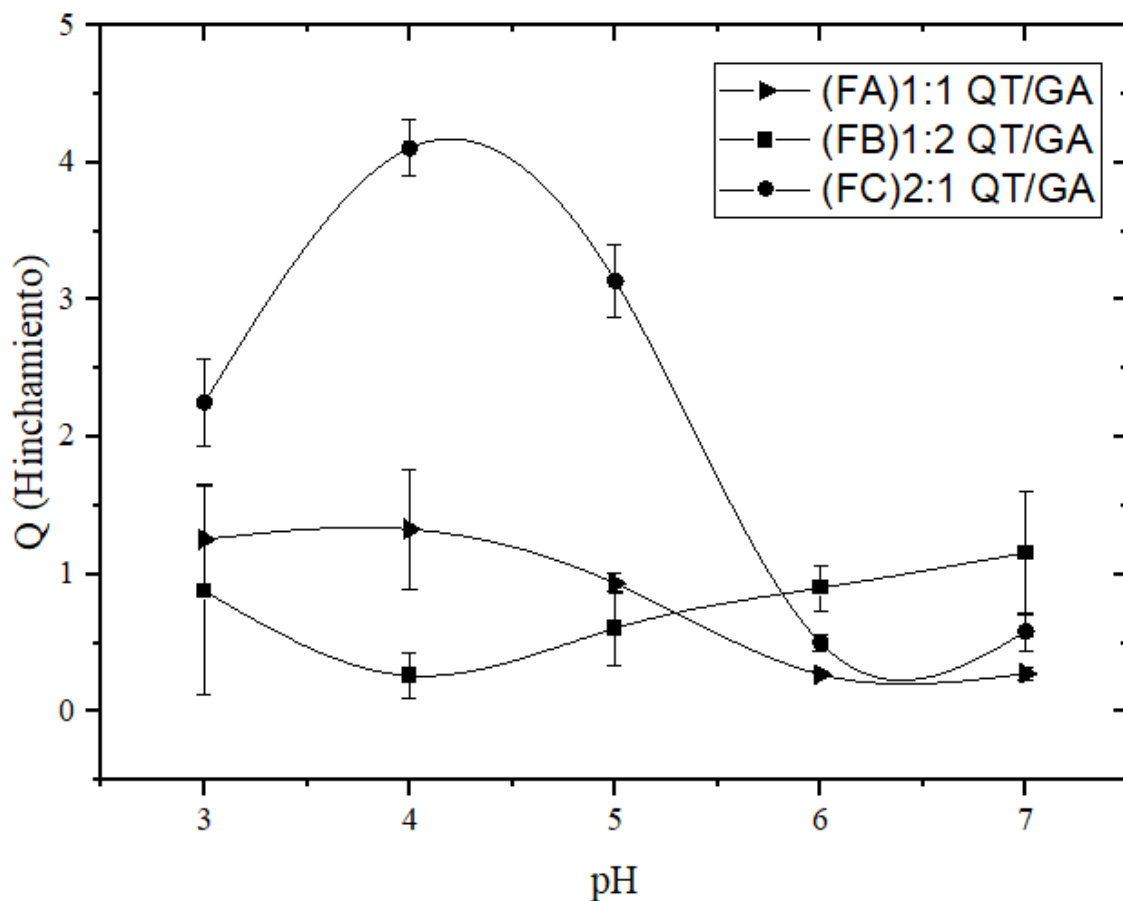


Figura 10. Grado de hinchamiento de las películas mucoadhesivas sin fármaco (F1, F2, F3) en soluciones amortiguadoras de pH 3-7

Las películas FC exhiben el mayor grado de hinchamiento, alcanzando su máxima expansión en condiciones de pH 4, donde aumentan hasta 4 veces su tamaño inicial. A pH 5, el incremento es de 3.5 veces respecto al tamaño inicial. Estos resultados son altamente satisfactorios, ya que el pH de interés para el análisis corresponde a valores de pH 4 y pH 5, ya que son condiciones que se asemejan a las características de los fluidos vaginales. Este fenómeno se puede explicar debido a la presencia de los grupos aminos libres del QT, que al estar en un medio ácido se encuentran protonados, aumentando la formación de puentes de hidrógeno con las moléculas de agua y, en consecuencia, el hinchamiento de las películas(9).

Por otro lado, las películas FA y FB muestran un menor grado de hinchamiento en comparación a las películas FC, presentando un perfil más estable y moderado en todos los medios de pH. Las películas FB, que contiene mayor proporción de GA, presentan el menor grado de hinchamiento en condiciones ácidas, aumentando gradualmente su hinchamiento conforme las condiciones se acercan en medios de pH neutro. Por el contrario, el hinchamiento de las películas FA y FC disminuye en medios con pH cercano a la neutralidad.

Comparando el comportamiento de las películas placebo con las películas cargadas con nistatina, se puede observar como las películas con fármaco tienen un hinchamiento más significativo. Esto podría explicarse por la interacción entre la nistatina y la matriz polimérica, donde la presencia del fármaco afecta la disposición y flexibilidad de las cadenas poliméricas. Se ha reportado que la incorporación de moléculas activas, como la nistatina, puede generar un reordenamiento en la estructura de los polímeros, facilitando la absorción de agua al modificar la red polimérica. Además, la nistatina puede actuar como un agente plastificante en la matriz, disminuyendo la rigidez de la película y permitiendo una mayor expansión en presencia de

agua. De igual manera, la carga de nistatina podría estar afectando la distribución de cargas dentro de la matriz polimérica, aumentando la repulsión electrostática en ciertos puntos y facilitando así la entrada de agua (29,30).

