



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

**“ELABORACIÓN DE NANOESFERAS POLIMÉRICAS
DE LIBERACIÓN CONTROLADA PARA EL TRATAMIENTO
DE VAGINITIS”**

TESIS

**PARA OPTAR POR EL GRADO DE
DOCTORA EN CIENCIAS**

PRESENTA:

M. en C. BEATRIZ MARTÍNEZ PÉREZ

TUTORA:

DRA. ELIZABETH PIÑÓN SEGUNDO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

COMITÉ TUTOR:

DRA. MARÍA JOSEFA BERNAD BERNAD

DRA. LUZ MARÍA MELGOZA CONTRERAS

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

Ciudad Universitaria, CD. MX., Marzo 2019



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

MIEMBROS DEL JURADO

Presidente: Dra. Flora Adriana Ganem Rondero

Secretario: Dra. María Josefa Bernad Bernad

Vocal: Dra. Helgi Helen Francisca Jung Cook

Vocal: Dr. Emilio Bucio Carrillo

Vocal: Dr. Gerardo Leyva Gómez

PUBLICACIONES DERIVADAS DEL PROYECTO DOCTORAL

ARTÍCULO:

- ❖ Martínez Pérez Beatriz; Quintanar-Guerrero David, Tapia-Tapia Melina, Cisneros Tamayo Ricardo, Zambrano-Zaragoza María-L., Alcalá-Alcalá Sergio, Mendoza-Muñoz Néstor, Piñón-Segundo Elizabeth. (2018). **Controlled-release biodegradable nanoparticles: From preparation to vaginal applications.** *European Journal of Pharmaceutical Sciences.* 115(30), 185-195.

PRESENTACIONES EN CONGRESOS NACIONALES:

- ❖ **XLVII Congreso Nacional de Ciencias Farmacéuticas 2014.** Preparación y caracterización de nanopartículas poliméricas de clotrimazol o fluconazol para aplicación vaginal. Modalidad: Cartel. Puerto Vallarta, México. Octubre de 2014.
- ❖ **QuimiUNAM 2015.** Preparation and Characterization of Polymer Submicron Spheres for the Treatment of Vaginitis. Modalidad: Cartel. Distrito Federal, México. Abril de 2015.
- ❖ **Primer Seminario de Nanotecnología, Biotecnología y Aplicaciones.** Nanotecnología Farmacéutica como una oportunidad para el diseño de nuevos medicamentos. Modalidad: Presentación oral. Tultitlán, Estado de México. Noviembre de 2016.

PRESENTACIONES EN CONGRESOS INTERNACIONALES:

- ❖ **International Multidisciplinary Joint Meeting 2014.** Estudio de adsorción de quitosán en nanopartículas de ácido poli(láctico-co-glicólico)-clotrimazol. Modalidad: cartel. Pachuca, México. Junio de 2014.

- ❖ **ICANano2014: International Congress on Applications of Nanotechnology.** Bioadhesive nanoparticles for vaginal delivery of clotrimazole. Modalidad: Cartel. Distrito Federal, México. Octubre de 2014.
- ❖ **XLVIII Congreso Nacional y VI Internacional de Ciencias Farmacéuticas.** Desarrollo y validación de un método microbiológico para evaluar nanopartículas poliméricas de aplicación vaginal. Modalidad: Cartel. Cancún, México. Septiembre del 2015.
- ❖ **5th FIP World Congress of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences 2015.** Biodegradable and Mucoadhesive nanoparticles: an alternative for vaginal delivery of clotrimazole. Modalidad: Cartel. Düsseldorf, Alemania. Septiembre del 2015.
- ❖ **10th PBP World Meeting on Pharmaceutics, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology.** Bioadhesive clotrimazole-loaded nanoparticles as a potential vaginal delivery system: Preparation, characterization and Microbiological evaluation. Modalidad: Cartel. Glasgow, U. K. Abril de 2016.

LUGAR DE REALIZACIÓN DE LA TESIS:

- ❖ Laboratorio de Sistemas de Liberación Modificada (L-13) de la Unidad de Investigación Multidisciplinaria de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Cuautitlán Izcalli, Estado de México.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) y a la Facultad de Estudios Superiores (FES-Cuautitlán), por ser mi casa de estudios y *alma mater*.

A la UNAM por el financiamiento brindado para la realización de los proyectos: UNAM-DGAPA-PAPIIT IN221717 y UNAM-DGAPA-PAPIIT IT203614 y a la FES-Cuautitlán por el PIAPI 1641.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por su apoyo financiero a través de la beca 206033 y el proyecto CB 0128799.

De forma muy especial, a la Dra. Elizabeth Piñón Segundo por permitirme realizar el proyecto de Tesis, por su paciencia, confianza y apoyo brindados.

A la Dra. María Josefa Bernad Bernad, y a la Dra. Luz María Melgoza Contreras por las contribuciones y retroalimentaciones brindadas en las reuniones semestrales de Comité Tutor.

A los miembros del Jurado: Dra. Adriana Ganem Rondero, Dra. María Josefa Bernad Bernad, Dra. Helgi Jung Cook, Dr. Gerardo Leyva Gómez y al Dr. Emilio Bucio Carrillo; por sus comentarios y aportaciones brindadas para el enriquecimiento de mi trabajo de Tesis.

Al Dr. David Quintanar por su apoyo y confianza para el uso de la liofilizadora y ultracentrífuga, equipos de su Laboratorio.

A la Mtra. Melina Tapia Tapia del Centro Conjunto de Investigación Química Sustentable UAEM-UNAM (CCIQS) y al Dr. Ricardo Cisneros Tamayo de la Universidad Politécnica del Valle de México (UPVM) por su apoyo y asesoría.

Al Técnico Draucin Jiménez Celi del Taller de Soplado de Vidrio por su apoyo en la reparación y fabricación de algunas piezas de material de vidrio usadas en este proyecto.

A mis amigas de la FES-Cuautitlán: Leticia Bustos Carlos, Adriana Morales Hipólito y Claudia Mariano Hernández, por su amistad y apoyo incondicional.

A mis amigos y amigas de la UPVM, por brindarme su apoyo incondicional y amistad.

DEDICATORIA

*Gracias a mis padres Felix (q. e. p. d) y Francisca
por su amor, ejemplo de fortaleza y su apoyo brindados
para consolidar este logro.*

*A mis hermanos y sobrinos
por su amor y apoyo.*

1.0 ÍNDICE GENERAL

| | |
|---|----|
| 1.0 ÍNDICE GENERAL | 7 |
| 2.0 MARCO TEÓRICO | 24 |
| 2.1 La vagina..... | 24 |
| 2.1.1 Fluido Vaginal..... | 24 |
| 2.1.2 Moco cervical..... | 25 |
| 2.1.3 pH y flora de la vagina..... | 26 |
| 2.2 Concepto de vaginitis..... | 26 |
| 2.2.1 Etiología de la vaginitis..... | 26 |
| 2.2.2 Factores de riesgo de la vaginitis | 28 |
| 2.2.3 Tratamiento de la vaginitis candidiásica..... | 28 |
| 2.3 Administración vaginal de medicamentos..... | 29 |
| 2.4 Bioadhesión de sistemas de administración vaginal..... | 32 |
| 2.4.1 Adhesión, bioadhesión y mucoadhesión | 32 |
| 2.4.2 Ventajas de la mucoadhesión | 32 |
| 2.4.3 Teorías de la mucoadhesión | 33 |
| 2.4.3.1 Teoría de la humectación | 33 |
| 2.4.3.2 Teoría de la adsorción | 34 |
| 2.4.3.3 Teoría electrónica | 34 |
| 2.4.3.4 Teoría de la fractura..... | 35 |
| 2.4.3.5 Teoría de la difusión | 36 |
| 2.4.3.6 Teoría mecánica | 36 |
| 2.5 Propiedades del PLGA..... | 37 |
| 2.6 Propiedades del quitosán..... | 39 |
| 2.6.1 Propiedades antimicrobianas del quitosán..... | 41 |
| 2.7 Sistemas nanoparticulados para la liberación de fármacos | 42 |
| 2.8 Nanoacarreadores poliméricos para el transporte de fármacos | 43 |

| | |
|---|----|
| 2.8.1 Dendrímeros..... | 44 |
| 2.8.2 Micelas poliméricas | 45 |
| 2.8.3 Nanopartículas poliméricas | 45 |
| 2.9 Métodos de preparación de nanopartículas..... | 46 |
| 2.9.1 Emulsificación-Evaporación | 47 |
| 2.9.2 <i>Salting-out</i> | 47 |
| 2.9.3 Método de desplazamiento del solvente | 48 |
| 2.9.4 Emulsificación-Difusión | 49 |
| 2.10 Sistemas nanoparticulados para el tratamiento de infecciones vaginales | 50 |
| 3.0 OBJETIVOS E HIPÓTESIS: | 57 |
| 3.1 Objetivo general | 57 |
| 3.2 Objetivos particulares..... | 57 |
| 3.3 Hipótesis | 57 |
| 4.0 METODOLOGÍA | 58 |
| 4.1 Reactivos | 58 |
| 4.2 Aparatos y Equipos | 59 |
| 4.3 Parte Experimental..... | 60 |
| 4.3.1 Diagrama de Flujo | 60 |
| 4.3.2 Determinaciones previas | 61 |
| 4.3.2.1 Determinación de solubilidades cualitativas de clotrimazol y fluconazol en medios orgánicos e inorgánicos. | 61 |
| 4.3.2.2 Determinación cuantitativa de la solubilidad de clotrimazol y fluconazol | 61 |
| 4.3.2.3 Curvas de calibración | 61 |
| 4.3.3 Desarrollo de los métodos analíticos para la cuantificación de clotrimazol y fluconazol | 62 |
| 4.3.3.1 Especificidad del método | 62 |
| 4.3.3.2 Linealidad del método..... | 62 |
| 4.3.3.3 Exactitud del método | 63 |

| | |
|--|----|
| 4.3.3.4 Repetibilidad del método | 63 |
| 4.3.3.5 Límites de cuantificación y detección del método..... | 63 |
| 4.3.4 Preparación de nanoesferas | 63 |
| 4.3.4.1 Preparación de nanoesferas de PLGA-clotrimazol (NEs-PLGA-CLT) y nanoesferas PLGA-fluconazol (NEs-PLGA-FLU) por el método de desplazamiento del solvente..... | 63 |
| 4.3.4.2 Preparación de NEs-PLGA-CLT y NEs-PLGA-FLU por el método de emulsificación difusión | 64 |
| 4.3.5 Caracterización de NEs-PLGA-CLT y NEs-PLGA-FLU..... | 64 |
| 4.3.5.1 Tamaño de partícula y potencial Z..... | 64 |
| 4.3.5.2 Determinación de PVAL residual en NEs-PLGA-CLT y NEs-PLGA-FLU | 65 |
| 4.3.5.3 Cuantificación de fármaco en NEs-PLGA-CLT y NEs-PLGA-FLU | 65 |
| 4.3.5.4 Determinación del porcentaje de eficiencia de encapsulación (%E.E.) de clotrimazol y fluconazol en NEs-PLGA-CLT y NEs-PLGA-FLU | 66 |
| 4.3.5.5 Preparación de NEs-PLGA-CLT modificadas en la superficie con quitosán (NEs-PLGA-CLT-QTS)..... | 66 |
| 4.3.6 Caracterización de NEs-PLGA-CLT-QTS | 67 |
| 4.3.6.1 Tamaño de partícula y potencial Z de NEs-PLGA-CLT-QTS | 67 |
| 4.3.6.2 Determinación de PVAL residual en NEs-PLGA-CLT-QTS..... | 67 |
| 4.3.6.3 Cuantificación de clotrimazol en NEs-PLGA-CLT-QTS | 67 |
| 4.3.6.4 Determinación del porcentaje de eficiencia de encapsulación de clotrimazol en NEs-PLGA-CLT-QTS..... | 67 |
| 4.3.6.5 Cuantificación de quitosán adsorbido en NEs-PLGA-CLT-QTS..... | 67 |
| 4.3.6.6 Análisis de Espectroscopía de Infrarrojo (FTIR) | 68 |
| 4.3.7 Estudio de adsorción de quitosán sobre nanoesferas de NEs-PLGA-CLT .. | 68 |
| 4.3.8 Estudios de liberación <i>in vitro</i> de NEs-PLGA-CLT y NEs-PLGA-QTS | 69 |
| 4.3.9 Desarrollo del método microbiológico para determinar la CMI de NEs-PLGA-CLT y NEs-PLGA-CLT-QTS contra <i>Candida albicans</i> | 70 |
| 4.3.9.1 Preparación del inóculo | 70 |
| 4.3.9.2 Inoculación de las placas..... | 70 |

| | |
|---|----|
| 4.3.9.3 Preparación de la solución <i>stock</i> de clotrimazol | 71 |
| 4.3.9.4 Linealidad del método..... | 71 |
| 4.3.9.5 Repetibilidad del método | 71 |
| 4.3.9.6 Reproducibilidad del método | 71 |
| 4.3.9.7 Exactitud del método | 71 |
| 4.3.9.8 Límites de cuantificación y detección del método..... | 71 |
| 4.3.10 Determinación de la CMI de NEs-PLGA-CLT y NEs-PLGA-CLT-QTS | 72 |
| 4.3.10.1 Preparación de la solución <i>stock</i> de NEs-PLGA-CLT y NEs-PLGA-CLT-QTS..... | 72 |
| 4.3.10.2 CMI de NEs-PLGA-CLT y NEs-PLGA-CLT-QTS | 72 |
| 4.3.11 Prueba de mucoadhesión por el método Mucina-Partícula para NEs-PLGA, NEs-PLGA-CLT y NEs-PLGA-CLT-QTS y mucina..... | 73 |
| 4.3.12 Estudio de Microscopía de Fuerza Atómica para determinar la morfología y mucoadhesión de NEs-PLGA, NEs-PLGA-CLT y NEs-PLGA-CLT-QTS con mucina..... | 73 |
| 4.3.13 Elaboración del modelo celular porcino para la evaluación de la viabilidad celular de NEs-PLGA, NEs-PLGA-CLT y NEs-PLGA-CLT-QTS..... | 74 |
| 4.3.14 Determinación de la viabilidad celular administrando NEs-PLGA, NEs-PLGA-CLT-NEs y NEs-PLGA-CLT-QTS | 75 |
| 5.0 RESULTADOS Y DISCUSIÓN | 77 |
| 5.1 Determinaciones previas..... | 77 |
| 5.1.1 Determinación de solubilidades cualitativas de clotrimazol y fluconazol en medios orgánicos e inorgánicos..... | 77 |
| 5.1.2 Espectros de absorción | 78 |
| 5.1.3 Determinación cuantitativa de la solubilidad de clotrimazol y fluconazol | 79 |
| 5.1.4 Curvas de calibración | 79 |
| 5.1.5 Desarrollo de los métodos analíticos para la cuantificación de clotrimazol y fluconazol | 80 |
| 5.2 Preparación de NEs-PLGA-CLT y NEs-PLGA-FLU..... | 80 |
| 5.2.1 Caracterización de NEs-PLGA-CLT y NEs-PLGA-FLU..... | 82 |
| 5.2.1.1 Tamaño de partícula y potencial Z..... | 82 |

| | |
|---|-----|
| 5.2.1.2 Determinación de PVAL residual en NEs-PLGA-CLT-QTS..... | 85 |
| 5.2.2 Determinación del porcentaje de eficiencia de encapsulación de clotrimazol y fluconazol a partir de nanoesferas de PLGA..... | 86 |
| 5.3 Preparación de nanoesferas de PLGA-clotrimazol-quitosán | 89 |
| 5.3.1 Caracterización de NEs-PLGA-CLT-QTS | 89 |
| 5.3.1.1 Tamaño de partícula y potencial Z..... | 89 |
| 5.3.1.2 Determinación de PVAL residual | 90 |
| 5.3.2 Cuantificación de clotrimazol a partir de NEs-PLGA-CLT-QTS | 91 |
| 5.3.3 Cuantificación de quitosán a partir de NEs-PLGA-CLT-QTS | 91 |
| 5.3.4 Análisis de Espectroscopía de Infrarrojo (FTIR)..... | 94 |
| 5.3.5 Estudio de adsorción de quitosán sobre NEs-PLGA-CLT | 96 |
| 5.3.6 Estudios de liberación <i>in vitro</i> | 100 |
| 5.3.7 Desarrollo del método microbiológico para determinar la CMI de NEs-PLGA-CLT y NEs-PLGA-CLT-QT contra <i>Candida albicans</i> | 107 |
| 5.3.8 Determinación de la CMI de nanoesferas NEs-PLGA-CLT Y NEs-PLGA-CLT-QTS | 112 |
| 5.3.9. Prueba de mucoadhesión por el método Mucina-Partícula para NEs-PLGA, NEs-PLGA-CLT, NEs-PLGA-CLT-QTS y mucina. | 114 |
| 5.3.10 Estudio de Microscopía de Fuerza Atómica para determinar la morfología y mucoadhesión de NEs-PLGA, NEs-PLGA-CLT y NEs-PLGA-CLT-QTS con mucina..... | 118 |
| 5.3.11 Determinación de la viabilidad celular de CLT, NEs-PLGA, NEs-PLGA-CLT y NEs-PLGA-CLT-QTS..... | 126 |
| 6.0 CONCLUSIONES | 128 |
| 7.0 PERSPECTIVAS | 130 |
| 8.0 REFERENCIAS | 131 |
| 9.0 ANEXOS..... | 152 |
| ANEXO 1. Propiedades fisicoquímicas de clotrimazol y fluconazol..... | 152 |
| ANEXO 2.- Fórmula del Fluido Vaginal Simulado..... | 154 |
| ANEXO 3.- Desarrollo del método de cuantificación de clotrimazol. | 155 |
| ANEXO 4.- Desarrollo del método de cuantificación para fluconazol | 162 |

| | |
|--|-----|
| ANEXO 5. Complejo PVAL-H ₃ BO ₃ -I ₂ -KI a 640 nm..... | 169 |
| ANEXO 6.- Desarrollo del método de cuantificación de quitosán a partir de nanoesferas de clotrimazol-PLGA-quitosán..... | 171 |
| ANEXO 7.- Valores de cantidades adsorbidas y no adsorbidas de quitosán sobre NEs-PLGA-CLT-QTS..... | 178 |
| ANEXO 8.- Modelos de las isotermas de adsorción de quitosán sobre la superficie de NEs-PLGA-CLT-QTS..... | 179 |
| ANEXO 9.- Porcentajes de liberación <i>in vitro</i> de clotrimazol a partir de las NEs- PLGA..... | 182 |
| ANEXO 10.- Desarrollo del método microbiológico placa-cilindro de NEs-PLGA contra <i>Candida albicans</i> | 185 |
| ANEXO 11.- Determinación de CMI NEs-PLGA contra <i>Candida albicans</i> | 188 |
| ANEXO 12.- Tamaño de partícula y potencial Z de NEs-PLGA de los estudios de mucoadhesión de las NEs con mucina | 190 |
| ANEXO 13.- Resultados de la citometría de células epiteliales vaginales para la determinación de la viabilidad celular de NEs-PLGA..... | 192 |
| ANEXO 14.- Publicación..... | 197 |

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

| Abreviatura | Significado |
|--------------------|--|
| α | Nivel de significancia |
| ANOVA | Análisis de Varianza |
| PVAL | Alcohol polivinílico [por sus siglas en inglés, Poly (vinyl alcohol)] |
| C | Concentración |
| C.V. | Coefficiente de Variación |
| Ce | Concentración de quitosán no adsorbida |
| CLT | Clotrimazol |
| CMI | Concentración mínima inhibitoria |
| Cs | Concentración de saturación |
| Fcal | Valor de F calculada |
| Fcrit | Valor de F crítica |
| FDA | Administración de Medicamentos y Alimentos de Estados Unidos de América (por sus siglas en inglés, Food and Drug Administration) |
| FLU | Fluconazol |
| FTIR | Espectroscopía Infrarroja por Transformadas de Fourier |
| FVS | Fluido Vaginal Simulado |
| H ₁ | Hipótesis alterna |
| H ₀ | Hipótesis nula |
| IR | Infrarrojo |
| LC | Límite de Cuantificación |
| LSS | Lauril Sulfato de Sodio |
| MFA | Microscopía de Fuerza Atómica |
| NCLs | Nanocápsulas Lipídicas |
| NEs | Nanoesferas |
| NEs-PLGA | Nanoesferas de ácido poli (láctico-co-glicólico) |
| NEs-PLGA-CLT | Nanoesferas de ácido poli (láctico-co-glicólico) cargadas con clotrimazol |
| NEs-PLGA-CLT-QTS | Nanoesferas de ácido poli (láctico-co-glicólico) cargadas con clotrimazol y modificadas en la superficie con quitosán |
| NEs-PLGA-FLU | Nanoesferas de ácido poli (láctico-co-glicólico) cargadas con fluconazol |
| NPs | Nanopartículas |

| | |
|-------------|--|
| p/p | Peso/peso |
| p/v | Peso/volumen |
| PCL | Poli- ϵ -caprolactona |
| PEO-PPO-PEO | Polímero tribloque: PEO: poli(óxido de etileno), PPO: poli(óxido de polipropileno), PEO: poli(óxido de etileno). |
| PGA | Ácido poliglicólico (por sus siglas en inglés, poly-glycolide acid) |
| PLA | Ácido poliláctico (por sus siglas en inglés, poly-lactide acid) |
| PLGA | Ácido poli (láctico-co-glicólico) [por sus siglas en inglés, poly (D,L-lactide-co-glycolide acid)] |
| Q | Cantidad de quitosán adsorbida |
| QTS | Quitosán |
| r^2 | Coefficiente de determinación |
| SBF | Suero Bovino Fetal |
| $s_{b0}=b$ | Ordenada al origen |
| NLSs | Nanopartículas Lipídicas Sólidas |
| SSF | Solución Salina Fisiológica |
| t_{cal} | Valor de t calculada |
| t_{crit} | Valor de t crítica |
| UFC | Unidades Formadoras de Colonias |
| USA | Estados Unidos de América |
| v/v | Volumen/Volumen |
| λ | Longitud de onda de máxima absorción |
| \bar{x} | Promedio |

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Cambios de pH vaginal en las diferentes etapas de la vida de la mujer. 31

Figura 2. Relación de las fuerzas de tensión interfacial involucradas en la humectación de un material sobre una superficie mucosa. 34

Figura 3. Formación de la bicapa electrónica adhesiva propuesta por la teoría electrónica de la mucoadhesión. 35

Figura 4. Teoría difusional de la mucoadhesión..... 36

Figura 5. Etapas de la mucoadhesión.. 37

Figura 6. Estructura química del quitosán (a) y estructura química de la quitina (b).... 41

Figura 7. Esquema de un dendrímero como sistema de transporte de fármacos 44

Figura 8. Representación esquemática de un sistema micelar para el transporte de fármacos..... 45

Figura 9. Representación esquemática de la formación de nanopartículas por el método de emulsificación- evaporación. 47

Figura 10. Representación esquemática de la formación de nanopartículas por el método de *salting-out*. 48

Figura 11. Mecanismo de formación de nanopartículas por el método de desplazamiento del solvente.. 49

Figura 12. Mecanismo de formación de nanopartículas por el método de Emulsificación-Difusión..... 50

Figura 13. Fotografía del aparato sexual porcino. 74

Figura 14. Zona de conteo celular en la cámara de Neubauer para determinar la viabilidad celular de CLT, QTS, NEs-PLGA, NEs-PLGA-CLT-NEs y NEs-PLGA-CLT-QTS. 76

Figura 15. Espectros de absorción de clotrimazol en soluciones amortiguadoras de acetatos 0.1 M pH=3.5, pH=4.5 y pH= 5.5. 78

Figura 16. Espectros de absorción de fluconazol en soluciones amortiguadoras de acetatos 0.1 M pH=3.5, pH=4.5 y pH= 5.5. 79

Figura 17. Adsorción de PVAL sobre NEs-PLGA. Figura modificada de Murakami H. et al., 1999..... 86

Figura 18. Mecanismo de reacción propuesto para la reacción de quitosán con ninhidrina. 93

| | |
|--|-----|
| Figura 19. Espectros IR de: a) PLGA, b) clotrimazol, c) quitosán, d) NEs-PLGA, e) NEs-PLGA-CLT y f) NEs-PLGA-CLT-QTS..... | 95 |
| Figura 20. Relación entre la cantidad adsorbida de quitosán en función de la cantidad de quitosán adicionada..... | 96 |
| Figura 21. Tamaño de partícula promedio de NEs-PLGA-CLT-QTS en función de la cantidad de quitosán adicionada..... | 98 |
| Figura 22. Potencial Z de NEs-PLGA-CLT-QTS en función de la cantidad de quitosán adicionada..... | 98 |
| Figura 23. Porcentaje de clotrimazol liberado a partir de NEs-PLGA-CLT y NEs-PLGA-QTS en función del tiempo..... | 103 |
| Figura 24. Modelos de liberación de NEs-PLGA-CLT y NEs-PLGA-CLT-QTS: a) Modelo de orden cero, b) Modelo de primer orden..... | 104 |
| Figura 25. Modelos de liberación de NEs-PLGA-CLT y NEs-PLGA-CLT-QTS: a) Modelo de Peppas, b) Modelo de Higuchi..... | 105 |
| Figura 26. Modelos de liberación de NEs-PLGA-CLT y NEs-PLGA-CLT-QTS: a) Modelo de Hixon Crowell, b) Modelo de Weibull..... | 106 |
| Figura 27. Linealidad del método microbiológico para evaluar la actividad fungicida de clotrimazol contra <i>Candida albicans</i> | 108 |
| Figura 28. Evaluación de la reproducibilidad y repetibilidad del método microbiológico para determinar la actividad fungicida de clotrimazol contra <i>Candida albicans</i> | 109 |
| Figura 29. Estudios para determinar el límite de cuantificación del método microbiológico para evaluar la actividad fungicida de clotrimazol contra <i>Candida albicans</i> | 110 |
| Figura 30. Límite de cuantificación del método microbiológico para evaluar la actividad fungicida de clotrimazol contra <i>Candida albicans</i> , $n=18$ | 111 |
| Figura 31. Relación lineal entre el halo de inhibición de crecimiento de <i>Candida albicans</i> y la concentración de clotrimazol contenido en NEs-PLGA-CLT y NEs-PLGA-CLT-QTS..... | 113 |
| Figura 32. Placas de Agar Dextrosa Saboraud con NEs-PLGA-CLT (L1) y NEs-PLGA-CLT-QTS (L2) con 12 días de incubación a 37°C..... | 114 |
| Figura 33. Tamaño de partícula promedio de dispersiones de NEs-PLGA-CLT-QTS con mucina..... | 117 |
| Figura 34. Potencial Z de dispersiones de NEs-PLGA, NEs-PLGA-CLT, NEs-PLGA-CLT-QTS con mucina..... | 118 |
| Figura 35. Micrografías por MFA bidimensional (a) y tridimensional (b) de NEs-PLGA..... | 121 |

| | |
|---|-----|
| Figura 36. Micrografías por MFA bidimensional (a) y tridimensional (b) de NEs-PLGA-CLT..... | 121 |
| Figura 37. Micrografías por MFA bidimensional (a) tridimensional (b) y de fase (c) de NEs-PLGA-CLT-QTS..... | 122 |
| Figura 38. Micrografías por MFA bidimensional (a) y tridimensional (b) y de señal de error (c) de Mucina (0.1%)..... | 123 |
| Figura 39. Micrografías por MFA bidimensional (a) y tridimensional (b) y de señal de error bidimensional (c) y señal de error tridimensional (d) de Mucina (0.1%) - NEs-PLGA-CLT..... | 124 |
| Figura 40. Micrografías por MFA bidimensional (a) y tridimensional (b) y de señal de error bidimensional (c) y señal de error tridimensional (d) de Mucina (0.1%) - NEs-PLGA-CLT-QTS..... | 125 |
| Figura 41. Resultados de viabilidad celular de CLT, NEs-PLGA, NEs-PLGA-CLT y NEs-PLGA-CLT-QTS en células epiteliales vaginales porcinas | 127 |
| Figura 42. Estructura química de clotrimazol. | 152 |
| Figura 43. Estructura química de fluconazol. | 153 |
| Figura 44. Especificidad de clotrimazol evaluado en medio FVS=4.2 y LSS al 0.5% (p/v)..... | 155 |
| Figura 45. Especificidad del método de cuantificación de Fluconazol en medio FVS pH=4.2..... | 162 |
| Figura 46. Especificidad de quitosán evaluado en medio FVS=4.2. | 171 |
| Figura 47. Modelo de Isoterma de Langmuir para evaluar la adsorción de quitosán sobre la superficie de NEs-PLGA-CLTQTS..... | 179 |
| Figura 48. Modelo de Isoterma de BET para evaluar la adsorción de quitosán sobre la superficie de NEs-PLGA-CLT-QTS.. | 179 |
| Figura 49. Modelo de Isoterma de Freundlich para evaluar la adsorción de quitosán sobre la superficie de NEs-PLGA-CLT-QTS. | 180 |
| Figura 50. Modelo de Isoterma de Halsey para evaluar la adsorción de quitosán sobre la superficie de NEs-PLGA-CLT-QTS. | 180 |
| Figura 51. Modelo de Isoterma de Henderson para evaluar la adsorción de quitosán sobre la superficie de NEs-PLGA-CLT-QTS. | 181 |
| Figura 52. Modelo de Isoterma de Smith para evaluar la adsorción de quitosán sobre la superficie de NEs-PLGA-CLT-QTS. | 181 |

ÍNDICE DE TABLAS

| | |
|--|-----|
| Tabla 1. Propiedades fisicoquímicas del PLGA..... | 39 |
| Tabla 2. Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) ¹ y Concentración Mínima Bactericida (CMB) ¹ de quitosán en solución acética a pH=5. | 42 |
| Tabla 3. Sistemas nanoparticulados de administración vaginal para el tratamiento de infecciones..... | 54 |
| Tabla 4. Metodologías utilizadas para la preparación de NEs-PLGA-CLT y NEs-PLGA-FLU..... | 64 |
| Tabla 5. Niveles de concentración de clotrimazol utilizados para determinar la CMI de nanoesferas contra <i>Candida albicans</i> | 72 |
| Tabla 6. Pruebas de solubilidad ¹ cualitativas para clotrimazol y fluconazol..... | 77 |
| Tabla 7. Resultados del desarrollo del método de cuantificación de fluconazol y clotrimazol en medio FVS con LSS al 0.5% p/v. | 81 |
| Tabla 8. Comparación del tamaño de partícula entre las técnicas de preparación de desplazamiento del solvente y emulsificación-difusión de NEs-PLGA-CLT y NEs-PLGA-FLU. | 82 |
| Tabla 9. Prueba <i>t</i> de student para la comparación del tamaño de partícula de NEs-PLGA-CLT y NEs-PLGA-FLU preparadas por las técnicas de preparación de desplazamiento del solvente y emulsificación-difusión. | 83 |
| Tabla 10. Análisis de varianza para evaluar el efecto de potencial Z entre NEs-PLGA-CLT y NEs-PLGA-FLU..... | 85 |
| Tabla 11. Resultados de caracterización de nanoesferas de clotrimazol-PLGA y fluconazol-PLGA, preparadas por los métodos de preparación de desplazamiento del solvente y emulsificación-difusión. | 88 |
| Tabla 12. Análisis de varianza para evaluar el efecto de método de preparación de nanoesferas y fármaco sobre la eficiencia de encapsulación. | 89 |
| Tabla 13. Caracterización fisicoquímica de lotes de NEs-PLGA-CLT-QTS. | 90 |
| Tabla 14. Desarrollo del método de cuantificación de quitosán. | 92 |
| Tabla 15. Valores de tamaño de partícula y potencial Z de nanoesferas de PLGA-clotrimazol-quitosán en función de la cantidad de quitosán adicionada..... | 96 |
| Tabla 16. Parámetros derivados del ajuste lineal de la concentración de quitosán en diferentes modelos de adsorción..... | 100 |
| Tabla 17. Valores de constantes derivadas de los modelos de Higuchi y Peppas. ... | 101 |

| | |
|--|-----|
| Tabla 18. Evaluación de la linealidad de la zona de inhibición de clotrimazol en función de la concentración..... | 107 |
| Tabla 19. Repetibilidad (intra-día) del método microbiológico para evaluar la actividad fungicida de clotrimazol contra <i>Candida albicans</i> | 108 |
| Tabla 20. Reproducibilidad del método microbiológico para evaluar la actividad fungicida de clotrimazol contra <i>Candida albicans</i> | 108 |
| Tabla 21. Exactitud del método microbiológico para evaluar la actividad fungicida de clotrimazol contra <i>Candida albicans</i> | 109 |
| Tabla 22. Determinación del límite de cuantificación del método microbiológico para evaluar la actividad fungicida de clotrimazol contra <i>Candida albicans</i> | 110 |
| Tabla 23. Parámetros de evaluación del método microbiológico para la determinación de la concentración mínima inhibitoria de clotrimazol contenido en NEs-PLGA. | 111 |
| Tabla 24. Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria de NEs-PLGA-CLT y las NEs-PLGA-CLT-QTS contra <i>Candida albicans</i> | 112 |
| Tabla 25. Análisis de varianza para evaluar la diferencia significativa del tamaño de partícula de nanoesferas de PLGA en función de la concentración de mucina. | 116 |
| Tabla 26. Composición química del Fluido Vaginal Simulado pH= 4.2. | 154 |
| Tabla 27. Linealidad del método de cuantificación de clotrimazol en FVS pH= 4.2... .. | 156 |
| Tabla 28. Análisis de Varianza para evaluar la linealidad del método de cuantificación de clotrimazol en FVS pH=4.2. | 157 |
| Tabla 29. Prueba t Student para el intercepto de la curva de linealidad del clotrimazol en FVS pH= 4.2. | 157 |
| Tabla 30. Exactitud del método de cuantificación de clotrimazol en FVS pH= 4.2..... | 158 |
| Tabla 31. Repetibilidad del método de cuantificación de clotrimazol en FVS pH= 4.2. | 159 |
| Tabla 32. Límites de cuantificación y determinación para la determinación de clotrimazol en medio FVS pH= 4.2. | 160 |
| Tabla 33. Análisis de Varianza para evaluar límites de cuantificación de clotrimazol. | 161 |
| Tabla 34. Prueba de prueba t de Student para evaluar el intercepto en la curva de determinación de límites de cuantificación de clotrimazol. | 161 |
| Tabla 35. Linealidad del método de cuantificación de fluconazol en FVS pH= 4.2. | 163 |
| Tabla 36. Análisis de Varianza del método de cuantificación de fluconazol en FVS pH= 4.2..... | 164 |

| | |
|--|-----|
| Tabla 37. Prueba t Student para el intercepto de la curva de linealidad del método de cuantificación de fluconazol en FVS pH= 4.2. | 164 |
| Tabla 38. Exactitud del método de cuantificación de fluconazol en FVS pH= 4.2..... | 165 |
| Tabla 39. Repetibilidad del método de cuantificación de fluconazol en FVS pH= 4.2. | 166 |
| Tabla 40. Límites de cuantificación y determinación de fluconazol en medio FVS pH= 4.2..... | 166 |
| Tabla 41. Análisis de Análisis de Varianza para límites de cuantificación del método de cuantificación de fluconazol..... | 168 |
| Tabla 42. Prueba t Student para el intercepto de la curva de límites de cuantificación del método de cuantificación de fluconazol. | 168 |
| Tabla 43. Curva de calibración del complejo PVAL-H ₃ BO ₃ -I ₂ -KI a 640 nm. | 169 |
| Tabla 44. Análisis de Varianza para evaluar la linealidad del complejo PVAL-H ₃ BO ₃ -I ₂ -KI. | 170 |
| Tabla 45. Prueba t Student para el intercepto de la curva de linealidad del complejo PVAL-H ₃ BO ₃ -I ₂ -KI. | 170 |
| Tabla 46. Linealidad del método de cuantificación de quitosán por medio del complejo quitosán-nihidrina a 572 nm en ácido acético al 0.5% v/v..... | 172 |
| Tabla 47. Análisis de varianza para evaluar la linealidad del complejo quitosán-nihidrina. | 173 |
| Tabla 48. Tabla de prueba t Student para el intercepto de la curva de linealidad del complejo quitosán-nihidrina. | 173 |
| Tabla 49. Exactitud del método de cuantificación de quitosán por medio del complejo quitosán-nihidrina a 572 nm en ácido acético al 0.5% v/v..... | 174 |
| Tabla 50. Repetibilidad del método de cuantificación de quitosán por medio del complejo quitosán-nihidrina a 572 nm en ácido acético al 0.5% v/v. | 175 |
| Tabla 51. Límite de cuantificación para la determinación de quitosán por medio del complejo quitosán-nihidrina a 572 nm en ácido acético al 0.5% v/v. | 176 |
| Tabla 52. Análisis de varianza para evaluar el límite de cuantificación del complejo quitosán-nihidrina. | 177 |
| Tabla 53. Valores promedio de la cantidad adsorbida de quitosán sobre NEs-PLGA-CLT-QTS utilizados para en la evaluación de los modelos de adsorción. | 178 |
| Tabla 54. Porcentajes de liberación de clotrimazol a partir de NEs-PLGA-CLT. | 182 |
| Tabla 55. Porcentajes de liberación de clotrimazol a partir de NEs-PLGA-CLT-QTS. | 183 |

| | |
|--|-----|
| Tabla 56. Porcentajes de liberación de clotrimazol libre. | 184 |
| Tabla 57. Diámetros del halo de inhibición para evaluar la linealidad del método microbiológico de clotrimazol contra <i>Candida albicans</i> | 185 |
| Tabla 58. Diámetros del halo de inhibición para evaluar la repetibilidad del método microbiológico de clotrimazol contra <i>Candida albicans</i> | 186 |
| Tabla 59. Diámetros del halo de inhibición para evaluar la reproducibilidad del método microbiológico de clotrimazol contra <i>Candida albicans</i> | 186 |
| Tabla 60. Diámetros del halo de inhibición para evaluar el límite de cuantificación del método microbiológico de clotrimazol contra <i>Candida albicans</i> | 187 |
| Tabla 61. Diámetros del del halo de inhibición para determinar la CMI de NEs-PLGA-CLT contra <i>Candida albicans</i> | 188 |
| Tabla 62. Diámetros del halo de inhibición para determinar la CMI de NEs-PLGA-CLT-QTS contra <i>Candida albicans</i> | 189 |
| Tabla 63. Tamaño de partícula promedio de NEs-PLGA para realizar los estudios de mucoadhesión con mucina. | 190 |
| Tabla 64. Potencial Z de NEs-PLGA para realizar los estudios de mucoadhesión con mucina. | 191 |
| Tabla 65. Resultados del conteo de células epiteliales vaginales por cuadrante de la cámara de Neubauer para evaluar la viabilidad celular de clotrimazol | 192 |
| Tabla 66. Resultados del conteo de células epiteliales vaginales por cuadrante de la cámara de Neubauer para evaluar la viabilidad celular de NEs-PLGA. | 193 |
| Tabla 67. Resultados del conteo de células epiteliales vaginales por cuadrante de la cámara de Neubauer para evaluar la viabilidad celular de NEs-PLGA-CLT | 194 |
| Tabla 68. Resultados del conteo de células epiteliales vaginales por cuadrante de la cámara de Neubauer para evaluar la viabilidad celular de NEs-PLGA-CLT-QTS. | 195 |
| Tabla 69. Resultados del conteo de células epiteliales vaginales por cuadrante de la cámara de Neubauer para evaluar la viabilidad celular de quitosán | 196 |

1.0 INTRODUCCIÓN

La vaginitis es un proceso inflamatorio en la mucosa vaginal, que puede ser o no de origen infeccioso; esta enfermedad genera un alto índice de consultas ginecológicas por parte de mujeres de todas las edades, ámbitos económicos y socio-culturales (Mills, 2017). De acuerdo con diversos estudios (Hernández-Bueno et al., 2008; Rivera-Sánchez et al., 2006) la incidencia de la vaginitis en mujeres mexicanas oscila alrededor de 50-70%. De acuerdo con estadísticas proporcionadas por la Secretaría de Salud en México (SSA), el número de pacientes reportados con candidiasis durante el período 1990-2003, pasó de 72718 a 336648 casos (SSA, 2004). En febrero del 2017 se reportaron 111,055 nuevos casos de vaginitis, de los cuales 28,157 corresponden a candidiasis urogenital (SSA, 2017).

La vaginitis está considerada en el cuadro de infecciones de transmisión sexual y su alta incidencia en México ha generado un problema de salud (CENETEC, 2014). En muchos de los casos, las infecciones vaginales reincidentes dañan a largo plazo la mucosa vaginal, lo que origina una gran susceptibilidad para infectarse con otros microorganismos más peligrosos, e incluso con virus como el del papiloma humano o el virus de inmunodeficiencia humana.

Las infecciones vaginales representan un grave problema de salud a pesar de los innumerables agentes terapéuticos en uso. El éxito limitado de las terapias farmacológicas es consecuencia de la interrupción del tratamiento, generando elevadas tasas de reincidencia.

Los sistemas de liberación vaginal de fármacos disponibles actualmente (geles, óvulos, tabletas, espumas) muestran una serie de limitaciones tales como escurrimientos, suciedad y un corto tiempo de residencia; estas características ocasionan inconformidad y malestar en la paciente. Además, es importante señalar que uno de los principales problemas que existen en la población, no sólo mexicana sino mundial, es que muchas mujeres no acuden al médico para revisión ginecológica y en caso de acudir, no terminan el tratamiento farmacológico de manera integral.

La administración vaginal de fármacos para efecto local es un reto, ya que se tienen que diseñar medicamentos que logren atravesar la mucosa vaginal y que el fármaco permanezca el tiempo suficiente para lograr una eficiencia terapéutica (das Neves et al., 2015).

La nanotecnología ofrece una serie de oportunidades para la innovación farmacéutica al explorar nuevas vías de administración menos agresivas y más atractivas para el paciente (Dinarvand et al., 2011). Además de mejorar significativamente los esquemas en el tratamiento con una liberación prolongada y controlada de moléculas activas. El uso de un sistema farmacéutico nanoparticulado ofrece diversas ventajas como la posibilidad de orientar y controlar la liberación de fármacos, lo cual conlleva a la reducción de efectos secundarios (De Jong y Borm, 2008). También las nanopartículas proporcionan una mejor especificidad de entrega del fármaco dentro del organismo, debido a que su tamaño les permite llegar a sitios de acción que pueden ser restringidos (Piñón-Segundo et al., 2005).

En el presente trabajo de investigación, se prepararon nanoesferas poliméricas de PLGA como plataforma para la entrega vaginal de clotrimazol, como tratamiento alternativo de la vaginitis. Para brindar la característica bioadhesiva a las nanoesferas, estas se modificaron en su superficie con quitosán. Las nanoesferas preparadas se caracterizaron para determinar su morfología, distribución del tamaño de partículas, eficiencia de encapsulación, potencial zeta, perfil de liberación *in vitro*, etc., además se evaluaron sus propiedades bioadhesivas y su capacidad fungicida contra *Candida albicans*.