4.4. Cinética de hinchamiento

Los resultados de la prueba de la cinética de hinchamiento de las formulaciones F1, F2 y F3, se rompen en los primeros 30 minutos del experimento en los pH 4 y pH 5. Sin embargo, dejan residuos pegajosos sobre el dispositivo de PLA flexible y dentro de las soluciones, las películas placebo continúan desintegrándose, sin dejar residuos observables después de 2 horas del análisis.

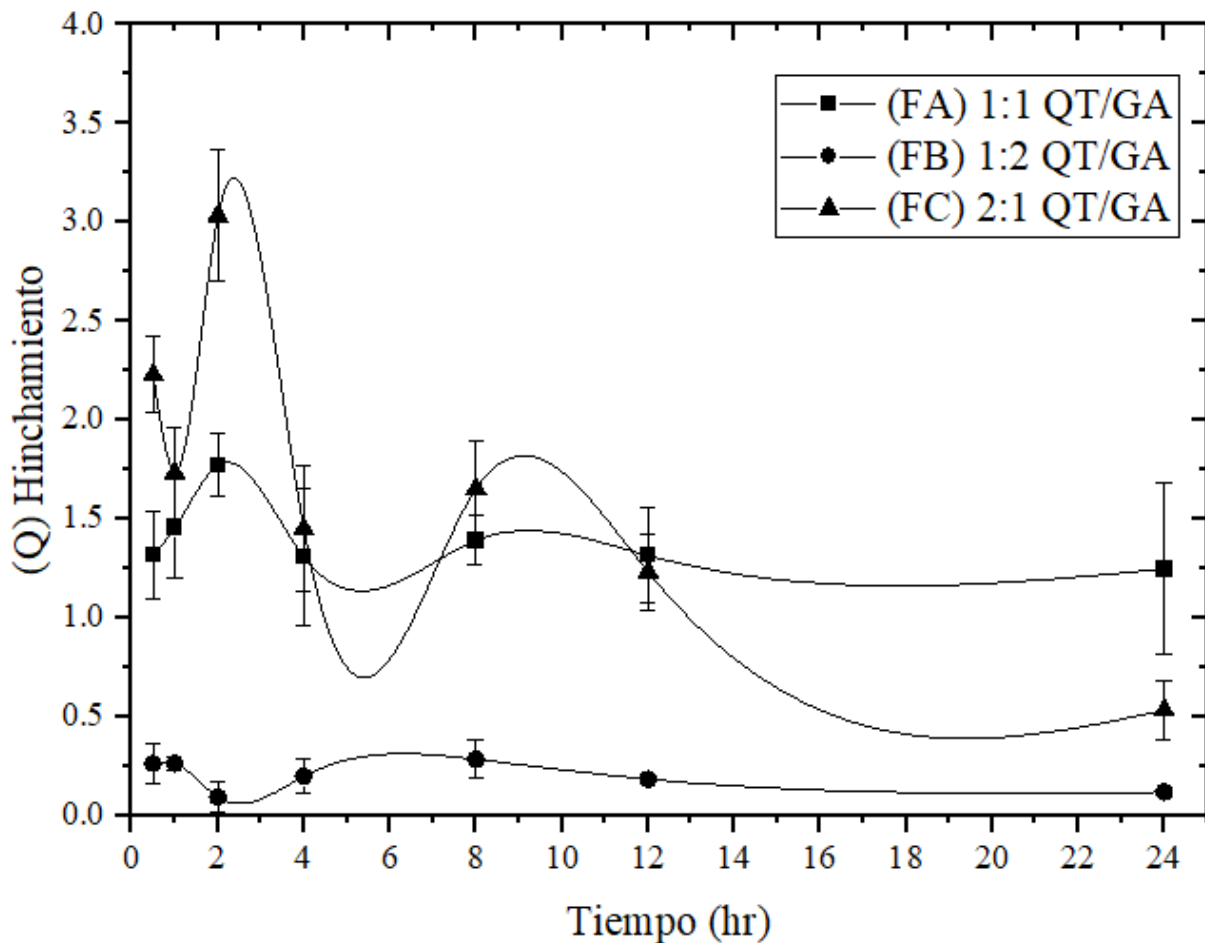


Figura 11. Cinética de hinchamiento de las películas FA, FB y FC a pH 4

Por otro lado, el comportamiento de la cinética de hinchamiento de las películas FA, FB y FC a pH 4 se presentan en la Figura 11 donde el hinchamiento de las películas se muestra en función del tiempo de muestreo. En la gráfica se observa que las películas FB no experimentan variaciones significativas en su hinchamiento a lo largo del tiempo. En contraste, las películas FC exhiben un comportamiento de mayor hinchamiento y más variable durante las 24 horas de muestreo, alcanzando un máximo de hinchamiento a las 2 horas, seguido de una pérdida notable de peso a las 4 horas. Adicionalmente, las muestras FA muestran un comportamiento de hinchamiento conforme al tiempo menos intenso en comparación con las FC a pH 4, alcanzando su punto máximo de hinchamiento a las 2 horas.