2.0 MARCO TEÓRICO

2.1 La vagina

La vagina es un tubo fibromuscular expandible que se extiende desde el cuello uterino hasta el vestíbulo vulvar con una longitud de 7-10 cm, aproximadamente 4 cm de ancho y de 150-200 μm de grosor. Longitudinalmente en forma de S y transversalmente con una conformación de H. Sus paredes se encuentran en contacto entre sí. La pared posterior es más larga que la anterior, consecuencia de la asimetría del cuello uterino (Machado et al., 2015).

La vagina está constituida por tres capas: a) Capa externa, conformada por tejido conjuntivo y fibras elásticas; b) Capa muscular constituida por fibras musculares lisas; c) Capa mucosa, que es de color rosado cambiante a color rojo oscuro durante la menstruación. Esta capa se encuentra formada por un epitelio estratificado rico en fibras elásticas que se adhiere íntimamente a la capa muscular (Rencher, 1999).

2.1.1 Fluido Vaginal

Aún cuando el epitelio vaginal es considerado una superficie mucosa, no posee células caliciformes y no presenta directa liberación de mucinas. El cérvix uterino que comunica a la vagina con el útero, está cubierto por un epitelio con un 95% de células secretoras (productoras de moco cervical) y un 5% de células ciliadas (Vigil, 2014). Las secreciones de la vagina llegan a través del fluido uterino o folicular durante la ovulación.

El fluido vaginal está constituido por una mezcla de diferentes sustancias como exudados del epitelio, moco cervical, células epiteliales exfoliadas, secreciones de las glándulas de Bartholin, leucocitos y fluidos endometriales (Machado et al., 2015).

La consistencia del fluido vaginal tiene diferentes cambios a través del ciclo menstrual y con la edad reproductiva. La cantidad de flujo vaginal segregado varía de mujer a mujer y también a lo largo del ciclo menstrual. Diversos estudios sugieren que la producción diaria de fluido vaginal es de alrededor de 6 g/día, de los cuales 0.5-0.75 g se encuentran presentes en la vagina en todo momento (Owen y Katz, 1999).

2.1.2 Moco cervical

El moco cervical varía en cantidad y viscosidad, en función del ciclo menstrual. Antes de la ovulación el moco cervical es más fluido; sin embargo, después de la ovulación, el moco se espesa. Los cambios en el moco están relacionados con las fluctuaciones de estrógenos y progesterona (Han et al, 2017). Los estrógenos estimulan la producción de moco, líquido isotónico que contiene altas cantidades de mucinas. En cambio, la progesterona genera la producción de un moco seco y viscoso. La cantidad de moco cervical en la vagina es de aproximadamente 2-5 ml (Rencher, 1999).

El moco cervical está formado por dos fases: La fase acuosa o soluble está constituida por un 90-95% de agua, sales inorgánicas (KCl, CaCl₂ y NaCl), carbohidratos (fructosa, glucosa), proteínas solubles, enzimas e inmunoglobulinas, aminoácidos y lípidos. La fase sólida o insoluble está compuesta por glicoproteínas denominadas mucinas (Vigil, 2014).

Las mucinas son glicoproteínas extracelulares con peso molecular de 0.5 a 20 MDa. Las mucinas son copolímeros de bloques ramificados y no ramificados. Las mucinas contienen un aproximado del 80% de N-acetilgalactosamina, N-acetilglucosamina, fucosa, galactosa, ácido siálico, manosa y sulfatos (Bansil y Turner, 2006). Una molécula de mucina tiene cuatro subunidades y cada subunidad se compone de dominios T. Estos dominios tienen un péptido ramificado y uno o dos bloques péptidicos (Strous y Dekker, 1992). La ramificación de las mucinas permite modelarlas mediante un modelo de cepillo de botella de polímero (Saariaho et al., 1997). La conformación de la cadena principal es mucho más extendida que sus ramificaciones. La conformación de la región péptidica no glicosilada de las subunidades depende de su composición de aminoácidos y de la solución. Puede presentar tres conformaciones: hélice rígida, espiral y glóbulos (Bloomfield, 1983). La presencia de bucles, dobleces y giros de la estructura de la mucina sugieren que las cadenas de mucina tienen una gran flexibilidad. La longitud de la mucina en solución es de 100 nm y el radio total es de 50-200 nm, mientras que el diámetro efectivo de las moléculas de mucina es de 5 nm (Sheehan, 1986; Bansil y Turner, 1995).

Las glucoproteínas de la mucina forman una red de macromoléculas que se disocian entre sí por medio de enlaces no covalentes. Esta disociación proporciona las características reológicas del moco vaginal (Capra et al., 2007). La interacción

intermolecular de la mucina no es covalente, ya que la estructura de gel se ve afectada por pequeñas fuerzas de corte (MacAdam, 1993).

2.1.3 pH y flora de la vagina

La población microbiana de la vagina cambia de acuerdo con diversos factores como las etapas del ciclo menstrual, estrés, relaciones sexuales, uso de productos anticonceptivos, duchas vaginales, etc. Uno de los factores más importantes es el nivel de estrógenos sanguíneo de la mujer. Los estrógenos afectan en los niveles de glucógeno depositado en el epitelio, lo cual a su vez afecta a la generación de un ambiente ácido debido a la producción de ácido láctico por medio de la degradación de glucosa originada por *Lactobacillus* spp, que predominan en la vagina y producen altas cantidades de peróxido de hidrógeno, que elimina a bacterias incapaces de sintetizar catalasa (Livengood, 2009).

Los organismos presentes en la vagina como flora natural son especies de *Lactobacillus*, *Bacteroides*, *Peptococcus*, *Corynebacterium*, *Staphylococcus epidermicus*, *Peptostreptococcus* y *Eubacterium*. El pH natural de la mujer en edad reproductiva es de 3.5 a 5.0, pero puede cambiar en virtud de una variedad de circunstancias. Cuando existe una infección bacteriana debido a *Gardnerella vaginalis*, aumenta el pH desde 5.0 hasta 6.0; de igual forma una mujer infectada con *Trichomonas vaginalis*, tiene un pH vaginal superior a 6 (Kumar et al., 2010). Sin embargo, en infecciones generadas por *Candida albicans*, el pH vaginal, inclusive en casos de alta reincidencia de vaginitis es de 4.0-5.0 (Sherrington et al., 2017).

2.2 Concepto de vaginitis

La vaginitis infecciosa se puede definir como un síndrome caracterizado por uno o más de los siguientes signos y síntomas: aumento de la secreción vaginal (flujo), prurito, ardor, irritación, disuria, dispareunia y fetidez o mal olor vaginal; secundario a la presencia de microorganismos patógenos (CENETEC, 2014).

2.2.1 Etiología de la vaginitis

De acuerdo con Briseño (2012), la vaginitis se puede clasificar según el microorganismo que la produce en:

- a) Vaginitis bacteriana. La producen generalmente *Gardnerella vaginalis*, *Corynebacterium* spp, *Prevotella* spp, *Mycoplasma hominis*, *Bacteroides* spp, *Fusobacterium* spp y *Mobiluncus* spp; que reemplazan a los lactobacilos y generan un aumento en el pH (hasta de 7.0). Sin embargo, *Gardnerella vaginalis* es la causa más común de la vaginitis bacteriana. Aproximadamente el 50 % de los casos de vaginitis pueden ser asintomáticos y tener un comienzo y/o remisión espontánea. Aunque su prevalencia es mayor en las mujeres sexualmente activas que en las no activas, actualmente no se considera una infección de transmisión sexual.
- b) Vaginitis candidiásica. Causada por el hongo *Candida albicans*. Este tipo de vaginitis es más común en diabetes y embarazo. La vaginitis candidiásica se puede clasificar a su vez en:
- Vaginitis por *Candida*: Este tipo de vaginitis es diagnosticado con la presencia de *Candida* spp. Es frecuente cuando existe embarazo, cuadros recurrentes (más de 4 episodios por año), especies diferentes de *Candida*, hiperestrógenismo, diabetes mellitus o inmunodeficiencia. Las especies más frecuentemente identificadas en casos de vaginitis candidiásica son *Candida albicans* (39.0%), *Candida glabrata* (35.9%) y *Candida tropicalis* (16.2%) (Rivera-Sánchez et al., 2006).
 - Vaginitis recurrente por *Candida albicans*: se define como la presencia de al menos 4 episodios al año, sintomáticos y documentados de candidiasis vulvovaginal, con resolución parcial de síntomas entre los episodios; tiene una prevalencia de aproximadamente 5 % en las mujeres en edad reproductiva.
- c) Vaginitis por *Trichomona vaginalis*: Síndrome que tiene como agente causal a *Trichomona vaginalis*, que es un protozoo flagelado, en la mujer se localiza en la vagina, uretra y glándulas para-uretrales. La infección del tracto urinario como único sitio de infección se da en un porcentaje cercano al 5 %, mientras que la infección uretral en la vaginitis se da en 90 %.
- d) Vaginitis persistente: Persistencia de signos y síntomas de la vaginitis, a pesar del tratamiento.

Hernández-Bueno y colaboradores (2008), reportaron que el 75% de pacientes mexicanas diagnosticadas con vaginitis presentaron la enfermedad por causa de *Candida* spp. Los factores de patogenicidad de *Candida* incluyen su desarrollo a 37°C, la capacidad de adhesión a células del epitelio vaginal y la gran capacidad de

producir pseudohifas (Tur et al., 2013). Otro de los factores de patogenicidad de *Candida* es su capacidad de crecimiento en un rango de pH desde 2 hasta 10 (Sánchez-Hernández et al., 2017; Sherrington, 2017). Sin embargo, el pH de mayor prevalencia de *Candida* es de 4.5, ya que en estas condiciones tiene una mayor producción de fosfolipasas, uno de sus principales factores de patogenicidad (Ombrella et al., 2008). Los factores de patogenicidad mencionados generan una alta reincidencia en pacientes con vaginitis candidiásica.

2.2.2 Factores de riesgo de la vaginitis

Mendling (1988) propuso que los factores que predisponen a la vaginitis se clasifican en endógenos y exógenos.

Exógenos:

- a) Locales: prendas ajustadas, ropa interior sintética, obesidad, poca higiene, aerosoles y desodorantes vaginales, anticonceptivos orales, dispositivos intrauterinos, diafragma y duchas vaginales.
- b) Tratamientos hormonales.
- c) Antibióticos que disminuyen la flora normal vaginal.
- d) Radiaciones.
- e) Inmunosupresores y citostáticos.
- f) Progestágenos y corticoides.
- g) Dieta rica en carbohidratos.

Endógenos:

- a) Enfermedades metabólicas como diabetes, anemia, hipertiroidismo, Cushing y Addison.
- b) Embarazo.
- c) Enfermedades crónicas y VIH.

2.2.3 Tratamiento de la vaginitis candidiásica

La selección de medicamentos para el tratamiento de la vaginitis depende del origen de ésta, por lo que es necesario considerar el agente etiológico. En la mayoría de los

casos clínicos, la vaginitis de origen micótico es causada por *Candida albicans*. Las especies comúnmente identificadas en pacientes mexicanas diagnosticadas con candidiasis vaginal son *Candida albicans* (39.0%), *Candida glabrata* (35.9%) y *Candida tropicalis* (16.2%) (Rivera-Sánchez et al., 2006).

Resulta muy difícil distinguir dichas infecciones entre sí, tomando como base sólo la sintomatología, siendo absolutamente necesario fundamentarse en la exploración y el estudio microbiológico para establecer el diagnóstico y, por ende, su tratamiento (Perea, 2010).

Existe un gran número de productos farmacéuticos de administración vaginal para el tratamiento de vaginitis como cremas, tabletas u óvulos; sin embargo, algunas veces, estas formas de administración pueden ser incómodas para la mujer, originando irritación local, ardor y mayor frecuencia miccional. Estos efectos colaterales, provocan en muchos de los casos la interrupción del tratamiento en cuanto se presenta la mejora de los síntomas, sin que se erradique completamente la infección (Borhade et al., 2012).

Los fármacos de elección para el tratamiento de la vaginitis causada por *Candida spp* son: fluconazol, itraconazol, miconazol, ketoconazol, clotrimazol y nistatina (SSA, 2004). La eficacia del clotrimazol supera el 85%, con dosis mayores a 100 mg por día (Tur et al., 2013). El fluconazol se administra por vía oral como dosis única, el clotrimazol e itraconazol son recomendados en tratamientos durante 3-7 días. Sin embargo, de estos tres fármacos, el que tiene menores efectos adversos es el clotrimazol. A pesar de lo anterior, el tratamiento y el uso de clotrimazol durante periodos extensos puede generar efectos secundarios como dolor e irritación (Kolling et al., 2013). Consecuentemente, en la presente investigación se incorporó el clotrimazol en nanoesferas poliméricas como una alternativa en el tratamiento de vaginitis candidiásica.

2.3 Administración vaginal de medicamentos

Hasta antes de 1918, no se consideraba a la vagina como sitio de absorción de fármacos. Fue en 1918 que Macht, informó sobre la absorción de morfina, atropina y yoduro de potasio por vía vaginal. A partir de entonces, se han administrado hormonas como insulina, estrógenos, prostágenos, andrógenos y prostaglandinas (Alexander et al., 2004).

La posición anatómica, el abundante suministro de sangre y sobre todo la alta superficie de la vagina, provee un lugar de aplicación sistémica o local de fármacos. La administración vaginal ofrece las siguientes ventajas:

- a) Evita el metabolismo hepático (efecto del primer paso), así como sus efectos secundarios en el hígado. Por ejemplo, los estrógenos naturales son metabolizados en un 95% por el hígado cuando se administran por vía oral; sin embargo, su administración vaginal les proporciona una menor incidencia de efectos secundarios y se obtiene el mismo efecto farmacológico (Alexander et al., 2004).
- b) Reducción de la incidencia y gravedad de los efectos secundarios gastrointestinales. La presencia de los efectos adversos de los fármacos anticonceptivos son el principal factor asociado con la interrupción del tratamiento; sin embargo, con la administración vaginal de estos fármacos, se puede reducir la incidencia de los efectos secundarios y mejorar la aceptabilidad del paciente (Rosenberg et al., 1995).
- c) Provee de una alta área superficial (65-107 cm²) para la absorción de los fármacos (Pendergrass et al., 2003). Se ha demostrado que fármacos como misoprostol e indometacina administrados por vía vaginal presentan un mayor efecto farmacológico en comparación con su administración oral (Abramov et al., 2000; Wing et al., 1995).

En contraste, la vía vaginal también presenta algunas limitaciones, principalmente debido a los cambios cíclicos hormonales de la mujer que llevan a modificar el espesor y porosidad del epitelio, el volumen, la viscosidad y el pH del fluido vaginal.

El epitelio vaginal sufre cambios morfológicos cíclicos bajo la influencia de hormonas tales como estrógeno, progesterona, hormona luteinizante y hormona folículo estimulante. Estos cambios se asocian con el envejecimiento, el ciclo menstrual y el embarazo y afectan drásticamente el espesor del epitelio, porosidad, pH, así como la cantidad y composición de las secreciones vaginales (Rencher, 1999).

Características como el volumen, viscosidad y pH del fluido vaginal tienen una influencia considerable para que los fármacos se absorban vía vaginal. Un volumen elevado favorece la absorción de fármacos poco solubles en agua; sin embargo,

también puede desplazar el medicamento de la cavidad vaginal y posteriormente, reducir la absorción. También la presencia de un exceso de moco cervical puede dificultar la absorción del fármaco. Dado que muchos fármacos son electrolitos débiles, su grado de ionización está influenciado por el pH vaginal persistente y consecuentemente la absorción de estos fármacos se ve afectada. En la Figura 1, se observan los cambios de pH vaginal en las distintas etapas de la vida de la mujer (Iyer et al., 2001).

| | | | | | | | |
|-------------|---------------------|------------|-----------------|----------------------|-----------------------|-------------------|--|
| pH | 8 | | | | | | |
| | 7 | | | | | | |
| | 6 | | | | | | |
| | 5 | | | | | | |
| | 4 | | | | | | |
| | 3 | | | | | | |
| | 2 | | | | | | |
| | 1 | | | | | | |
| Rango de pH | Nacimiento 4 - 5 | Niñez 7 | Pubertad 5-7 | Adolescencia 4 -5 | Embarazo 3.5 – 4.5 | Menopausia 6-7 | |

Figura 1. Cambios de pH vaginal en las diferentes etapas de la vida de la mujer. (Imagen modificada de Iyer et al., 2001).

Las formas farmacéuticas de administración vaginal incluyen soluciones, cremas, ungüentos, geles, óvulos, comprimidos y cápsulas vaginales. La eficacia de estas formas farmacéuticas dependerá de su capacidad para lograr concentraciones de fármaco óptimas en el sitio de acción adecuado. Cuando el blanco terapéutico es sistémico, el fármaco debe ser transportado a través del epitelio para llegar a circulación sistémica. Por otro lado, cuando se desea un efecto local, como en el caso de los microbicidas, es necesaria la retención del fármaco en la superficie del epitelio vaginal con un grado de absorción bajo (Machado et al., 2015).

La mayoría de los fármacos permean a través del epitelio vaginal por mecanismos de difusión (Sassi et al., 2004). Los fármacos hidrofílicos se transportan por medio de difusión paracelular (entre células epiteliales adyacentes) ya que su tamaño molecular está inversamente relacionado con su absorción; por otra parte los fármacos hidrofóbicos se absorben por medio de la difusión transcelular (a través de las células epiteliales), más comúnmente por difusión pasiva a través del epitelio a favor de un gradiente de concentración (Brannon-Peppas, 1993). Los cambios cíclicos en el

epitelio vaginal alteran estos mecanismos de absorción del fármaco (Kumar et al., 2010).

2.4 Bioadhesión de sistemas de administración vaginal

2.4.1 Adhesión, bioadhesión y mucoadhesión

La gran mayoría de los sistemas de administración vaginal, se basan en el uso de polímeros mucoadhesivos, los cuales tienen la propiedad de hincharse y exhibir una liberación controlada de fármacos, que conlleva a una mejora en su biodisponibilidad. Khan y colaboradores (2004), compararon parámetros farmacocinéticos del misoprostol administrado por las vías oral, rectal y vaginal. Los investigadores encontraron que el misoprostol administrado por vía vaginal estuvo presente en el torrente sanguíneo durante mayor tiempo, en comparación con el fármaco administrado por las otras dos vías.

La bioadhesión es definida como el estado en el que dos materiales (uno de ellos de naturaleza biológica) permanecen unidos uno con otro durante periodos largos de tiempo por fuerzas interfaciales. Si la unión es debida al *mucus*, a este fenómeno se le denomina mucoadhesión (Acartürk, 2009).

2.4.2 Ventajas de la mucoadhesión

Andrews y colaboradores (2009), mencionan que algunas de las ventajas del uso de formulaciones farmacéuticas mucoadhesivas son:

- a) Mejora en la biodisponibilidad del fármaco como resultado de una mayor adhesión y tiempo de contacto de la formulación en el sitio de acción. Por ejemplo, la curcumina tiene una biodisponibilidad oral muy baja; sin embargo, al ser formulada en nanopartículas mucoadhesivas para administración rectal, se obtuvieron niveles sostenidos, mejorando su efecto citotóxico en el cáncer colorrectal (Chuah et al., 2014).
- b) El uso de moléculas bioadhesivas permite direccionar la liberación del fármaco en un sitio o tejido en particular.
- c) El aumento de tiempo de permanencia sumado a una liberación controlada del fármaco permite disminuir la frecuencia de administración.

- d) Evitan el metabolismo hepático.
- e) Se reducen los efectos adversos del fármaco debido a una disminución de dosis. Por ejemplo, Aggarwal y Kaur (2005), observaron una mejora en la farmacodinamia del maleato de timolol, así como un efecto más prolongado, cuando el fármaco se administra en niosomas mucoadhesivos recubiertos con quitosán, en comparación con una formulación comercializada (0.5% de maleato de timolol). Los investigadores reportan que la formulación comercial obtuvo un efecto farmacológico similar con la formulación de niosomas, aún cuando ésta última contiene 0.25% de fármaco. Este hecho es importante para evitar los efectos secundarios cardiovasculares asociados con el maleato de timolol.

2.4.3 Teorías de la mucoadhesión

2.4.3.1 Teoría de la humectación

Esta teoría se aplica a materiales líquidos o de baja viscosidad. Esta teoría describe que cuando un material adhesivo entra en contacto con la mucosa, penetra, se endurece y adhiere a la superficie debido a un cambio en la energía interfacial (Fórmulas 1). La afinidad de un líquido a una superficie puede determinarse a través de la medición de su ángulo de contacto con la superficie: a menor ángulo de contacto, mayor es la afinidad a la superficie (Figura 2) (Andrews et al., 2009).

$$\gamma_{SG} = \gamma_{SL} + \gamma_{LG}(\cos\theta) \text{ ----- Fórmula 1}$$

$$P = \gamma_{SG} - (\gamma_{SL} - \gamma_{LG}) \text{ ----- Fórmula 2}$$

Dónde: γ_{SG} es definida como la tensión interfacial sólido-gas, γ_{SL} tensión interfacial sólido-líquido, γ_{LG} tensión interfacial líquido-gas, θ el ángulo de contacto y P es la presión de dispersión.

Se podría decir que, cuanto mayor sea la energía superficial de la superficie y el material adhesivo, mayor será el valor del trabajo de adhesión, es decir mayor será la energía para separar las dos fases (Carvalho et al., 2010).

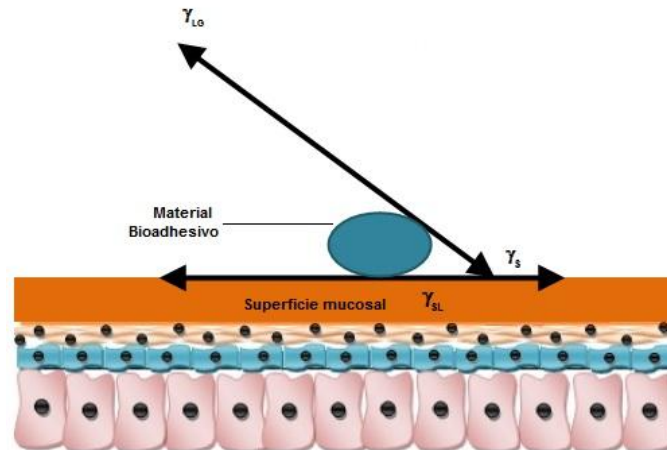


Figura 2. Relación de las fuerzas de tensión interfacial involucradas en la humectación de un material sobre una superficie mucosa. γ_{LG} es la tensión interfacial líquido-gas, γ_{SL} tensión interfacial sólido-líquido y γ_s tensión interfacial sólido. (Imagen modificada de Andrews et al., 2013)

2.4.3.2 Teoría de la adsorción

Esta teoría propone que la adhesión se origina como resultado de las interacciones superficiales primarias y secundarias. Las interacciones primarias resultantes de la quimisorción, generan la adhesión debido a enlaces iónicos, covalentes y metálicos entre ambas superficies. Los enlaces secundarios se deben principalmente a fuerzas del tipo Van der Waals, hidrofóbicas y enlaces de puentes de hidrógeno (Ahuja et al., 1997).

2.4.3.3 Teoría electrónica

De acuerdo Dodou y colaboradores (2005), la adhesión entre el material bioadhesivo y la capa mucosal se origina por medio de la transferencia de electrones entre el moco y el material bioadhesivo, esta transferencia forma una doble capa de cargas eléctricas en la interfase mucoadhesiva (Figura 3).

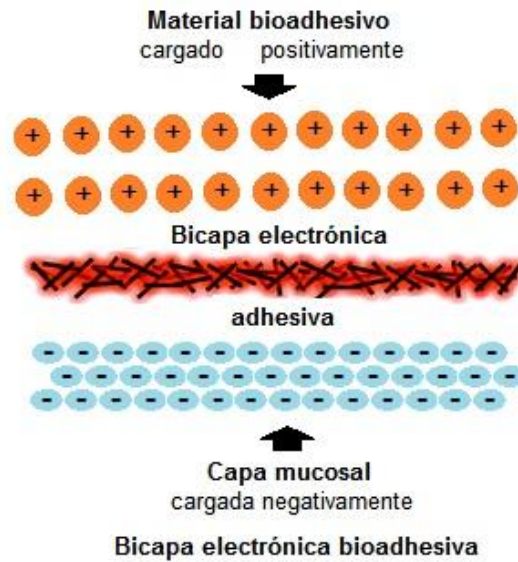


Figura 3. Formación de la bicapa electrónica adhesiva propuesta por la teoría electrónica de la mucoadhesión (Imagen modificada de Dodou et al., 2005).

2.4.3.4 Teoría de la fractura

Esta teoría propone que la fuerza de adhesión está relacionada con la fuerza de separación entre dos superficies. Por lo tanto, la teoría relaciona la fuerza de separación entre el material bioadhesivo y la capa mucosal con la fuerza de su enlace adhesivo (Mansuria et al., 2016). Esta fuerza de separación S_m , se determina por medio de la relación entre la fuerza de desprendimiento máximo (F_m) y el área superficial total A_o (Fórmula 3).

$$S_m = \frac{F_m}{A_o} \text{----- F\acute{o}rmula 3}$$

La energ\u00eda de fractura (g_c) se puede obtener a trav\u00e9s del trabajo de adhesi\u00f3n reversible W_r (energ\u00eda requerida para crear nuevas superficies fracturadas), y el trabajo de adhesi\u00f3n irreversible, W_i (trabajo de deformaci\u00f3n pl\u00e1stica requerido para la remoci\u00f3n de un punto de prueba hasta la interrupci\u00f3n del enlace adhesivo con la superficie).

$$g_c = W_r + W_i \text{----- F\acute{o}rmula 4}$$

Sin embargo, se ha demostrado que la ruptura rara vez ocurre en la superficie, pero sí cerca de ella, por lo que, el punto más débil puede ser la interfaz de la capa de moco o la región hidratada del moco (Mathiowitz et al., 1999). Dado que la teoría de la fractura se ocupa únicamente de la fuerza requerida para separar las partes, no tiene en cuenta la interpenetración o difusión de las cadenas de polímero, por lo cual, es apropiado el uso de esta teoría para en materiales bioadhesivos rígidos o semirrígidos, en los cuales las cadenas de polímero no penetran en la capa de moco (Carvalho et al., 2010).

2.4.3.5 Teoría de la difusión

La teoría propone que la mucoadhesión es originada por la difusión de las cadenas poliméricas del material bioadhesivo en la red de cadenas glucoproteicas de la capa mucosal (Figura 4). El proceso de difusión puede depender también del peso molecular, densidad de reticulación, movilidad-flexibilidad de las cadenas poliméricas y la temperatura (Lee et al., 2000).



Figura 4. Teoría difusional de la mucoadhesión (Imagen modificada de Mansuria et al., 2016).

2.4.3.6 Teoría mecánica

Las irregularidades de la capa mucosal tales como grietas y poros pueden favorecer el anclaje del material bioadhesivo. Estas irregularidades aumentan el área superficial

disponible para las interacciones favoreciendo la adhesión (Thakur et al., 2015). La mucoadhesión implica dos pasos principales: a) Contacto entre el material bioadhesivo y una membrana (humectación) y, b) penetración del bioadhesivo en la superficie mucosa (interpenetración) Figura 5 (Sankar y Jain, 2013).

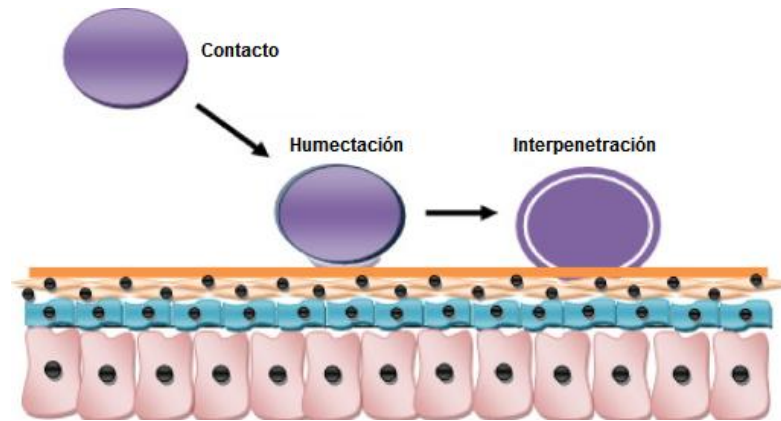


Figura 5. Etapas de la mucoadhesión. (Imagen modificada de Mansuria et al., 2013).

La composición de los sistemas mucoadhesivos es de naturaleza polimérica y son capaces de formar hidrogeles, tales como poliacrilatos, quitosán, derivados de celulosa (hidroxietilcelulosa, hidroxipropilcelulosa, e hidroxipropilmetilcelulosa), ácido hialurónico y derivados, pectina, carragenina y alginato de sodio, entre otros (Andrews, 2009).

2.5 Propiedades del PLGA

El PLGA es un copolímero de los ácidos poliláctico y poliglicólico (PLA y PGA, respectivamente) que se introdujo en los años 70's para su uso en suturas médicas y ha logrado numerosas aplicaciones en la administración de fármacos, ingeniería de tejidos, dispositivos médicos y quirúrgicos (Kapoor et al., 2015). Las aplicaciones del PLGA para su uso médico son debidas a características como: biocompatibilidad, control de la velocidad de biodegradación y liberación de principios activos, funcionalización química de la superficie de sus materiales y por su aprobación para uso clínico por parte de la Administración de Medicamentos y Alimentos de los Estados Unidos de América (FDA) (Gentile et al., 2014; Sharma et al., 2016).

La mayoría de las propiedades fisicoquímicas del PLGA (Tabla 1) tienen una marcada diferencia dependiendo de la proporción lactida (LA) y glicolida (GA). Una de las propiedades de gran interés del PLGA, es su velocidad de biodegradación, la cual puede variar de 1-6 meses dependiendo de la proporción de sus monómeros LA:GA. El tiempo de biodegradación del PLA es de 12-24 meses y el del PGA es de 6-12 meses. Con la proporción 50:50 LA:GA, el tiempo de biodegradación del PLGA puede ser de 1-2 meses. La presencia de grupos metilo laterales en el PLA lo hace más hidrófobo que el PGA, por lo tanto, al incrementar la proporción lactida en el PLGA, también aumenta su tiempo de biodegradación (Kapoor et al., 2015). Otra de las propiedades importantes del PLGA es su temperatura de transición vítrea (T_g). La T_g es una propiedad esencial para la evaluación de la estabilidad morfológica, propiedades de difusión y velocidad de biodegradación. Los copolímeros del PLGA son de naturaleza amorfa con una temperatura de transición vítrea de 40-55°C (Rosas y Pedraz, 2007). Las propiedades del PLGA pueden cambiar en un ambiente húmedo. Uno de los cambios es la reducción de la T_g , debido a la hidrólisis del PLGA (Makadia y Siegel, 2012). Este cambio en las propiedades del PLGA influye sobre la biodegradación así como las velocidades de liberación y degradación del fármaco.

El pH del medio es otro factor importante en la biodegradación del PLGA. Li y McCarthy (1999), estudiaron la degradación hidrolítica de microesferas de PLGA en pH=3.7 y pH=7.4. Los investigadores observaron una mayor rapidez en la degradación a pH=7.4 que a 3.7. La degradación hidrolítica de las microesferas de PLGA a pH 7.4 podría deberse a la difusión de los oligómeros solubles desde la superficie, así como a la neutralización de los grupos carboxilo terminales localizados en la superficie por el medio ligeramente básico. Sin embargo, en pH=3.7, la degradación de las microesferas de PLGA fue más rápida en el interior que en la superficie. Aún más, la absorción de agua, fue 10 veces mayor a pH= 7.4 que a pH=3.7 (Li y McCarthy, 1999). Por otra parte, Zolnik y Burgess (2007), sugieren que el mecanismo de degradación de microesferas de PLGA a pH=7.4, es del interior de las microesferas hacia la superficie y en pH=2.4, la degradación es de la superficie al interior de las microesferas. A pH=7.4, las microesferas de PLGA sufren cambios morfológicos en la superficie tales como picaduras y formación de poros, estos cambios pueden deberse a la mayor absorción de agua en éstas condiciones de pH. Por el contrario, en condiciones de pH=2.4, las microesferas del PLGA mantuvieron una superficie lisas (Zolnik y Burgess, 2007).

El PLGA se utilizó en el presente trabajo de tesis debido a las numerosas ventajas y propiedades, tales como, biodegradabilidad, biocompatibilidad, control de la liberación de fármacos. Sin embargo, a pesar de las excelentes propiedades de PLGA, su bioadhesividad es más baja que la requerida para lograr una terapia eficiente a través de la administración vaginal (Ndesendo et al., 2009). Para abordar esta limitante, en esta investigación, la superficie de las nanoesferas de PLGA preparadas se modificó con quitosán para mejorar su mucoadhesividad.

Tabla 1. Propiedades fisicoquímicas del PLGA. (Tabla modificada de Kapoor et al., 2015).

| Tipo de PLGA | Viscosidad inherente (dl/g) | Densidad (g/ml) | Temperatura de transición vítrea (°C) | Solubilidad* (a 5% p/p) | Tiempo de biodegradación (meses) |
|---------------|-----------------------------|-----------------|---------------------------------------|-------------------------|----------------------------------|
| 50:50 DL-PLGA | 0.55–0.75 | 1.34 | 40-55 | 1,2,3,4,5,6 | 1–2 |
| 65:35 DL-PLG | 0.55–0.75 | 1.3 | 40-55 | 1,2,3,4,5,6 | 3–4 |
| 75:25 DL-PLG | 0.55–0.75 | 1.3 | 40-55 | 1,2,3,4,5,6 | 4–5 |
| 85:15 DL-PLG | 0.55–0.75 | 1.27 | 40-55 | 1,2,3,4,5,6 | 5–6 |
| DL-PLA | 0.55–0.75 | 1.25 | 28-40 | 1,2,3,4,5,6 | 12–16 |
| L-PLA | 0.90–1.20 | 1.24 | 55-80 | 1,4,5 | >24 |
| PGA | 1.40–1.80 | 1.53 | >70 | 5 | 6–12 |

* 1: Diclorometano, 2: Tetrahidrofurano, 3: Acetato de etilo, 4: cloroformo, 5: Hexafluoro-2-propanol, 6: acetona.

2.6 Propiedades del quitosán

El quitosán es el producto natural y más importante derivado de la quitina. Es el segundo polisacárido natural más abundante después de la celulosa. El quitosán se obtiene de fuentes naturales, incluyendo los exoesqueletos de los insectos, conchas de crustáceos, camarones, langostinos, cangrejos, etc., así como las paredes celulares de los hongos (Qi et al., 2004).

Las formas poliméricas de quitosán son aminopolisacáridos con estructuras únicas que le permiten una gran cantidad de funciones, como su mucoadhesividad. El quitosán es más adecuado para aplicaciones biológicas que la quitina, debido a su

mejor solubilidad en agua y ácidos orgánicos. El quitosán tiene enlaces glicosídicos β - (1 \rightarrow 4) que son similares en estructura a la celulosa (Figura 6). El quitosán se produce mediante la hidrólisis básica o hidrólisis enzimática de la quitina en presencia de desacetilasa (Kong et al., 2010).

El quitosán presenta propiedades especiales, tales como la viscosidad, solubilidad en diversos solventes orgánicos, mucoadhesividad, formación de polioxisales, comportamiento polielectrolito, capacidad para formar películas, formación de quelatos con metales, características estructurales y ópticas. La mucoadhesividad que brinda el quitosán se puede explicar por la interacción entre los grupos amino catiónicos del quitosán y restos aniónicos tales como los ácidos siálico y sulfónico sobre la capa de *mucus* (Shailesh et al., 2013). Las propiedades fisicoquímicas del quitosán que determinan sus propiedades funcionales son peso molecular promedio y grado de desacetilación, este último está relacionado con su solubilidad.

El grupo amino del quitosán le proporciona un sitio de reacción bajo condiciones suaves. La protonación del grupo amino le confiere un carácter altamente reactivo, que puede, por ejemplo, conducir al fenómeno de adsorción de cationes metálicos en medios ácidos, debido a que los protones y cationes de metal que compiten para la interacción con el grupo amino (Sudheesh et al., 2013).

Algunas de las propiedades funcionales del quitosán son: biodegradabilidad, biocompatibilidad, mucodhesión, capacidad filmogénica, promotor de la adsorción, actividad antimicrobiana, entre otras. Estas propiedades justifican su amplio uso en la industria farmacéutica, sobre todo por su potencial en el desarrollo de sistemas de liberación de fármacos, dado que constituye un vehículo para la encapsulación del fármaco, protegiéndolo y liberándolo de forma controlada, además de promover su absorción y/o adsorción en el epitelio (Expósito et al., 2010).

Ohya y colaboradores (1994), presentaron los primeros resultados de nanopartículas de quitosán para aplicaciones de liberación de fármacos. Obtuvieron nanopartículas cargadas con 5-fluoracilo por emulsificación. Actualmente existe una gran cantidad de nanopartículas de quitosán cargadas con fármacos, pero también para el transporte de macromoléculas, como proteínas, o ácido desoxirribonucleico.

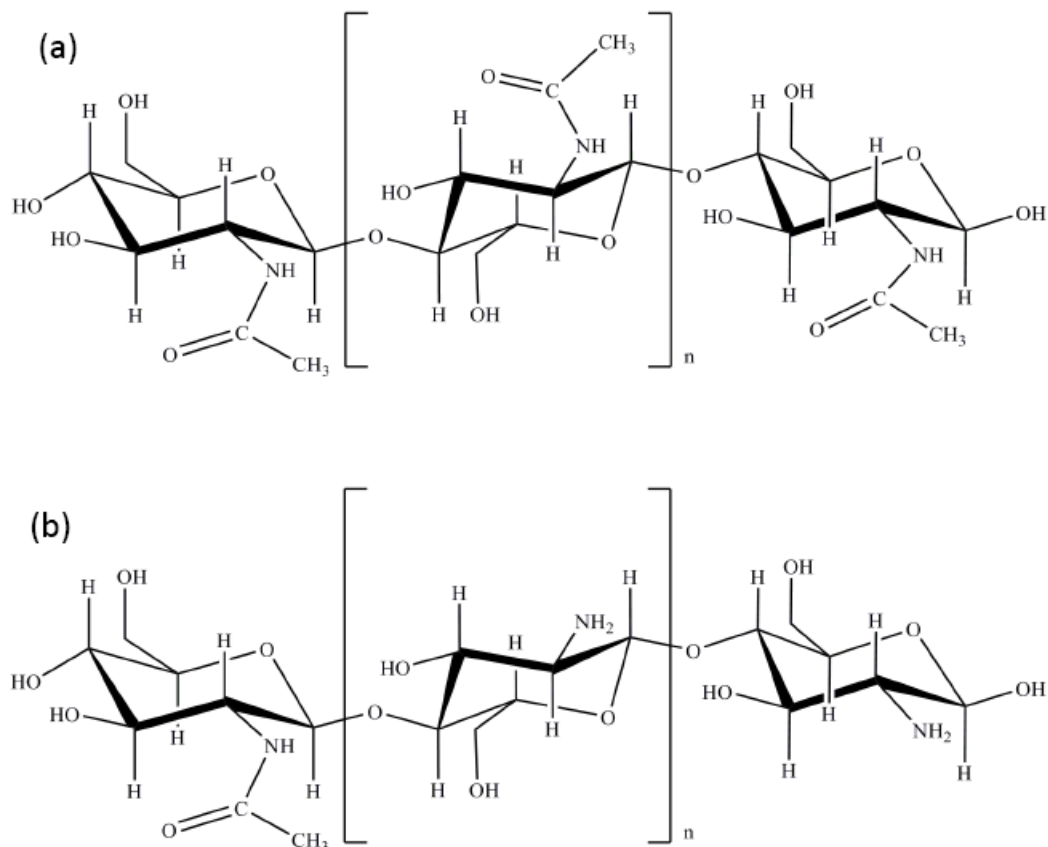


Figura 6. Estructura química del quitosán (a) y estructura química de la quitina (b).
 (Imagen tomada de Sudheesh et al., 2013).

2.6.1 Propiedades antimicrobianas del quitosán

Wang y colaboradores (2004), reportaron la actividad antimicrobiana del quitosán bajo concentraciones desde 0.025 a 0.1 % p/v para microorganismos Gram-negativos, Gram-positivos y *Candida albicans*. (Wang et al., 2004). De igual forma Qi et al, reportaron las concentraciones mínimas inhibitorias del quitosán y de nanopartículas de quitosán ante diferentes microorganismos, resultados mostrados en la Tabla 2 (Qi et al. 2004).

Como se puede observar en la Tabla 2, si el quitosán se presenta en forma de NPs se ve aumentada la actividad microbicida, en comparación con la solución de quitosán. La actividad antimicrobiana del quitosán puede ser explicada a través del siguiente mecanismo: 1) adsorción del quitosán sobre la superficie celular, 2) difusión a través

de la pared celular, 3) adsorción sobre la membrana citoplasmática, 4) disrupción de la membrana citoplasmática, 5) Separación de los componentes de la membrana y, 6) Muerte celular (Kong et al., 2010).

Dadas las características fisicoquímicas y funcionales del PLGA y el quitosán, estos polímeros brindan la oportunidad de desarrollar sistemas nanoparticulados de liberación controlada para el tratamiento de vaginitis.

Tabla 2. Concentración Mínima Inhibitoria (CMI)¹ y Concentración Mínima Bactericida (CMB)¹ de quitosán en solución acética a pH=5. (Tabla modificada de Qi et al., 2004).

| Bacteria | QTS | | NPs-QTS ² | | NPs-Cu-QTS ³ | | Doxiciclina | | Control | |
|--------------------------------|-----|-----|----------------------|-----|-------------------------|-----|-------------|-----|---------|------|
| | CMI | CMB | CMI | CMB | CMI | CMB | CMI | CMB | CMI | CMB |
| <i>E. coli</i> | 8 | 64 | 1/16 | 1 | 1/32 | 1 | 1 | 4 | 2500 | 2500 |
| <i>Salmonella choleraesuis</i> | 16 | 32 | 1/16 | 1 | 1/32 | 1 | 4 | 32 | 2500 | 2500 |
| <i>Salmonella typhimurium</i> | 16 | 64 | 1/8 | 2 | 1/16 | 2 | 2 | 32 | 2500 | 2500 |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | 8 | 32 | 1/8 | 2 | 1/16 | 2 | 1/4 | 8 | 2500 | 2500 |

¹CMI (µg/ml) y CMB (µg/ml)

²Nanopartículas de quitosán (NPs-QTS).

³Nanopartículas de Cobre-quitosán (NPs-Cu-QTS).

2.7 Sistemas nanoparticulados para la liberación de fármacos

Dada la importancia creciente de la nanotecnología, en el Programa Especial de Ciencia, Tecnología e Innovación 2014-2017, se establece en el área de Desarrollo Tecnológico que uno de los temas prioritarios es para desarrollo de nanomateriales y nanotecnología (CONACyT, 2014). Lo anterior da pie a la creación de nuevas áreas de investigación tales como aplicaciones de la nanotecnología en instituciones educativas, tanto para la formación de mano de obra especializada, así como la generación de nuevas patentes y productos nanotecnológicos.