Sin embargo, existe gran la variabilidad entre la muestra se refleja en las barras de error, lo que impide identificar una tendencia clara en estas películas bajo las condiciones establecidas.

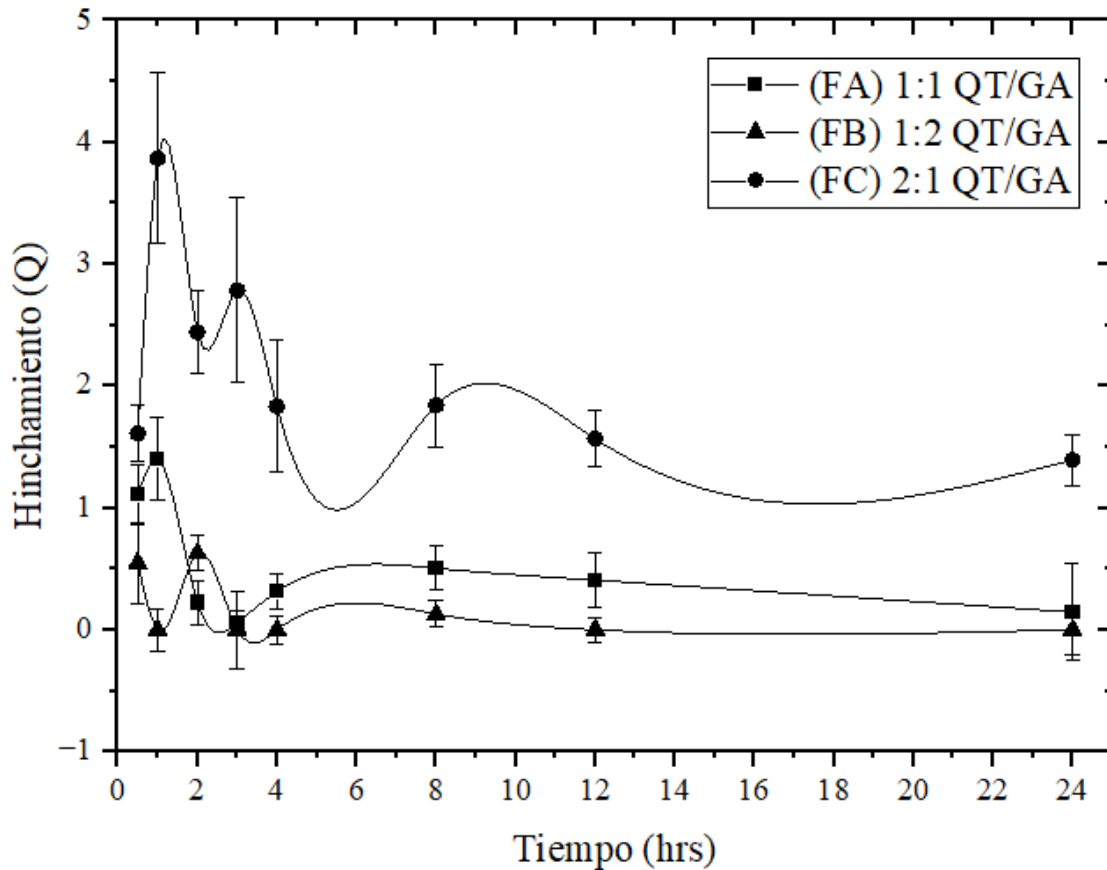


Figura 12. Cinética de hinchamiento de las películas FA, FB y FC a pH 5

Asimismo, la cinética de hinchamiento de las películas FA, FB y FC a pH 5 se presenta en la Figura 12. Se observa una tendencia similar a la registrada a pH 4, donde las formulaciones FC muestran el perfil de hinchamiento más pronunciado, seguidas por las películas FA y FB, respectivamente. Bajo estas condiciones, las películas FC alcanzan un hinchamiento máximo a las 2 horas de muestreo, aumentando su tamaño inicial en 4 veces, seguido de cambios variables a lo largo del tiempo. De manera similar, las películas FA y FB alcanzan su hinchamiento máximo también a las 2 horas, aumentando su tamaño en 1.5 y 0.5 veces, respectivamente, ambas manteniendo una tendencia estable durante más de 24 horas.

4.5. Cinética de liberación del fármaco

Los perfiles de liberación de nistatina de las películas FA, FB y FC son expresados como fracción de fármaco liberada a las 0.15, 0.30, 0.45, 1, 2,4,8,12 y 24 hrs.

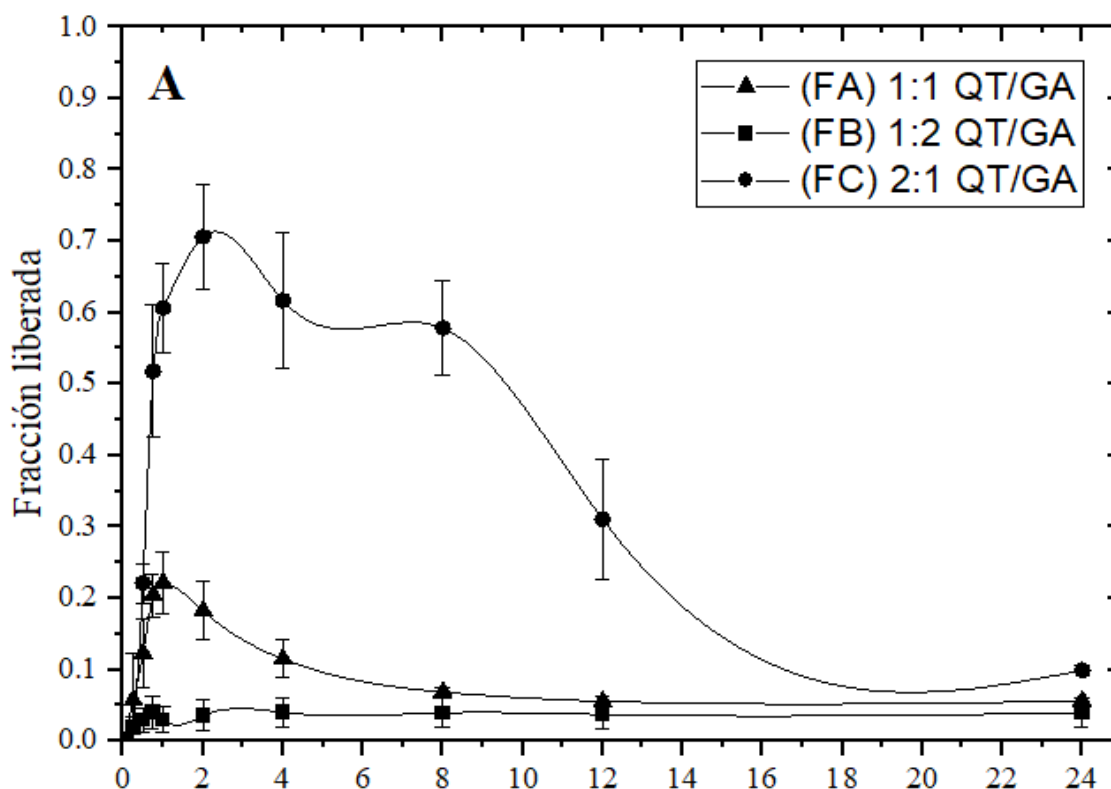


Figura 14. Cinética de liberación de las películas FA, FB y FC a pH4

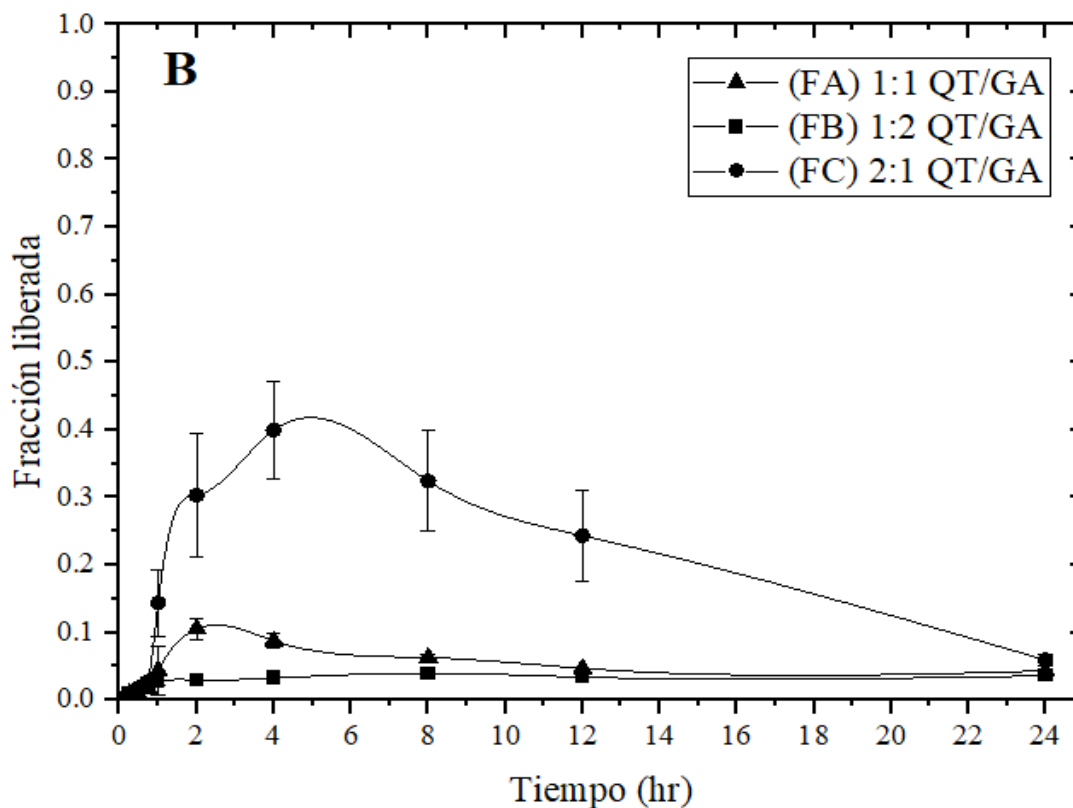


Figura 15. Cinética de liberación de las películas FA, FB y FC a pH 5

De acuerdo con la Figura 14 y 15 a partir de las 8 horas, en ambos medios se registra una disminución significativa en la fracción liberada de nistatina, acompañada de una pérdida de turbidez y color en el medio vista durante el proceso experimental. Este comportamiento podría atribuirse a la degradación de la nistatina, ya que se ha demostrado que esta se descompone significativamente a pH 3-4, perdiendo hasta el 90% de su actividad biológica tras una exposición de más de 6 horas a 37 °C (31). Por su parte, investigaciones previas indican liberación significativa de nistatina en medios de simulación ácidos durante las primeras 6 horas, consistente con los intervalos de mayor liberación observados en este estudio (32).