La aplicación de la nanotecnología en el desarrollo de formulaciones farmacéuticas es uno de los grandes avances dentro de la Industria Farmacéutica en los últimos años y en los siguientes el impacto será aún mayor. De acuerdo con Zhang et al. (2007) los primeros medicamentos nanoparticulados aprobados por la FDA fueron:

1. Sirolimus (Rapamune[®]), primer fármaco nanoparticulado aprobado por FDA en el año 2000.
2. Aprepitant (Emend[®]), utilizado para la prevención de náusea y vómito que se asocian con la quimioterapia antineoplásica, fue aprobado en el 2003.
3. Fenofibrato (TriCor[®]), aprobado en el año 2004.
4. Acetato de Magestrol (Megace[®] ES), utilizado en terapia hormonal, aprobado en el 2005.
5. Palmitato de paliperidona (Invega[®] Sustenna), antipsicótico que se aprobó en Julio del 2009.

En el año 2005 se aprobó el medicamento Abraxane[®] (nanopartículas de paclitaxel y albúmina), medicamento utilizado en la terapia contra el cáncer, generó en los primeros 9 meses del año 2009 utilidades de 210 millones de dólares a la empresa Abraxis BioScience, Inc. (Pillay, 2009).

En el año 2016, se reportó que en el mercado existen 59 formulaciones farmacéuticas con sistemas nanoparticulados los cuales han logrado buenos resultados en el tratamiento de enfermedades como cáncer, problemas hormonales, infecciones bacterianas y virales (Robo et al., 2016; Ventola, 2017; Weissig y Guzmán-Villanueva., 2015). Por otra parte, son 74 los estudios clínicos que actualmente evalúan nanoformulaciones farmacéuticas (consultado el 19-01-2019 de <https://clinicaltrials.gov/>).

La nanotecnología ofrece una serie de oportunidades para la innovación farmacéutica como el explorar nuevas vías de administración que sean menos agresivas y más confortables para el paciente (Dinarvand et al., 2011). Además de mejorar significativamente los esquemas en el tratamiento con una liberación prolongada y controlada de moléculas activas. Las ventajas de los nanosistemas como: protección de fármacos lábiles, liberación controlada, modulación de adhesión y/o penetración al moco vaginal; ofrecen una gran oportunidad para su aplicación en el suministro de fármacos de uso vaginal.

2.8 Nanoacarreadores poliméricos para el transporte de fármacos

Los materiales poliméricos han sido utilizados para el diseño de nanosistemas transportadores de fármacos debido a que muchos de estos materiales tienen características altamente deseables tales como biocompatibilidad, biodegradabilidad,

protección a la degradación del fármaco; además proporcionan una liberación controlada del fármaco y factibilidad de modificaciones superficiales que pueden permitir la dirección de la liberación del fármaco en un sitio específico (Venditti, 2017).

2.8.1 Dendrímeros

Los dendrímeros son nanoestructuras altamente ramificadas y reactivas con un núcleo interno (Figura 7). Los dendrímeros tienen estructuras controladas y con una forma globular, un solo peso molecular y la ventaja de modificar la química superficial (Liu y Fréchet, 1999). En estos sistemas el fármaco puede incorporarse tanto en el núcleo como en la estructura ramificada por medio de enlaces covalentes o fuerzas electrostáticas. Las ventajas de los dendrímeros son: pueden incorporar fármacos hidrofílicos o hidrofóbicos, tienen una vida media aumentada, alta solubilidad, estabilidad y permeabilidad de los fármacos, reducen la captación de macrófagos, paso fácil a través de barreras fisiológicas, entrada celular rápida, mejora de la eficiencia de liberación y entrega dirigida del fármaco. Las principales desventajas de estos sistemas es su baja biodegradación y por consiguiente una alta toxicidad.

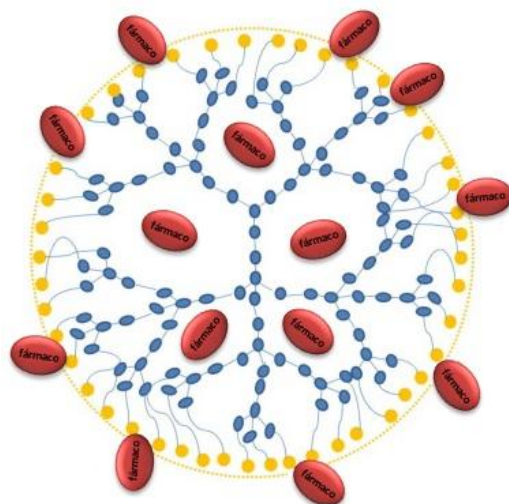


Figura 7. Esquema de un dendrímero como sistema de transporte de fármacos (Imagen modificada de Venditti, 2017).

2.8.2 Micelas poliméricas

Una micela polimérica es un ensamble supramolecular de polímeros anfifílicos para formar una estructura o vesícula núcleo-capa (Villafuerte-Robles, 2009). En estos sistemas, los fármacos hidrofóbicos se pueden encapsular en el núcleo de la micela polimérica (Figura 8). Las micelas se forman a partir de copolímeros de bloque en las que el núcleo interno es hidrófobo mientras que la parte superficial es hidrofílica. El tamaño de la micela polimérica (< 100 nm) reduce su interacción con proteínas séricas prolongando su tiempo en circulación sanguínea (Hong et al., 2017). Sin embargo, presentan dos grandes desventajas: su inestabilidad y posible disociación (Yamamoto et al., 2007). Algunos autores han incluido lípidos en el sistema micelar polimérico en los que el segmento hidrofóbico es de naturaleza lipídica (Torchilin et al., 1995).

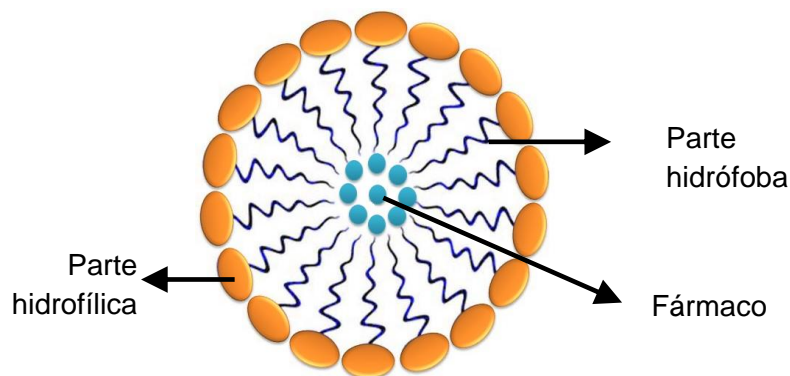


Figura 8. Representación esquemática de un sistema micelar para el transporte de fármacos. (Imagen modificada de Torchilin et al., 1995).

2.8.3 Nanopartículas poliméricas

De acuerdo con Kreuter (2007), para fines farmacéuticos, las nanopartículas se definen como partículas coloidales del rango en tamaño de 10 a 1000 nm ($1 \mu\text{m}$), están constituidas de materiales macromoleculares y pueden contener fármaco(s) o material biológicamente activo atrapado, encapsulado, adsorbido o ligado a su superficie.

Las nanopartículas pueden clasificarse en nanoesferas o nanocápsulas. Las nanoesferas tienen su núcleo sólido, mientras que las nanocápsulas tienen un centro líquido. En estos sistemas el fármaco se puede encontrar encapsulado en núcleo y

rodeado por una membrana polimérica (nanocápsulas) o atrapado entre las cadenas poliméricas (nanoesferas) (Chen et al., 2016).

Las nanopartículas poliméricas pueden proporcionar una liberación sostenida de los fármacos durante periodos largos. Para direccionar la liberación de los fármacos al sitio de acción, el sistema puede conjugarse con un ligando específico de tejido o célula para acoplarse y liberar el fármaco (Guicun y et al., 2012). Las nanopartículas poliméricas pueden tener al menos tres componentes: material polimérico, fármaco y modificadores de la superficie que aumentan la biodistribución y la direccionalidad del sistema (Ferrati, 2005).

El uso de las nanocápsulas involucra el control de la liberación de fármacos y mejora de la estabilidad y biodisponibilidad de los fármacos (El-Gogary et al., 2014); para estos fines se prefieren tamaños entre 50 y 400 nm. Las nanocápsulas también pueden emplearse para la protección de enzimas y vectores de transfección en terapia génica, así como protectores en catálisis heterogénea (Baier et al., 20012; Chen et al., 2016). La selección de componentes apropiados para la preparación de las nanocápsulas es determinante para lograr su estabilidad a largo plazo y biocompatibilidad (Couvreur et al., 2013).

2.9 Métodos de preparación de nanopartículas

La selección del método de preparación de nanopartículas depende de su aplicación y de las características fisicoquímicas del fármaco. Los métodos de preparación de nanopartículas se pueden dividir en tres principales grupos: 1) Métodos fisicoquímicos con el uso de polímeros preformados (emulsificación- evaporación, emulsificación-difusión, *salting-out*, etc.), 2) Síntesis química *in situ* de macromoléculas dada por reacciones de polimerización y policondensación. 3) Métodos mecánicos, por ejemplo, homogenizadores de alta presión, sonicadores, molinos de alta energía y el método de secado por aspersión (Li et al., 2010).

2.9.1 Emulsificación-Evaporación

Consiste en la disolución del polímero y el fármaco en un solvente orgánico. La emulsión se prepara a través de la adición de una solución acuosa del tensoactivo a la solución orgánica polimérica. La formación de las nanopartículas es inducida por la agitación (sonicación u homogenización), una vez formadas las nanogotas, el disolvente orgánico es evaporado para formar las nanopartículas insolubles en el medio acuoso (Figura 9). Las ventajas de este método de preparación son: alta eficiencia de encapsulación (>70%), alta reproducibilidad de lote a lote, facilidad de escalamiento y distribución estrecha de tamaño de partícula (Pinto-Reis et al., 2006).

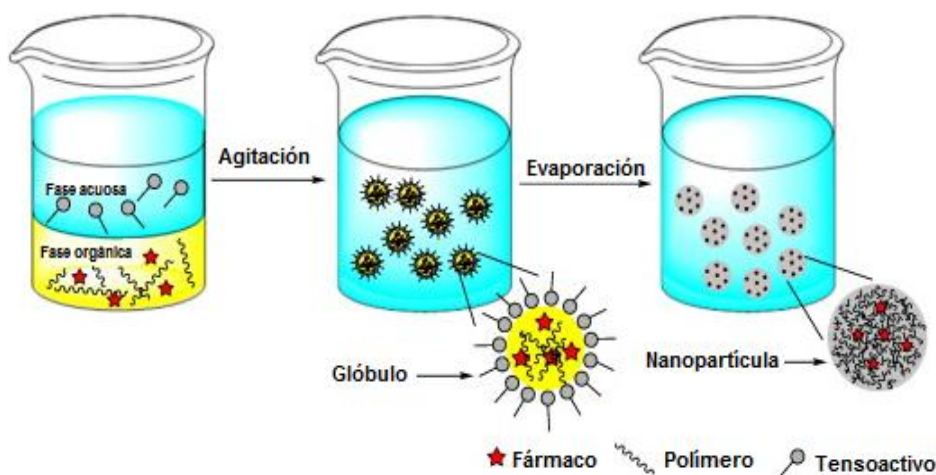


Figura 9. Representación esquemática de la formación de nanopartículas por el método de emulsificación- evaporación. (Imagen modificada de Crucho y Barros., 2015).

2.9.2 Salting-out

Mediante esta técnica, se forma una emulsión agua/aceite que contiene polímeros, agua, acetona, electrolito (sal), tensoactivo y el componente activo. La fase orgánica es emulsificada con la solución acuosa de tensoactivo bajo agitación (Figura 10). En la solución acuosa también es adicionado el electrolito (cloruro de magnesio, cloruro de calcio, cloruro de sodio, etc.) La emulsión formada es diluida con agua para potenciar la difusión de la acetona a la fase acuosa e inducir la formación de las nanopartículas (Quintanar-Guerrero et al., 1998).

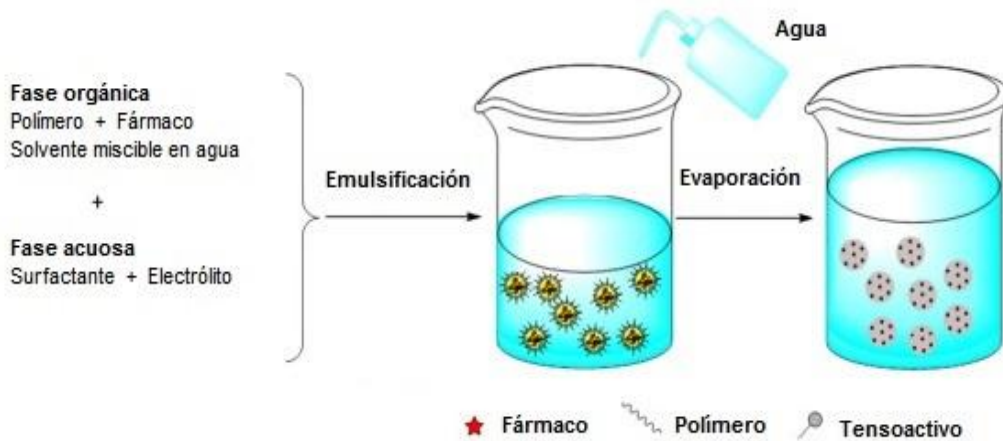


Figura 10. Representación esquemática de la formación de nanopartículas por el método de *salting-out*. (Imagen modificada de Crucho y Barros., 2015).

2.9.3 Método de desplazamiento del solvente

En este método el polímero se disuelve en un disolvente miscible en agua y de polaridad intermedia, fase que es adicionada a una solución acuosa de tensoactivo de forma controlada (Figura 11). Debido a la rápida difusión espontánea de la solución del polímero en la fase acuosa, las nanopartículas se forman instantáneamente por la repulsión al medio acuoso (Mora-Huertas y et al., 2011). Este método se fundamenta en la deposición interfacial de un polímero después del desplazamiento del disolvente orgánico desde una solución lipofílica a la fase acuosa (Quintanar-Guerrero et al., 1997).

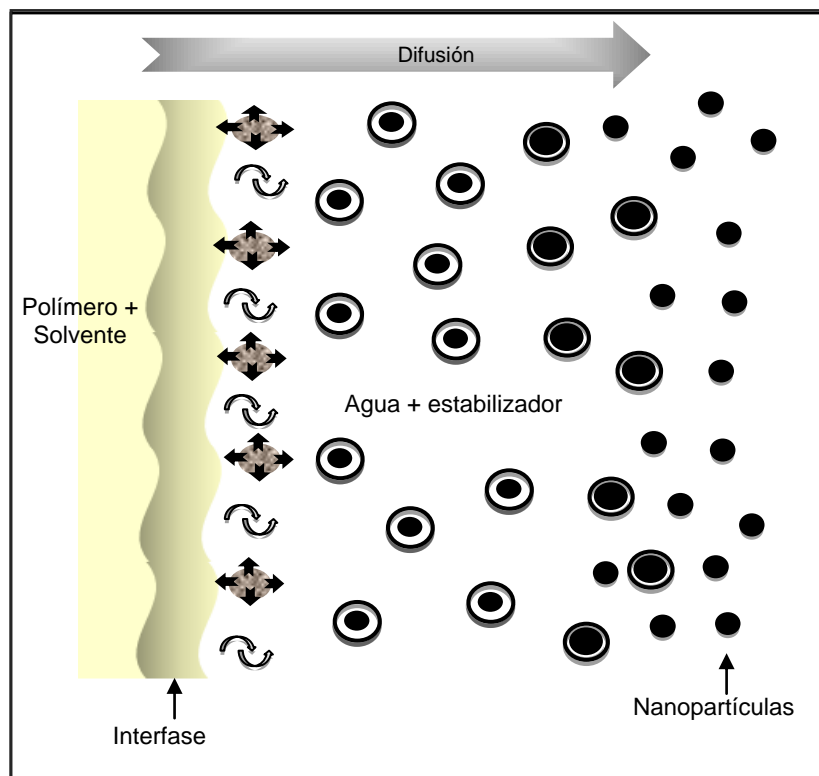


Figura 11. Mecanismo de formación de nanopartículas por el método de desplazamiento del solvente. (Imagen modificada de Quintanar-Guerrero et al., 1997).

2.9.4 Emulsificación-Difusión

El polímero es disuelto en el solvente (saturado en agua) y esta fase orgánica se emulsifica con agitación vigorosa en una solución acuosa que contiene el estabilizante. La subsecuente adición de agua al sistema causa que el solvente difunda hacia la fase externa, dando como resultado la formación de nanopartículas (Figura 12). Para el éxito de este método, el disolvente orgánico y el agua tienen que saturarse mutuamente a temperatura ambiente para asegurar el equilibrio termodinámico entre ambas fases. La técnica de emulsificación-difusión tiene ventajas como la obtención de altos rendimientos, proceso de fácil escalamiento, reproducibilidad de lote a lote y eficiencias de encapsulación buenas (Piñón-Segundo et al., 2005; Quintanar-Guerrero et al., 1998).

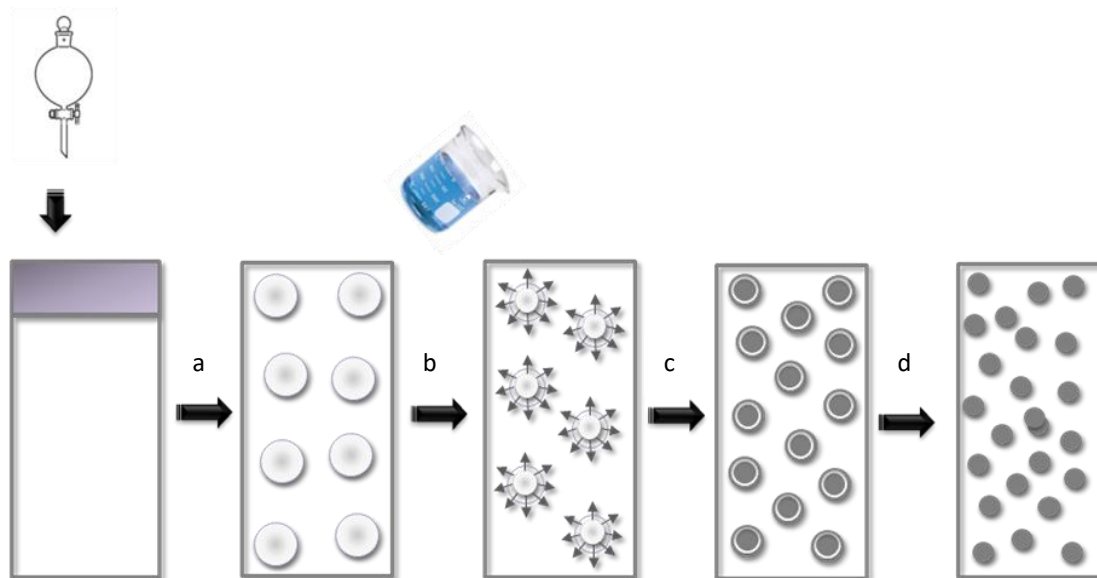


Figura 12. Mecanismo de formación de nanopartículas por el método de Emulsificación-Difusión. a) Emulsificación de las fases acuosa y oleosa, b) difusión del solvente a la fase externa, c) evaporación del solvente, d) formación de las nanopartículas. (Imagen modificada de Quintanar-Guerrero et al., 1997).

2.10 Sistemas nanoparticulados para el tratamiento de infecciones vaginales

A pesar de que existe una gran variedad de formas farmacéuticas convencionales para la administración vaginal de fármacos, la mayoría de estas presentan un bajo control de la liberación del fármaco una vez que llega al moco cervical, problema que restringe la absorción de fármacos con problemas de permeabilidad o estabilidad. Otra de las grandes limitantes es el bajo tiempo de permanencia de la forma farmacéutica en la cavidad vaginal a causa del flujo vaginal que interviene en el proceso de limpieza continua de la vagina (das Neves y Sarmiento, 2014).

Diversas investigaciones científicas han demostrado que el uso de nanoacarreadores de fármacos para administración vaginal brinda ventajas diversas, tales como: 1) Protección a moléculas susceptibles de la degradación, 2) Liberación controlada del fármaco, 3) Se puede direccionar la liberación del fármaco en un sitio específico, 4) Permite la adhesión al moco cervical y 5) Se puede lograr una penetración a través de la capa mucosal y/o lograr una entrega intracelular (das Neves et al., 2015).

La escala nanométrica de los sistemas portadores de fármacos brinda oportunidades únicas para la administración vaginal. Las mucinas, principales glicoproteínas del

epitelio vaginal crean una red tridimensional de canales acuosos en forma de malla con diámetros entre 50 nm y 1800 nm (Lai et al., 2010). El tamaño de abertura de la malla permite que los sistemas nanoacarreadores sean retenidos o atraviesen con rapidez esa red, estos fenómenos son dependientes de las propiedades de superficie y de la distribución del tamaño de partícula.

Las propiedades de superficie de los nanoacarreadores también tienen una gran importancia en su transporte a través del epitelio vaginal. La promoción de la mucoadhesión es deseable para retener partículas en mayor tiempo para contrarrestar el mecanismo de autolimpieza de la vagina. Los nanoacarreadores pueden interactuar mediante enlaces electrostáticos y/o covalentes con la mucina.

En los últimos años es notable el incremento de formulaciones nanoparticuladas para el transporte de fármacos, no obstante, aún es muy limitado el número de estos sistemas para el tratamiento de vaginitis. En la Tabla 3, se enlistan diferentes ejemplos de nanosistemas que se encuentran en investigación para el tratamiento de vaginitis, incluyendo liposomas, nanopartículas lipídicas sólidas, nanofibras y nanopartículas poliméricas.

Los liposomas son sistemas vesiculares compuestos de una capa fosfolipídica que encierran un núcleo acuoso. Dadas sus características anfífilas, los fármacos solubles en agua se pueden encapsular en el centro acuoso y los fármacos insolubles pueden ser retenidos en la bicapa lipídica. La composición fosfolipídica y su semejanza con la membrana celular les brinda a los liposomas las características de biodegradabilidad y biocompatibilidad (Refai et al., 2017). Los liposomas han sido los primeros sistemas nanoacarreadores utilizados para el tratamiento de vaginitis (Patel et al., 2009; Pavelić, et al., 2005). Sin embargo, una de las principales desventajas del uso de liposomas para la administración vaginal es su naturaleza líquida, generando un tiempo de retención corto en la vagina. Para contrarrestar este inconveniente, investigadores como Pavelić y colaboradores (2005), han preparado hidrogeles a base de carbomeros como vehículos para la administración vaginal de liposoma. Otros autores como Jøraholmen y colaboradores (2014), recubrieron liposomas con el polímero mucoadhesivo quitosán para mejorar el tiempo de residencia y la liberación de fármaco. Los liposomas ofrecen ventajas únicas para la administración vaginal, pero pueden presentar problemas de estabilidad al atravesar el epitelio. Dependiendo de la composición lipídica se puede presentar acumulación y/o obstrucción de la piel, así como rompimiento del sistema (Cevc et al., 2002).

Otros sistemas nanoacarreadores de fármacos para el tratamiento de la vaginitis son las nanopartículas lipídicas sólidas. Se clasifican en nanopartículas lipídicas sólidas (NLSs) y nanocápsulas lipídicas (NCLs). Las NLSs se encuentran constituidas únicamente por lípidos sólidos, mientras que las NCLs tienen una mezcla de lípidos sólidos y líquidos, ambos tipos de nanopartículas se han utilizado para la administración vaginal (Vanić y Škalko-Basnet, 2017).

Las NLSs ofrecen ventajas como el uso de excipientes aceptados por las agencias regulatorias, control de la liberación del fármaco, incorporación de fármacos hidrofílicos y lipofílicos, y factibilidad de escalamiento a nivel industrial de bajo costo (Müller et al., 2002). Se han diseñado diferentes sistemas lipídicos nanoparticulados con fármacos antimicóticos como clotrimazol (Cassano et al., 2016; das Neves et al., 2012; Esposito et al., 2013), ketokonazol (Cassano et al., 2016) y bifonazol (Garse et al., 2015). No obstante, las ventajas, los lípidos pueden sufrir transiciones polimórficas y cristalizarse. Este fenómeno puede originar liberación del fármaco durante el almacenamiento (das Neves et al., 2012).

Las nanopartículas poliméricas tienen grandes aplicaciones en la nanotecnología farmacéutica para la vectorización de moléculas activas debido a la posibilidad de obtener una funcionalización superficial, además del uso de polímeros biodegradables y biocompatibles. El desarrollo de nanopartículas poliméricas para aplicación vaginal inició con Olmsted y colaboradores (2001), quienes determinaron que nanopartículas de poliestireno de 59-1000 nm fueron capaces de ser retenidas en moco cervical humano debido a interacciones con mucinas. Posteriormente, Lai y colaboradores (2007) determinaron que el tamaño y química superficial de las nanopartículas poliméricas para la administración vaginal son factores importantes para su transporte efectivo a través del moco cervical. Nanopartículas de hasta 500 nm pueden distribuirse en el moco vaginal. En contraste, partículas de tamaño micrométrico no pueden difundir a través de los fluidos vaginales. Por otra parte, partículas con tamaño menor a 100 nm presentan un mayor obstáculo de transporte comparadas con partículas de tamaño de 200 nm (Lai et al., 2007). Estos investigadores determinaron que con la pegilación de nanopartículas de poliestireno de tamaño de 59-1000 nm se logra un mayor transporte a través del moco cervical a comparación de nanopartículas del mismo tamaño y/o sin funcionalizar. Similares resultados fueron reportados por Cu y Saltzman (2009), quienes determinaron que nanopartículas de PLGA pegiladas mostraron una velocidad de difusión en moco cervical 3-10 veces mayor, en comparación con las nanopartículas sin modificación.

Evaluada la capacidad de nanopartículas poliméricas para penetrar a través del moco cervical se han desarrollado plataformas con otros polímeros para el transporte de fármacos fungicidas. Santos y colaboradores (2013), diseñaron nanocápsulas mucoadhesivas de Eudragit® RS 100 para transportar clotrimazol obteniendo porcentajes de encapsulación del 93-97%. Plataformas biodegradables fueron utilizadas por Van de Ven y colaboradores (2012), quienes diseñaron nanopartículas biodegradables de PLGA para el transporte de anfotericina B; por otra parte, Rossi y colaboradores (2017) encapsularon amoxicilina con nanopartículas de ascorbato de quitosán.

Tabla 3. Sistemas nanoparticulados de administración vaginal para el tratamiento de infecciones.

| Naturaleza del sistema nanoparticulado | Fármaco | Eficiencia de encapsulación | Tamaño (nm) | Bioadhesión | Evaluación de Actividad microbicida | Tiempo de liberación (h) | Referencia |
|--|---------------------------|--|-------------|-------------|-------------------------------------|--------------------------|--------------------------|
| Liposomas | Clotrimazol, metronidazol | Clotrimazol: 64-71% Metronidazol: 5-7% | 277-305 | Si | No | 24 | Pavelić et al., 2005. |
| Liposomas | Clotrimazol | 16-23% | 100-200 | Si | No | 24 | Jøraholmen et al., 2014. |
| Nanopartículas sólidas lipídicas | Clotrimazol y ketoconazol | Ketoconazol: 33-35% Clotrimazol: 41-43% | 170-428 | No | Si | 12 | Cassano et al., 2016. |
| Nanopartículas sólidas lipídicas | Clotrimazol | 93.21-97.21% | 201 | Si | Si | 7 (38-49%) | Esposito et al., 2013. |
| Nanopartículas lipídicas sólidas | Bifonazol | 69.97-95.06% | 255-43 | No | Si | 10 (50%) | Garse et al., 2015. |

Tabla 3 (continuación). Sistemas nanoparticulados de administración vaginal para el tratamiento de infecciones.

| Naturaleza del sistema nanoparticulado | Fármaco | Eficiencia de encapsulación | Tamaño (nm) | Bioadhesión | Evaluación de Actividad microbiciada | Tiempo de liberación (h) | Referencia |
|--|--------------------------|-----------------------------|------------------------------------|-------------|--------------------------------------|--------------------------------------|---------------------------|
| Nanopartículas lipídicas sólidas | Clotrimazol | NLSs: 76-87% NC: 79-87% | NLSs: 100-600 nm NC: 100-200 NLSs: | No | No | En 24 h: NC: 56.6% NLSs: 42.5% | das Neves et al., 2012. |
| Polimérico: chitosan ascorbate | Amoxicilina trihidratada | 18-55% | 210-268 | Si | Si | -- | Rossi et al., 2017. |
| Polimérico: Eudragit RS 100 | Clotrimazol | 99.90% | 137-146 | Si | Si | 24 | Santos et al., 2013. |
| Polimérico: PLGA 50:50 | Anfotericina B | 54.3-63.4 % | 86-153 | No | Si | 2 (92-100%) | Van de Ven et al., 2012. |
| Polimérico: PLGA 50:50 | Péptido inhibidor de VIH | --- | 245 | Si | --- | 4 | Ariza-Sáenz et al., 2017. |
| Polimérico: PLGA 50:50/quitosán | Imiquimod | 57% | 213 | Si | — | — | Frank et al., 2017. |

Tabla 3 (continuación). Sistemas nanoparticulados de administración vaginal para el tratamiento de infecciones.

| Naturaleza del sistema nanoparticulado | Fármaco | Eficiencia de encapsulación | Tamaño (nm) | Bioadhesión | Evaluación de Actividad microbica | Tiempo de liberación (h) | Referencia |
|--|------------|-----------------------------|-------------|-------------|-----------------------------------|--------------------------|-------------------------|
| Polimérico: PLGA 50:50 | Tenofovir | 10.5% | 110 | Si | — | 24 | Machado et al., 2016. |
| Polimérico: PLGA 50:50 | Dapivirina | 90.2 % | 275 | Si | — | 24 | das Neves et al., 2015. |
| Polimérico: PCL/PEO-PPO-PEO | Dapivirina | 97.8 % | 185 | Si | — | — | das Neves et al., 2013. |

--- Dato no reportado. PLGA: Ácido poli(láctico-co-glicólico). PCL: Policaprolactona. PEO-PPO-PEO: Polímero tribloque: PEO: poli(óxido de etileno), PPO: poli(óxido de polipropileno), PEO: poli(óxido de etileno).

3.0 OBJETIVOS E HIPÓTESIS

3.1 *Objetivo general:*

Diseñar, preparar y caracterizar un sistema farmacéutico de liberación controlada con nanoesferas poliméricas para el tratamiento de vaginitis.

3.2 *Objetivos particulares:*

- a) Diseñar nanoesferas poliméricas biodegradables con características bioadhesivas de administración vaginal.
- b) Preparar las nanoesferas poliméricas a través de las técnicas de desplazamiento del solvente y/o emulsificación-difusión.
- c) Desarrollar un método de cuantificación para clotrimazol y fluconazol a partir de nanoesferas de PLGA-clotrimazol.
- c) Caracterizar fisicoquímicamente las nanoesferas a través de la determinación de: tamaño y morfología, características de superficie (potencial Z), y eficiencia de encapsulación y estudios de espectroscopía infrarroja.
- d) Realizar estudios de adsorción superficial de quitosán sobre nanoesferas de PLGA.
- d) Realizar perfiles de liberación *in vitro* del sistema de nanoesferas de PLGA en fluido vaginal simulado (FVS) pH= 4.2.
- e) Determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) de las nanoesferas poliméricas a través de la técnica de microdilución.
- f) Evaluar la mucoadhesión de las nanoesferas por medio del método de Mucina-Partícula.
- g) Evaluar la viabilidad celular de las nanoesferas obtenidas en un cultivo de células vaginales porcinas.

3.3 *Hipótesis*

Si es posible preparar nanoesferas poliméricas por el método de desplazamiento del solvente o emulsificación-difusión, cargarlas con un principio activo antimicótico, y modificarlas superficialmente con un polímero mucoadhesivo; entonces será posible generar un sistema de liberación modificada con mayor tiempo de permanencia en la vagina y una mayor eficiencia microbicida para el tratamiento de vaginitis.

4.0 METODOLOGÍA

4.1 Reactivos

Acetato de etilo A.C.S. (Fermont[®], México)

Acetona A.C.S. (Fermont[®], México)

Ácido acético glacial (IDQ, México)

Ácido bórico A.C.S. (Sigma Aldrich[®], USA)

Ácido clorhídrico A.C.S. (J.T. Baker, México)

Ácido láctico (Farmacia París, México)

Ácido poli (láctico-co-glicólico) PLGA 50:50 (Sigma Aldrich[®], USA)

Alcohol polivinílico Mowiol[®] 4-88 (Glomarza, México).

Cloruro de sodio (Farmacia París, México)

Clotrimazol (Fabrica Italiana Sintetici S.p.A; Lote 37)

Fluconazol (Glenmark Pharmaceuticals LTD; Lote A88016005)

Glicerol (Farmacia París, México)

Glucosa (Farmacia París, México)

Hidróxido de calcio (Farmacia París, México)

Hidróxido de sodio en hojuelas (Fermont[®], México)

Hidróxido de potasio (Farmacia París, México)

Lauril Sulfato de sodio (Farmacia París, México)

Quitosán (75-85% desacetilado) PM 50,000-190,000 (Sigma Aldrich[®], USA)

Urea (Farmacia París, México)

Yodo A.C.S. (Sigma Aldrich[®], USA)

Yoduro de potasio A.C.S. (grado reactivo, Sigma Aldrich[®])

4.2 Aparatos y Equipos

Balanza analítica VE-204 (Velab[®], México)

Baño de agua con agitación Dubnoff (QUIMIS[®], Brasil)

Espectrofotómetro UV-Vis Genesys[®] 10S (Thermo Scientific, USA)

Espectrofotómetro de Infrarrojo IR 100 (Perkin Elmer[®], USA).

Liofilizadora de mesa (Labconco[®], USA)

Microscopio de Fuerza Atómica MultiMode 8 (Bruker[®], USA)

Parrilla eléctrica con agitación RT10 (IKA[®], USA)

Rotavapor[®] R 210 (BUCHI[®], Suiza)

Recirculador de líquidos con termostato (Polyscience[®], USA)

Potenciómetro pH/ORP Meter, HI2211 (Hanna[®] Instrument, México)

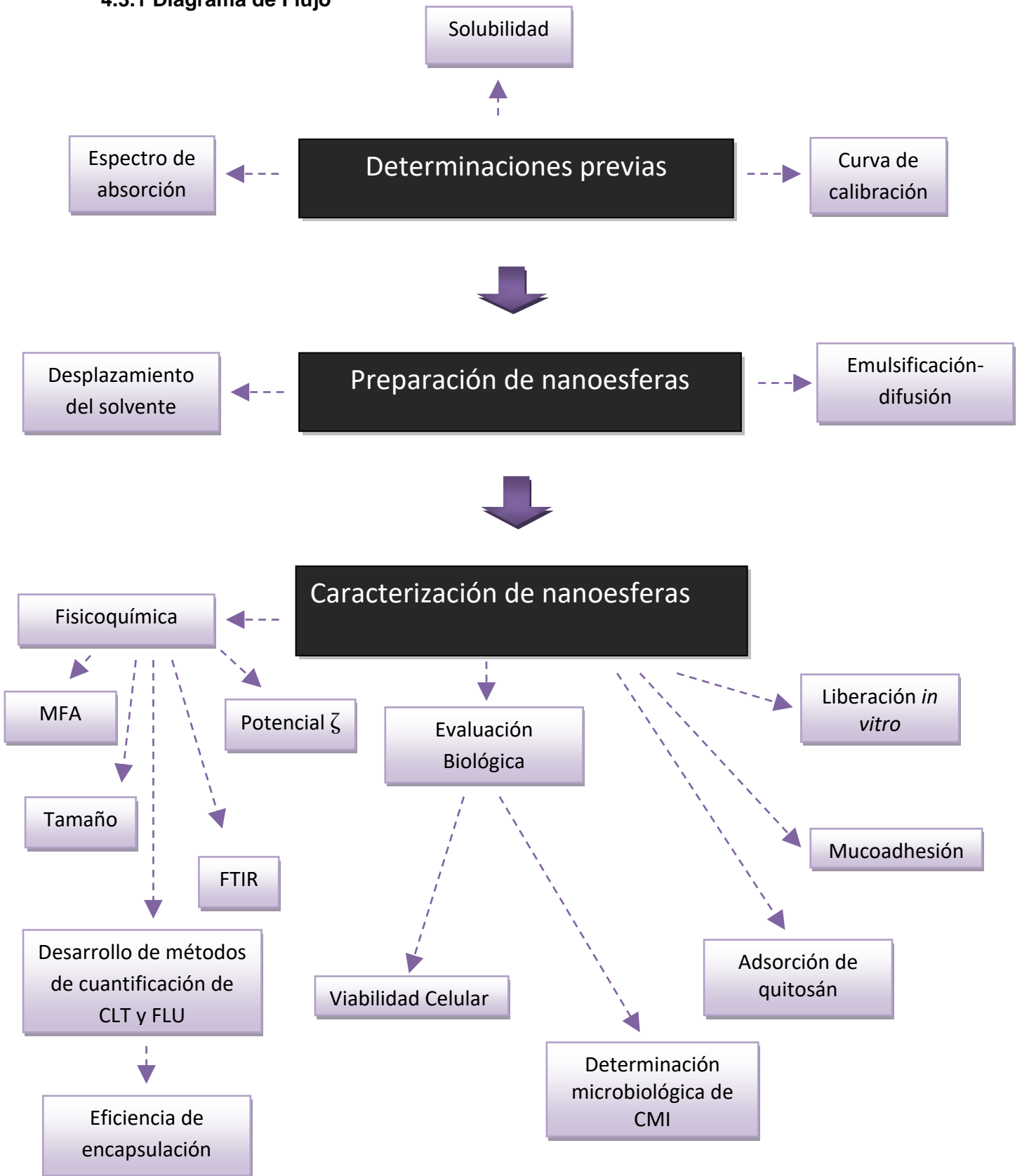
Ultracentrífuga Optima LE-80K (Beckman[®], USA)

Ultra-Turrax[®] T25 (IKA[®], USA)

Zetasizer Nano ZS90 (Malvern[®], U.K.)

4.3 Parte Experimental

4.3.1 Diagrama de Flujo



4.3.2 Determinaciones previas

4.3.2.1 Determinación de solubilidades cualitativas de clotrimazol y fluconazol en medios orgánicos e inorgánicos.

Para determinar la solubilidad cualitativa, 10 mg de fármaco fueron agregados en 10 ml de solventes orgánicos (acetona y acetato de etilo) y en medios acuosos (soluciones amortiguadoras de acetatos 0.1 M (pH= 3.5, pH= 4.5, pH= 5.5) y FVS pH=4.2 y lauril sulfato de sodio (LSS) al 0.5% p/v). Posteriormente se observó si el fármaco se disolvió completamente o no en cada uno de los medios. La composición química de la solución FVS se muestra en el Anexo 2.

4.3.2.2 Determinación cuantitativa de la solubilidad de clotrimazol y fluconazol

Para determinar los espectros de absorción de clotrimazol y fluconazol en UV-Vis, se solubilizaron 10 mg de clotrimazol o fluconazol en 10 ml FVS pH=4.2 con LSS al 0.5% p/v. Se obtuvieron los espectros de absorción para cada solución en un rango de longitudes de onda de 200 a 400 nm. A partir de los espectros, se determinaron las longitudes de máxima absorción (λ_{\max}) de clotrimazol y fluconazol.

Se determinó el punto de saturación de 10 ml de una solución de FVS con LSS al 0.5% p/v; para esto se hicieron adiciones sucesivas de 5 mg de fármaco (clotrimazol o fluconazol) hasta observar la presencia de cristales. Después cada solución se filtró a través de una membrana de 0.22 μm y se determinó la absorbancia del filtrado de clotrimazol a 265 nm y la de la solución de fluconazol a 261 nm.

4.3.2.3 Curvas de calibración

Se construyeron curvas de calibración de clotrimazol y fluconazol para obtener cuantitativamente las cantidades solubilizadas en el medio de disolución.

a) Curvas de Calibración de clotrimazol y fluconazol: Se preparó una solución *stock* de concentración 50 mg/ml de fármaco. Se prepararon sistemas 1:10, 3:10, 5:10, 7:10 y 9:10 a partir de la solución *stock* y se llevaron al aforo con FVS en LSS al 0.5% p/v. Cada sistema se preparó por triplicado determinando su absorbancia a una λ_{\max} de 265 nm para clotrimazol y λ_{\max} de 261 nm para fluconazol.

b) Curva de calibración del complejo PVAL-H₃BO₃-I₂-KI: A partir de una solución *stock* de concentración de 550 µg /ml, se prepararon sistemas 1:10, 3:10, 5:10, 7:10 y 9:10 con la solución *stock* y se llevaron al aforo con agua desionizada. Se tomó 1 ml de cada nivel de concentración y se llevó a un aforo de 5 ml con agua desionizada. A cada sistema se adicionaron 2 ml de H₃BO₃ 0.65 M y 1 ml de I₂ 0.05 M en KI 0.15 M para formar el complejo colorido. Se utilizó como blanco un sistema 5 ml de agua desionizada, 2 ml de H₃BO₃ 0.65 M y 1 ml de I₂ 0.05 M en KI 0.15 M. Se obtuvieron los valores de absorbancia a una λ_{\max} de 640 nm.

c) Curva de la calibración del complejo ninhidrina-quitosán: A partir de una solución *stock* de quitosán de concentración 0.8 mg/ml se prepararon sistemas 1:10, 2:10, 3:10, 4:10 y 5:10 que fueron llevados al aforo con ácido acético al 0.5% (v/v). Para formar el complejo ninhidrina-quitosán, se adicionaron 0.5 ml del reactivo de ninhidrina a 1 ml de cada solución de quitosán. Los sistemas se mantuvieron en baño maría con temperatura de 90 °C durante 10 min. Los sistemas se dejaron enfriar a temperatura ambiente y se les adicionaron 10 ml de la mezcla etanol-agua (50:50). Se determinó la absorbancia por triplicado a una λ_{\max} de 572 nm en un espectrofotómetro UV-visible.

4.3.3 Desarrollo de los métodos analíticos para la cuantificación de clotrimazol y fluconazol

4.3.3.1 Especificidad del método

La especificidad se valoró con la comparación de los espectrogramas UV-Vis de soluciones del fármaco y de cada uno de los componentes químicos del sistema analítico de forma individual y como mezcla física. Se considera el método específico si la respuesta obtenida (absorbancia), se atribuye únicamente del analito (clotrimazol o fluconazol).

4.3.3.2 Linealidad del método

La linealidad se evaluó con la obtención del parámetro r^2 de la curva de calibración descrita en el apartado 4.3.2.3. El método se considera lineal si el valor de r^2 es ≥ 0.98 , el intercepto igual a 0 y coeficiente de variación (%C.V.) ≤ 3 %.

4.3.3.3 Exactitud del método

La exactitud se determinó con 6 réplicas de tres niveles de concentración de clotrimazol. Se analizaron los valores de porcentaje de recobro $98 \% \leq x \leq 102 \%$ y $\%C.V. \leq 3\%$

4.3.3.4 Repetibilidad del método

Se compararon tres niveles de concentración evaluados en tres días por un analista. Se analizó el $\% C.V. \leq 3\%$.