Las películas FC presentan el perfil de liberación más alto en ambos medios evaluados. A pH 4, las películas liberan el 50% de fármaco durante los primeros 30 minutos, alcanzando una fracción máxima liberada a las 2hr de análisis liberando aproximadamente el 70% de

nistatina. En contraste, a pH 5, la máxima liberación se observa a las 4 horas, liberando cerca del 40% del fármaco. Desde una perspectiva clínica, una liberación inicial rápida de nistatina resulta beneficiosa, ya que facilita alcanzar la concentración terapéutica del fármaco en el menor tiempo posible (32). Por el contrario, las películas FB muestran el perfil de liberación más bajo en comparación con las películas FA y FC, tanto a pH 4 como a pH 5. En ambos casos, la fracción máxima de liberación no supera el 10% del fármaco en todos los intervalos de muestreo a pH 4, y a pH 5, esta fracción no supera el 5% de nistatina en ninguno de los intervalos analizados. Estas películas en proporción 1:2 QT/GA pueden estar creando una matriz de liberación demasiado densa y menos permeable al agua, dificultando la liberación del fármaco. En cuanto a las películas FA, su comportamiento varía según el medio. A pH 4, alcanzan un máximo de liberación en la primera hora de muestreo, liberando aproximadamente el 25% del fármaco, para luego disminuir gradualmente. Sin embargo, a pH 5, la liberación máxima ocurre a las 2 horas, con un 10% de nistatina liberado.

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES

Se logran formular con éxito películas mucoadhesivas utilizando diferentes proporciones de QT y goma arábiga GA, demostrando que la proporción de estos biopolímeros influye significativamente en las propiedades de hinchamiento y en la liberación del fármaco. La inclusión de nistatina en las formulaciones modifica el comportamiento de hinchamiento de las películas, lo que se atribuye a las interacciones entre el fármaco y la matriz polimérica, alterando su estructura y capacidad de interacción con moléculas de agua.

En términos generales, las formulaciones con una mayor proporción de QT exhiben un mayor grado de hinchamiento y una liberación más rápida de nistatina, lo que sugiere que este biopolímero favorece la formación de una red polimérica más abierta y permeable.

En contraste, las formulaciones con mayor proporción de GA presentan un perfil de liberación más lento y un menor grado de hinchamiento, lo que indica una matriz más densa y menos permeable al agua, lo que resulta beneficioso para aplicaciones que requieren una liberación más controlada y prolongada del fármaco.

Estos resultados sugieren que las formulaciones FC (2:1 QT/GA) son particularmente adecuadas para aplicaciones en entornos ligeramente ácidos, como la mucosa vaginal. Su capacidad para favorecer un hinchamiento significativo y una liberación más eficiente de nistatina las hace ideales para este tipo de aplicaciones terapéuticas. En medios ácidos, estas películas muestran una liberación rápida del fármaco seguida de una liberación más controlada, lo que es ventajoso en tratamientos de acción localizada. Además, el considerable grado de hinchamiento observado en estos medios sugiere que las formulaciones FC tendrían una gran capacidad de adhesión al tejido vaginal, lo cual es clave para una liberación localizada y prolongada del fármaco. No obstante, es fundamental realizar estudios in vivo para confirmar la efectividad de este comportamiento en condiciones fisiológicas reales y evaluar el desempeño de estas películas como sistemas de liberación terapéutica en entornos biológicos.

Por otro lado, las formulaciones FA (1:1 QT/GA) y FB (1:2 QT/GA), al presentar un hinchamiento más moderado, ofrecen una mayor estabilidad estructural en una gama más amplia de pH, lo que las hace más adecuadas para aplicaciones que requieren una menor expansión y una liberación más gradual del fármaco. Estas formulaciones podrían ser útiles en contextos terapéuticos donde sea necesario un control más preciso de la liberación a lo largo del tiempo, sin los puntos rápidos de liberación observados en las películas FC.

CAPÍTULO VI

TRABAJO A FUTURO

Como trabajo a futuro, se propone realizar pruebas de bioadhesión en tejido animal para evaluar las propiedades in vivo de las películas mucoadhesivas formuladas. Este estudio permitirá confirmar la capacidad de adhesión de las películas a la mucosa vaginal, así como su comportamiento en condiciones fisiológicas reales, proporcionando información crucial para su aplicación terapéutica. Además, se sugiere llevar a cabo un estudio comparativo de los espectros de infrarrojo de los reactivos utilizados en las formulaciones.

CAPÍTULO VII

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Candidiasis vulvovaginal: una antigua enfermedad con nuevos desafíos [Internet]. [cited 2024 Dec 11]. Available from: <https://www.elsevier.es/es-revista-revista-iberoamericana-micologia-290-pdf-S1130140617300281>
2. Aranaz I, Alcántara AR, Civera MC, Arias C, Elorza B, Caballero AH, et al. Chitosan: An Overview of Its Properties and Applications. *Polymers (Basel)* [Internet]. 2021 Oct 1 [cited 2024 May 22];13(19). Available from: </pmc/articles/PMC8512059/>
3. Musa HH, Ahmed AA, Musa TH. Chemistry, Biological, and Pharmacological Properties of Gum Arabic. In 2018. p. 1–18.
4. Bácskay I, Ujhelyi Z, Fehér P, Arany P. The Evolution of the 3D-Printed Drug Delivery Systems: A Review. *Pharmaceutics* [Internet]. 2022 Jul 1 [cited 2024 Dec 11];14(7):1312. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC9318419/>
5. Noel SP, Courtney H, Bumgardner JD, Haggard WO. Chitosan films: A potential local drug delivery system for antibiotics. In: *Clinical Orthopaedics and Related Research*. Springer New York; 2008. p. 1377–82.
6. Karavasili C, Eleftheriadis GK, Gioumouxouzis C, Andriotis EG, Fatouros DG. Mucosal drug delivery and 3D printing technologies: A focus on special patient populations. Vol. 176, *Advanced Drug Delivery Reviews*. Elsevier B.V.; 2021.
7. Fu J, Yu X, Jin Y. 3D printing of vaginal rings with personalized shapes for controlled release of progesterone. *Int J Pharm*. 2018 Mar 25;539(1–2):75–82.

8. Tagami T, Hayashi N, Sakai N, Ozeki T. 3D printing of unique water-soluble polymer-based suppository shell for controlled drug release. *Int J Pharm.* 2019 Sep 10;568.
9. Humelnicu AC, Samoilă P, Cojocaru C, Dumitriu R, Bostănaru AC, Mareş M, et al. Chitosan-Based Therapeutic Systems for Superficial Candidiasis Treatment. Synergetic Activity of Nystatin and Propolis. *Polymers (Basel).* 2022 Feb 1;14(4).
10. Rivera-Toledo E, Jiménez-Delgadillo AU, Manzano-Gayosso P. Antifúngicos poliénicos. Mecanismo de acción y aplicaciones. *Revista de la Facultad de Medicina.* 2020 Mar 25;63(2):7–17.
11. Nystatin - PubMed [Internet]. [cited 2024 Dec 11]. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31643896/>
12. Aranaz I, Alcántara AR, Civera MC, Arias C, Elorza B, Caballero AH, et al. Chitosan: An overview of its properties and applications. Vol. 13, *Polymers.* MDPI; 2021.
13. Kravanja G, Primožič M, Knez Ž, Leitgeb M. Chitosan-based (Nano)materials for Novel Biomedical Applications. Vol. 24, *Molecules.* MDPI AG; 2019.
14. Jaafar NS. Clinical effects of Gum Arabic (Acacia): A mini review. Vol. 28, *Iraqi Journal of Pharmaceutical Sciences.* University of Baghdad - College of Pharmacy; 2019. p. 9–16.
15. Cozic C, Picton L, Garda MR, Marlhoux F, Le Cerf D. Analysis of arabic gum: Study of degradation and water desorption processes. *Food Hydrocoll.* 2009;23(7):1930–4.
16. Musa HH, Ahmed AA, Musa TH. Chemistry, Biological, and Pharmacological Properties of Gum Arabic. In 2018. p. 1–18.

17. de Carvalho ACW, Paiva NF, Demonari IK, Duarte MPF, do Couto RO, de Freitas O, et al. The Potential of Films as Transmucosal Drug Delivery Systems. Vol. 15, *Pharmaceutics*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI); 2023.
18. Panda B, Parihar AS, Mallick S. Effect of plasticizer on drug crystallinity of hydroxypropyl methylcellulose matrix film. *Int J Biol Macromol*. 2014;67:295–302.
19. Musazzi UM, Khalid GM, Selmin F, Minghetti P, Cilurzo F. Trends in the production methods of orodispersible films. Vol. 576, *International Journal of Pharmaceutics*. Elsevier B.V.; 2020.
20. Notario-Pérez F, Cazorla-Luna R, Martín-Illana A, Galante J, Ruiz-Caro R, das Neves J, et al. Design, fabrication and characterisation of drug-loaded vaginal films: State-of-the-art. Vol. 327, *Journal of Controlled Release*. Elsevier B.V.; 2020. p. 477–99.
21. Thwala LN, Santander-Ortega MJ, Lozano MV, Csaba NS. Functionalized Polymeric Nanostructures for Mucosal Drug Delivery. In: *Biomedical Applications of Functionalized Nanomaterials: Concepts, Development and Clinical Translation*. Elsevier; 2018. p. 449–87.
22. das Neves J, Notario-Pérez F, Sarmiento B. Women-specific routes of administration for drugs: A critical overview. Vol. 176, *Advanced Drug Delivery Reviews*. Elsevier B.V.; 2021.
23. Szymańska E, Wojasiński M, Dąbrowska J, Krzyżowska M, Nowicka M, Ciach T, et al. Chitosan-poly(ethylene oxide) nanofibrous mat as a vaginal platform for tenofovir disoproxyl fumarate – The effect of vaginal pH on drug carrier performance. *Int J Biol Macromol*. 2022 Dec 1;222:856–67.