4.3.3.5 Límites de cuantificación y detección del método

Se prepararon cinco niveles de concentración considerando la obtención de respuestas 10 veces menores a las obtenidas en las descritas en el punto 4.3.2.3. Se analizó si r^2 es ≥ 0.98 , el intercepto es igual a 0 y el coeficiente de variación ($\%C.V.$) es $\leq 3\%$.

4.3.4 Preparación de nanoesferas

4.3.4.1 Preparación de nanoesferas de PLGA-clotrimazol (NEs-PLGA-CLT) y nanoesferas PLGA-fluconazol (NEs-PLGA-FLU) por el método de desplazamiento del solvente.

Se preparó una fase orgánica con 100 mg de PLGA y 20 mg de fármaco disueltos en 20 ml de acetona. Se adicionó la fase orgánica bajo goteo constante a los 60 ml de la fase acuosa (PVAL al 0.5% p/v) y agitación utilizando un homogenizador de alta velocidad Ultra-Turrax[®] T-25 (IKA, USA) de 6000 rpm. Bajo estas condiciones de agitación, se mantuvo el sistema durante 10 minutos. Posteriormente, el sistema se evaporó a presión reducida para eliminar el solvente orgánico y una parte de agua. El sistema se centrifugó a 20000 rpm durante 20 minutos; el procedimiento se realizó dos veces para retirar el PVAL. Las nanoesferas se redispersaron en un volumen no mayor a 20 ml con agua desionizada y se liofilizaron.

4.3.4.2 Preparación de NEs-PLGA-CLT y NEs-PLGA-FLU por el método de emulsificación difusión

En este caso, la fase orgánica se preparó con 100 mg de PLGA y 20 mg de fármaco disueltos en 20 ml de acetato de etilo saturado previamente con agua. Bajo una agitación de 6000 rpm utilizando un homogenizador de alta velocidad, la fase orgánica se adicionó a 40 ml de fase acuosa (PVAL al 0.5% p/v disuelto en agua saturada con acetato de etilo). El sistema permaneció en las mismas condiciones de agitación durante 10 minutos. Pasado ese tiempo, se adicionaron 160 ml de agua desionizada al sistema, y se mantuvo la agitación durante 5 minutos más bajo las mismas condiciones. Se evaporó el solvente y parte del agua en un rotaevaporador a presión reducida, posteriormente se centrifugó el sistema a 20000 rpm durante 20 minutos, el proceso se realizó dos veces para eliminar el exceso de PVAL. Finalmente se liofilizó la pastilla de nanoesferas.

Los sistemas que fueron preparados se resumen en la Tabla 4.

Tabla 4. Metodologías utilizadas para la preparación de NEs-PLGA-CLT y NEs-PLGA-FLU.

| Sistema | No. De lote | Método de preparación |
|--------------|-------------|-----------------------------|
| NEs-PLGA-CLT | 1 | Desplazamiento del solvente |
| NEs-PLGA-CLT | 2 | Emulsificación-difusión |
| NEs-PLGA-FLU | 3 | Desplazamiento del solvente |
| NEs-PLGA-FLU | 4 | Emulsificación-difusión |

4.3.5 Caracterización de NEs-PLGA-CLT y NEs-PLGA-FLU

4.3.5.1 Tamaño de partícula y potencial Z

Se determinó el tamaño de partícula promedio, la distribución del tamaño de partícula, así como el índice de polidispersión con un contador electrónico Zetasizer Nano ZS90 Malvern®. Para todos los lotes de nanoesferas analizados se utilizó como medio de

dispersión agua desionizada. Las lecturas se realizaron a 25°C y un ángulo de incidencia de 90°. Las determinaciones se realizaron por triplicado preparando diluciones de una suspensión acuosa de nanoesferas.

4.3.5.2 Determinación de PVAL residual en NEs-PLGA-CLT y NEs-PLGA-FLU

Se realizó una hidrólisis ácida con HCl 1.3 M durante 48 horas a muestras de nanoesferas de 5-10 mg. Los sistemas se neutralizaron con NaOH 2.5 M. El sistema se llevó a un aforo de 10 ml con agua destilada y se filtró. De la solución filtrada se tomó 1 ml y se llevó a un aforo de 5 ml con agua destilada. Al sistema anterior se adicionaron 2 ml de H₃BO₃ 0.65 M y 1 ml de I₂ 0.05 M en KI 0.15 M para formar el complejo colorido de PVAL- H₃BO₃-I₂. El sistema se leyó espectrofotométricamente a λ= 640 nm, la absorbancia obtenida se interpoló en la curva de calibración para obtener la concentración del sistema.

4.3.5.3 Cuantificación de fármaco en NEs-PLGA-CLT y NEs-PLGA-FLU

Muestras de 5-10 mg de nanoesferas se hidrolizaron con 3 ml de HCl 1.3 M durante 48 horas. Posteriormente, las muestras se neutralizaron con NaOH 2.5 M. Cada sistema se llevó a un aforo de 10 ml de FVS en LSS al 0.5% p/v y se mantuvo en agitación durante 4 horas. Los sistemas se filtraron con una membrana de 0.22 μm. Se determinó la absorbancia de los sistemas a λ=261 nm para el fluconazol y λ=265 nm para el clotrimazol. La cantidad de fármaco cargado se obtuvo a través de la siguiente fórmula:

$$\% F.C. = \frac{C.F.N}{C.F.I.} * 100 \dots\dots\dots \text{Fórmula (5)}$$

Donde F.C., es la cantidad de fármaco cargado en las nanoesferas; C.F.N., es la cantidad de fármaco cargado en las nanoesferas; C.F.I., es la cantidad de fármaco inicial.

4.3.5.4 Determinación del porcentaje de eficiencia de encapsulación (%E.E.) de clotrimazol y fluconazol en NEs-PLGA-CLT y NEs-PLGA-FLU

El porcentaje de encapsulación se determinó de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$\% E.E. = \frac{\% F.C.}{\% F.I. - (1 - F.PVAL)} * 100 \dots\dots\dots \text{Fórmula (6)}$$

Donde E.E., es la eficiencia de encapsulación del fármaco; F.C., es la cantidad de fármaco cargado en las nanoesferas; F.I., es la cantidad de fármaco inicial incorporada en las nanoesferas y F. PVAL es la fracción de PVAL residual.

4.3.5.5 Preparación de NEs-PLGA-CLT modificadas en la superficie con quitosán (NEs-PLGA-CLT-QTS)

Dado que el clotrimazol fue seleccionado debido a una mayor eficiencia de encapsulación, se decidió trabajar únicamente con las nanopartículas con este fármaco para modificar su superficie con quitosán.

Para poder adsorber quitosán sobre NEs-PLGA-CLT, se aplicaron dos diferentes métodos. En el primero se incorporó el quitosán en la fase acuosa durante la preparación de las NEs-PLGA-CLT; en el segundo método, el quitosán fue adicionado después de que las NEs-PLGA-CLT se formaron. Las nanoesferas con quitosán fueron codificadas como NEs-PLGA-CLT –QTS.

Metodología 1.- Se preparó la fase orgánica con 100 mg de PLGA y 20 mg de clotrimazol en 20 ml de acetato de etilo previamente saturado con agua. Para la preparación de la fase acuosa, se adicionaron 0.5 ml de ácido acético concentrado a 40 ml de PVAL al 0.5% p/v para disolver 20 mg de quitosán. La fase orgánica fue adicionada a la fase acuosa con agitación magnética a 8000 rpm utilizando un homogenizador de alta velocidad. La agitación se mantuvo durante 10 minutos. Posteriormente, se adicionaron 160 ml de agua al sistema y se continuó con la agitación a 8000 rpm durante 5 minutos más. Se evaporó el solvente y la mayor cantidad posible de agua bajo presión reducida en un rotaevaporador. Las nanoesferas fueron recuperadas con dos procesos consecutivos de ultracentrifugación para eliminar el PVAL residual de las nanoesferas. Finalmente, las nanoesferas se liofilizaron durante 48 horas.

Métodología 2.- Se sigue el mismo procedimiento que el método 1, la variante es que las nanoesferas una vez centrifugadas, se redispersaron con 40 ml de una solución acética de quitosán de concentración 0.5 mg/ml. El sistema se mantuvo en agitación magnética durante 24 horas para después ser centrifugado y liofilizar las nanoesferas.

4.3.6 Caracterización de NEs-PLGA-CLT-QTS

4.3.6.1 Tamaño de partícula y potencial Z de NEs-PLGA-CLT-QTS

El tamaño de partícula y determinación de potencial Z se realizaron conforme a la metodología descrita en el punto 4.3.5.1.

4.3.6.2 Determinación de PVAL residual en NEs-PLGA-CLT-QTS

La determinación de PVAL, se realizó de acuerdo con la metodología descrita en el punto 4.3.5.2.

4.3.6.3 Cuantificación de clotrimazol en NEs-PLGA-CLT-QTS

La cantidad de clotrimazol a partir de NEs-PLGA-CLT-QTS fue determinada siguiendo la metodología marcada en el punto 4.3.5.3.

4.3.6.4 Determinación del porcentaje de eficiencia de encapsulación de clotrimazol en NEs-PLGA-CLT-QTS

El porcentaje de eficiencia de encapsulación se determinó de acuerdo con la fórmula planteada en el punto 4.3.5.4.

4.3.6.5 Cuantificación de quitosán adsorbido en NEs-PLGA-CLT-QTS

A una muestra de NEs-PLGA-CLT-QTS de aproximadamente 5-10 mg se le adicionó 10 ml de ácido acético al 0.5% v/v y se mantuvo en agitación durante 48 h. Posteriormente el sistema se filtró con una membrana de 0.22 μm . Se tomaron 0.5 ml del filtrado y se mezclaron con 0.25 ml de reactivo de ninhidrina en un tubo de cultivo con rosca y se colocó en baño maría a 90°C durante 10 minutos. El sistema se retiró

del baño y se dejó enfriar hasta alcanzar temperatura ambiente. Posteriormente, se adicionaron 3 ml de una mezcla alcohol etílico-agua 50:50 y se determinó la absorbancia del complejo a 572 nm.

El porcentaje de quitosán adsorbido se determinó partir de la siguiente ecuación:

$$\%Q.A. = \frac{C.Q.N}{C.Q.I.} * 100 \dots\dots\dots \text{Fórmula (7)}$$

Donde Q.A. es la cantidad de quitosán adsorbido; C.Q.N, es la cantidad de quitosán en las nanoesferas y C.Q.I., es la cantidad de quitosán inicial.

4.3.6.6 Análisis de Espectroscopía de Infrarrojo (FTIR)

Se realizaron mediciones de muestras en estado sólido de CTS, CLT, NEs-PLGA, NEs-PLGA-CLT y NEs-PLGA-CLT-QTS. Se utilizó un FTIR Spectrometer 100 (Perkin Elmer®, EE. UU.). Aproximadamente 10 mg en estado sólido de cada muestra fueron escaneados a una frecuencia de 400-4000 cm⁻¹ a 25 °C.

4.3.7 Estudio de adsorción de quitosán sobre nanoesferas de NEs-PLGA-CLT

Se preparó un lote de nanoesferas de PLGA-clotrimazol con la metodología de emulsificación-difusión mediante el procedimiento marcado en el apartado 4.3.4.2. Una vez retirado el PVAL por centrifugación, las nanoesferas se resuspendieron con 100 ml de agua desionizada. Se tomaron alícuotas de 10 ml de nanoesferas y a cada alícuota se adicionaron 0.5, 1, 2, 3, 4, 5, 6 y 7 ml de una solución de quitosán de concentración 4 mg/ml. Los sistemas se llevaron a un volumen final de 20 ml con agua desionizada y se dejaron en agitación magnética durante 24 horas. Se centrifugaron los sistemas a 18000 rpm durante 20 minutos. Se determinó la distribución de tamaño de partícula y potencial Z a las nanoesferas obtenidas. Finalmente, cada lote de nanoesferas se liofilizó.

Se determinó la cantidad de quitosán adsorbido en los lotes preparados siguiendo la metodología descrita en el punto 4.3.6.5. Los resultados obtenidos se ajustaron en los modelos de adsorción siguientes:

Ecuación de Langmuir: $\frac{C_e}{q} = \frac{1}{bq_m} + \frac{C_e}{q_m}$ Formula (8)

Ecuación de BET: $\frac{C_e}{q(1 - C_e)} = \frac{1}{bq_m} + \frac{b-1}{bq_m} C_e$ Fórmula (9)

Ecuación de Freundlich: $\log q = \log k + \frac{1}{n} \log C_e$ Fórmula (10)

Ecuación de Halsey: $\ln q = \frac{1}{n} \ln k - \frac{1}{n} \ln(-\ln C_e)$ Fórmula (11)

Ecuación de Henderson: $\ln[-\ln(1 - C_e)] = \ln k + n \ln q$ Fórmula (12)

Ecuación de Smith: $q = W_b - W_a \ln(1 - C_e)$ Fórmula (13)

Donde: q= cantidad adsorbida de quitosán por unidad de peso de nanoesferas de PLGA (mg/g; mol/g); Ce= Concentración de quitosán en el equilibrio (mg/l; mol/l); b, q_m, k, n, W_a, W_b son constantes de adsorción de cada modelo.

4.3.8 Estudios de liberación *in vitro* de NEs-PLGA-CLT y NEs-PLGA-QTS

Los estudios de liberación *in vitro* se realizaron utilizando bolsas de diálisis y manteniendo las nanoesferas bajo condiciones sink ($C < 0.15 C_s$, donde la solubilidad de clotrimazol en el medio de disolución $C_s = 0.7620$ mg / ml). Muestras de aproximadamente 0.85 mg de clotrimazol, 14-18 mg de NEs-PLGA-CLT y NEs-PLGA-CLT-QTS (equivalentes a 3 mg de fármaco), se resuspendieron en 5 ml de medio de disolución (FVS pH= 4.2 con LSS al 0.5% p/v). Las muestras se colocaron en una bolsa de diálisis de peso molecular 6000-8000 Da. Las bolsas de diálisis fueron selladas y colocadas dentro de un vial con 30 ml de medio de disolución. Los sistemas

se mantuvieron bajo agitación de 500 rpm y temperatura de 37°C. Se tomaron alícuotas de 1 ml, volúmenes reemplazados por 1 ml de medio de disolución fresco a tiempos determinados. Los estudios se realizaron por triplicado. Se evaluó el ajuste de los datos obtenidos a los modelos de orden cero, primer orden, Hixon-Crowell, Weibull, Higuchi y Peppas (Fredenberg et al., 2011; Siepmann y Peppas, 2011).

4.3.9 Desarrollo del método microbiológico para determinar la CMI de NEs-PLGA-CLT y NEs-PLGA-CLT-QTS contra *Candida albicans*

Se prepararon diluciones de NEs de acuerdo con la metodología descrita por el Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) M27-A3 (Cantón et al., 2007). El método utilizado fue el de cilindro-placa. El agar utilizado fue el dextrosa saboraud como medio selectivo para *Candida albicans*. Se determinaron los parámetros de linealidad, exactitud, repetibilidad, reproducibilidad y límite de cuantificación, de acuerdo con el siguiente procedimiento:

4.3.9.1 Preparación del inóculo

Se tomó una muestra de cultivo de 5 colonias de *Candida albicans* ≥ 1 mm y de 24 h de crecimiento en placa de agar dextrosa sabouraud. La muestra se resuspendió en un tubo de cultivo con solución salina estéril (NaCl 0.85%). El sistema se agitó y se ajustó a la densidad óptica de 0.5 McFarland, añadiendo la cantidad necesaria de solución salina (1×10^6 - 5×10^6 UFC/ml).

4.3.9.2 Inoculación de las placas

Se inocularon las placas de manera uniforme con un aplicador de algodón impregnado con la suspensión del inóculo. Las placas se dejaron secar de 5-10 minutos con la placa entreabierta en zona estéril. Posteriormente se colocaron discos de papel filtro de 0.6 mm de diámetro. Se adicionaron 10 μ l de soluciones metanólicas de clotrimazol con las concentraciones evaluadas (Tabla 5). Las placas se incubaron a 35°C durante 24-48 h. Se midió el halo de inhibición para determinar la reducción del crecimiento.

4.3.9.3 Preparación de la solución stock de clotrimazol

Se pesaron 5 mg de clotrimazol y se llevaron a un aforo de 50 ml en una mezcla de metanol agua 3:1. La concentración final de la solución stock de clotrimazol fue de 0.10 mg/ml.

4.3.9.4 Linealidad del método

La linealidad del sistema se evaluó a través de una curva de calibración con 6 niveles de concentración de clotrimazol. Cada nivel de concentración se evaluó por triplicado en tres diferentes días. Los sistemas de linealidad se prepararon en un rango de concentraciones de 15-60 µg/ml.

4.3.9.5 Repetibilidad del método

La repetibilidad se evaluó con la preparación de los sistemas con tres niveles de concentración (15,20 y 25 µg/ml). Se evaluó por sextuplicado en tres días diferentes.

4.3.9.6 Reproducibilidad del método

La evaluación de la reproducibilidad se desarrolló bajo la misma metodología que la repetibilidad, pero el procedimiento fue realizado por un segundo analista.

4.3.9.7 Exactitud del método

La exactitud del sistema se evaluó con la obtención del valor promedio de las determinaciones en cada nivel de concentración de los datos obtenidos de repetibilidad y reproducibilidad.

4.3.9.8 Límites de cuantificación y detección del método

El límite de cuantificación se determinó a través de una curva de calibración con 5 niveles de concentración de clotrimazol. Cada nivel de concentración se evaluó por sextuplicado en tres diferentes días. El rango de concentraciones fue de 5-30 µg/ml.

4.3.10 Determinación de la CMI de NEs-PLGA-CLT y NEs-PLGA-CLT-QTS

Se tomaron 5 colonias de tamaño ≥ 1 mm con crecimiento de 24 h y se resuspendieron en una solución salina estéril (NaCl 0.9% p/v). La densidad óptica se ajustó a una turbidez de 0.5 de McFarland. Esta suspensión se inoculó en una placa con medio agar dextrosa sabouraud. Sobre las placas se depositaron discos de papel filtro de diámetro de 6 mm, y sobre estos se aplicaron 20 μ l de soluciones y/o dispersiones metanólicas de muestras de clotrimazol y NEs-PLGA, NEs-PLGA-CLT y NEs-PLGA-CLT-QTS (rango de 0 - 30 μ g/ml). Las placas se incubaron a 37°C durante 24 y al termino se determinó la zona de inhibición de cada disco. Las pruebas se realizaron por triplicado.

4.3.10.1 Preparación de la solución *stock* de NEs-PLGA-CLT y NEs-PLGA-CLT-QTS

Muestras de nanoesferas equivalentes a 1 mg de clotrimazol se dispersaron y llevaron a un aforo de 10 ml con una mezcla de metanol agua 3:1.

4.3.10.2 CMI de NEs-PLGA-CLT y NEs-PLGA-CLT-QTS

Se determinó a través de la evaluación de la inhibición del crecimiento, con 5 niveles de concentración de clotrimazol contenidos en NEs-PLGA-CLT y NEs-PLGA-CLT-QTS mostrados en la Tabla 5.

Tabla 5. Niveles de concentración de clotrimazol utilizados para determinar la CMI de nanoesferas contra *Candida albicans*.

| No. Sistema | Solución <i>stock</i> (ml) | Mezcla metanol-agua 3:1 (ml) | Concentración de clotrimazol (mg/ml) |
|-------------|----------------------------|------------------------------|--------------------------------------|
| 1 | 1.5 | 3.5 | 0.030 |
| 2 | 1.0 | 4.0 | 0.020 |
| 3 | 0.5 | 4.5 | 0.010 |
| 4 | 0.25 | 4.75 | 0.005 |
| 5 | 0.05 | 4.95 | 0.001 |

4.3.11 Prueba de mucoadhesión por el método Mucina-Partícula para NEs-PLGA, NEs-PLGA-CLT y NEs-PLGA-CLT-QTS y mucina.

La mucoadhesión de las NEs-PLGA, NEs-PLGA-CLT y NEs-PLGA-CLT-QTS se evaluó por medio del método Mucina-Partícula (Mucin Particle Method), basado en la medición del cambio en el tamaño de partícula o potencial Z de partículas de mucina con dispersiones de polímeros (das Neves, et al., 2012; Takeuchi, et al., 2005). Se prepararon 40 ml de dispersiones de mucina de concentraciones 0.1 y 1 % p/v en Fluido Vaginal Simulado pH=4.2. Las dispersiones se mantuvieron en condiciones de temperatura de 37°C y agitación de 150 rpm/min durante 24 horas. Posteriormente, las dispersiones se sonicaron durante 5 minutos a una intensidad de 40 % y frecuencia de 26 KHz y se centrifugaron a 5000 rpm durante 25 min. Se obtuvieron los sobrenadantes y les determinó tamaño de partícula y potencial Z por triplicado. Se tomaron 5 ml de cada dispersión y se adicionaron NEs-PLGA, NEs-PLGA-CLT y NEs-PLGA-CLT-QTS (0.1% p/v). Los sistemas se mantuvieron a temperatura de 37°C y agitación de 150 rpm/min durante 2 horas y, finalmente, se determinó tamaño de partícula y potencial Z por triplicado.

4.3.12 Estudio de Microscopía de Fuerza Atómica para determinar la morfología y mucoadhesión de NEs-PLGA, NEs-PLGA-CLT y NEs-PLGA-CLT-QTS con mucina.

Se realizaron estudios de MFA para evaluar la morfología de NEs-PLGA, NEs-PLGA-CLT y NEs-PLGA-CLT-QTS. Una muestra de aproximadamente 5 mg de cada lote se dispersó con agua desionizada. Alicuotas de 5 µl de cada muestra se depositó sobre un cubreobjetos. Las muestras se dejaron secar a temperatura ambiente durante 24 h. El análisis de las muestras se realizó utilizando el modo de *tapping* a una velocidad de barrido de 1 Hz. El *cantilever* utilizado fue RTSPA. El área de imagen fue de 10 µm². Para el tratamiento de las muestras, se utilizó el software MULTIMODE 8 con NanoScope Analysis ver 1.5 (Bruker Instruments, USA).

4.3.13 Elaboración del modelo celular porcino para la evaluación de la viabilidad celular de NES-PLGA, NES-PLGA-CLT y NES-PLGA-CLT-QTS

- a) Obtención de la muestra. Se obtuvieron 3 muestras de vaginas de cerda en un rastros autorizado por SAGARPA. La muestra se introdujo en una caja térmica con hielo y con una solución de 2 litros de solución de Dulbecco y penicilina al 1%.
- b) Preparación del cultivo primario. Se obtuvo el tejido vaginal, con todas las condiciones de asepsia en una campana de flujo de aire laminar, se colocó el órgano en solución salina de fosfatos (SSF) con 100 UI/mL de penicilina. Se preparó el tejido en placas de Petri, lavándolo varias veces con SSF con antibiótico. Ubicada (Figura 13) y seleccionada el área del ectocervix porcino, se fragmentó en piezas pequeñas de 1 cm². Se colocaron 5 piezas en una placa de Petri con 1 ml de medio Ham F-10 suplementado con 10 % de suero bovino fetal (SBF). Las muestras se incubaron a 37 °C en atmósfera de 0.5 % de CO₂, hasta que las piezas se adhirieran al soporte. Después se añadió medio de cultivo Ham F-12 hasta completar 20 ml. Se realizaron cambios de medio de cultivo (Ham F-12 suplementado con 10 % de SBF) a las 24 h para eliminar los detritos celulares y se dejaron crecer bajo las mismas condiciones.

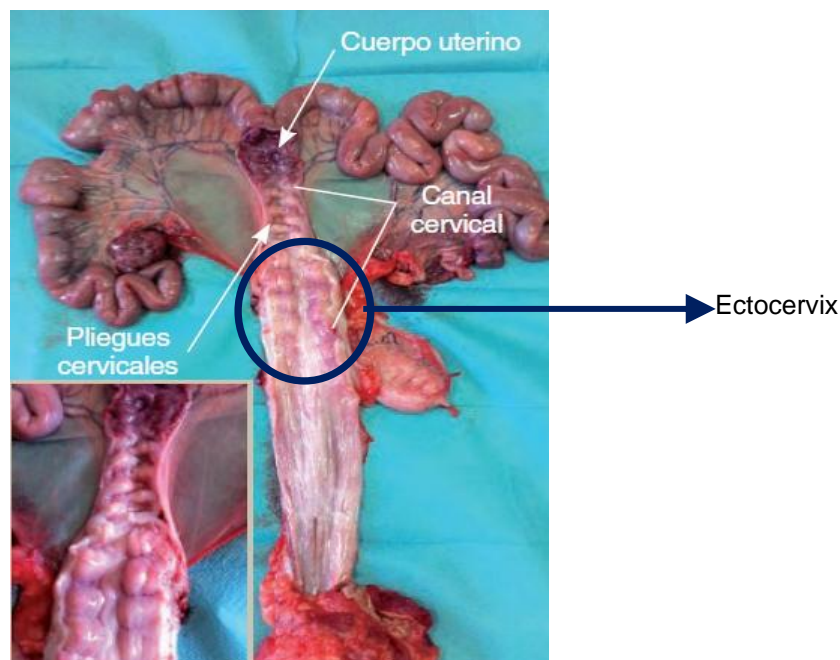


Figura 13. Fotografía del aparato sexual porcino. (Imagen tomada de Martínez et al., 2016).

Después de 72 horas de incubación, se realizó cambio de medio de cultivo a las muestras (pase). A partir del tercer pase, las células se disgregaron, se diluyeron y pasaron 1 ml de la muestra a una caja de Petri y se adicionaron 20 ml de medio de cultivo HAM F-12, con SBF y penicilina. Se tomaron muestras para observar en microscopía óptica. A partir del décimo pase se observaron bajo microscopía invertida.

4.3.14 Determinación de la viabilidad celular administrando NEs-PLGA, NEs-PLGA-CLT-NEs y NEs-PLGA-CLT-QTS

La viabilidad celular se determinó con el método de hemocitómetro (Cámara de Neubauer). Se redispersó y homogenizó el cultivo celular por medio de repipeteo de la placa. Se tomaron 200 μ l (equivalentes a 7.5×10^5 células) y se colocaron en una microplaca de 96 pozos. Se adicionaron 50 μ l de soluciones de CLT o 50 μ l de suspensiones de QTS, NEs-PLGA, NEs-PLGA-CLT y NEs-PLGA-CLT-QTS. Para los sistemas que contenían clotrimazol se prepararon 5 niveles de concentración: 1, 10, 50, 100 y 200 μ g de clotrimazol / ml de suspensión de NEs en mucina al 1 % p/v. Cada muestra se preparó por triplicado. La placa se mantuvo en incubación a 37 °C y 5 % de CO₂ durante 24 horas. Posteriormente, se adicionaron 80 μ l de una solución de tripsina al 0.05 % p/v en EDTA al 0.004 % p/v. Las muestras fueron redispersadas y homogenizadas. La placa se mantuvo en incubación a 37 °C durante 5 minutos. Se adicionaron 150 μ l de medio HAM F12 enriquecido con Suero Bovino Fetal al 10 % (v/v). Las muestras se colocaron en tubos eppendorf de 2 ml y se centrifugaron a 900 rpm durante 5 minutos. Se retiró el sobrenadante y se adicionaron 250 μ l de solución amortiguadora de fosfatos (Sigma Aldrich). El pellet de células se redispersó y se tomaron 20 μ l y se les adicionaron 80 μ l de una solución de azul de tripano al 0.4 % p/v. Se tomaron 10 μ l de esta mezcla y colocaron en la cámara de Neubauer. Se observó la cámara de Neubauer en un microscopio óptico con el objetivo de 40x. Se realizó el conteo de número de células muertas (núcleo teñido de color azul) y células vivas presentes en los 4 cuadrantes mostrados en la Figura 14. Cada muestra se preparó por triplicado. Como control positivo se tomaron células totalmente viables.

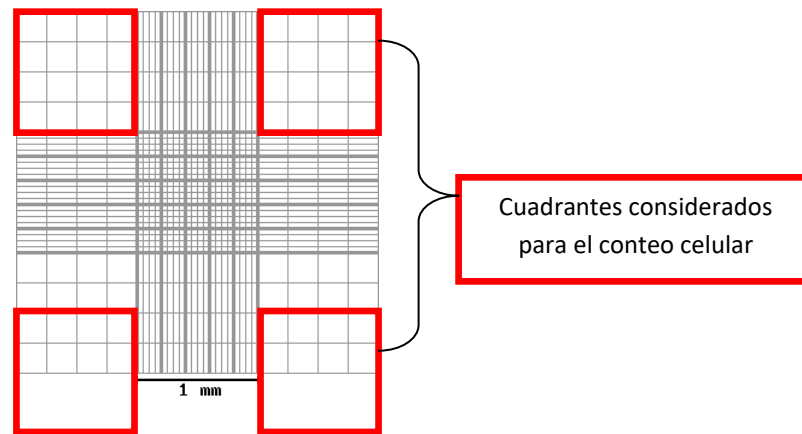


Figura 14. Zona de conteo celular en la cámara de Neubauer para determinar la viabilidad celular de CLT, QTS, NEs-PLGA, NEs-PLGA-CLT-NEs y NEs-PLGA-CLT-QTS.

La viabilidad celular fue determinada por medio del siguiente modelo matemático (UASLP, 2013):

$$\%V.C. = \frac{C.V.}{C.V. + C.M.} * 100 \dots\dots\dots \text{Fórmula (14)}$$

Donde V.C. es la viabilidad celular; C.V., es el total de células vivas y C.M., es el total de células muertas.

El total de células se calculó con la siguiente fórmula (UASLP, 2013):

$$T.C. = \frac{C.V.}{4 * 4 * 5 * 10000 * 0.25} \dots\dots\dots \text{Fórmula (15)}$$

Donde T.C., es el total de células; C.V., es el total de células vivas; 4x4, es el total de cuadros evaluados; 5, es el factor de dilución y 0.25 ml es el volumen de muestra.

5.0 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Determinaciones previas

5.1.1 Determinación de solubilidades cualitativas de clotrimazol y fluconazol en medios orgánicos e inorgánicos.

Los resultados de solubilidad (Tabla 6) muestran una mayor solubilidad de fluconazol y clotrimazol en la solución amortiguadora de acetatos 0.1 M utilizando LSS al 0.5% p/v como tensoactivo. Los resultados de las pruebas de solubilidad realizadas en diferentes medios acuosos para clotrimazol y fluconazol fueron utilizados para desarrollar un método espectrofotométrico UV visible y cuantificar ambos fármacos a partir de las nanoesferas. Los resultados de la tabla 6, nos indican que la selección de LSS como surfactante para realizar las pruebas de solubilidad fue el adecuado, dado que se observa solubilidad de fluconazol y clotrimazol en el rango de pH de 3.5 a 5.5; sin embargo, se decidió trabajar con el sistema FVS pH=4.2 con LSS al 0.5% como medio de disolución para desarrollar el método espectrofotométrico para la cuantificación de fluconazol y clotrimazol.

Tabla 6. Pruebas de solubilidad¹ cualitativas para clotrimazol y fluconazol.

| Fármaco | Medio | | | |
|-------------|--|--|--|-------------|
| | Solución amortiguadora de acetatos pH= 3.5 | Solución amortiguadora de acetatos pH= 4.5 | Solución Amortiguadora de acetatos pH= 5.5 | FVS pH= 4.2 |
| Clotrimazol | Soluble | Soluble | Soluble | Soluble |
| Fluconazol | Soluble | Soluble | Soluble | Soluble |

¹El término de solubilidad utilizado es el descrito en la USP 33-NF (2010); es decir ml de disolvente/g soluto: Muy soluble (<1), fácilmente soluble (1-10), soluble (10-30), ligeramente soluble (30-100), poco soluble (100-1000) y muy poco soluble (1000-10000) y prácticamente insoluble (>10000).

5.1.2 Espectros de absorción

Los espectros de absorción UV-visible de clotrimazol y fluconazol (Figuras 15 y 16), muestran que las longitudes de onda de máxima absorción para clotrimazol y fluconazol son de 265 nm y 261 nm, respectivamente. En el caso de la curva de alcohol polivinílico la longitud de onda de máxima absorción es de 640 nm. Los valores de longitud de onda de máxima absorción así como el espectro de absorción de clotrimazol y fluconazol coinciden con los reportados por Moffat y colaboradores (2011), por lo que se puede decir que no existe interferencia espectrofotométrica por parte del LSS en las condiciones de pH trabajadas. Sin embargo, si se observa una diferencia de absorbancia entre los tres espectros evaluados. Dado que la absorbancia es directamente proporcional a la solubilidad se puede decir que existe una diferencia de solubilidad en las tres condiciones de pH evaluadas. En el caso del clotrimazol, se observa una mayor solubilidad en pH= 3.5, esto es debido a la presencia del grupo imidazol en su estructura (Figura 42, Anexo 1), el par de electrones disponibles del imidazol es protonado en pH ácido, generando su naturaleza polar y haciéndolo más soluble en soluciones de pH más bajo (Borhade et al., 2012). En la Figura 16, también se observa un incremento de solubilidad fluconazol con la disminución del pH. La estructura del fluconazol (Figura 43, Anexo 1) tiene dos grupos 1, 2, 4-triazol, grupos que también pueden ser protonados en pH ácidos.

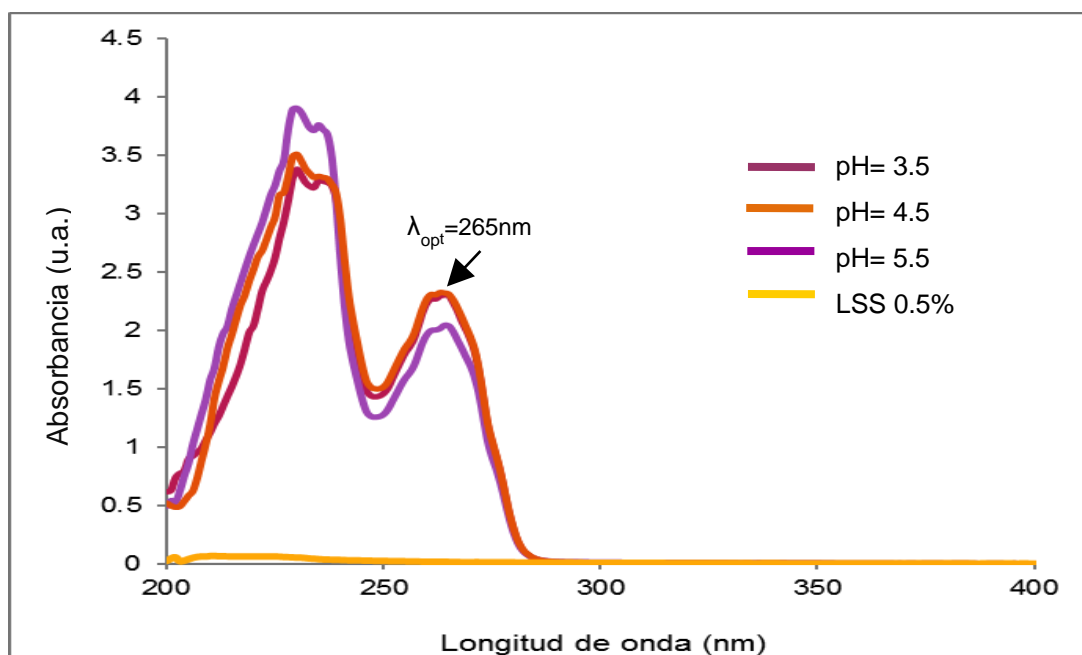


Figura 15. Espectros de absorción de clotrimazol en soluciones amortiguadoras de acetatos 0.1 M pH=3.5, pH=4.5 y pH= 5.5.

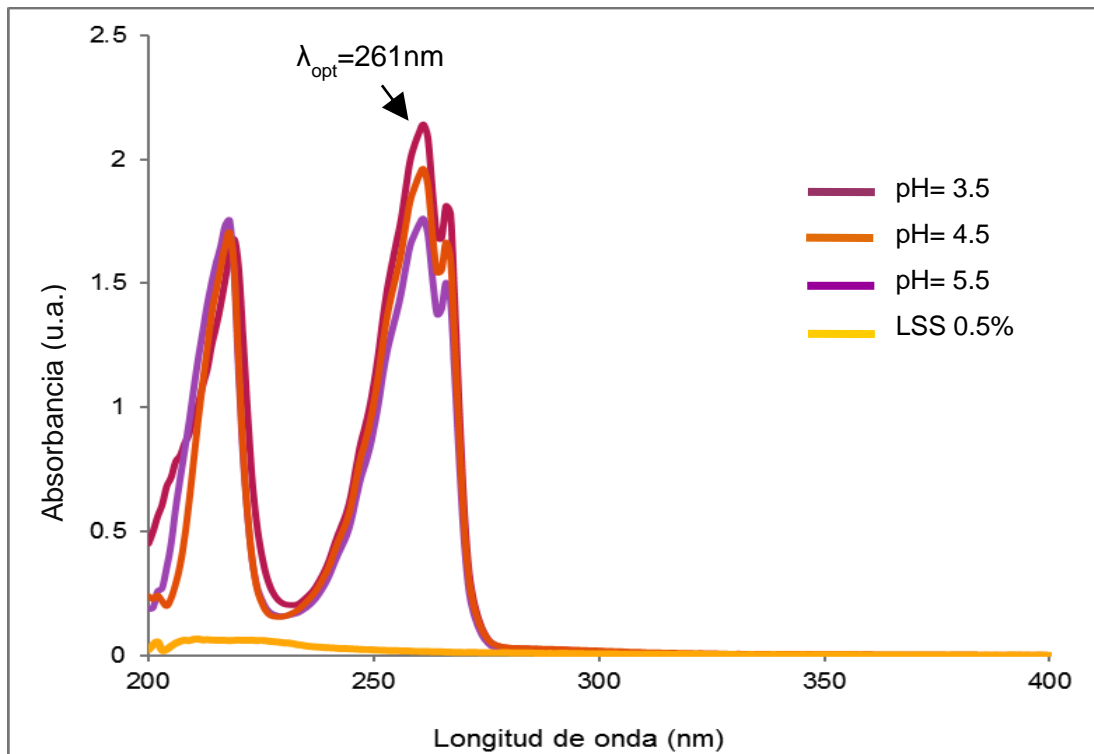


Figura 16. Espectros de absorción de fluconazol en soluciones amortiguadoras de acetatos 0.1 M pH=3.5, pH=4.5 y pH= 5.5.

5.1.3 Determinación cuantitativa de la solubilidad de clotrimazol y fluconazol

La solubilidad obtenida para clotrimazol fue de 0.7620 mg/ml y en el caso del fluconazol fue de 7.086 mg/ml, ambas determinaciones se realizaron en un medio de FVS pH= 4.2 con LSS al 0.5% p/v. Estos resultados muestran que el fluconazol es casi 10 veces más soluble que el clotrimazol. De acuerdo con Aher y colaboradores (2009), la ligera solubilidad en agua del fluconazol se debe a las fracciones 1,2, 4 triazoles de su estructura química, estas fracciones químicas son capaces de formar enlaces de hidrógeno, por lo que además de proporcionarle las propiedades fungicidas también favorecen la solvatación en agua.

5.1.4 Curvas de calibración

A partir de las curvas de calibración preparadas para cuantificar clotrimazol, fluconazol y complejo PVAL- H_3BO_3 - I_2 -KI, se obtuvieron en cada caso los parámetros de

coeficiente de determinación (r^2), porcentaje de coeficiente de variación (% C.V.), ordenada al origen (b), y pendiente (m). Los valores de cada parámetro cumplen con los criterios de linealidad de acuerdo con la Guía de Validación de Métodos Analíticos (CNQFBM, 2002). El análisis estadístico ANOVA para cada curva indica que existe una linealidad entre la concentración de fármaco y su respectiva absorbancia dado que la F-calculada es mayor a la F-crítica. De igual forma la prueba t de Student indica en todos los casos que la ordenada al origen es estadísticamente igual a cero, dado que la t-crítica es menor a la t-calculada (Anexo 5, Tabla 45).

5.1.5 Desarrollo de los métodos analíticos para la cuantificación de clotrimazol y fluconazol

Además de evaluar la linealidad del método de cuantificación de fármaco contenido en las nanoesferas de PLGA, también se evaluaron los parámetros de especificidad, repetibilidad, exactitud, así como los límites de cuantificación y detección.

La especificidad del método de cuantificación de clotrimazol y fluconazol se demuestra en los Anexos 3 y 4, lo cual indica que tampoco existe interferencia por parte del PLGA y PVAL.

Los resultados se resumen en la Tabla 7 y en los Anexos 3 y 4, se incluyen las pruebas estadísticas de cada parámetro evaluado.

De acuerdo con los resultados de la Tabla 7, se cumple con los criterios de aceptación señalados en la Guía de Validación de Métodos Analíticos (CNQFBM, 2002).

5.2 Preparación de NEs-PLGA-CLT y NEs-PLGA-FLU

Las nanoesferas de fármaco y PLGA se prepararon con dos técnicas: 1) desplazamiento del solvente y 2) emulsificación-difusión y determinar la técnica que nos permitiera obtener una mayor eficiencia de encapsulación. La formación de las nanoesferas por el método de desplazamiento del disolvente es explicada por una turbulencia interfacial generada durante el desplazamiento del disolvente generado por una reducción localizada de tensión interfacial, donde la fase orgánica se somete a pulsaciones rápidas y erráticas generando un cambio de presión ó disminución de la

tensión interfacial. Como las gotas de disolvente contienen polímero, estos tenderán a agregarse y formar nanoesferas debido a su insolubilidad en agua (Quintanar-Guerrero, et al., 1998). El método de desplazamiento del solvente se ha empleado por diferentes autores (Chorny et al., 2002; Mathu et al., 2009; Bilati U. et al., 2005) para la encapsulación de fármacos hidrofóbicos como hidrofílicos.

Tabla 7. Resultados del desarrollo del método de cuantificación de fluconazol y clotrimazol en medio FVS con LSS al 0.5% p/v.

| Parámetro | Criterio de aceptación ¹ | Clotrimazol | Fluconazol |
|--|---|--|--|
| Especificidad | a) Específico al fármaco | a) Específico | a) Específico |
| Linealidad | a) $r^2 > 0.98$ b) %C.V. < 3 | a) 0.99 b) 1.85 | a) 0.99 b) 1.20 |
| Exactitud | a) %C.V. < 1.5 b) % Recobro 97-103%. | a) 0.32 b) 100.82 | a) 0.62 b) 100.78 |
| Repetibilidad | a) %C.V. < 1.5 | a) 1.12 | a) 1.44 |
| Límites de cuantificación (LC) y detección (LD). | a) $LD = \frac{3.3 \cdot s_{b0}}{m}$ b) $LC = \frac{10 \cdot s_{b0}}{m}$ Donde: s_{b0} = ordenada al origen m = pendiente | a) LD = 0.0017894 mg/ml b) LC = 0.0054224 mg/ml | a) LD = 0.0020314 mg/ml b) LC = 0.0061558 mg/ml |

¹ Criterios de aceptación, de acuerdo con la Guía de Validación de Métodos Analíticos Fisicoquímicos (CNQFBM, 2002).

La formación de las nanoesferas preparadas por emulsificación-difusión, se fundamenta en la difusión de las moléculas del polímero hacia la fase acuosa, originando regiones locales de supersaturación, desde las cuales son formados nuevos glóbulos o agregados de polímeros no totalmente desolvatados. La estabilidad de estos agregados o protonanoesferas por el estabilizante es importante para evitar su coalescencia. Esta estabilidad, permite la formación de las partículas de tamaño nanométrico después de la completa difusión del solvente orgánico (Quintanar-Guerrero, et al., 1997). El método de emulsificación-difusión se ha utilizado con frecuencia por diferentes autores para la encapsulación de fármacos tanto hidrofóbicos

como hidrofílicos en nanopartículas poliméricas y lipídicas (Kwon, 2001; Mora-Huertas et al., 2012; Piñón-Segundo et al. 2005; Quintanar-Guerrero et al., 2005; Trotta et al., 2003).

5.2.1 Caracterización de NEs-PLGA-CLT y NEs-PLGA-FLU

5.2.1.1 Tamaño de partícula y potencial Z

En la Tabla 8 se muestran los resultados del tamaño de partícula para clotrimazol y fluconazol a través de las dos técnicas de preparación de nanoesferas:

Tabla 8. Comparación del tamaño de partícula entre las técnicas de preparación de desplazamiento del solvente y emulsificación-difusión de NEs-PLGA-CLT y NEs-PLGA-FLU.

| Fármaco | Desplazamiento del solvente | | | Emulsificación-Difusión | | |
|-----------|-----------------------------|-------------|-------------|--------------------------|------------|------------|
| | Tamaño de partícula (nm) | IPD | PZ (mV) | Tamaño de partícula (nm) | IPD | PZ (mV) |
| CLT | 299.0 | 0.186 | -1.13 | 339.7 | 0.015 | -1.11 |
| | 304.0 | 0.209 | -1.04 | 349.0 | 0.082 | -0.83 |
| | 305.5 | 0.141 | -1.02 | 350.2 | 0.009 | -1.05 |
| \bar{x} | 302.83±2.16 | 0.178±0.028 | -1.06±0.047 | 346.3±4.69 | 0.035±0.03 | -0.99±0.12 |
| FLU | 288.0 | 0.142 | -2.31 | 350.7 | 0.060 | -2.37 |
| | 246.6 | 0.103 | -1.71 | 345.9 | 0.109 | -2.11 |
| | 243.7 | 0.161 | -1.51 | 261.1 | 0.044 | -2.09 |
| \bar{x} | 259.43±20.23 | 0.135±0.024 | -1.86±0.32 | 325.9±41.15 | 0.071±0.03 | -2.19±0.12 |

IPD: Índice de polidispersión; PZ: Potencial Zeta; \bar{x} : promedio±desviación estándar

Se evaluaron los datos anteriores a través de una prueba de t para determinar si existe diferencia significativa en el tamaño de partícula comparando las dos técnicas de preparación, la cual se resumen en la Tabla 9.

H₀: No existe una diferencia significativa en el tamaño de partícula de NEs-PLGA-CLT y NEs-PLGA-FLU entre las técnicas de preparación desplazamiento del solvente y emulsificación difusión.

H_1 : Existe una diferencia significativa en el tamaño de partícula de NEs-PLGA-CLT y NEs-PLGA-FLU entre las técnicas de preparación desplazamiento del solvente y emulsificación difusión.

Tabla 9. Prueba t de student para la comparación del tamaño de partícula de NEs-PLGA-CLT y NEs-PLGA-FLU prepradas por las técnicas de preparación de desplazamiento del solvente y emulsificación-difusión.

| Parámetro | Desplazamiento del solvente | Emulsificación-difusión |
|-------------------------------------|-----------------------------|-------------------------|
| Media | 281.1333 | 332.7666 |
| Varianza | 815.3586 | 1249.1426 |
| Observaciones | 6 | 6 |
| Diferencia hipotética de las medias | 0 | |
| Grados de libertad | 10 | |
| Estadístico t | -2.7835 | |
| $P(T \leq t)$ una cola | 0.0096 | |
| Valor crítico de t (una cola) | 1.8124 | |
| $P(T \leq t)$ dos colas | 0.0193 | |
| Valor crítico de t (dos colas) | 2.2281 | |

Como se observa en la Tabla 10, el valor obtenido de t es mayor al valor crítico de t , por lo tanto, se determina que si existe una diferencia significativa en el tamaño de partícula entre las dos técnicas de preparación de nanoesferas. Uno de los factores que pueden afectar el tamaño de partícula es la tensión interfacial entre las fases interna y externa en la preparación de las nanoesferas. Furtado-Mosqueira et al. (2000), encontraron que, a menor tensión interfacial, el tamaño de partícula de nanocápsulas formadas de ácido poliláctico era menor. Los datos obtenidos indican que la técnica de desplazamiento del solvente genera nanoesferas de menor tamaño que las obtenidas por la técnica de emulsificación-difusión. En la técnica de preparación de desplazamiento del solvente la tensión interfacial acetona-agua es menor que la tensión interfacial acetato de etilo-agua presente en la técnica de preparación de emulsificación-difusión (Pinto-Reis et al., 2006).

Otro factor que influye sobre el tamaño de partícula es la proporción de las fases orgánica/acuosa. En el caso de la técnica de desplazamiento del solvente la proporción de fase orgánica/acuosa es de 0.33, menor a la utilizada en la técnica

emulsificación difusión (0.5). Al tener una mayor cantidad de fase acuosa, se favorece el proceso de difusión y por tanto incide en una disminución del tamaño de partícula. Plasari et al. (1997), evaluó la proporción de fase orgánica/acuosa sobre el tamaño de partícula de nanoesferas de etilcelulosa por el método de desplazamiento de solvente; sus resultados determinaron que al variar la proporción de la fase orgánica/acuosa de 0.12-0.34 el tamaño de partícula varió de 70-85 nm. De igual forma, al aumentar la proporción de la fase orgánica/acuosa origina un aumento del tamaño de partícula al formar las nanoesferas por el método de emulsificación-difusión (Leurox et al., 1995; Poletto et al., 2008).

El tamaño de partícula en la administración vaginal es de suma importancia, de acuerdo con das Neves et al. (2014), nanopartículas de tamaño entre 200 nm y 500 nm de diámetro se pueden distribuir en el moco cervicovaginal, en comparación con nanopartículas menores a 100 nm que podrían presentar mayores obstáculos debido a su confinamiento en los canales de la malla de mucina. Considerando lo anterior, se podría decir que las técnicas de preparación de nanoesferas desplazamiento del solvente y emulsificación difusión, nos brindan la oportunidad de obtener tamaños adecuados para la administración vaginal.

El potencial Z es una herramienta importante para conocer las propiedades eléctricas de la superficie de las nanoesferas, pero también es un parámetro que predice su estabilidad cuando se utilizan tensoactivos iónicos como estabilizantes. De acuerdo con Kharia et al. (2012), el potencial Z es un parámetro que determina la estabilidad de una dispersión coloidal, siendo así que valores absolutos de 30 mV pueden prevenir la agregación de los coloides. El rango de valores de potencial Z de nanoesferas de clotrimazol y fluconazol es de -0.99 a -2.19 mV (Tabla 10). Los valores obtenidos de potencial Z, coinciden con los valores reportados (Ahlin P. et al., 2002; Hariharan et al., 2006; Konan Y. N. et al., 2003) para nanoesferas formadas por las técnicas de emulsificación difusión y desplazamiento del solvente utilizando PLGA 50:50 y PVAL como agente estabilizante. La carga negativa de los valores de potencial Z (Tabla 8) de las nanoesferas de clotrimazol y fluconazol, se deben a la presencia de los grupos carboxilo terminales de las cadenas de PLGA. (Mora-Huertas et al; 2011). Los valores de potencial Z de nanoesferas de clotrimazol y fluconazol no muestran una diferencia significativa al evaluar el factor técnica de preparación de las nanoesferas; sin embargo, si existe una diferencia significativa en los valores de potencial Z entre las nanoesferas de clotrimazol, fluconazol y blanco (-0.75 ± 0.3 mV). El análisis de

varianza mostrado en la Tabla 10, nos indica que los valores de potencial Z de los lotes de NEs de fluconazol, son estadísticamente diferentes a los lotes del blanco y clotrimazol, independientemente del tipo de técnica de preparación. Esta diferencia puede deberse a la presencia en la superficie de fluconazol, que se evidencia con una disminución de la eficiencia de encapsulación (sección 5.2.3.).

Los valores obtenidos de potencial Z, coinciden con los valores reportados (Ahlin P. et al., 2002; Hariharan et al., 2006; Konan Y. N. et al., 2003) para nanoesferas formadas por las técnicas de emulsificación difusión y desplazamiento del solvente utilizando PLGA 50:50 y PVAL como agente estabilizante. Aunque los valores de potencial Z son muy bajos, la estabilidad física de las nanoesferas preparadas se preserva debido al uso de PVAL como agente estabilizante. De acuerdo con Galindo-Rodriguez y colaboradores (2004), la estabilidad del PVAL se debe a: 1) una cobertura total de la superficie de la nanoesfera, 2) anclaje firme en la interfaz, 3) formación de una película superficial y, 4) conformación óptima del PVAL hacia la fase externa.

Tabla 10. Análisis de varianza para evaluar el efecto de potencial Z entre NEs-PLGA-CLT y NEs-PLGA-FLU.

| Origen de las variaciones | Suma de cuadrados | Grados de libertad | Promedio de los cuadrados | F | Probabilidad | Valor crítico para F |
|---------------------------|-------------------|--------------------|---------------------------|--------------|--------------|----------------------|
| Entre grupos | 4.666 | 4 | 1.166 | 16.79 | 0.0001 | 3.478 |
| Dentro de grupos | 0.694 | 10 | 0.069 | | | |
| Total | 5.360 | 14 | | | | |

5.2.1.2 Determinación de PVAL residual en NEs-PLGA-CLT-QTS

De acuerdo con Murakami y colaboradores (1999), la fuerte adsorción de PVAL en la superficie de PLGA es originada por la fijación de los grupos acetato de las moléculas de PVAL con los grupos carboxilo de PLGA a través de una unión hidrófoba (Figura 17). En el anexo 5, se muestran los resultados de la curva de calibración del complejo PVAL-H₃BO₃-I₂-KI. El porcentaje de PVAL residual determinado en las nanoesferas para todos los casos fue menor al 3% (Tabla 8), resultados que concuerdan con los reportados por diversos autores al preparar nanoesferas de PLGA por la técnica de

emulsificación-difusión y el uso de PVAL como agente estabilizante (Rodríguez C. I. M. et al., 2009; Piñón S. E., 2005; Quintanar-Guerrero et al., 1996). De acuerdo con Galindo-Rodríguez et al. (2004), la cantidad de PVAL residual se debe a una cantidad de PVAL no removible. Los autores sugieren que existe una interpenetración de PVAL durante la emulsificación, conduciendo a una fuerte interacción y por lo tanto a una adsorción superficial irreversible. La presencia de PVAL residual en las nanoesferas liofilizadas le confiere buena rehidratación sin la adición de un crioprotector, debido a la característica hidrofílica que le confieren los grupos hidroxilo a las moléculas de PVAL (Murakami et al., 1999).

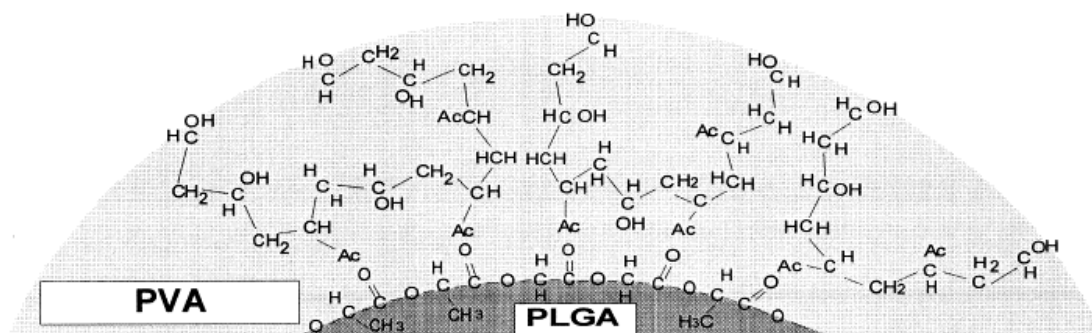


Figura 17. Adsorción de PVAL sobre NEs-PLGA. Figura modificada de Murakami H. et al., 1999.

5.2.2 Determinación del porcentaje de eficiencia de encapsulación de clotrimazol y fluconazol a partir de nanoesferas de PLGA

En la Tabla 11 se muestra que el clotrimazol tuvo valores de eficiencia de encapsulación mayores al 60%; sin embargo, en el caso del fluconazol, los valores son menores al 50%. Resultados similares son reportados por Nogueira de Assis y colaboradores, (2008), quienes lograron encapsular fluconazol con ácido poliláctico (PLA) por el método de desplazamiento del solvente con porcentajes de encapsulación del 30%.

Para determinar la existencia de una diferencia significativa de valores de eficiencia de encapsulación, se realizó el estudio de análisis de varianza evaluando los factores: tipo de fármaco y método de preparación de nanoesferas.

Los resultados del análisis de varianza para demostrar el efecto significativo entre el método de preparación y fármaco sobre la eficiencia de encapsulación se muestran en la Tabla 12. Los resultados indican que la técnica de preparación de nanoesferas no influyó de forma significativa en la eficiencia de encapsulación, pero si existe una diferencia estadísticamente significativa al comparar el tipo de fármaco.

A pesar de que no es estadísticamente significativa, sí se muestra una ligera diferencia de la eficiencia de encapsulación de clotrimazol entre las técnicas de preparación de las nanoesferas evaluadas. Los mayores porcentajes de eficiencia de encapsulación para clotrimazol se obtuvieron con la técnica de emulsificación difusión. Esta diferencia se puede explicar por el mecanismo de formación de las nanoesferas de las dos técnicas. De acuerdo con Mora-Huertas et al. (2012), la cantidad de fármaco encapsulado depende de los coeficientes de partición del fármaco entre las diferentes fases que se producen durante la formación de la nanoesfera. Dado que el clotrimazol es un fármaco lipofílico, presenta una mayor afinidad con el medio saturado de acetato de etilo que con la acetona (miscible en agua) y por lo tanto puede ser favorecida su incorporación en el glóbulo formado durante la emulsificación.

Los resultados anteriores muestran que el fármaco con mayor porcentaje de encapsulación es el clotrimazol y la técnica de preparación con mejores resultados fue la de emulsificación-difusión.

Para determinar el fármaco para la preparación de NEs-PLGA, además de evaluar la técnica también se consideraron reportes de diferentes autores (Hilley-Vensel, 2002; Sobel et al., 1995) quienes indican que fluconazol tiene una potencia fungicida muy semejante a la de clotrimazol contra especies de *Candida*; sin embargo, es considerablemente mayor el número de efectos adversos que genera fluconazol en comparación con clotrimazol. Dado lo anterior y los resultados obtenidos, se decidió trabajar con el clotrimazol como fármaco y utilizar la técnica de emulsificación-difusión para la preparación de las nanoesferas.

Tabla 11. Resultados de caracterización de nanoesferas de clotrimazol-PLGA y fluconazol-PLGA, preparadas por los métodos de preparación de desplazamiento del solvente y emulsificación-difusión.

| Fármaco | Método de preparación | Fármaco cargado | PVAL residual (%) | E.E. ¹ (%) | Tamaño de partícula (nm) | IPD ² | Potencial Z (mV) |
|-------------|-----------------------------|-------------------|-------------------|-----------------------|--------------------------|-------------------|--------------------|
| Clotrimazol | Desplazamiento del solvente | 60.58 | 3.12 | 61.17 | 299.0 | 0.186 | -1.13 |
| | | 59.09 | 2.9 | 59.67 | 304.0 | 0.209 | -1.04 |
| | | 64.25 | 2.87 | 64.88 | 305.5 | 0.141 | -1.02 |
| | \bar{x} = | 61.31±2.17 | 2.96±0.11 | 61.90±2.18 | 302.83±2.77 | 0.17±0.02 | -1.06±0.04 |
| Clotrimazol | Emulsificación-difusión | 64.82 | 2.00 | 65.46 | 339.7 | 0.015 | -1.11 |
| | | 67.27 | 2.15 | 67.93 | 349.0 | 0.082 | -0.83 |
| | | 85.36 | 2.35 | 86.21 | 350.2 | 0.009 | -1.05 |
| | \bar{x} = | 72.48±9.16 | 2.17±0.14 | 73.19±9.24 | 346.3±4.69 | 0.03±0.03 | - 0.99±0.12 |
| Fluconazol | Desplazamiento del solvente | 44.45 | 2.23 | 44.89 | 288.0 | 0.142 | -2.31 |
| | | 60.22 | 2.27 | 60.81 | 246.6 | 0.103 | -1.71 |
| | | 45.60 | 2.44 | 46.05 | 243.7 | 0.161 | -1.56 |
| | \bar{x} = | 50.09±7.18 | 2.31±0.09 | 50.58±7.24 | 259.43±20.23 | 0.13±0.02 | -1.86±0.32 |
| Fluconazol | Emulsificación-difusión | 46.90 | 1.32 | 47.37 | 350.7 | 0.060 | -2.37 |
| | | 47.96 | 1.44 | 48.43 | 345.9 | 0.109 | -2.11 |
| | | 48.43 | 1.68 | 48.91 | 261.1 | 0.044 | -2.09 |
| | \bar{x} = | 47.76±0.64 | 1.48±0.14 | 48.24±0.65 | 325.9±41.15 | =0.07±0.02 | -2.19±0.12 |

¹E.E.: Eficiencia de encapsulación; ²IPD: Índice de Polidispersión; \bar{x} : promedio±desviación estándar.

Tabla 12. Análisis de varianza para evaluar el efecto de método de preparación de nanoesferas y fármaco sobre la eficiencia de encapsulación.

| Origen de las variaciones | Suma de cuadrados | Grados de libertad | Promedio de los cuadrados | F | Probabilidad | Valor crítico para F |
|---------------------------|-------------------|--------------------|---------------------------|---------------|--------------|----------------------|
| Fármaco | 968.583 | 1 | 968.583 | 18.377 | 0.002 | 5.317 |
| Método de preparación | 58.741 | 1 | 58.741 | 1.114 | 0.321 | 5.317 |
| Interacción | 136.755 | 1 | 136.755 | 2.594 | 0.145 | 5.317 |
| Dentro del grupo | 421.634 | 8 | 52.704 | | | |
| Total | 1585.713 | 11 | | | | |

El uso de PLGA para la preparación de nanoesferas les confiere biodegradabilidad y biocompatibilidad, así como control en la liberación del fármaco; sin embargo, su limitación radica en su baja bioadhesividad, característica deseable para lograr una terapia eficaz a través de la administración vaginal (Ndesendo et al., 2009). Para hacer frente a esta limitación, la superficie de las NEs-PLGA-CLT se modificó con QTS para proveerlas de mucoadhesividad. El quitosán es un biopolímero con una gran cantidad de aplicaciones en sistemas farmacéuticos debido a sus virtudes como la biocompatibilidad, mucoadhesividad y sus propiedades microbicidas (Chakravarthi, 2011; Shuckla et al., 2013 y Yoncheva K. et al., 2011).

5.3 Preparación de nanoesferas de PLGA-clotrimazol-quitosán

5.3.1 Caracterización de NEs-PLGA-CLT-QTS

Los resultados de caracterización de estos lotes de nanoesferas se muestran en la Tabla 13.

5.3.1.1 Tamaño de partícula y potencial Z

La adsorción del quitosán en la superficie de las nanoesferas se evidenció por el aumento del tamaño (44%) de las nanoesferas comparadas antes de adicionar quitosán (Tabla 13). De igual forma, el potencial Z en las nanoesferas funcionalizadas con quitosán mostró un aumento y cambio de carga (negativo a positivo) en relación

con aquellas que no tienen quitosán (Tabla 11). Los valores de potencial Z positivo evidencian la presencia del quitosán en la superficie de las nanoesferas de PLGA, dado que los grupos amino en condiciones de pH < 5 tienen características de carga positiva, debido a la protonación del grupo amino primario del quitosán (pKa=6.5) (Leane et al., 2004; Ritthidej, 2011).

Tabla 13. Caracterización fisicoquímica de lotes de NEs-PLGA-CLT-QTS.

| Lote | Tamaño de partícula (nm) | Potencial Z (mv) | Clotrimazol cargado (%) | PVAL residual (%) | Eficiencia de encapsulación (%) | Quitosán adsorbido (%) |
|-------------|--------------------------|-------------------|-------------------------|-------------------|---------------------------------|------------------------|
| <u>1</u> | 497.9 | 4.81 | 68.19 | 2.56 | 68.86 | 7.10 |
| | 501.1 | 4.82 | 64.56 | 2.89 | 65.20 | 9.35 |
| | 499.8 | 5.22 | 70.57 | 2.23 | 71.26 | 7.52 |
| \bar{x} = | 499.6±1.61 | 4.95±0.23 | 67.81±2.47 | 2.56±0.33 | 68.44±3.05 | 7.99±1.19 |
| <u>2</u> | 419.1 | 3.03 | 86.08 | 2.32 | 86.93 | 18.01 |
| | 428.9 | 2.83 | 86.72 | 2.18 | 87.57 | 19.89 |
| | 424.0 | 2.82 | 85.47 | 2.57 | 86.31 | 16.86 |
| \bar{x} = | 424.0±4.90 | 12.89±4.09 | 85.64±1.21 | 2.36±0.38 | 86.94±0.72 | 18.25±0.84 |

Lote 1: Funcionalización de las NEs con quitosán desde la formación de las NEs-PLGA-CLT;
Lote 2: Funcionalización de las NEs con quitosán después de la formación de las NEs-PLGA-CLT; \bar{x} : promedio±desviación estándar.

5.3.1.2 Determinación de PVAL residual

La cantidad de PVAL residual en todos los casos fue menor al 5%, resultado que indica su adecuado lavado. Cabe mencionar que los valores de PVAL residual no se afectaron por la metodología de preparación de las nanoesferas. Estos datos concuerdan con los encontrados por Pawar y colaboradores (2013), al determinar el 3.2 % de PVAL residual en nanoesferas de PLGA funcionalizadas con quitosán preparadas por la técnica de emulsificación.

5.3.2 Cuantificación de clotrimazol a partir de NEs-PLGA-CLT-QTS

Los resultados de la Tabla 13 muestran una diferencia de clotrimazol encapsulado entre las dos metodologías propuestas de adsorción de quitosán sobre la superficie de las nanoesferas de PLGA. Cuando el quitosán se adicionó en la fase acuosa en la preparación de las nanoesferas (metodología 1), se obtuvo un porcentaje de fármaco cargado menor (67.81%) a diferencia de la segunda metodología en la que el quitosán se adsorbió una vez formada la nanoesfera (85.64%). La disminución de la eficiencia de encapsulación en la metodología 1, podría deberse a una posible interacción de los grupos azo del clotrimazol con los grupos amino protonados de las cadenas del quitosán disuelto en la fase acuosa (externa) durante la preparación de las nanoesferas. Estos datos concuerdan con los reportados por Yang y colaboradores (2009), al encontrar una disminución del porcentaje de eficiencia de encapsulación al aumentar la cantidad de quitosán en la fase acuosa. Por otra parte, la adsorción de quitosán en la metodología 2, mejora la eficiencia de encapsulación comparándola con el lote de nanoesferas sin quitosán. Lo anterior indica que el quitosán adsorbido sobre la superficie de las nanoesferas de PLGA, además de brindarle la característica de mucoadhesión, también impide la salida del clotrimazol de las nanoesferas durante el proceso de centrifugación.

5.3.3 Cuantificación de quitosán a partir de NEs-PLGA-CLT-QTS

Se utilizó un método de cuantificación de quitosán adsorbido en NEs-PLGA-CLT-QTS fundamentado en la reacción de los grupos amino primarios del quitosán con la ninhidrina y formación de un complejo colorido (púrpura de Ruhemann) (Leane et al., 2004). En la Figura 18 se propone el mecanismo de reacción de la ninhidrina con el quitosán: 1.- Una molécula de ninhidrina reacciona con el grupo primario amino del quitosán para formar una base de schiff (a), que posteriormente da origen a una amina primaria como intermediario (b), que reacciona con una segunda molécula de ninhidrina para formar el complejo de Ruhemann (c). La reacción anterior ha sido utilizada por varios autores para la cuantificación de los grupos amino primarios de quitosán (Curotto y Aros, 1993; Leane et al., 2004). El método de cuantificación de quitosán con ninhidrina es un método rápido, sensible y reproducible; sin embargo, su limitación es el grado de acetilación del quitosán (Curotto y Aros, 1993). Para evitar variaciones en el método, se desarrolló un método de cuantificación con el quitosán; los resultados del desarrollo del método se muestran en la Tabla 14.

En el Anexo 6, se muestra el espectro de absorción y especificidad para el método de quitosán-ninhidrina.

Los resultados de la Tabla 13 indican que con la metodología 1 (quitosán en la fase externa), se obtuvieron menores porcentajes de adsorción de quitosán. Como se explicó anteriormente, esto podría deberse a una interacción del clotrimazol y quitosán, así como la posible migración de quitosán hacia la fase acuosa durante la formación de las nanoesferas.

En la metodología 2 de incorporación de quitosán, se mejoró la cantidad de quitosán adsorbido en la superficie de las nanoesferas, esto puede deberse a que existió un mayor tiempo de contacto entre la superficie de las nanoesferas y el quitosán a diferencia de la primera metodología.

Tabla 14. Desarrollo del método de cuantificación de quitosán.

| Parámetro | Criterio de aceptación ¹ | Resultados |
|---|---|--|
| Especificidad | a) Específico al fármaco | b) Específico, cumple |
| Linealidad | a) $r^2 > 0.98$ b) %C.V. < 3 | c) 0.998, cumple d) 2.19, cumple |
| Exactitud | a) %C.V. < 1.5 b) % Recobro 97-103%. | c) 1.491, cumple d) 97.32, cumple |
| Repetibilidad | a) %C.V. < 1.5 | b) 1.40, cumple |
| Límites de cuantificación (LC) y detección (LD) | a) $LD = \frac{3.3 \cdot s_{b0}}{m}$ b) $LC = \frac{10 \cdot s_{b0}}{m}$ Donde: s_{b0} = ordenada al origen m = pendiente | a) LD = 0.496 µg/ml b) LC = 1.502 µg/ml |

¹Criterios de aceptación, de acuerdo con la Guía de Validación de Métodos Analíticos Fisicoquímicos (CNQFBM, 2002).

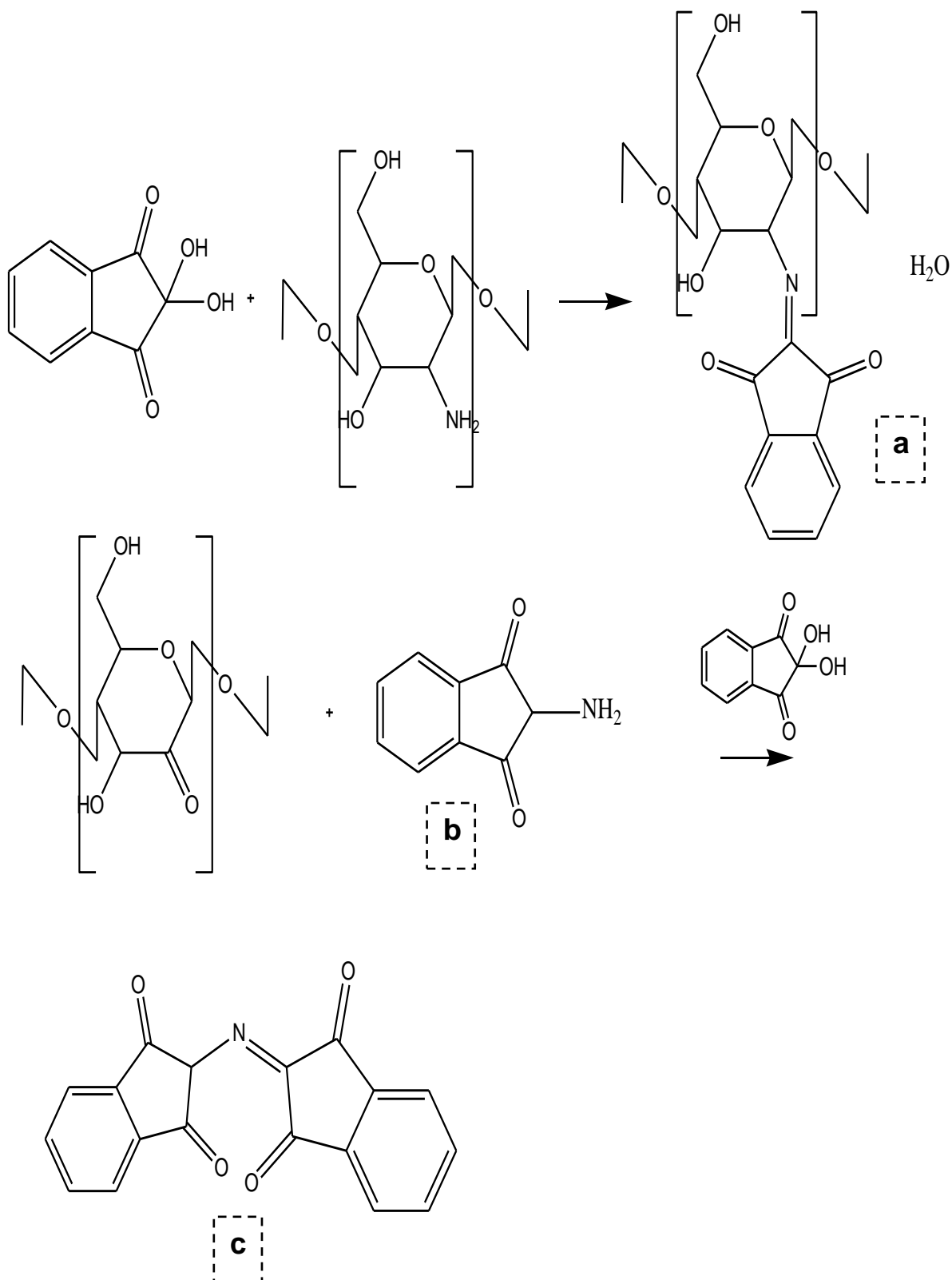


Figura 18. Mecanismo de reacción propuesto para la reacción de quitosán con ninhidrina. a) Formación de la base de Schiff, b) Amina primaria intermediaria (2-amino-1,3-indandiona), c) Formación del complejo de Ruhemman.

5.3.4 Análisis de Espectroscopía de Infrarrojo (FTIR)

El análisis espectroscópico por Infrarrojo (FTIR) permite la evaluación de la interrelación de los grupos funcionales de los componentes químicos de la formulación de las nanoesferas (Mainardes et al., 2006). Como se observa en la Figura 19b, el espectro del clotrimazol muestra bandas en el rango de 600-800 cm^{-1} , región en la que se encuentran las vibraciones de flexión del -C-H de los grupos aromáticos para anillos conjugados. En la longitud de onda de 1564 cm^{-1} se encuentran las vibraciones de estiramiento del enlace -N-O, y en 1266 cm^{-1} el estiramiento asociado con los enlaces -C-O. Un espectro similar para clotrimazol fue observado por Bilensoy y colaboradores (2006). El espectro de PLGA (Figura 19a) presenta bandas características en 1748.7 cm^{-1} y en un rango de 1087.2–1270 cm^{-1} asociadas con el estiramiento C-O y C=O, respectivamente. Estas bandas de PLGA fueron informadas por Kang y colaboradores (2008). Por lo tanto, la encapsulación de clotrimazol es evidente en los espectros de NEs-PLGA-CLT (Figura 19e) y NEs-PLGA-CLT-QTS (Figura 19f) dentro del intervalo de 675-730 cm^{-1} y 1450 cm^{-1} , que indican grupos aromáticos de clotrimazol. El espectro del quitosán (Figura 19c) presenta bandas a 3454 cm^{-1} , correspondiente a las vibraciones de estiramiento simétricas -OH y amina -N-H. Bandas similares del espectro de quitosán fueron informados por Mourya y colaboradores (2010) y Salehizadeh y colaboradores (2012). La adsorción de quitosán se observa en el espectro de NEs-PLGA-CLT-QTS (Figura 19f) a 3330-3350 cm^{-1} , indicando grupos amino primarios del CTS.

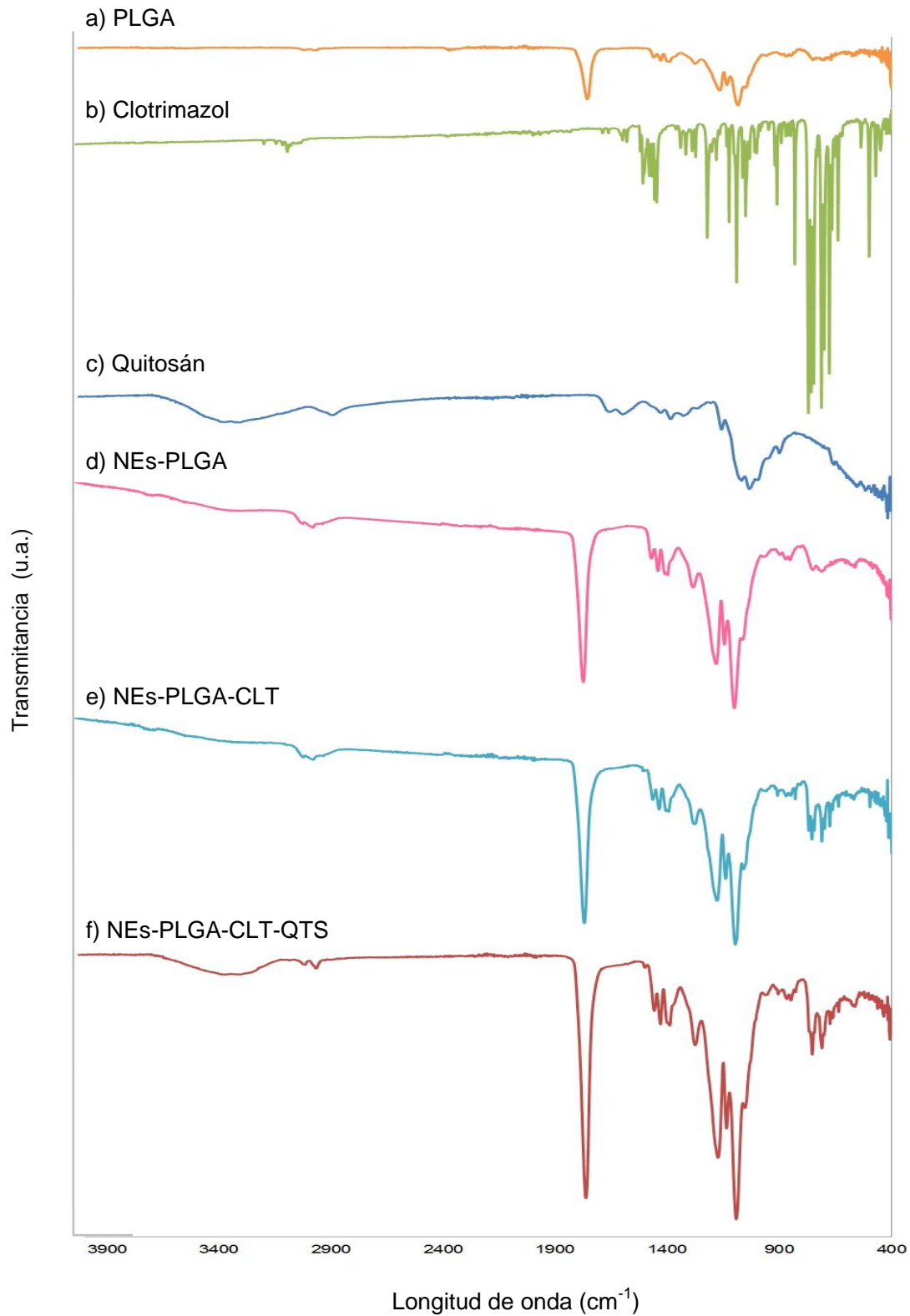


Figura 19. Espectros IR de: a) PLGA, b) clotrimazol, c) quitosán, d) NEs-PLGA, e) NEs-PLGA-CLT y f) NEs-PLGA-CLT-QTS. u.a.: unidades arbitrarias.

5.3.5 Estudio de adsorción de quitosán sobre NEs-PLGA-CLT

En la Figura 20, se observa una relación lineal ($r^2 = 0.9837$) entre la cantidad de quitosán adicionada y la adsorbida sobre la superficie de NEs-PLGA-CLT. Resultados que justifican el aumento tamaño de partícula y potencial Z en función de la cantidad adicionada de quitosán (Figuras 21 y 22).

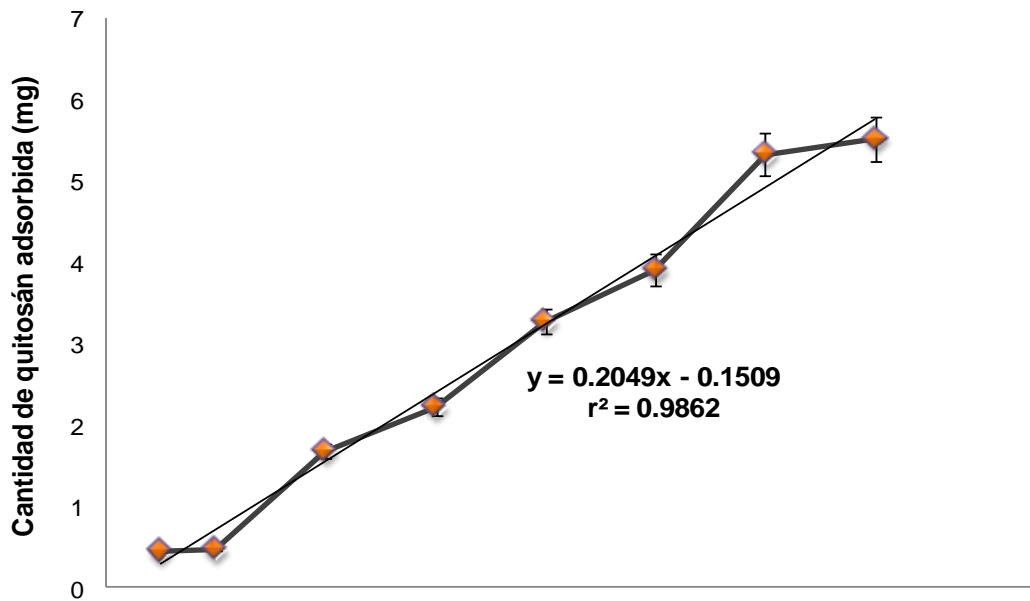


Figura 20. Relación entre la cantidad adsorbida de quitosán en función de la cantidad de quitosán adicionada ($n=3$).

Como se mencionó anteriormente, en la Figura 21 se observa un aumento proporcional del tamaño de partícula de NEs-PLGA-CLT con la cantidad de quitosán adsorbido en la superficie de las nanoesferas. El aumento gradual de valores de potencial Z con la cantidad de quitosán adicionado (Figura 22), sugiere otra evidencia de la adsorción del quitosán sobre la superficie de las nanoesferas de PLGA. En el anexo 7, se muestran los valores de las cantidades de quitosán adicionadas, adsorbidas y concentraciones en el equilibrio.

En la tabla 15 se muestran los valores de tamaño de partícula y potencial Z de nanoesferas de PLGA-clotrimazol-quitosán en función de la cantidad de quitosán adicionada.

Tabla 15. Valores de tamaño de partícula y potencial Z de nanoesferas de PLGA-clotrimazol-quitosán en función de la cantidad de quitosán adicionada.

| Lote | Cantidad adicionada de quitosán (mg) | Tamaño de partícula promedio (nm) | Potencial Z (mV) | Lote | Cantidad adicionada de quitosán (mg) | Tamaño de partícula promedio (nm) | Potencial Z (mV) |
|---------------|--------------------------------------|-----------------------------------|------------------|--------|--------------------------------------|-----------------------------------|------------------|
| Blanco | 0 | 388 | -0.25 | Lote 5 | 20 | 440.2 | 3.33 |
| | | 379.3 | -0.32 | | | 411.1 | 2.91 |
| | | 399.9 | 0.31 | | | 430.3 | 3.69 |
| | | $\bar{x}=389.1\pm 8.4$ | -0.09 ± 0.3 | | | $\bar{x}=427.2\pm 12.1$ | 3.31 ± 0.3 |
| Lote 1 | 2 | 421.8 | 0.71 | Lote 6 | 16 | 449.1 | 3.30 |
| | | 429.8 | 0.54 | | | 453.5 | 4.20 |
| | | 434.3 | 0.08 | | | 459.9 | 3.99 |
| | | $\bar{x}=428.6\pm 6.5$ | 0.44 ± 0.4 | | | $\bar{x}=454.1\pm 4.4$ | 3.83 ± 0.4 |
| Lote 2 | 4 | 418.2 | 1.12 | Lote 7 | 24 | 487.9 | 6.20 |
| | | 411.1 | 1.68 | | | 467.2 | 6.93 |
| | | 426.9 | 0.83 | | | 474.2 | 5.82 |
| | | $\bar{x}=418.7\pm 10.7$ | 1.21 ± 0.4 | | | $\bar{x}=476.4\pm 8.6$ | 6.32 ± 0.5 |
| Lote 3 | 12 | 410.6 | 0.92 | Lote 8 | 28 | 547.1 | 8.37 |
| | | 398.3 | 1.72 | | | 527.7 | 10.2 |
| | | 424.5 | 0.91 | | | 549.7 | 9.59 |
| | | $\bar{x}=411.1\pm 10.7$ | 1.19 ± 0.4 | | | $\bar{x}=541.5\pm 9.8$ | 9.39 ± 0.8 |
| Lote 4 | 8 | 417.0 | 2.85 | | | | |
| | | 434.6 | 1.85 | | | | |
| | | 434.5 | 1.16 | | | | |
| | | $\bar{x}=428.7\pm 8.3$ | 1.95 ± 0.7 | | | | |

\bar{x} : Promedio \pm Desviación estándar

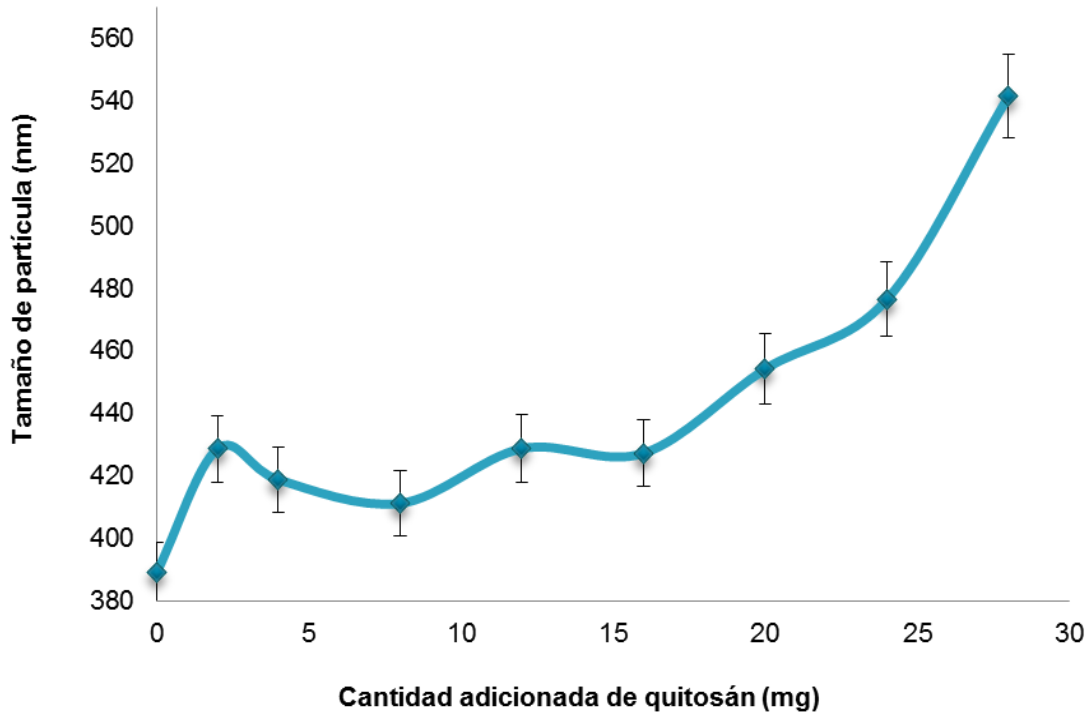


Figura 21. Tamaño de partícula promedio de NEs-PLGA-CLT-QTS en función de la cantidad de quitosán adicionada ($n=3$).