24. Shaikh R, Raj Singh T, Garland M, Woolfson A, Donnelly R. Mucoadhesive drug delivery systems. Vol. 3, Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences. 2011. p. 89–100.
25. Bagan J, Paderni C, Termine N, Campisi G, Lo Russo L, Compilato D, et al. Mucoadhesive Polymers for Oral Transmucosal Drug Delivery: A Review. *Curr Pharm Des.* 2012 Oct 11;18(34):5497–514.
26. Jawadi Z, Yang C, Haidar ZS, Santa Maria PL, Massa S. Bio-Inspired Muco-Adhesive Polymers for Drug Delivery Applications. Vol. 14, *Polymers.* MDPI; 2022.
27. Alaei S, Omidian H. Mucoadhesion and Mechanical Assessment of Oral Films. Vol. 159, *European Journal of Pharmaceutical Sciences.* Elsevier B.V.; 2021.
28. FICHAS DE INFORMACIÓN TÉCNICA.
29. Machado RM, Tomás M, Palmeira-de-Oliveira A, Martinez-de-Oliveira J, Palmeira-de-Oliveira R. The vaginal sheet: an innovative form of vaginal film for the treatment of vaginal infections. *Drug Dev Ind Pharm.* 2020 Jan 2;46(1):135–45.
30. Blaganje M, Barbič M. Vaginal Yeast Infection. Vol. 15, *Current Bladder Dysfunction Reports.* Springer; 2020. p. 325–31.
31. HAMILTON-MILLER JMT. The effect of pH and of temperature on the stability and bioactivity of nystatin and amphotericin B. *Journal of Pharmacy and Pharmacology.* 1973;25(5):401–7.
32. Enache AC, Cojocaru C, Samoila P, Bele A, Bostanaru AC, Mares M, et al. Evaluation of Physically and/or Chemically Modified Chitosan Hydrogels for Proficient Release of Insoluble Nystatin in Simulated Fluids. *Gels.* 2022 Aug 1;8(8).

CAPITULO VIII

APÉNDICES

8.1. Curva de calibración

Para iniciar, se prepara la solución madre de 1 mg/ml (Nys/buffer) disolviendo 10 mg de nistatina en 10 ml de buffer con pH 4 o pH 5. La solución se agita en vórtex durante 10 segundos y se protege de la luz con papel aluminio. Posteriormente, a partir de la solución madre (1 mg/ml), se toma 1 ml para diluirse en 10 ml del buffer correspondiente, obteniendo así una solución de 0.1 mg/ml. Con esta última, se realizan las diluciones necesarias, detalladas en la Tabla 4, para construir una curva de calibración de 15 puntos.

Muestra	Concentración alícuota (mg/ml)	Alícuota (ml)	Aforo (ml)	Concentración final (mg/ml)
1	0.1	0.1	10	0.001
2	0.1	0.2	10	0.002
3	0.1	0.4	10	0.004
4	0.1	0.8	10	0.008
5	0.1	1	10	0.01
6	1	0.15	10	0.015
7	1	0.2	10	0.02
8	1	0.25	10	0.025
9	1	0.4	10	0.04
10	1	0.8	10	0.08
11	1	1	10	0.1
12	1	1.5	10	0.15
13	1	2	10	0.2
14	1	2.5	10	0.25
15	1	3	10	0.3

Tabla 5. Volúmenes de dilución para curva de calibración

Al tratarse de un fármaco de escasa solubilidad, previo a la toma de cada alícuota la solución se agita en vórtex durante 10 segundos para asegurar la correcta dispersión del principio activo en la solución. Las muestras se leen en el espectro UV-Visible (Beckman Coulter Du 520) a una longitud de onda de 406 nm. Para ello, en una celda de cuarzo se mide el blanco correspondiente, pH 4 o pH 5 según corresponda, posterior a ello se empiezan a medir las muestras previamente agitadas por el vórtex durante 10 segundos. Las curvas de calibración se realizan por triplicado.

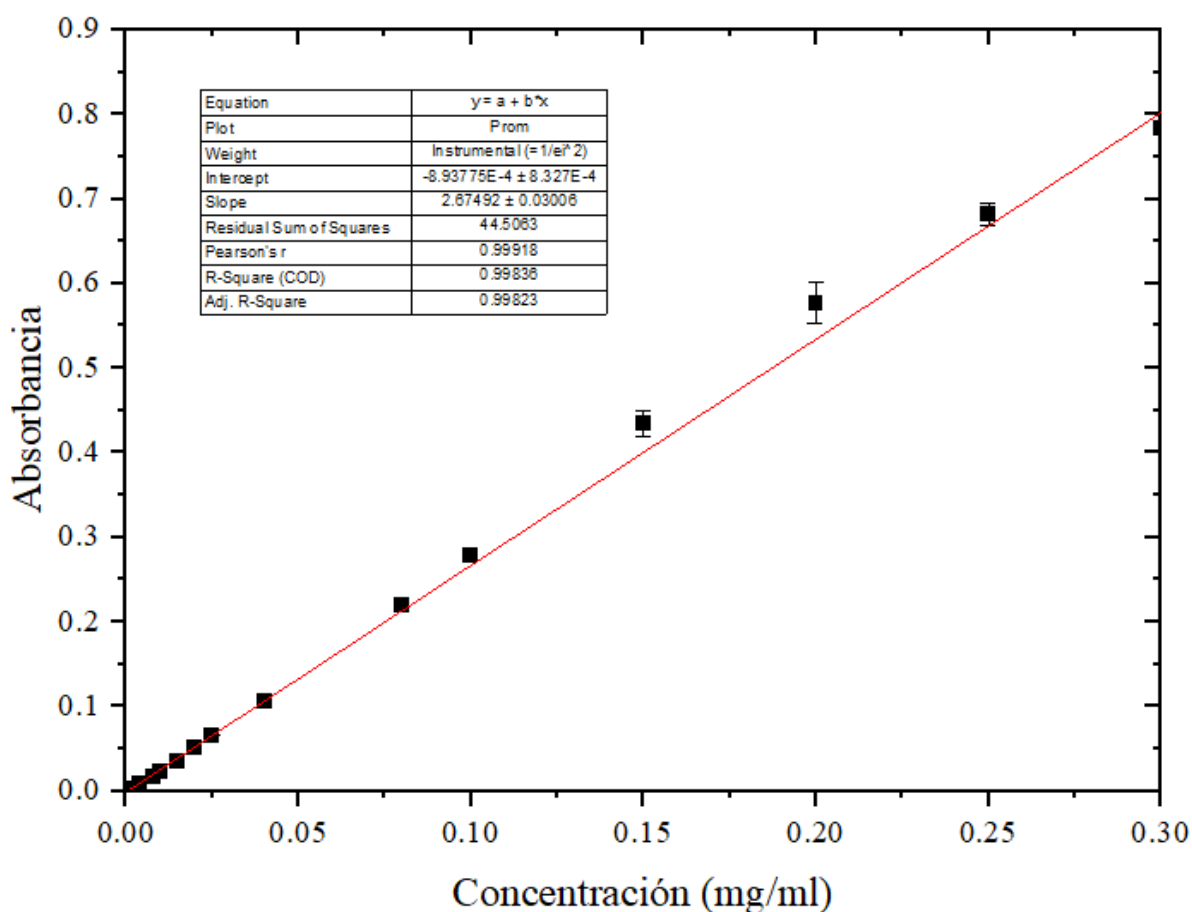


Figura 16. Curva de calibración de nistatina a pH 4

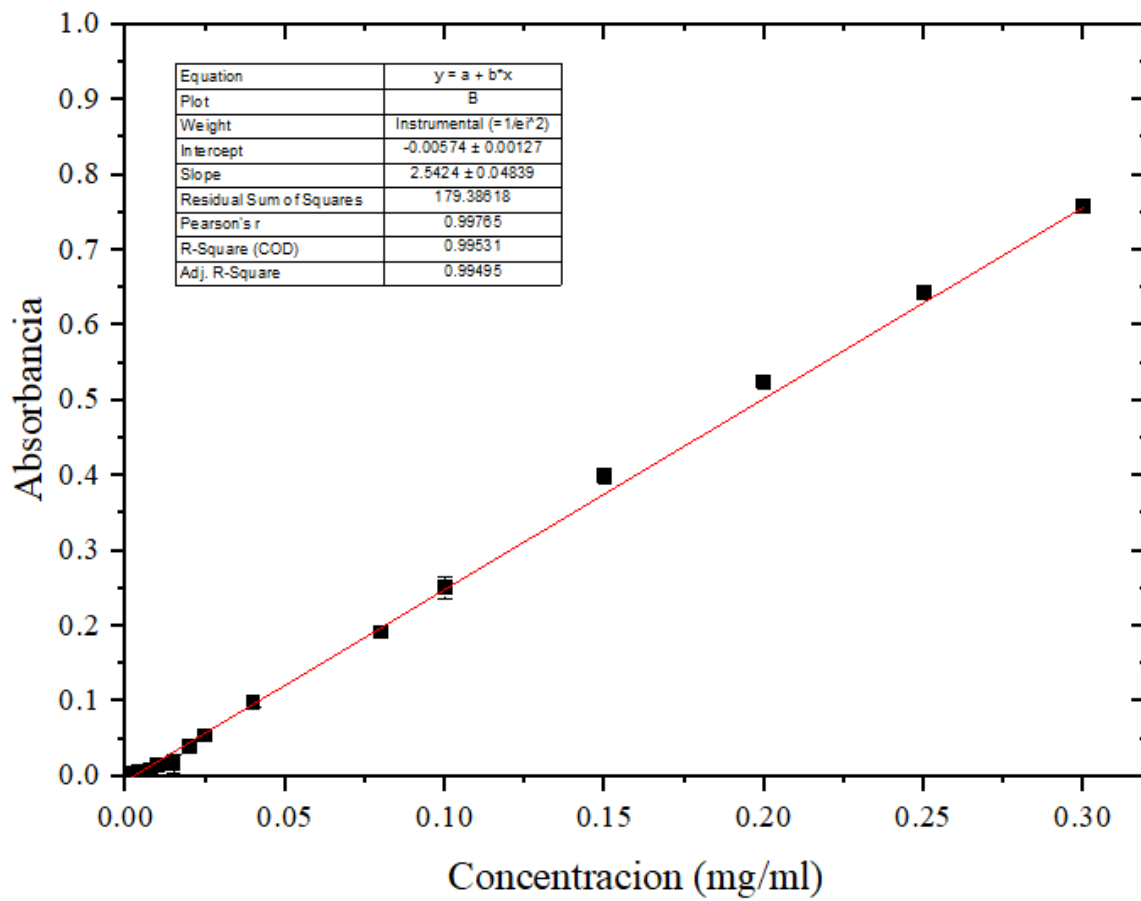


Figura 17. Curva de calibración de nistatina a pH 5