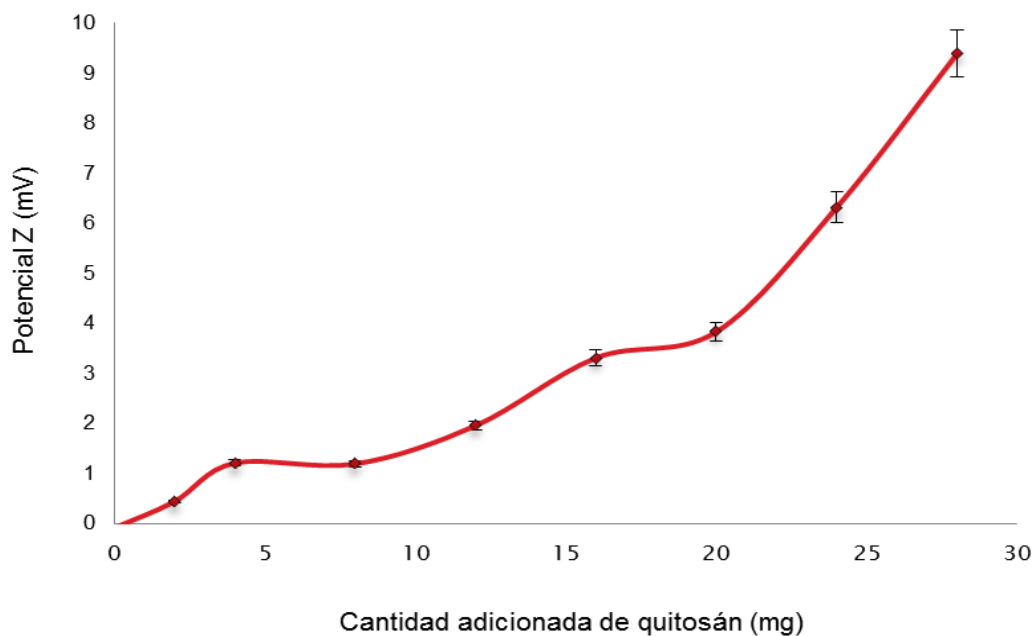


Figura 22. Potencial Z de NEs-PLGA-CLT-QTS en función de la cantidad de quitosán adicionada ($n=3$).

En la Figura 20, se observan 2 mesetas la primera es a concentraciones menores de 5 mg de quitosán adicionada, y la segunda, con cantidades superiores a 25 mg de quitosán adicionado sobre NEs-PLGA-CLT. Estos resultados son similares a los encontrados por Guo y colaboradores (2008), quienes estudiaron el mecanismo de adsorción de quitosán sobre nanopartículas de PLGA. Los investigadores observaron una meseta en concentraciones de quitosán bajas; es decir a cantidades de quitosán adicionadas entre 0 y 0.48 g/L (quitosán/ nanoesferas de PLGA). Los autores encontraron que en esta zona, los valores de adsorción de quitosán sobre nanopartículas de PLGA se ajustan a modelos de adsorción de monocapas, como Langmuir y BET. Sin embargo, en concentraciones superiores a las anteriormente mencionadas, los datos se ajustan a un modelo de multicapas. Los resultados anteriores concuerdan con los resultados obtenidos en nuestro estudio (Figuras 47-52, Anexo 8).

Como se muestra en las figuras 47 y 48, los modelos de Langmuir y BET no se ajustan con los datos obtenidos a una regresión lineal, es decir en el rango de concentraciones trabajadas, el modelo de adsorción de quitosán no se ajusta al modelo de adsorción de monocapa. Los modelos de adsorción que tienen un mayor acercamiento a la linealidad son Freundlich ($r^2=0.951$), Halsey ($r^2=0.955$), Henderson ($r^2=0.951$) y Smith ($r^2=0.977$) (Ver Figuras 49-52). El modelo de Freundlich se ajusta para una superficie homogénea y una superficie heterogénea con una adsorción en múltiples capas, el valor calculado de n es 1.01, superior a 1, que indica una buena adsorción de quitosán en la superficie de nanoesferas de PLGA-clotrimazol (Ghora S. et al., 2004). Los modelos de Halsey, Henderson y Smith describen la naturaleza exponencial o logarítmica de las relaciones entre q y C_e , que corresponden a la adsorción en múltiples capas. Estos modelos sugieren la adsorción sobre una superficie energéticamente heterogénea (Becher, 1990). El modelo de Halsey también describe una condensación de múltiples capas. De acuerdo con este modelo, la isoterma de múltiples capas se compone de tres regiones: la adsorción en una superficie fuertemente heterogénea, la adsorción en una superficie medianamente heterogénea y la adsorción en multicapa inducida por fuerzas de Van de Waals a cierta distancia de la superficie (Boente et al., 1996). El alto valor de las constantes para el modelo de Henderson indica una posible estructura microporosa o energéticamente heterogénea del adsorbato (Boki K. et al., 1991). Por otra parte, el modelo de Smith sugiere que la cantidad adsorbida en la superficie se subdivide en una fracción enlazada al adsorbato y una fracción condensada. La fracción unida de adsorbato está en la superficie

interior o exterior del adsorbente. La fracción normalmente condensada también puede tener más de una capa condensada del adsorbato (Al-Muhtaseb et al, 2004). Los datos obtenidos se ajustan mejor con el modelo de Smith, lo que sugieren que el quitosán adsorbido en la superficie de NEs-PLGA-CLT se podría encontrar en forma enlazada y condensada. Los valores de los parámetros derivados del ajuste lineal a los diferentes modelos de adsorción son mostrados en la Tabla 16, las gráficas correspondientes a cada isoterma se presentan en el anexo 8.

Tabla 16. Parámetros derivados del ajuste lineal de la concentración de quitosán en diferentes modelos de adsorción.

| Modelo | Ecuación lineal | Coefficiente de determinación (r ²) | Constante de capacidad de adsorción | Constante de intensidad de adsorción |
|------------|--------------------------------------|---|--------------------------------------|--------------------------------------|
| Langmuir | $y = -5.22 \times 10^{-4} x + 8.413$ | 0.018 | $q_m = -19.16 \times 10^2$ mg/g | $b = -6.2048 \times 10^{-5}$ |
| BET | $y = -45.93 \times 10^3 x + 8.413$ | 0.018 | $q_m = -2.1772 \times 10^{-5}$ mol/g | $b = -54.593 \times 10^2$ |
| Freundlich | $y = 9.90 \times 10^{-1} x + 7.000$ | 0.951 | $k = 1 \times 10^7$ | $n = 1.01$ |
| Halsey | $y = -12.18x + 16.18$ | 0.955 | $k = 3.775$ | $n = 8.21 \times 10^{-2}$ |
| Henderson | $y = 9.60 \times 10^{-1} x + 1.505$ | 0.951 | $k = 4.504$ | $n = 9.60 \times 10^{-1}$ |
| Smith | $y = -1 \times 10^7 x + 0.175$ | 0.977 | $W_b = 0.175$ | $W_a = 1 \times 10^7$ |

5.3.6 Estudios de liberación *in vitro*

Los perfiles de liberación de NEs-PLGA-CLT y NEs-PLGA-CLT-QTS muestran una liberación lenta en comparación con el perfil de liberación del clotrimazol libre, es decir, en solución (Figura 23). El perfil del clotrimazol libre muestra una liberación del 80% dentro de las primeras 8 horas, con una liberación de primer orden ($r^2=0.982$). Por otra parte, los perfiles de liberación de NEs-PLGA-CLT y NEs-PLGA-CLT-QTS muestran una liberación bifásica (liberación rápida o efecto burst y liberación lenta posterior). Los efectos burst se observaron en la primera hora de liberación (11% y 13% para NEs-

PLGA-CLT y NEs-PLGA-CLT-QTS, respectivamente). Este efecto puede atribuirse a la cantidad de fármaco no encapsulado en la superficie y susceptible a la hidratación (Fredenberg et al., 2011). Durante las primeras 30h, el 31% de clotrimazol se liberó a partir de NEs-PLGA-CLT y el 35% de NEs-PLGA-CLT-QTS, presentando comportamientos de orden cero ($r^2 > 0.995$), en esta fase las moléculas del fármaco difundieron de la superficie o a través de poros de las nanoesferas conectados hacia la superficie (Anexo 9).

Los porcentajes de liberación del clotrimazol disminuyeron drásticamente después de 30h. La máxima cantidad de clotrimazol liberado a las 432 h (18 días) fue del 83.155 para NEs-PLGA-CLT y 99.2% para NEs-PLGA-CLT-QTS. Para determinar el mecanismo de liberación del fármaco, se utilizaron modelos de orden cero (Figura 24a), primer orden (Figura 24b), Peppas (Figura 25a), Higuchi (Figura 25b), Hixon-Crowell (Figura 26a) y Weribull (Figura 26b). De acuerdo con Peppas (Fredenberg et al., 2011; Siepmann y Peppas, 2011), la fracción liberada de una sustancia depende de una constante (K) y un coeficiente de difusión (n), que describen su mecanismo de transporte. El modelo indica que para $n=0.43$, los sistemas esféricos siguen una liberación Fickiana pura; sin embargo, cuando los valores se encuentran entre 0.43 y 0.85, se muestra un transporte anómalo. Los valores de n para NEs-PLGA-CLT Y NEs-PLGA-CLT-QTS presentan valores cercanos a 0.43 (Tabla 17), evaluados en el periodo de 32-432 h. Por lo que podemos sugerir que el mecanismo de liberación de clotrimazol a partir de las nanoesferas es difusional. En general, la liberación del fármaco a partir de formulaciones de PLGA se debe a una serie de procesos: 1.- absorción de agua, 2.- hidrólisis y erosión. En primera instancia, el agua es absorbida por las cadenas de PLGA, que generan una hidrólisis en la matriz de PLGA generando poros (Fredenberg et al., 2011). En nuestro estudio, durante la primera etapa de liberación, el clotrimazol difundió rápidamente a partir de las nanoesferas debido al fármaco asociado con la superficie. En la segunda fase, la tasa de liberación fue descrita por el modelo de Higuchi.

Tabla 17. Valores de constantes derivadas de los modelos de Higuchi y Peppas.

| Lote | Higuchi ($M_t=kt^{1/2}$) | | Peppas ($\ln M_t/M_\infty = \ln K + n \ln t$) | |
|------------------|----------------------------|-------|---|-------|
| | k | r^2 | N | r^2 |
| NEs-PLGA-CLT | 0.1355 | 0.982 | 0.4311 | 0.976 |
| NEs-PLGA-CLT-QTS | 0.1365 | 0.980 | 0.4121 | 0.971 |

Los perfiles de liberación de NEs-PLGA-CLT y NEs-PLGA-CLT-QTS muestran una diferencia estadísticamente significativa ($F_{\text{crit}}=3.25 \times 10^{-10} < F_{\text{cal}}=4.08$; $\alpha=0.05$); estos resultados sugieren el incremento de la velocidad de liberación debido al quitosán adsorbido en NEs-PLGA-CLT-QTS. Similares perfiles de liberación de NEs-PLGA modificadas en la superficie con quitosán han sido reportados previamente (Chakravarthi y Robinson, 2011; Chen et al., 2016). Chakravarthi y Robinson (2011), observaron un efecto burst de paclitaxel a partir de NEs-PLGA-Paclitaxel y la liberación del 77% del fármaco en 6h; en contraste, para NEs-PLGA-Paclitaxel-QTS, se liberó el 87% en el mismo tiempo. Chen y colaboradores (2016), reportaron que el 78% de epirubicina se liberó a partir NEs-PLGA después de 10 días, mientras que la liberación de epirubicina a partir de nanoesferas modificadas con quitosán se incrementó a un 87%. Las propiedades hidrofílicas del quitosán permiten una difusión más rápida de moléculas de agua al interior de la nanoesfera, originando una matriz microporosa, que proporciona vías adicionales del transporte del fármaco incorporado en la matriz polimérica, propiciando de esta forma un incremento de la velocidad de liberación a partir de nanoesferas de PLGA modificadas en la superficie con quitosán (Jain et al., 2010).

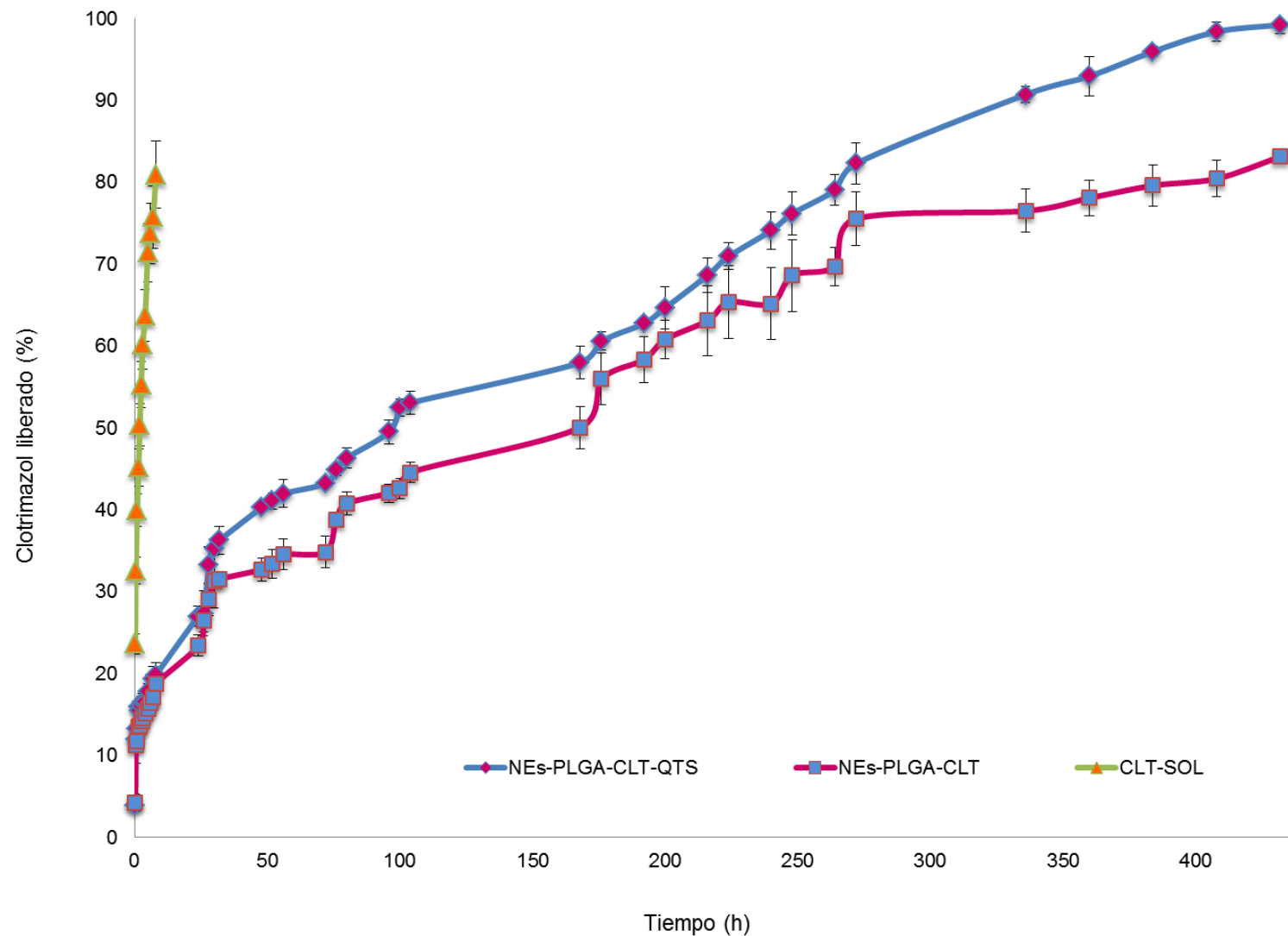


Figura 23. Porcentaje de clotrimazol liberado a partir de NES-PLGA-CLT y NES-PLGA-QTS en función del tiempo ($n=3$).

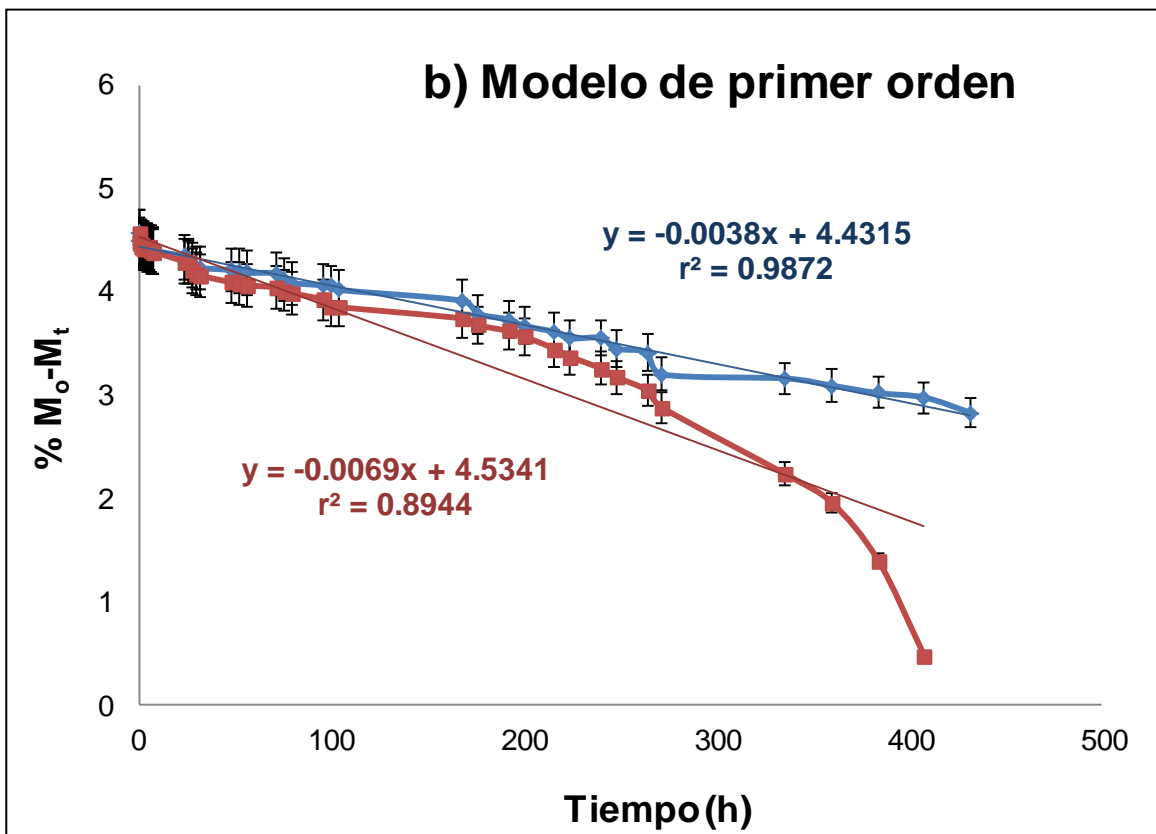
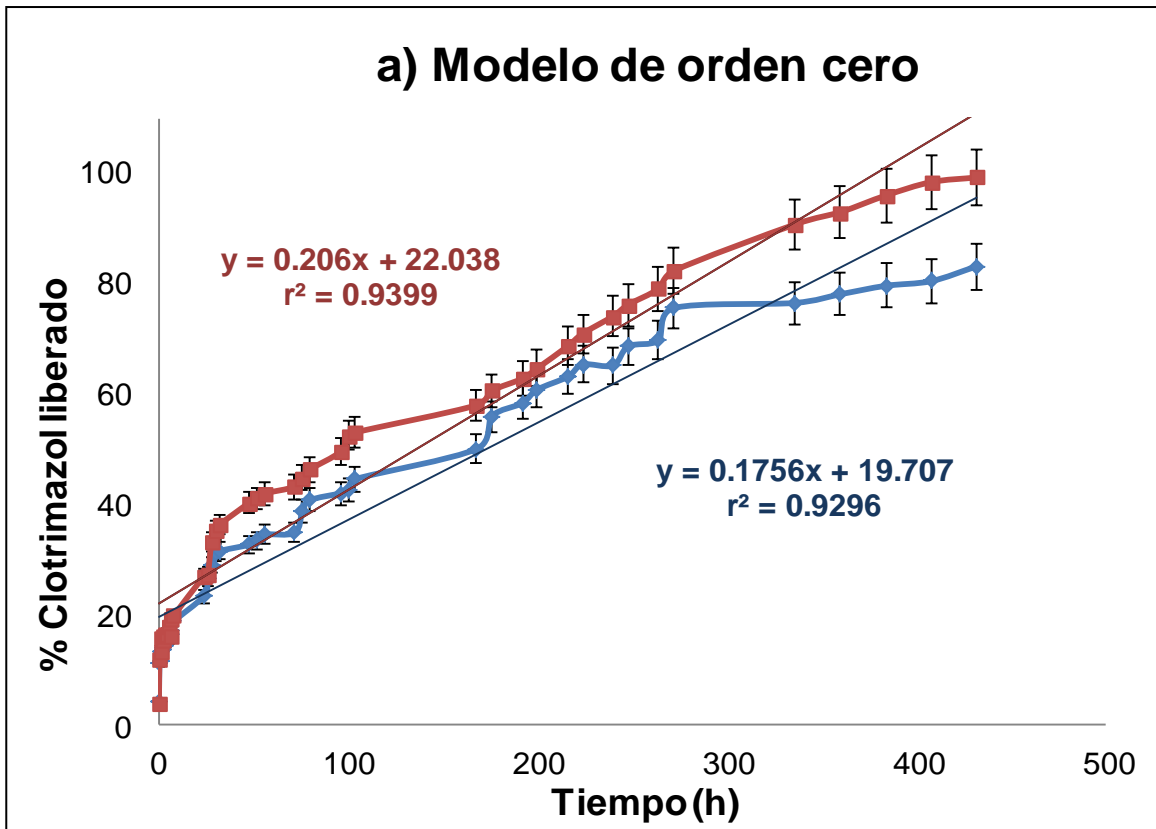


Figura 24. Modelos de liberación de NEs-PLGA-CLT y NEs-PLGA-CLT-QTS: a) Modelo de orden cero, b) Modelo de primer orden. M_t es igual a la cantidad acumulada en un tiempo t determinado, M_∞ es la cantidad máxima de clotrimazol liberada. ($n=3$)

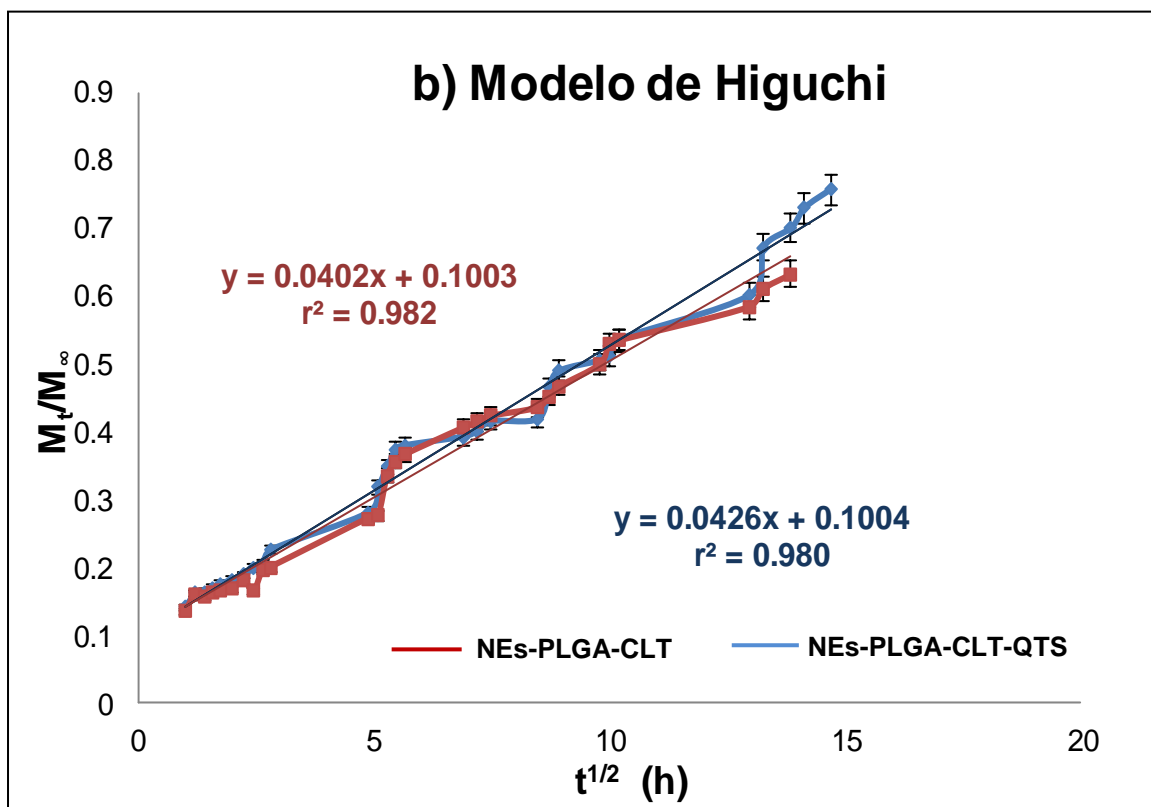
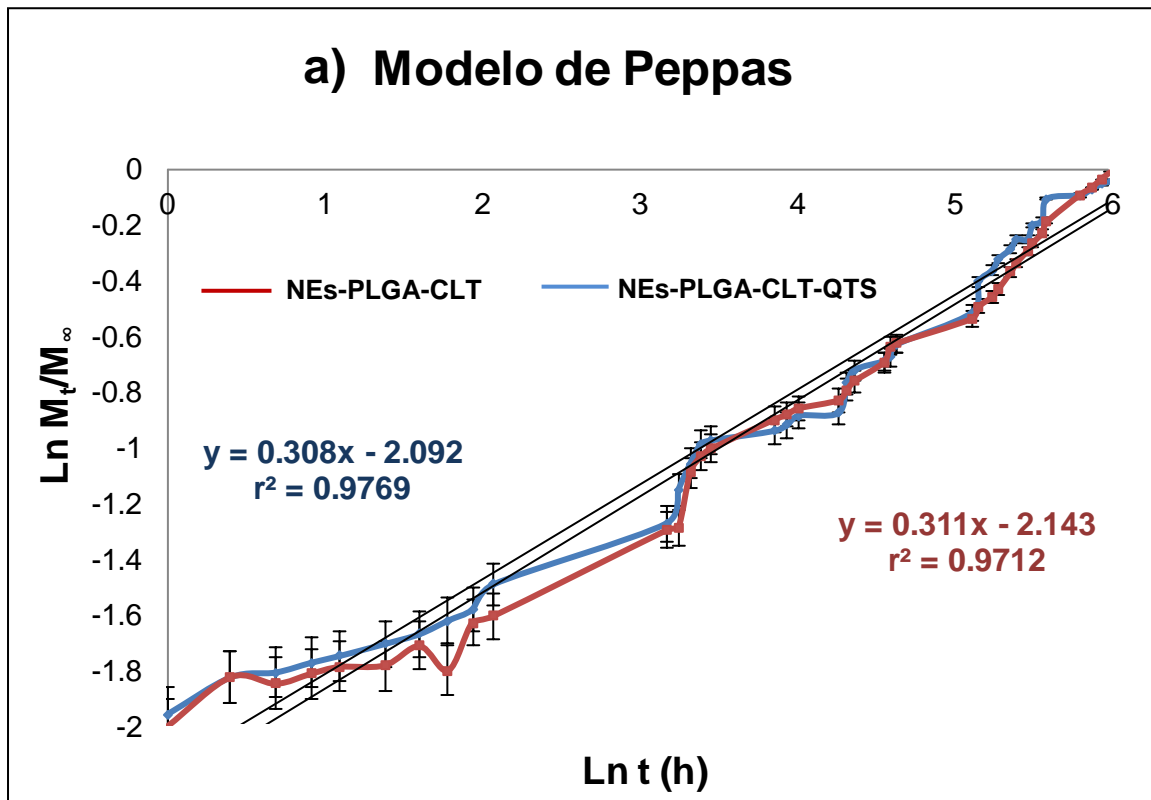


Figura 25. Modelos de liberación de NEs-PLGA-CLT y NEs-PLGA-CLT-QTS: a) Modelo de Peppas, b) Modelo de Higuchi. M_t es igual a la cantidad acumulada en un tiempo t determinado, M_∞ es la cantidad máxima de clotrimazol liberada. ($n=3$)

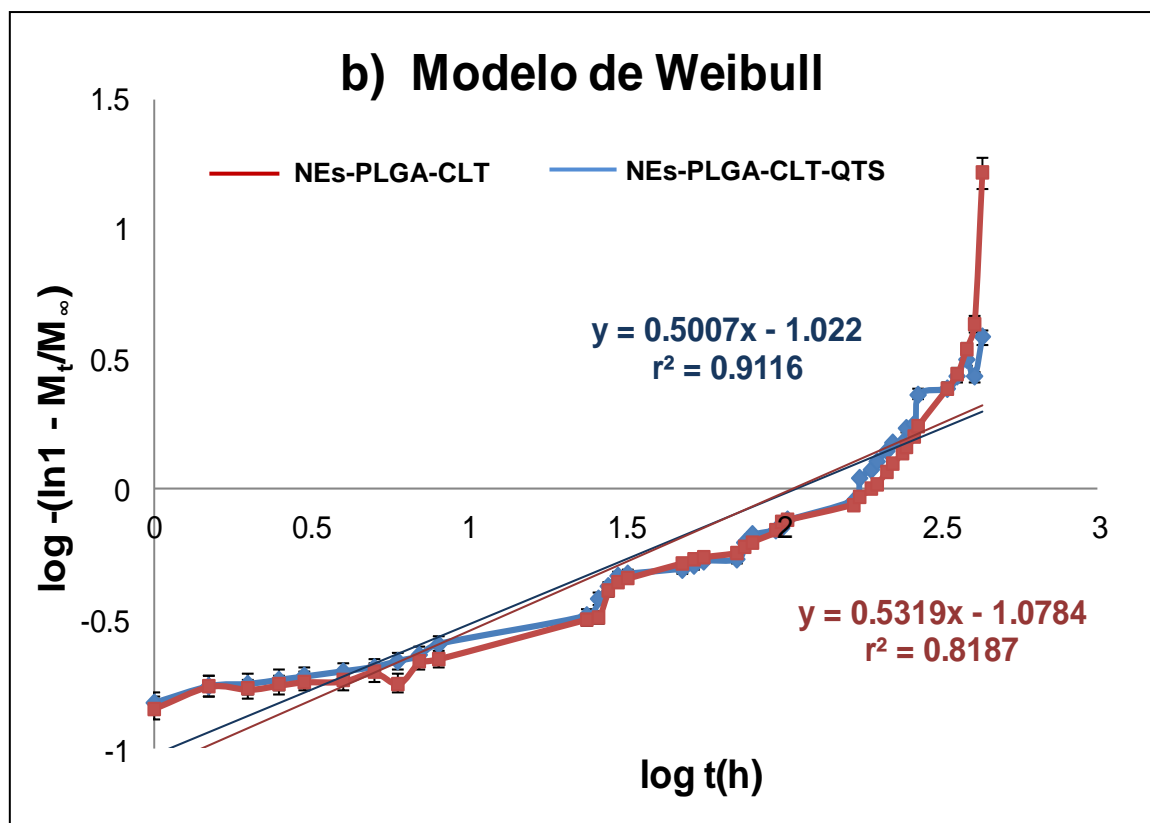
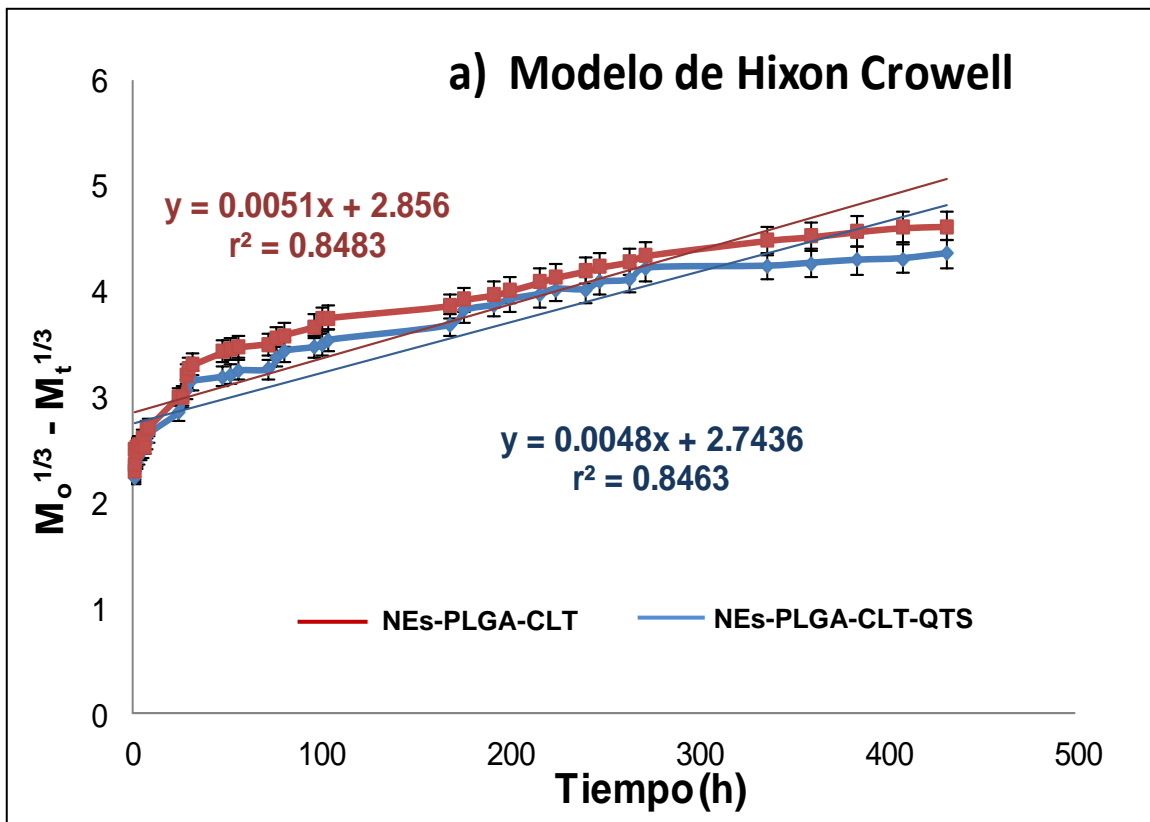


Figura 26. Modelos de liberación de NEs-PLGA-CLT y NEs-PLGA-CLT-QTS: a) Modelo de Hixon Crowell, b) Modelo de Weibull. M_t es igual a la cantidad acumulada en un tiempo t determinado, M_∞ es la cantidad máxima de clotrimazol liberada. ($n=3$)

Woodrow y colaboradores (2009), reportaron la liberación de pequeñas moléculas de RNA de interferencia (siRNA) de nanoesferas (100-300 nm) de PLGA durante 30 días, así como su capacidad de penetrar y permanecer en el tejido vaginal durante al menos 14 días. La liberación controlada de clotrimazol durante 18 días por NEs-PLGA-CLT-QTS ofrece la oportunidad de administrar en una sola dosis las nanoesferas y mantener el efecto microbicida durante este periodo. Sin embargo, se propone la realización de estudios *in vivo* para evaluar la penetración y retención de NEs-PLGA-CLT-QTS en el tejido vaginal.

5.3.7 Desarrollo del método microbiológico para determinar la CMI de NEs-PLGA-CLT y NEs-PLGA-CLT-QT contra *Candida albicans*

Se desarrolló el método microbiológico para determinar de la CMI de las nanoesferas utilizando el método de dilución descrito en Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) M27-A3 (Cantón et al., 2007). Se decidió trabajar con el método cilindro-placa debido a que es un método de gran sensibilidad y confiabilidad. Dado que el método microbiológico de cilindro-placa es sensible se determinó realizar por sextuplicado cada una de las pruebas en tres diferentes días para evaluar los parámetros del método microbiológico (Anexo 10).

En la Tabla 18, se muestran los valores obtenidos del promedio del halo de inhibición del crecimiento de *Candida albicans* en función de la concentración de clotrimazol.

Tabla 18. Evaluación de la linealidad de la zona de inhibición de clotrimazol en función de la concentración, $n=9$.

| Concentración (µg/ml) | Halo de inhibición promedio (mm) | Desviación estándar | % CV |
|-----------------------|----------------------------------|---------------------|------|
| 60 | 29.2 | 0.11 | 3.74 |
| 50 | 27.3 | 0.10 | 3.66 |
| 40 | 25.2 | 0.11 | 4.33 |
| 30 | 22.7 | 0.09 | 3.82 |
| 20 | 19.7 | 0.07 | 3.60 |
| 15 | 16.3 | 0.05 | 3.06 |

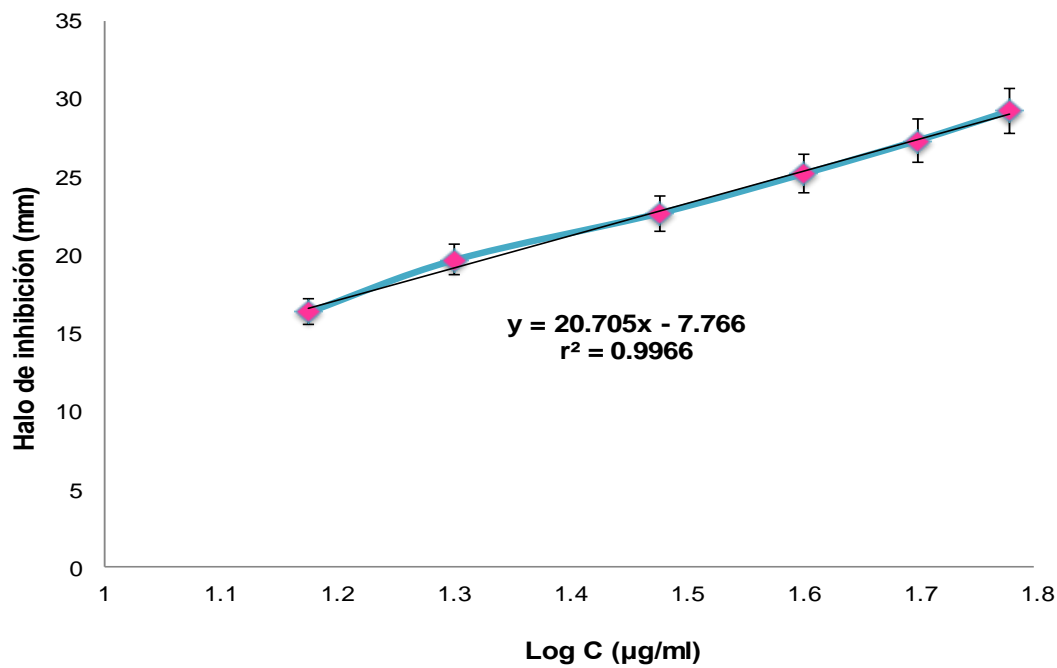


Figura 27. Linealidad del método microbiológico para evaluar la actividad fungicida de clotrimazol contra *Candida albicans*, $n=9$.

El coeficiente de determinación (Figura 27) entre el diámetro del halo de inhibición y el log C es mayor a 0.98, es decir el método cumple con la especificación de linealidad determinada por la Guía de Validación (CNQFBM, 2002).

Tabla 19. Repetibilidad (intra-día) del método microbiológico para evaluar la actividad fungicida de clotrimazol contra *Candida albicans*, $n=18$.

| Concentración (µg/ml) | Promedio (mm) | Desviación estándar | % C.V. |
|-----------------------|---------------|---------------------|-------------|
| 25 | 22.28 | 0.093 | 4.16 |
| 20 | 20.44 | 0.083 | 4.07 |
| 15 | 16.33 | 0.075 | 4.56 |
| Promedio % C.V. | | | <u>4.27</u> |

Tabla 20. Reproducibilidad del método microbiológico para evaluar la actividad fungicida de clotrimazol contra *Candida albicans*, $n=18$.

| Concentración (µg/ml) | Promedio (mm) | Desviación estándar | % C.V. |
|-----------------------|---------------|---------------------|-------------|
| 25 | 21.89 | 0.100 | 4.40 |
| 20 | 20.33 | 0.100 | 4.77 |
| 15 | 16.17 | 0.070 | 4.37 |
| Promedio % C.V. | | | <u>4.52</u> |

La exactitud se determinó con el valor promedio de las determinaciones en cada nivel de concentración de repetibilidad y reproducibilidad. De acuerdo con la Tabla 21 el valor del % C. V. es de 4.12 valor menor al 5%, es decir cumple con el criterio de validación (CNQFBM, 2002).

Tabla 21. Exactitud del método microbiológico para evaluar la actividad fungicida de clotrimazol contra *Candida albicans*, n=18.

| Concentración (µg/ml) | Promedio (mm) | Desviación estándar | % C.V. |
|-----------------------|---------------|---------------------|-------------|
| 25 | 22.08 | 0.096 | 4.38 |
| 20 | 20.39 | 0.090 | 4.43 |
| 15 | 16.25 | 0.073 | 4.50 |
| Promedio % C.V. | | | <u>4.12</u> |

Dado que el método cumple con ser lineal y exacto, se considera específico para evaluar la actividad fungicida del clotrimazol. En las Figuras 28 y 29 se observa una directa relación entre la concentración y el halo de inhibición del crecimiento de *Candida albicans*.

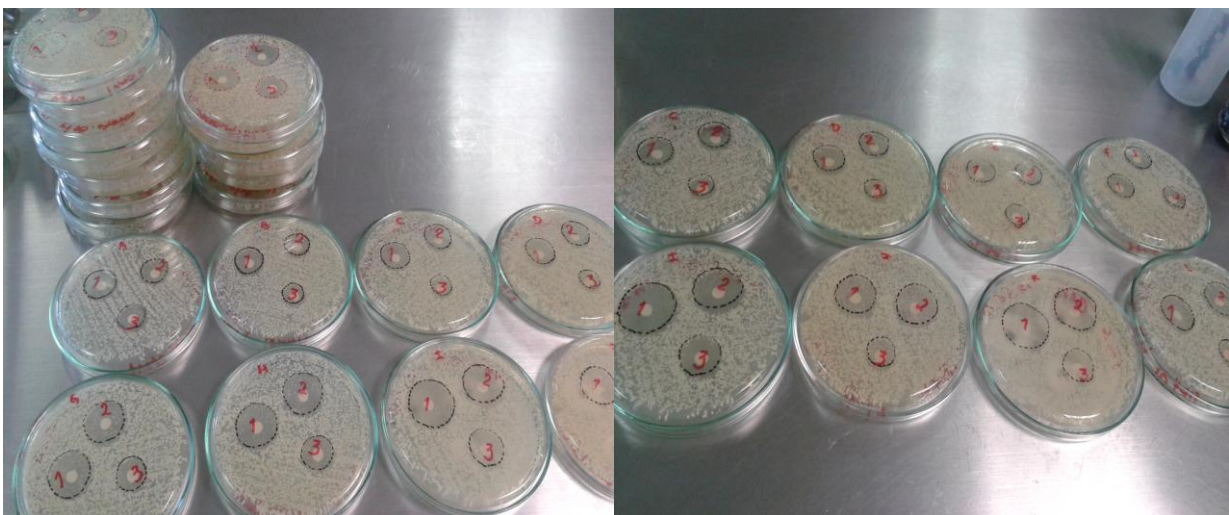


Figura 28. Evaluación de la reproducibilidad y repetibilidad del método microbiológico para determinar la actividad fungicida de clotrimazol contra *Candida albicans*.

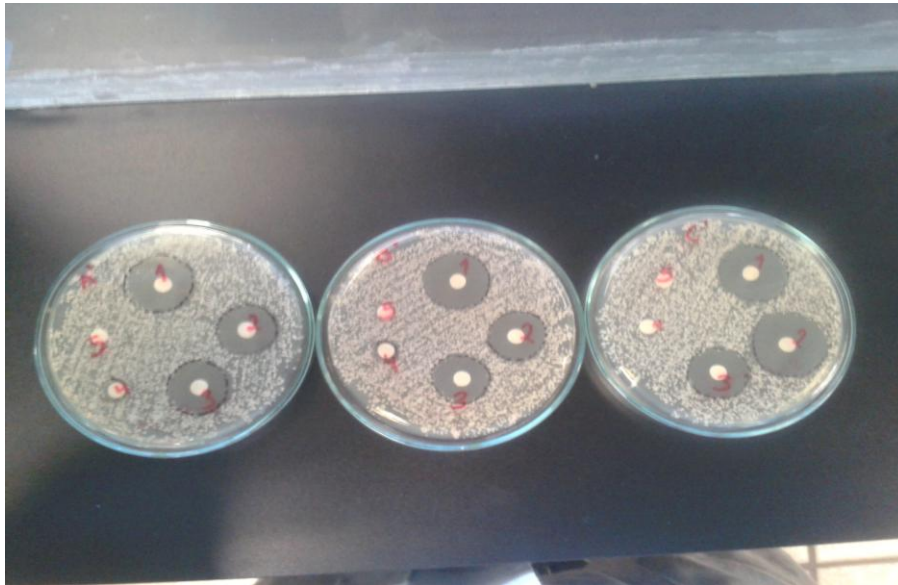


Figura 29. Estudios para determinar el límite de cuantificación del método microbiológico para evaluar la actividad fungicida de clotrimazol contra *Candida albicans*.

Tabla 22. Determinación del límite de cuantificación del método microbiológico para evaluar la actividad fungicida de clotrimazol contra *Candida albicans*, $n=18$.

| Concentración ($\mu\text{g/ml}$) | Promedio (mm) | Desviación estándar | % C.V. |
|------------------------------------|---------------|---------------------|-------------|
| 30 | 21.9 | 0.10 | 4.67 |
| 25 | 20.9 | 0.08 | 3.98 |
| 20 | 19.3 | 0.10 | 4.97 |
| 15 | 16.4 | 0.09 | 5.20 |
| 10 | 0.61 | 0.03 | 5.29 |
| 05 | 0.00 | 0.03 | 5.29 |
| Promedio % C. V. | | | 4.90 |

En la Figura 30, se observa que la zona de inhibición de clotrimazol contra *Candida albicans* es notable a partir de concentraciones superiores a 10 $\mu\text{g/ml}$.

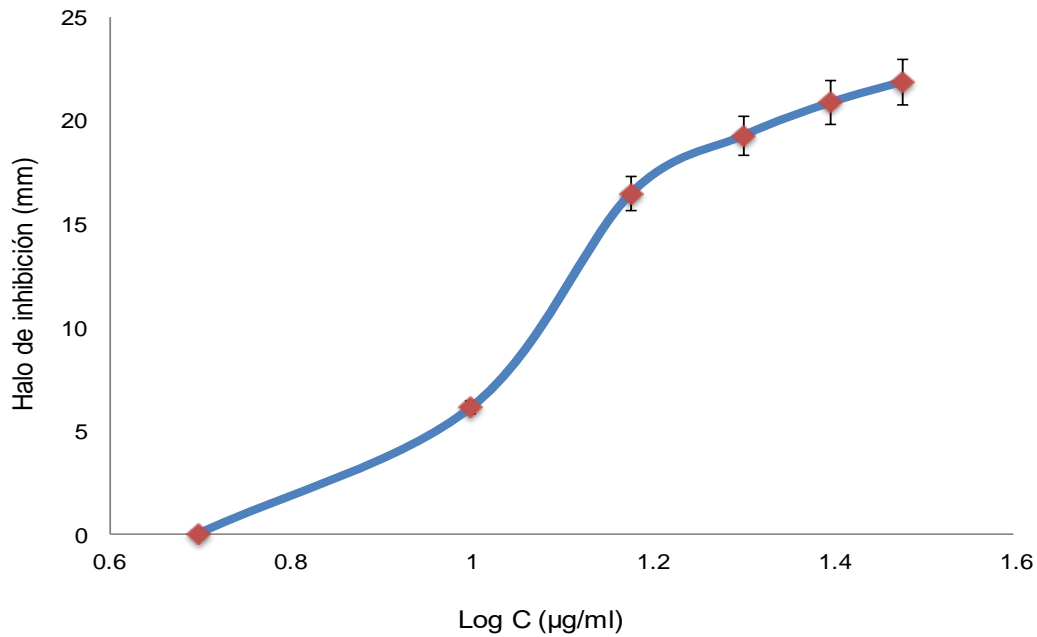


Figura 30. Límite de cuantificación del método microbiológico para evaluar la actividad fungicida de clotrimazol contra *Candida albicans*, n=18.

Los resultados del método microbiológico se resumen en la Tabla 23:

Tabla 23. Parámetros de evaluación del método microbiológico para la determinación de la concentración mínima inhibitoria de clotrimazol contenido en NEs-PLGA.

| Parámetro | Criterio de aceptación ¹ | Resultados |
|--|-------------------------------------|--------------------|
| Especificidad | a) Específico al fármaco | a) Específico |
| Linealidad | a) $r^2 > 0.98$ b) %C.V. < 5 | a) 0.99 b) 3.70 |
| Exactitud | a) %C.V. < 5.0 | a) 4.12 |
| Repetibilidad | a) %C.V. < 5.0 | a) 2.50 |
| Reproducibilidad | a) % C.V < 5 | b) 1.47 |
| Límite de cuantificación | ---- | a) 7 µg/ml |
| % C.V= Coeficiente de variación | | |

¹Criterios de aceptación para métodos microbiológicos de acuerdo a la Guía de Validación de Métodos Analíticos editada por el Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos México, A. C.

Los resultados de la evaluación del sistema para determinar la concentración mínima inhibitoria de NEs-PLGA-CLT y NEs-PLGA-CLT-QTS cumplen con los criterios de aceptación de acuerdo con la normatividad para métodos microbiológicos (Tabla 24). El desarrollo del método microbiológico es más difícil que un método analítico debido a que se involucran más factores tales como experiencia del analista. A pesar de lo anterior, se demostró que el método empleado de cilindro-placa resultó ser sensible para la evaluación fungicida de clotrimazol además de demostrar especificidad, linealidad, exactitud y precisión.

5.3.8 Determinación de la CMI de nanoesferas NEs-PLGA-CLT Y NEs-PLGA-CLT-QTS

Los valores de CMI muestran que la inhibición de actividad antifúngica frente a *Candida albicans* aumentó hasta 4 veces con las formulaciones nanoparticuladas de clotrimazol en comparación con la solución metanólica del fármaco (Anexo 11).

Tabla 24. Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria de NEs-PLGA-CLT y las NEs-PLGA-CLT-QTS contra *Candida albicans*, n=9.

| Concentración (µg/ml) | Zona de inhibición (mm) | | | | |
|-----------------------|------------------------------------|---|----------|--------------|------------------|
| | Solución metanólica de clotrimazol | Solución acética de quitosán (0.5% p/v) | NEs-PLGA | NEs-PLGA-CLT | NEs-PLGA-CLT-QTS |
| 30 | 23 ± 0.08 | 7 ± 0.05 | 6 ± 0.00 | 20 ± 0.08 | 26 ± 0.09 |
| 20 | 19 ± 0.07 | 6 ± 0.05 | 6 ± 0.00 | 19 ± 0.08 | 24 ± 0.07 |
| 10 | 6 ± 0.05 | 5 ± 0.00 | 5 ± 0.00 | 14 ± 0.07 | 20 ± 0.05 |
| 5 | 0 | 0 | 0 | 11 ± 0.07 | 15 ± 0.05 |
| 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| %CV | 3.70 | 0.50 | 0.80 | 2.80 | 3.30 |

%CV = Coeficiente de variación

En la Figura 31, se demuestra la linealidad entre la zona de inhibición del crecimiento de *Candida albicans* y la concentración de clotrimazol contenido en NEs-PLGA-CLT y NEs-PLGA-CLT-QTS.

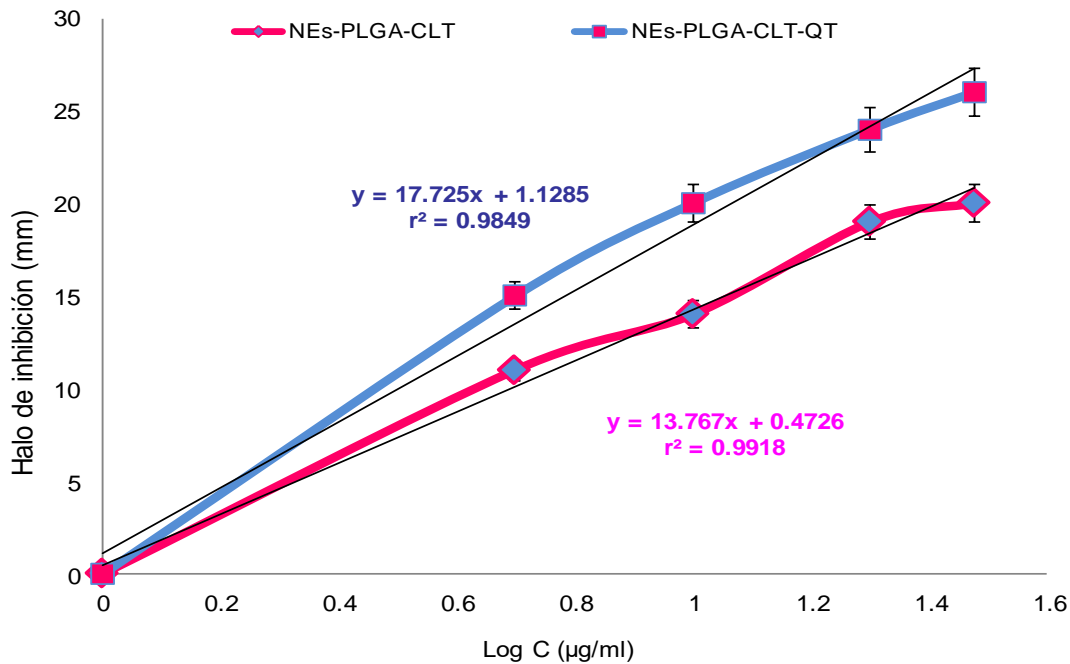


Figura 31. Relación lineal entre el halo de inhibición de crecimiento de *Candida albicans* y la concentración de clotrimazol contenido en NEs-PLGA-CLT y NEs-PLGA-CLT-QTS, $n=9$.

Los resultados son similares a los obtenidos por Ravani y colaboradores (2013), quienes observaron un aumento en el efecto bactericida de nanoformulaciones de vancomicina con PLGA contra *Staphylococcus aureus*. La formulación NEs-PLGA-CLT-QTS mostró una mayor actividad antifúngica que NEs-PLGA-CLT y NEs (valor de $p > 0,05$, $\alpha = 95$). El aumento del efecto antifúngico de NEs-PLGA-CLT-QTS puede explicarse en parte por las propiedades microbicidas del quitosán. Los grupos catiónicos de quitosán podrían generar interacciones con paredes de carga negativa de células de levadura. Esta interacción puede resultar en una inhibición adicional del crecimiento fúngico. Diversos autores coinciden en que el mecanismo antimicrobiano de quitosán es debido a su enlace con las membranas celulares cargadas negativamente y conducir a la disminución de la estabilidad osmótica de la célula, seguido por la fuga subsiguiente de los componentes intracelulares (Li et al., 2008; Qi et al., 2004, y Rabea et al., 2003). Además de la capacidad de adherirse a la pared celular, el quitosán también podría inhibir la transcripción del ARNm y la síntesis de proteínas por su unión a ADN bacteriano (Pelgrift et al., 2013). Por otro lado, el aumento de la actividad antifúngica de NEs-PLGA-CLT-QTS podría ser debida al tamaño conveniente de las nanoesferas para promover el proceso de fagocitosis y por lo tanto para mejorar la internalización celular de clotrimazol. Prior y colaboradores (2000) observaron una buena actividad antimicrobiana de gentamicina atrapado en nanopartículas de PLA/PLGA debido a su

tamaño adecuado para la fagocitosis. Esto también explica la actividad antifúngica de NEs-PLGA-CLT, que aún sin quitosán adsorbido en la superficie, también mejoró su actividad antifúngica en comparación con la solución metanólica de clotrimazol. El mecanismo antifúngico de NEs-PLGA-CLT-QTS sugerido es: primeramente adherirse a la pared celular bacteriana cargada negativamente en su superficie debido a interacciones electrostáticas con la superficie catiónica de las nanoesfera; provocar daños en la estructura de la pared celular debido a esta unión, liberar el clotrimazol para inhibir la síntesis de ergosterol y mantener de esta forma el efecto fungicida. En la Figura 32 se observa el efecto inhibitorio de las NEs-PLGA-CLT-QTS hasta 12 días después de la incubación de las placas.

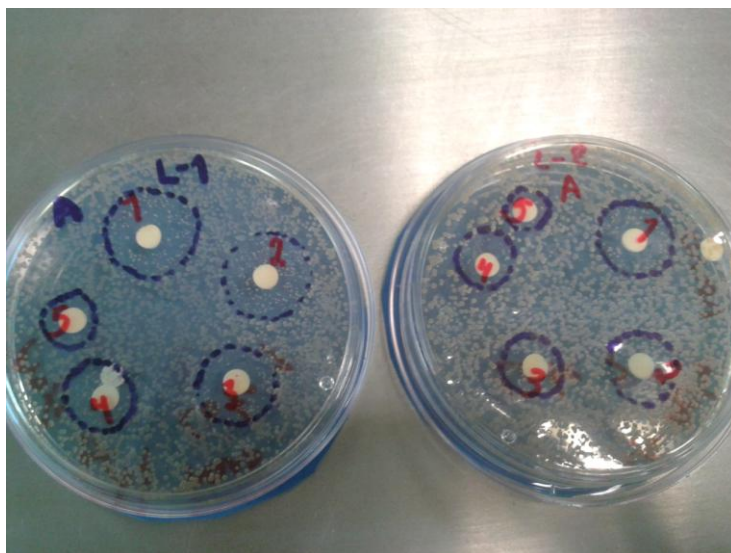


Figura 32. Placas de Agar Dextrosa Sabouraud con NEs-PLGA-CLT (L1) y NEs-PLGA-CLT-QTS (L2) con 12 días de incubación a 37°C.

5.3.9. Prueba de mucoadhesión por el método Mucina-Partícula para NEs-PLGA, NEs-PLGA-CLT, NEs-PLGA-CLT-QTS y mucina.

La mucoadhesión es una propiedad de un sistema que determina su interacción con el moco secretado en un sistema fisiológico. Los componentes principales del moco son las proteínas llamadas mucinas (Caramella et al., 2015). La evaluación de la mucoadhesión tiene una gran importancia para garantizar la interacción de las nanoesferas con el moco vaginal, además de la retención y residencia en el epitelio

vaginal para aumentar la eficacia antifúngica. Según Boddupalli y colaboradores (2010), la mucoadhesión de un sistema polimérico se muestra en las siguientes fases: contacto del sistema de mucosal (humectación y difusión) y consolidación (unión de las cadenas poliméricas con la mucina a través de interacciones electrostáticas). Takeichi y colaboradores (2005), desarrollaron un método de evaluación de mucoadhesión con partículas de Carbopol®-quitosán y su interacción con la mucina. Los investigadores determinaron la mucoadhesión del Carbopol y quitosán a través de los cambios de tamaño de partícula y potencial Z en la mucina. En esta metodología, las partículas de mucina se suspenden y se mezclan con una solución del polímero. Si la adición del polímero cambia el valor potencial zeta de las partículas de mucina, esto puede sugerir una mayor afinidad entre el polímero y las partículas de mucina. El proceso de mucoadhesión resulta como consecuencia de las interacciones entre las mucinas y depende en gran medida de la estructura molecular, incluida la carga de los materiales poliméricos mucoadhesivos. Dado que las moléculas de mucina son negativas a pH fisiológico; por medio del potencial zeta, es posible comprender las interacciones electrostáticas entre la mucina y las partículas poliméricas (Takeuchi et al., 2005).

En el presente estudio, se determinaron las variaciones en tamaño de partícula y potencial Z de las dispersiones de mucina con NEs-PLGA, NEs-PLGA-CLT y NEs-PLGA-CLT-QTS (valores de tamaño de partícula y potencial Z mostrados en el Anexo 12). Las variaciones del tamaño de partícula de las dispersiones de Mucina y NEs se muestran en la Figura 33. Los resultados indican un aumento en el tamaño de partícula de las NEs al incrementar de la concentración de mucina en las dispersiones evaluadas. En la Tabla 25, se muestra que existe una diferencia estadísticamente significativa del aumento del tamaño de partícula de las nanoesferas en función de la concentración de mucina ($F_{crit}=3.89 < F_{cal}=1355.54$; $\alpha =0.05$).

Este aumento de tamaño también fue observado por das Neves y colaboradores (2012) cuando estudiaron la mucoadhesividad de nanopartículas de policaprolactona (PCL) cargadas con dapivirina, así como con nanopartículas de quitosán, con este último polímero, los investigadores obtuvieron un tamaño de partícula de 800 nm, valor muy cercano al obtenido con el lote de NEs-PLGA-CLT-QTS. McGill y Smith, (2010) también obtuvieron el mismo aumento de tamaño en nanoesferas de poliestireno y micropartículas cuando evaluaron su interacción con la mucina. Estos autores informaron que las interacciones de las nanoesferas con mucina podrían deberse a que partículas de tamaño nanométrico presentan una mayor superficie de contacto

con las cadenas de mucina y pueden provocar un aumento de las zonas de unión. Las mucinas son glicoproteínas de alto peso molecular. Las especies que determinan las propiedades electrostáticas de la mucina son: residuos de ácidos glutámico y aspártico ($pK_a=4$), ácido siálico ($pK_a=2,6$) y grupos sulfato ($pK_a = 1,0$) (Lee et al., 2005). Por lo tanto, las moléculas de mucina están cargadas negativamente en soluciones con $pH > 2$. Las interacciones de polímeros mucoadhesivos con mucinas pueden ser: (a) la unión por puentes de hidrógeno, (b) las interacciones hidrofóbicas, (c) las interacciones electrostáticas y (d) el reconocimiento de lectinas/carbohidratos (Peppas y Huang, 2004).

Las propiedades de mucoadhesión del quitosán se deben a la formación de complejos de polielectrolitos con mucinas cargadas negativamente (Peppas y Huang, 2004). La gran área superficial de los nanosistemas tiene una mayor importancia debido a la interfaz disponible para establecer la unión con mucinas. Esta unión podría ser por períodos más largos que los alcanzados con estructuras más grandes (Sosnik et al., 2014). Los mayores incrementos en el diámetro hidrodinámico de NEs-PLGA-CLT-QTS pueden explicarse por interacciones electrostáticas entre la carga negativa de la mucina y la superficie cargada positivamente de NEs debido a los grupos amino de quitosán en pH vaginal ácido.

Tabla 25. Análisis de varianza para evaluar la diferencia significativa del tamaño de partícula de nanoesferas de PLGA en función de la concentración de mucina.

| Origen de las variaciones | Suma de cuadrados | Grados de libertad | Promedio de los cuadrados | Fcal | Probabilidad | Fcrit |
|---------------------------|-------------------|--------------------|---------------------------|----------------|--------------|-------------|
| Lote de NEs | 367557.66 | 2 | 183778.83 | <u>1355.54</u> | 7.32E-15 | <u>3.89</u> |
| Mucina (0.1%-1%) | 24775.38 | 1 | 24775.38 | <u>182.74</u> | 1.27E-08 | <u>4.75</u> |
| Interacción | 910.02 | 2 | 455.01 | 3.36 | 6.96E-02 | 3.89 |
| Dentro del grupo | 1626.91 | 12 | 135.58 | | | |
| Total | 394869.98 | 17 | | | | |

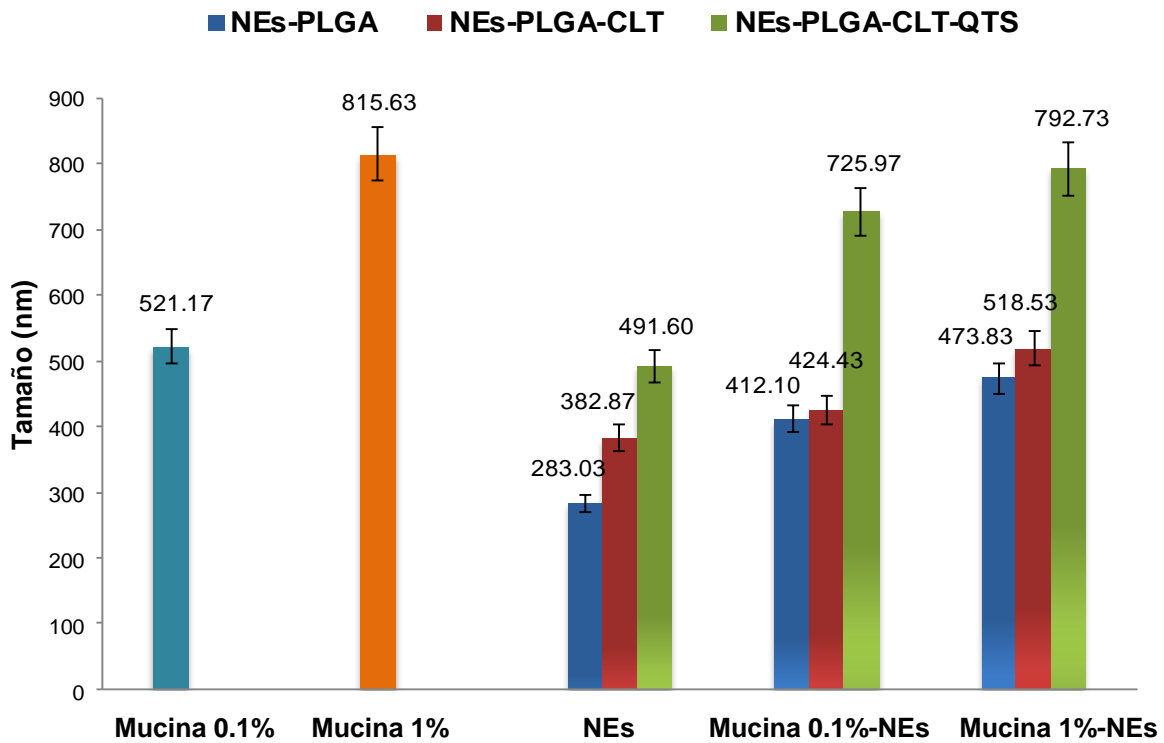


Figura 33. Tamaño de partícula promedio de dispersiones de NEs-PLGA-CLT-QTS con mucina ($n=3$).

La Figura 34 se muestra los valores de potencial Z de las nanoesferas en dispersiones de mucina al 0.1% y 1%. El potencial Z de las partículas de mucina disminuyó al interactuar con NEs-PLGA, NEs-PLGA-CLT y NEs-PLGA-QTS, estos cambios en los valores de potencial Z nos indican la interacción de las NEs con las partículas de mucina. De acuerdo con Takeuchi y colaboradores (2005), los valores de potencial Z se acercan a valores de cero como una tendencia hacia la agregación. Por otro lado, los valores de potencial Z de NEs-PLGA-CLT-QTS cambiaron drásticamente de valores positivos hacia valores negativos. Estos resultados podrían demostrar una alta afinidad de NEs-PLGA-CLT-QTS con la mucina para cubrir sus superficies. Estos resultados indican la propiedad de mucoadhesión de las nanoesferas de NEs-PLGA-CLT-QTS.

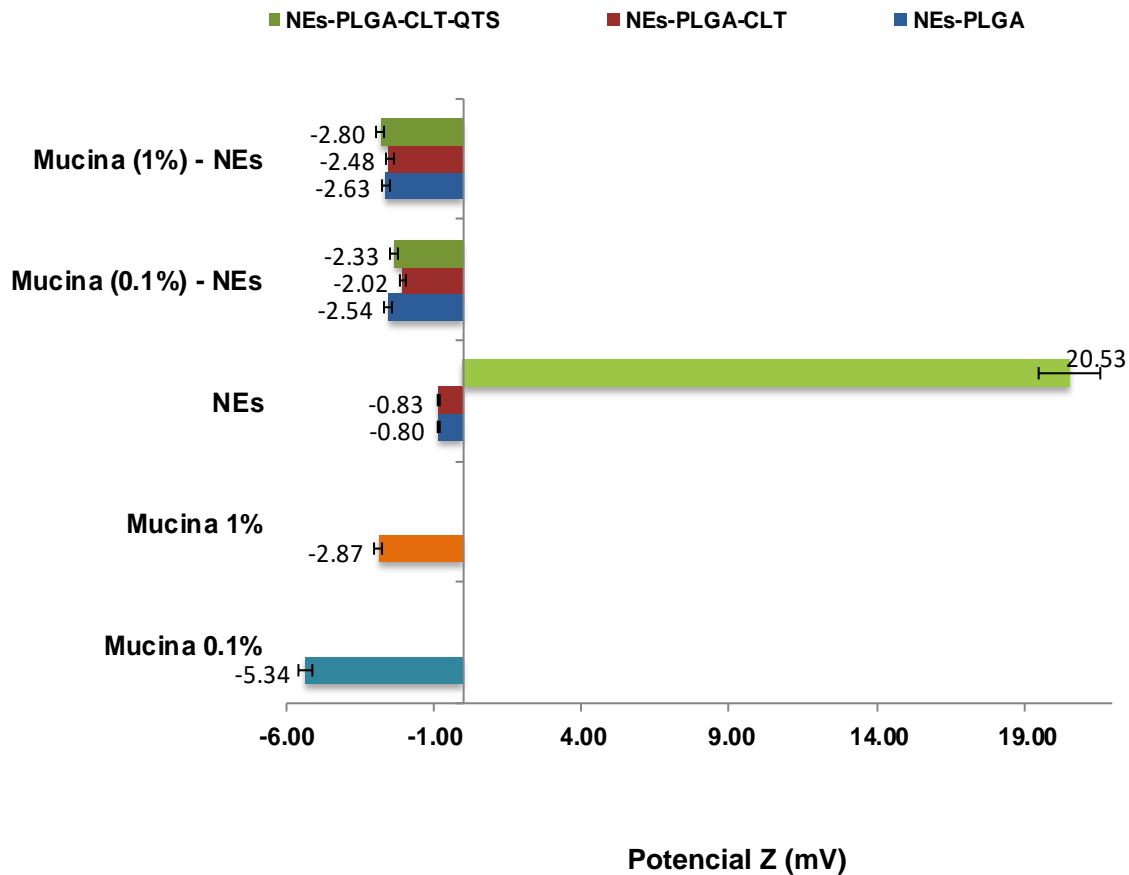


Figura 34. Potencial Z de dispersiones de NEs-PLGA, NEs-PLGA-CLT, NEs-PLGA-CLT-QTS con mucina ($n=3$).

5.3.10 Estudio de Microscopía de Fuerza Atómica para determinar la morfología y mucoadhesión de NEs-PLGA, NEs-PLGA-CLT y NEs-PLGA-CLT-QTS con mucina.

Las características estructurales y morfológicas de las nanoesferas se analizaron con imágenes de microscopía de fuerza atómica. Las NEs-PLGA y NEs-PLGA-CLT (Figuras 35 y 36, respectivamente) exhibieron una forma esférica y una superficie lisa; en contraparte, las NEs-PLGA-CLT-QTS (Figura 37) mostraron menos esfericidad y suavidad, debido al quitosán adsorbido en la superficie de las NEs. Taghavi y colaboradores (2017), también detectaron el aumento de tamaño y modificaciones en

la morfología por microscopía de fuerza atómica de nanoesferas de PLGA de epirubicina modificadas en la superficie con quitosán.

A pesar de que la técnica microscópica de fuerza atómica en modo oscilatorio no proporciona información al respecto de la composición química de las muestras, en el modo fase se puede obtener información cualitativa, basándose en la diferente cantidad de energía disipada por la muestra a medida que el *cantilever* “golpea” su superficie en cada ciclo de oscilación, de tal forma que los materiales más blandos absorben más energía que los materiales más rígidos. En la Figura 37c (Figura en el modo de fase), se observa un contraste de fase (zonas de la superficie oscuras) sobre la superficie de NEs-PLGA-CLT-QTS. Este contraste de fase sobre la superficie de las NEs, evidencia la presencia de quitosán en la superficie de NEs-PLGA-CLT-QTS por la diferencia de golpeteo del *cantilever* en la superficie.

Otra observación de las micrografías de NEs-PLGA-CLT-QTS (Figura 37) es que se encuentran más dispersas y distribuidas homogéneamente como partículas individuales en contraste con las NEs-PLGA (Figura 35) y NEs-PLGA-CLT (Figura 36), que se observaron más agrupadas. Esto podría explicarse por los valores de potencial Z: las NEs-PLGA-CLT-QTS obtuvieron un valor de potencial Z de +20.5 mV, mientras que las NEs-PLGA-CLT tuvieron un potencial Z de -0.8 mV, valores de potencial cercanos a cero y que pueden favorecer el acercamiento entre las nanoesferas.

El estudio de microscopía de fuerza atómica, también se utilizó para determinar de forma cualitativa la mucoadhesión de NEs-PLGA-CLT y NEs-PLGA-CLT-QTS con mucina. Para ello se obtuvieron micrografías de dispersiones con mucina al 0.1% (Figura 38), mucina 0.1% con NEs-PLGA-CLT (Figura 39) y mucina al 0.1% con NEs-PLGA-CLT-QTS (Figura 40).

Como se observa en la Figura 38 (dispersión de mucina al 0.1% sin NEs), la mucina formó una película polimérica, en la que se encuentran algunas partículas de mucina de mayor tamaño. En la Figura 39 (mucina (0.1%)-NEs-PLGA-CLT), pesar de que la mucina formó la película polimérica, se pueden observar a las NEs-PLGA-CLT en forma dispersa. Sin embargo, en la Figura 40 (mucina (0.1%)-NEs-PLGA-CLT-QTS), se puede observar que las NEs-PLGA-CLT-QTS, no se encuentran dispersas en la película de mucina, sino más bien agrupadas, al contrario de la muestra con NEs-PLGA-CLT. Lo anterior, nos podría indicar la mucoadhesión de las NEs debido a la presencia de mayores fuerzas de interacción entre las fibras de mucina con NEs-PLGA-CLT-QTS por medio de interacciones catiónicas del quitosán presente en la

superficie de las nanoesferas con la carga negativa de los grupos aniónicos de la mucina.

La técnica de MFA además de proporcionar información de la morfología, también nos podría proporcionar información cualitativa y cuantitativa de la mucoadhesión de nanoesferas de PLGA y quitosán con proteínas como la mucina. Li y colaboradores (2010), estudiaron las fuerzas de interacción entre una película de mucina con nanopartículas de PLGA y PLGA modificado con quitosán. A través de la determinación de las fuerzas de adhesión entre la mucina y nanopartículas de PLGA, los autores determinaron que sí se observa una fuerza de atracción entre las nanoesferas de PLGA modificadas con quitosán y la mucina. En el presente trabajo de tesis únicamente se observó la interacción entre las partículas de mucina con NEs-PLGA-CLT y NEs-PLGA-CLT-QTS; sin embargo, para obtener valores cuantificables de las fuerzas de adhesión entre la mucina y las NEs se sugiere continuar con los estudios de MFA.

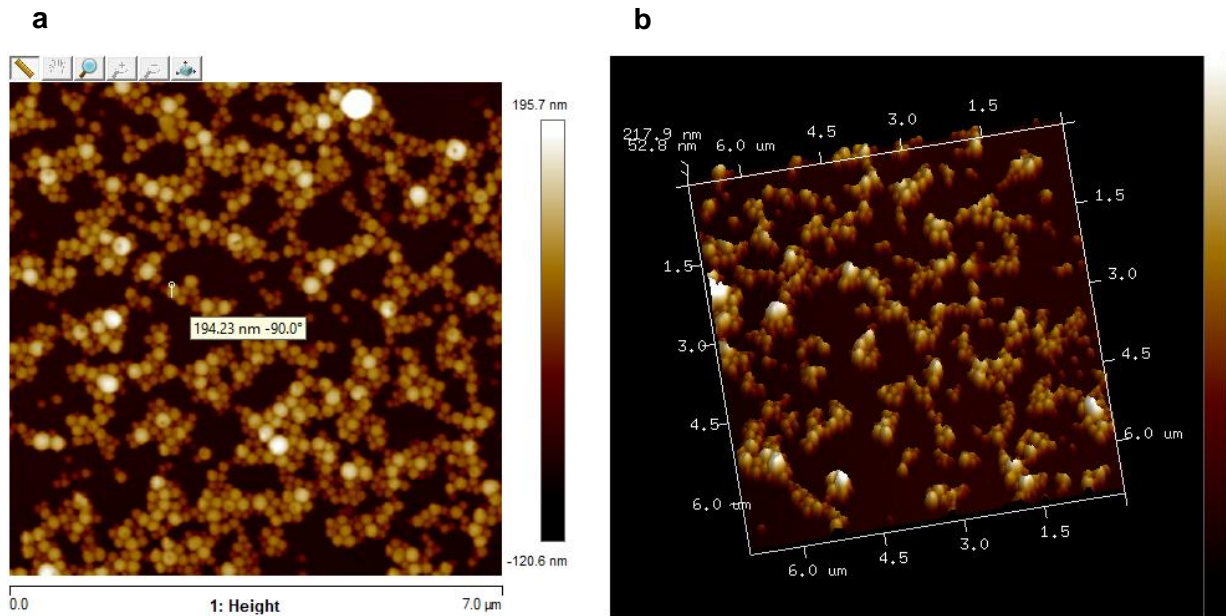


Figura 35. Micrografías por MFA bidimensional (a) y tridimensional (b) de NES-PLGA.

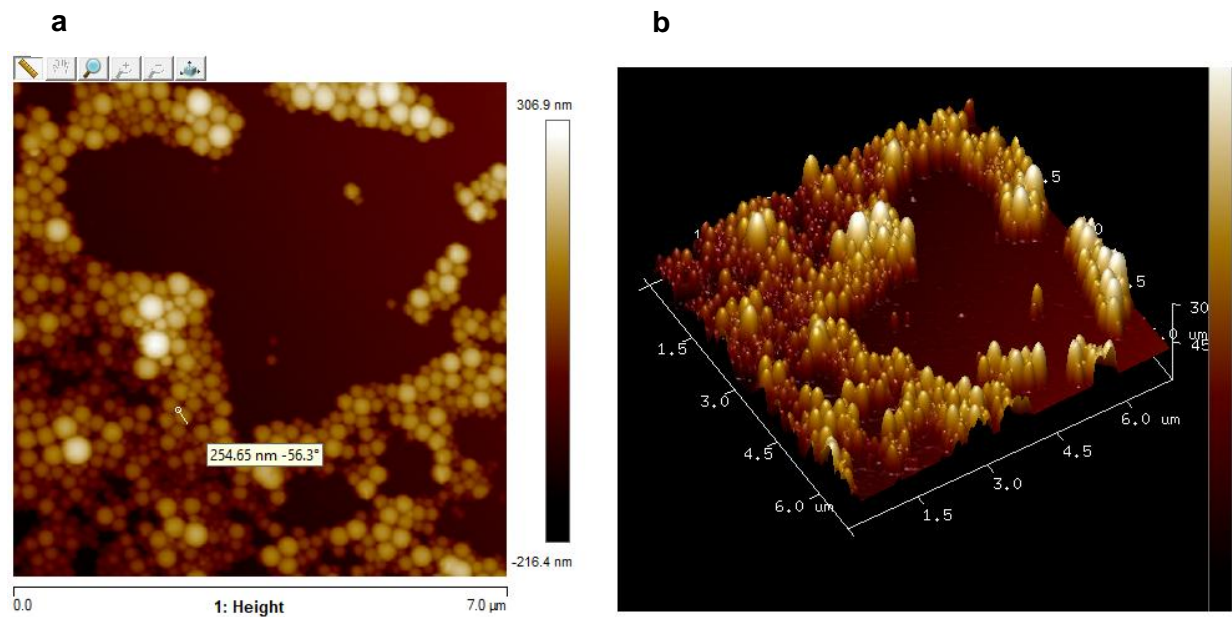


Figura 36. Micrografías por MFA bidimensional (a) y tridimensional (b) de NES-PLGA-CLT.

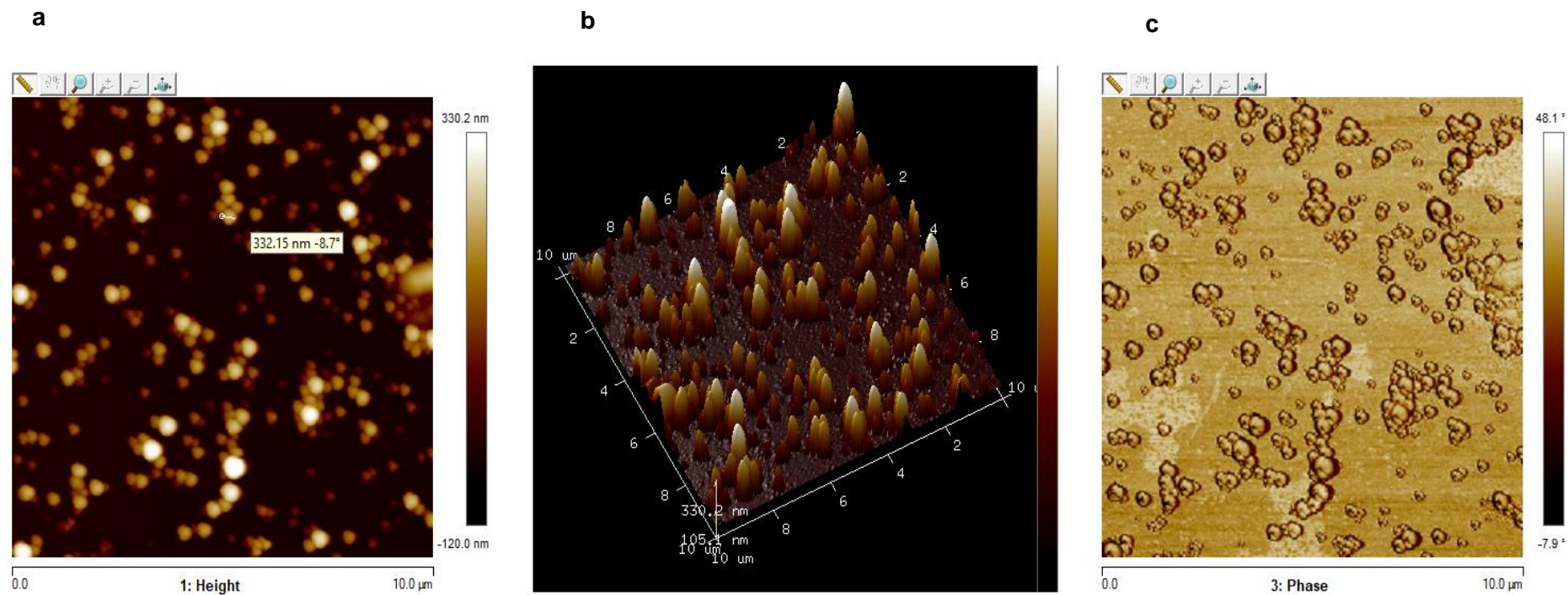


Figura 37. Micrografías por MFA bidimensional (a) tridimensional (b) y de fase (c) de NES-PLGA-CLT-QTS.

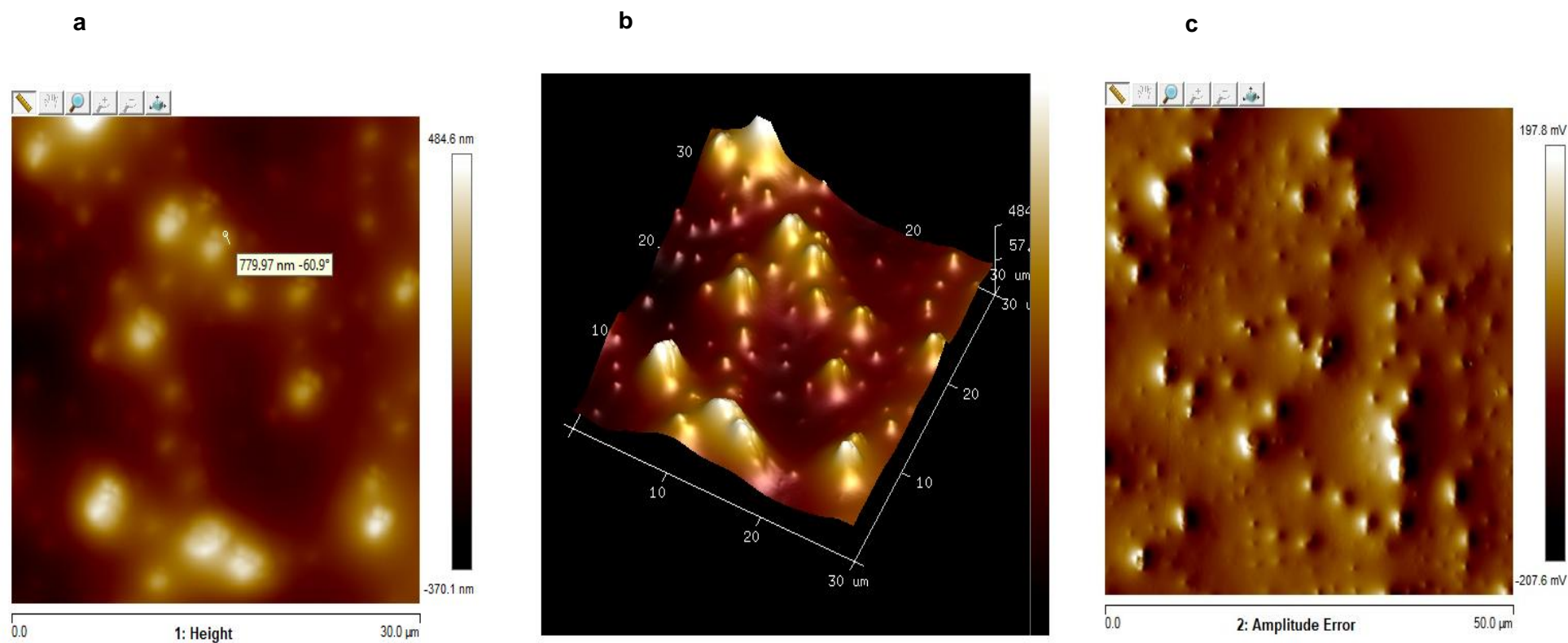


Figura 38. Micrografías por MFA bidimensional (a) y tridimensional (b) y de señal de error (c) de Mucina (0.1%).

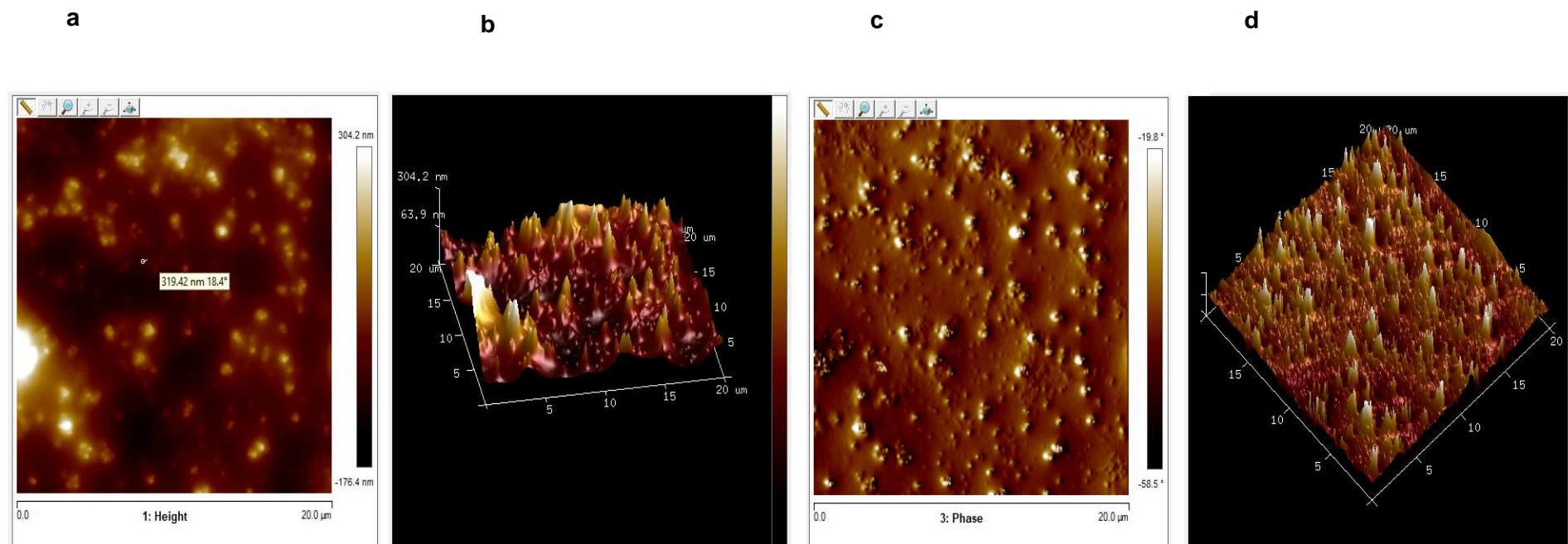


Figura 39. Micrografías por MFA bidimensional (a) y tridimensional (b) y de señal de error bidimensional (c) y señal de error tridimensional (d) de Mucina (0.1%) - NEs-PLGA-CLT.

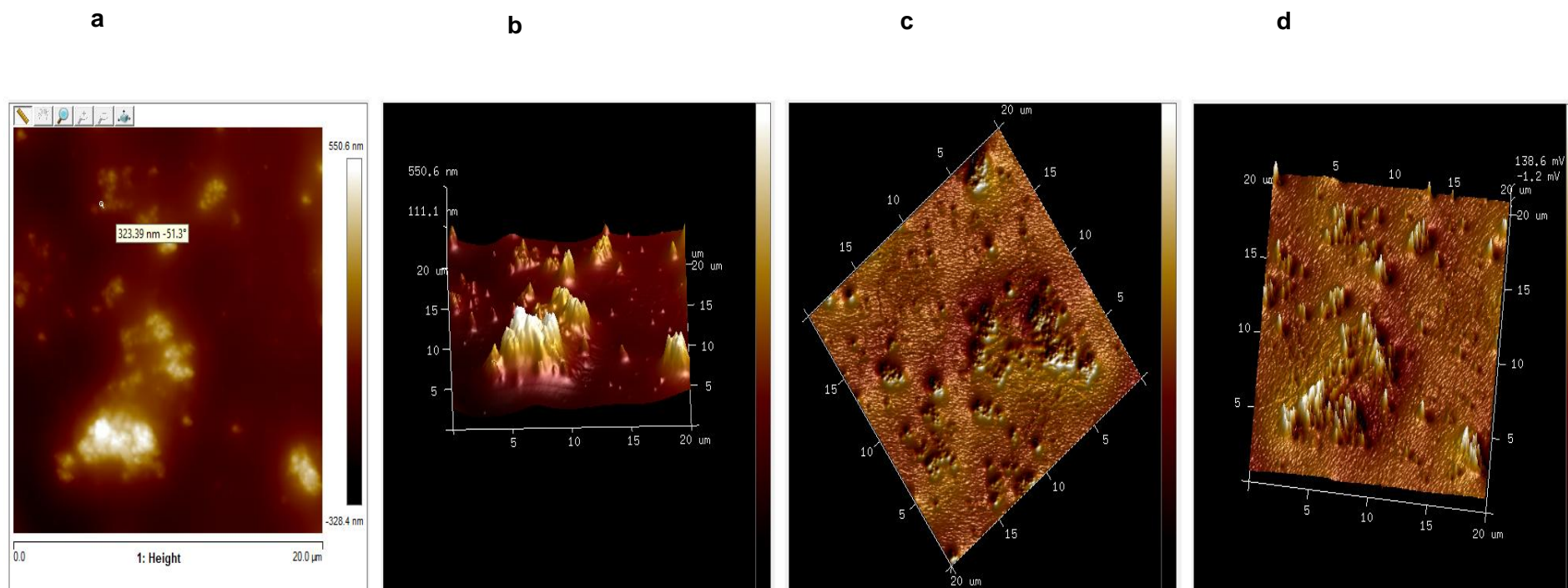


Figura 40. Micrografías por MFA bidimensional (a) y tridimensional (b) y de señal de error bidimensional (c) y señal de error tridimensional (d) de Mucina (0.1%) - NES-PLGA-CLT-QTS.

5.3.11 Determinación de la viabilidad celular de CLT, NEs-PLGA, NEs-PLGA-CLT y NEs-PLGA-CLT-QTS

Los estudios de viabilidad celular son importantes para un sistema de aplicación vaginal farmacéutica para determinar su bioseguridad y baja toxicidad de los sistemas en el epitelio vaginal. El comportamiento celular de los biomateriales determina su biocompatibilidad (Zhu et al., 2005). En este trabajo se evaluó la viabilidad celular de clotrimazol, quitosán, NEs-PLGA, NEs-PLGA-CLT y NEs-PLGA-CLT-QTS (Ver anexo 13). Los resultados de la Figura 41, muestran una viabilidad celular de todos los sistemas de nanoesferas por encima del 75%. Este valor es semejante al reportado por Miele y colaboradores (2018), quienes obtuvieron una viabilidad celular superior al 80% con nanopartículas de PLGA modificadas en la superficie con oleato de quitosán. Los resultados de la Figura 41 muestran un aumento de la viabilidad celular del fármaco liberado a partir de la NEs en comparación con el fármaco libre, lo cual sugiere una mayor protección al epitelio vaginal cuando el clotrimazol se encapsula en la matriz polimérica de PLGA. Por otra parte, se observó una ligera disminución de la viabilidad celular en NEs-PLGA-CLT-QTS, esto se podría ser atribuido al quitosán. Dodane y Vilivalam (1998), indican que probablemente el quitosán genere una perturbación en la membrana celular debido a sus cargas catiónicas. Aún con la ligera disminución de la viabilidad celular de NEs-PLGA-CLT-QTS debido a la presencia del quitosán, los valores de viabilidad de este polímero se mantuvieron por encima del 89% en el rango de concentraciones evaluado. Por lo tanto, podríamos decir que el quitosán es biocompatible con las células epiteliales vaginales en el rango de concentraciones trabajadas. Autores como Da Silva y colaboradores (2016) reportaron que el quitosán presenta un buen perfil en términos de viabilidad celular de las células HCE-T ARPE-19. De igual forma, Andrade y colaboradores (2011) reportaron que el quitosán, además de tener inocuidad, tiene una buena interacción con la membrana celular y la captación celular. Por lo tanto, consideramos que los sistemas NEs-PLGA-CLT-QTS y NEs-PLGA-CLT son bioseguros en el epitelio vaginal en el rango de concentración de 1-200 µg/ml.

A partir de los resultados obtenidos de esta investigación se demuestra que las NEs-PLGA cargadas con clotrimazol y modificadas superficialmente con quitosán mostraron ser una alternativa adecuada para el tratamiento de vaginitis.

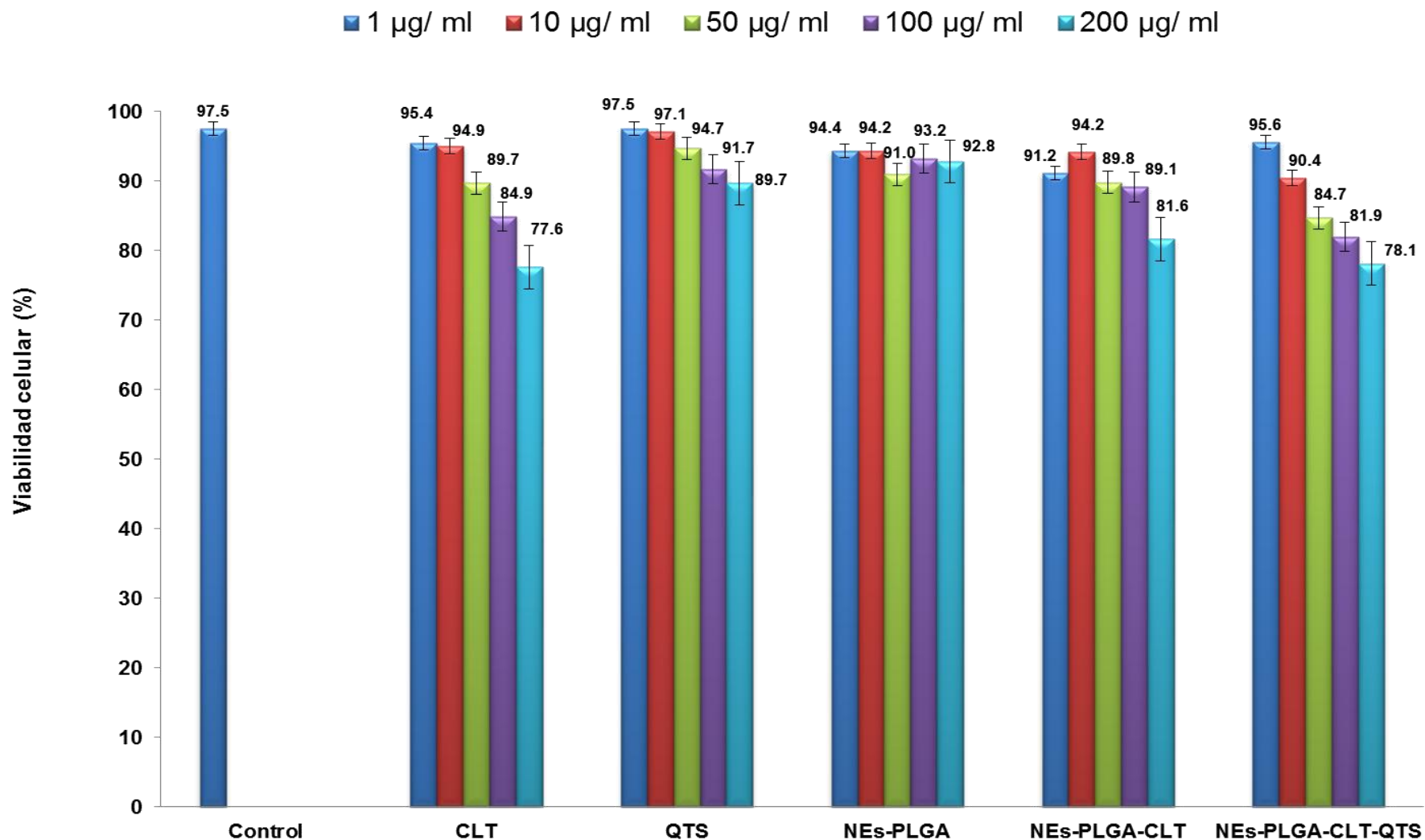


Figura 41. Resultados de viabilidad celular de CLT, NEs-PLGA, NEs-PLGA-CLT y NEs-PLGA-CLT-QTS en células epiteliales vaginales porcinas ($n=3$).

6.0 CONCLUSIONES

- ✓ Se prepararon NEs de PLGA cargadas con clotrimazol y modificadas en la superficie con quitosán por medio de la técnica de emulsificación-difusión. Los valores de eficiencia de encapsulación de clotrimazol en las NEs-PLGA-CLT-QTS, son superiores al 86%.
- ✓ Se desarrollaron los métodos de cuantificación de clotrimazol y fluconazol a partir de NEs-PLGA-CLT, NEs-PLGA-CLT-QTS y NEs-PLGA-FLU, así como el método de cuantificación del quitosán adsorbido sobre la superficie de NEs-PLGA-CLT. Los criterios de aceptación cumplieron con los especificados para la validación de métodos analíticos planteada por el Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos de México.
- ✓ La adsorción de quitosán en la superficie de las NEs-PLGA-CLT-QTS se comprobó por aumento en el tamaño de partícula, cambios en el potencial Z, así como estudios de espectroscopía infrarrojo y microscopía de fuerza atómica.
- ✓ Los estudios de adsorción de quitosán sobre la superficie de NEs-PLGA se ajustan al modelo de adsorción de Smith, modelo que propone la adsorción de quitosán en multicapas sobre la superficie de nanoesferas de PLGA.
- ✓ Los estudios cinéticos de liberación de clotrimazol a partir de las NEs-PLGA-CLT y NEs-PLGA-CLT-QTS revelan al proceso de difusión como el principal mecanismo que promueve el transporte del fármaco a través de las nanoesferas de PLGA. Se logró controlar el tiempo de liberación de clotrimazol a partir de NEs-PLGA-CLT y NEs-PLGA-CLT-QTS durante 18 días.
- ✓ Se desarrolló un método microbiológico de cilindro-placa para la evaluación antifúngica de NEs-PLGA-CLT y NEs-PLGA-CLT-QTS contra *Candida albicans*. El método microbiológico desarrollado cumple con los criterios de especificación para la validación de métodos analíticos planteada por el Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos de México.
- ✓ Las NEs-PLGA-CLT y NEs-PLGA-CLT-QTS mostraron una mayor inhibición contra *Candida albicans* en comparación con la solución metanólica de clotrimazol. Las NEs-PLGA-CLT-QTS mostraron una mayor eficacia

microbiológica, debido a la sinergia del efecto microbicida de clotrimazol y quitosán.

- ✓ Se evaluó la mucoadhesión de NEs-PLGA-CLT-QTS por medio del método de interacción de Mucina-Partícula. A través de este método se determinó la afinidad a la mucina por medio del aumento de tamaño y variaciones en el potencial Z.
- ✓ Se propuso un modelo porcino de células epiteliales vaginales para evaluar la viabilidad celular de las nanoesferas preparadas. Los valores superiores al 75% de NEs-PLGA-CLT y NEs-PLGA-CLT-QTS demuestran ser formulaciones biocompatibles con las células vaginales porcinas.
- ✓ Los estudios de Microscopía de Fuerza Atómica muestran de forma cualitativa una mayor afinidad a la mucina de las NEs-PLGA-CLT-QTS en comparación con el lote de NEs-PLGA-CLT.
- ✓ La adsorción de quitosán en las NEs-PLGA aumentó las propiedades antifúngicas contra *Candida albicans* así como sus propiedades mucoadhesivas.

7.0 PERSPECTIVAS

- Establecer un modelo de evaluación de la mucoadhesión de NEs-PLGA-CLT y NEs-PLGA-CLT-QTS así como complementar con la determinación de las fuerzas de adhesión por medio de metodologías de Microscopía de sonda de barrido: Microscopía de Fuerza Atómica y Microscopía de Fuerza Eléctrica para establecer una metodología cuantitativa en la evaluación de la mucoadhesión de las NEs.

- Realizar estudios de permeación *ex vivo* en tejido vaginal para evaluar la eficacia de NEs-PLGA-CLT-QTS.

- Realizar estudios *in vivo* para evaluar la permanencia de las nanoesferas en el epitelio vaginal y asegurar su eficacia durante el periodo de liberación del clotrimazol.

- Diseñar una formulación farmacéutica para administración de NEs-PLGA-CLT-QTS.

8.0 REFERENCIAS

Abramov Y., et al. (2000). Indomethacin for preterm labor: a randomized comparison of vaginal and rectal-oral routes. *Obstetrics & Gynecology*. 95, 482-486.

Acartürk F. (2009). Mucoadhesive vaginal drug delivery systems. *Recent Patents on Drug Delivery and Formulation*. 3: 193-205.

Ahlin P., et al. (2002). Investigation of polymeric nanoparticles as carriers of enalaprilat for oral administration. *International Journal of Pharmaceutics*. 239(1–2):113–120.

Aher N. G., et al. (2009). Synthesis and antifungal activity of 1,2,3-triazole containing fluconazole analogues. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*. 19(3),759-763.

Ahuja A., et al. (1997). Mucoadhesive drug delivery systems. *Drug Development and Industrial Pharmacy*. 23, 489-515.

Al-Muhtaseb H., et al. (2004). Water sorption isotherms of starch powders: Part 1: mathematical description of experimental data. *Journal of Food Engineering*. 61(3), 297-307.

Alexander N. J., et al. (2004). Why consider vaginal drug administration? *Fertility and Sterility*. 82(1).

Alukda D., et al. (2011). Formulation of tenofovir-loaded functionalized solid lipid nanoparticles Intended for HIV Prevention. *Journal of pharmaceutical Sciences*. 100(8): 3345-3356.

Andrade F., et al. (2011). Chitosan formulations as carriers for therapeutic proteins. *Current Drug Discovery Technologies*, 8, 157-172.

Andrews G. P., Laverty, T. P., Jones, D. S. (2009). Mucoadhesive polymeric platforms for controlled drug delivery. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 71(3), 505-518.

Ariza-Sáenz, M. et al. (2017). Penetration of polymeric nanoparticles loaded with an HIV-1 inhibitor peptide derived from GB virus C in a vaginal mucosa model. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 120, 98-106.

Aurimune CYT-6091. Tomado el 22-09-2012 de:
<http://www.cytimmune.com/go.cfm?do=page.view&pid=26>.

Baier G., et al. (2012). Surface Click Reactions on Polymeric Nanocapsules for Versatile Functionalization. *Macromolecules*. 45, 3419-3427.

Bansil R., Turner B.S. (2006). *Current Opinion in Colloid & Interface Science*. 11, 164-170.

Becher, P. (1990). A Review of: "Surfactants and Interfacial Phenomena". *Journal of Dispersion Science and Technology*. 11(5).

Bilati U., et al. (2005). Development of a nanoprecipitation method intended for the entrapment of hydrophilic drugs into nanoparticles. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 24(1):67-75.

Bilensoy E., et al. (2006). Mucoadhesive, thermosensitive, prolonged release vaginal gel for Clotrimazole: β -cyclodextrin complex. *AAPS American Association of Pharmaceutical Scientists*. 7(2).

Bloomfield V.A. (1983). Hydrodynamic properties of mucus glycoproteins. *Biopolymer*, 22, 2141-2154.

Boddupalli B. M., et al. (2010). Mucoadhesive drug delivery system: an overview. *Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research*. 1, 381-387.

Boente G., et al. (1996). Sorption isotherms of corn—Study of mathematical models. *Journal of Food Engineering*. 29(1), 115-128.

Boki K., et al. (1991). Equilibrium isotherm equations to represent moisture sorption on starch. *Journal of Food Science*. 56(4): 1106–1107.

Borhade V., et al. (2012). Clotrimazole nanoemulsion for malaria chemotherapy. Part I: Preformulation studies, formulation design and physicochemical evaluation. *International Journal of Pharmaceutics*. 431:138-148.

Brannon-Peppas, L. (1993). Novel vaginal drug release applications. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 11 (1-2), 169-177.

Briseño H. H. (2012). Candidiasis vulvovaginal recurrente: Nuevos protocolos terapéuticos. *Archivos Médicos de Actualización en Tracto genital Inferior*. 6:56-63.

Cantón L. E., et al. (2007). Métodos estandarizados por el CLSI para el estudio de la sensibilidad a los antifúngicos (documentos M27-A3, M38-A y M44-A). *Revista Iberoamericana de Micología*. 15a-1-17. Consultado el 20-02-2017 de: <http://www.quia.reviberoammicol.com/Capitulo15.pdf>

Capra R., et al. (2007). Rheological, dielectric and diffusion analysis of mucin/carbopol matrices used in amperometric biosensors. *Sensors and Actuators B: Chemical*. 124(2), 466-476.

Carvalho F. C., et al. (2010). Mucoadhesive drug delivery systems. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 46(1).

Caramella C. M., et al. (2015). Mucoadhesive and thermogelling systems for vaginal drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 92, 39-52.

Cassano R., et al. (2016). Preparation, characterization and *in vitro* activities evaluation of solid lipid nanoparticles based on PEG-40 stearate for antifungal drugs vaginal delivery. *Drug Delivery*. 23(3), 1047-56.

Centro Nacional de Excelencia Tecnológica en Salud (CENETEC). (2014). Prevención, Diagnóstico y tratamiento de la Vaginitis infecciosa en mujeres en edad reproductiva en el primer nivel de Atención. *Secretaría de Salud, México*. Consultado el 16-03-2016 de: http://www.cenetec.salud.gob.mx/descargas/gpc/CatalogoMaestro/081_GPC_Vaginitisinfec1NA/Vaginitis_ER_CENETEC.pdf

- Cevc G., et al. (2002). Ultradeformable lipid vesicles can penetrate the skin and other semi-permeable barriers unfragmented. Evidence from double label CLSM experiments and direct size measurements. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*. 1564 (1), 21-30.
- Chakravarthi S. S. (2011). Enhanced cellular association of paclitaxel delivered in chitosan-PLGA particles. *International Journal of Pharmaceutics*. 409(1–2):111–120.
- Chen, C., et al. (2016). Shape control of soft nanoparticles and their assemblies. *Chemistry of Materials*. 29(5), 1918-1945.
- Chorny M., et al. (2002). Lipophilic drug loaded nanospheres prepared by nanoprecipitation: effect of formulation variables on size, drug recovery and release kinetics. *Journal of Controlled Release*. 83(3): 389-400.
- Chuah L. H., et al. (2014). Cellular uptake and anticancer effects of mucoadhesive curcumin-containing chitosan nanoparticles. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 116(1), 228-236.
- Chung Y. C., et al. (2003). Effect of abiotic factors on the antibacterial activity of chitosan against waterborne pathogens. *Bioresource Technology*. 88, 179-184,
- Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos México, A.C. (CNQFBM). (2002). Guía de validación de métodos analíticos, México.
- Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT). (2014). Programa Especial de Ciencia, Tecnología e Innovación 2014-2018. Tomado el 25-11-2015 de: <http://www.siicyt.gob.mx/index.php/normatividad/nacional/631-3-programa-especial-de-ciencia-tecnologia-e-innovacion-2014-2018/file>
- Couvreur P. (2013). Nanoparticles in drug delivery: Past, present and future. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 65(1), 21-23.
- Crucho C. IC., Barros M.T. (2015). Formulation of functionalized PLGA polymeric nanoparticles for targeted drug delivery. *Polymer*. 68 (41-46).

Cu Y., Saltzman, W. M. (2009). Controlled surface modification with poly(ethylene)glycol enhances diffusion of PLGA nanoparticles in human cervical mucus. *Molecular Pharmaceutics*. 6(1), 173-181.

Cu Y., et al. (2011). *In vivo* distribution of surface-modified PLGA nanoparticles following intravaginal delivery. *Journal of Controlled Release*. 166 (2): 268-264.

Cu Y., et al. (2009). Controlled Surface Modification with Poly(ethylene)glycol Enhances Diffusion of PLGA Nanoparticles in Human Cervical Mucus. *Molecular Pharmaceutics*. 6 (1): 173-181.

Curotto E., Aros F. (1993). Quantitative determination of chitosan and the percentage of free amino groups. *Analytical Biochemistry*. 211, 240-241.

Da Silva, B. (2016). Chitosan-based nanoparticles for rosmarinic acid ocular delivery—*in vitro* tests. *International Journal of Biological Macromolecules*. 84, 112-120,

das Neves J., et al. (2010). Nanotechnology-based systems for the treatment and prevention of HIV/AIDS. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 62(4-5), 458-477.

das Neves J., et al. (2012). Interactions of microbicide nanoparticles with a simulated vaginal fluid. *Molecular Pharmaceutics*. 9, 3347-3356.

das Neves J. et al. (2012). Polymeric nanoparticles affect the intracellular delivery, antiretroviral activity and cytotoxicity of the microbicide drug candidate dapivirine. *Pharmaceutical Research*. 29 (6): 1468-1484.

das Neves J., et al. (2013). Assessing the physical-chemical properties and stability of dapivirine-loaded polymeric nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics*. 456, 307-314.

das Neves J., et al. (2015). Polymer-based nanocarriers for vaginal drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 92(15), 53-70.

das Neves J., et al. (2015). Precise engineering of dapivirine-loaded nanoparticles for the development of anti-HIV vaginal microbicides. *Acta Biomaterialia*. 18, 77-87.

das Neves J., Sarmiento, B. (2014). Drug Delivery and Development of Anti-HIV. *Microbicides*. CRC Press. 415-458.

de Assis N., et al. (2008). Release profiles and morphological characterization by atomic force microscopy and photon correlation spectroscopy of ^{99m}Techetium-fluconazole nanocapsules. *International Journal of Pharmaceutics*. 349(152-160).

Das S., et al. (2012). Are nanostructured lipid carriers (NLCs) better than solid lipid nanoparticles (SLNs): Development, characterizations and comparative evaluations of clotrimazole-loaded SLNs and NLCs? *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 47(1), 139-151.

De Jong W. H., Borm P. J. A. (2008). Drug delivery and nanoparticles: Applications and hazards. *International Journal of Nanomedicine*. 3(2), 133-149.

Delgado-Ramos, G. C. (2008). Economía Política de la Nanotecnología. *Revista Interdisciplinaria en Nanociencias y Nanotecnología*. 1(1).

Dinarvand R., et al. (2011). Polylactide-co-glycolide nanoparticles for controlled delivery of anticancer agents. *International Journal of Nanomedicine*. 6: 877-895.

Dodane V., Vilivalam V. D. (1998). Pharmaceutical applications of chitosan. *Pharmaceutical Science & Technology Today*. 1(6), 246-253.

Dodou D. et al. (2005). Mucoadhesives in the gastrointestinal tract: revisiting the literature for novel applications. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 60 (1), 1-16.

El-Gogary R. I., et al. (2014). Polyethylene glycol conjugated polymeric nanocapsules for targeted delivery of quercetin to folate-expressing cancer cells *in vitro* and *in vivo*. *ACS Nano*. 8, 1384-1401.

Ensign M. L., et al. (2012). Mucus-penetrating nanoparticles for vaginal drug delivery protect against herpes simplex virus. *Science Translational Medicine*. 4 (1): 1-12.

Esposito E., et al. (2013). Clotrimazole nanoparticle gel for mucosal administration. *Materials Science and Engineering: C*. 33(1), 411-418.

Expósito H. R. (2010). Quitosan, un biopolímero con aplicaciones en sistemas de liberación controlada de fármacos. Tesis de Doctorado, Universidad Complutense de Madrid, España.

Ferrati M. (2005). Cancer nanotechnology: opportunities and challenges. *Nature Reviews Cancer*. 5(3). 161-171.

Frank L. A., et al. (2017). The use of chitosan as cationic coating or gel vehicle for polymeric nanocapsules: Increasing penetration and adhesion of imiquimod in vaginal tissue. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 114, 202-212.

Fredenberg S., et al. (2011). The mechanisms of drug release in poly(lactic-co-glycolic acid)-based drug delivery systems - a review. *International Journal of Pharmaceutics*. 415, 34-52.

Furtado-Mosqueira V. C., et al. (2000). Poly(D,L-lactide) nanocapsules prepared by a solvent displacement process: Influence of the composition on physicochemical and structural properties. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 89(5), 614-626.

Galindo-Rodriguez S., et al. (2004). Physicochemical Associated with Nanoparticle Formation in the Salting-out, Emulsification-and Nanoprecipitation Methods. *Pharmaceutical Research*. 21(8), 1428-1439.

García G. N. (2011). Desarrollo de un sistema nanoparticulado de aplicación vaginal. Tesis Licenciatura, Universidad Nacional Autónoma de México, México.

Garse H., et al. (2015). Solid Lipid Nanoparticles Based Gel for Topical Delivery of Antifungal Agent. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*. 6(8), 3571-3579.

Gentile P., et al. (2014). An Overview of Poly(lactic-co-glycolic) Acid (PLGA)-Based Biomaterials for Bone Tissue Engineering. *International Journal of Molecular Sciences*. 15(3). 3640-36-59.

Ghora S., et al. (2004). S. Ghorai, K.K. Pant, Investigations on the column performance of fluoride adsorption by activated alumina in a fixed-bed. *Chemical Engineering Journal*. 98(1-2):165-173.

Guías de práctica clínica (GPC) IMSS-081-08. Diagnostico y tratamiento de la vaginitis infecciosa en mujeres en edad reproductiva en un primer nivel de atención. Consultado el 27-08-2017 de: <https://es.slideshare.net/anaateresaa/imss-081-08grr>

Guo C., et al. (2008). Understanding the adsorption mechanism of chitosan onto poly(lactide-co-glycolide) particles. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 70: 597-604.

Halley-Vensel T. D. (2002). Fluconazole: A valuable Fungistatic. *Prim Care Update OB/GYNS*. 9(5):181-183.

Han L., et al. (2017). Cervical mucus and contraception: what we know and what we don't. *Contraception*. 96, 310-321.

Hariharan S., et al. (2006); Design of estradiol loaded PLGA nanoparticulate formulations: A potential oral delivery system for hormone therapy. *Pharmaceutical Research*. 23(1):184-195.

Hernández-Bueno J. A., et al. (2008). Prevalencia de vaginitis mixta en mujeres latinoamericanas según la percepción de los médicos. Preferencia, efectividad e inocuidad de clindamicina más ketoconazol. *Ginecología y Obstetricia Mexicana*. 76 (11): 652-8.

Hong W., et al. (2017). pH-sensitive micelles for the intracellular co-delivery of curcumin and Pluronic L61 unimers for synergistic reversal effect of multidrug resistance. *Scientific Report*. 7 (42465).

Iyer V. et al. (2001). Vaginal drug delivery. Consultado el 30-08-2012 de: <http://www.expresspharmaonline.com/20080715/research02.shtml>

Jain G. K., et al. (2010). Mechanistic study of hydrolytic erosion and drug release behaviour of PLGA nanoparticles: influence of chitosan. *Polymer Degradation and Stability*. 95, 2360-2366.

Jøraholmen M. W., et al. (2014). Chitosan-coated liposomes for topical vaginal therapy: assuring localized drug effect. *International Journal of Pharmaceutics*. 472(1-2). 94-101.

Kang Y., et al. (2008). Preparation of PLLA/PLGA microparticles using solution enhanced dispersion by supercritical fluids (SEDS). *Journal of Colloid and Interface Science*. 322, 87-94.

Kapoor D. N., et al. (2015). PLGA: A unique polymer for drug delivery. *Therapeutic Delivery*. 6(1), 41-58.

Khan R. U., et al. (2004). Oral, Rectal, and Vaginal Pharmacokinetics of Misoprostol. *Obstetrics and Gynecology*. 103(5), 866-870.

Kharia A.A., et al. (2012). Formulation and Evaluation of Polymeric Nanoparticles and Antiviral Drug for Gastroretention. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Nanotechnology*. 4(4).

Kolling W. M., et al. (2013). The use of extemporaneously compounded 1% tetracaine to improve adherence with clotrimazole 1% topical solution in the treatment of ear infection: a case report. *American Journal of Otolaryngology*. 34(6), 757-758.

Konan Y. N., et al. (2003). Preparation and characterization of sterile sub-200 nm meso-tetra(4-hydroxyphenyl)porphyrin-loaded nanoparticles for photodynamic therapy. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 55(1):115–124.

Kong M., et al. (2010). Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: A state of the art review. *International Journal of Food Microbiology*. 144: 51–63.

Kreuter J. (2007). Nanoparticles—a historical perspective. *International Journal of Pharmaceutics*. 331 (1), 1-10.

- Kumar L., et al. (2010). Advantages of intra-vaginal drug delivery system: an overview. *International Journal of Pharmaceutical Research*. 2 (6): 582-594.
- Kwon H. Y., et al. (2001). Preparation of PLGA nanoparticles containing estrogen by emulsification–diffusion method. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 182 (1-3): 123-130.
- Lai S. K., et al. (2007). Rapid transport of large polymeric nanoparticles in fresh undiluted human mucus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 104 (5), 1482-1487.
- Lai S. K., et al. (2009). Mucus-penetrating nanoparticles for drug and gene delivery to mucosal tissues. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 61: 158–171.
- Lee J. W., et al. (2000). Bioadhesive-based dosage forms: the next generation. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 89 (7), 850-866.
- Lee S., et al. (2005). Porcine gastric mucin (PGM) at the water/poly(dimethylsiloxane) (PDMS) interface: influence of pH and ionic strength on its conformation, adsorption, and aqueous lubrication properties. *Langmuir*. 21, 8344-8353,
- Leane M.M., et al. (2004). Use of the ninhydrin assay to measure the release of chitosan from oral solid dosage forms. *International Journal of Pharmaceutics*. 271:241-249.
- Leurox J.C., et al. (1995). New approach for the preparation of nanoparticles by a modified emulsification- diffusion method. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 41(1):14-18.
- Li D.X., et al. (2010). A novel method for modifying AFM probe to investigate the interaction between biomaterial polymers (Chitosan-coated PLGA) and mucin film. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 75, 277-283.
- Li Q., et al. (2008). Antimicrobial nanomaterials for water disinfection and microbial control: potential applications and implications. *Water Research*, 42, 4591-4602.

- Li S., McCarthy S. (1999). Further investigations on the hydrolytic degradation of poly (DL-lactide). *Biomaterials*. 20,35-44.
- Li X., et al. (2010). Nanoparticles by spray drying using innovative new technology: The Buchi Nano Spray Dryer B-90. *Journal of Controlled Release*. 147(2), 304-310.
- Liu M., Fréchet M. J. (1999). Designing dendrimers for drug delivery. *Pharmaceutical Science & Technology Today*. 2(10), 393-401.
- Livengood C. H. (2009) Bacterial vaginosis: an overview for 2009. *Reviews in Obstetrics and Gynecology*. 2(1): 28-37.
- MacAdam, A. (1993). The effects of gastro-intestinal mucus on drug adsorption. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 11, 201-220.
- Makadia H. K., Siegel S. J. (2012). Poly Lactic-co-Glycolic Acid (PLGA) as Biodegradable Controlled Drug Delivery Carrier. *Polymers*. 3(3), 1377-1397.
- McGill S., Smyth H.D.C. (2010). Disruption of the mucus barrier by topically applied exogenous particles. *Molecular Pharmaceutics*. 7, 2280-2288,
- Mainardes R. M., et al. (2006). Thermoanalytical study of praziquantel-loaded PLGA nanoparticles. *Revista Brasileira de Ciências Farmaceuticas*. 42, 523-530.
- Mansuria S., et al. (2016). Mucoadhesion: A promising approach in drug delivery system. *Reactive and Functional Polymers*. 100, 151-172.
- Martínez C.A., et al. (2016). Avances recientes hacia la aplicación comercial de la transferencia de embriones en la especie porcina. *Suis* (133). Artículo consultado el 20-02-2018 de: <http://albeitar.portalveterinaria.com/noticia/15251/articulos-porcino/avances-recientes-hacia-la-aplicacion-comercial-de-la-transferencia-de-embriones-en-la-especie-porcina.html>
- Machado A., et al. (2016). Development and *in vivo* safety assessment of tenofovir-loaded nanoparticles-in-film as a novel vaginal microbicide delivery system. *Acta Biomaterialia*. 44, 332-340.

Machado R. M., et al. (2015). Studies and methodologies on vaginal drug permeation. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 92, 14-16.

Mendling W. (2012). *Vulvovaginal Candidosis: Theory and Practice*. Springer Science & Business Media. p171.

Mathiowitz E., et al. (1999). Bioadhesive drug delivery systems: fundamentals, novel approaches, and development. *Drugs and the Pharmaceutical Sciences*. p696.

Mathu M. S., et al. (2009). PLGA nanoparticle formulations of risperidone: preparation and neuropharmacological evaluation. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*. 5(3): 323-333.

Miele D., et al. (2018). Chitosan oleate salt as an amphiphilic polymer for the surface modification of Poly-Lactic-Glycolic Acid (PLGA) nanoparticles. Preliminary studies of mucoadhesion and cell interaction properties. *Marine Drugs*. 16(11), 447.

Mills B. B. (2017). Vaginitis: Beyond the Basics. *Obstetrics & Gynecology Clinics of North America*. 44, 159–177.

Moffat A. C., et al. (2011). *Clarke's Analysis of Drugs and Poisons*, fourth edition. Pharmaceutical Press, London, UK.

Mora-Huertas C. E., et al. (2012). Nanocapsules prepared via nanoprecipitation and emulsification–diffusion methods: Comparative study. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 80 (1): 235-239.

Mora-Huertas C. E., et al. (2011). Influence of process and formulation parameters on the formation of submicron particles by solvent displacement and emulsification–diffusion methods: Critical comparison. *Advances in Colloid and Interface Science*. 163(2):90–122.

Mourya V. K., et al. (2010). Carboxymethyl chitosan and its applications. *Advanced Materials Letters*. 1, 11-33.

- Müller R.H., et al. (2002). Nanostructured lipid matrices for improved microencapsulation of drugs. *International Journal of Pharmaceutics*. 242(1–2),121-128.
- Murakami H., et al. (1999). Preparation of poly(dl-lactide-co-glycolide) nanoparticles by modified spontaneous emulsification solvent diffusion method. *International Journal of Pharmaceutics*. 187(2):143–152.
- Ndesendo V. M. K., et al. (2009). *In vitro* and *ex vivo* bioadhesivity analysis of polymeric intravaginal caplets using physicomaterials and computational structural modeling. *International Journal of Pharmaceutics*. 370, 151-159.
- Ohya Y. et al. (1994). Release behavior of 5-fluoracil from chitosan-gel nanospheres immobilizing 5-fluoracil coated with polysaccharides and their cell specific cytotoxicity. *Pure and Applied Chemistry*. 31: 629-542.
- Olmsted S. S., et al. (2001). Diffusion of macromolecules and virus-like particles in human cervical mucus. *Biophysical Journal*. 81(4), 1930-1937.
- Ombrella A. M. et al. (2008). Protease and phospholipase activities of *Candida albicans* isolated from vaginal secretions with different pH values. *Revista Iberoamericana de Micología*. 25(1).
- Owen D.H., Katz, D.F. (1999). A vaginal fluid simulant. *Contraception*. 59(2), 91-95.
- Panáček A., et al. (2009). Antifungal activity of silver nanoparticles against *Candida* spp. *Biomaterials* . 30: 6333–6340.
- Patel D. B., et al. (2009). Liposomal drug delivery of metronidazole for the local treatment of vaginitis. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Nanotechnology*. 2, 421–427.
- Pavelic Ž., et al. (2005). Characterisation and *in vitro* evaluation of bioadhesive liposome gels for local therapy of vaginitis. *International Journal of Pharmaceutics*. 301 (1–2), 140-148.

Pawar D., et al. (2013). Development and characterization of surface modified PLGA nanoparticles for nasal vaccine delivery: Effect of mucoadhesive coating on antigen uptake and immune adjuvant activity. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 85: 550–559.

Pelgrift R. Y. (2013). Nanotechnology as a therapeutic tool to combat microbial resistance. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 65, 1803-1815.

Pendergrass P. B. et al. (2003). Surface Area of the Human Vagina as Measured from Vinyl Polysiloxane Casts. *Gynecological and Obstetric Investigation*. 55, 110-113.

Peppas N. A., Huang Y. (2004). Nanoscale technology of mucoadhesive interactions. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 56, 1675-1687.

Perea E. J. (2010). Infecciones del aparato genital femenino: vaginitis, vaginosis y cervicitis. *Medicine*. 10(57): 3910-3914.

Pillay S. (2009). Design and development of an implantable drug delivery polymeric scaffold for the treatment of parkinson's disease. Tesis de maestría, Universidad de Witwatersrand, Johannesburgo, Sudáfrica.

Pinto-Reis C., et al. (2006). Nanoencapsulation I. Methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*. 2: 8-21.

Piñón-Segundo E., et al. (2005). Preparation and characterization of triclosán nanoparticles for periodontal treatment. *International Journal of Pharmaceutical*, 294: 217-232.

Plasari E., et al. (1997). Influence of Process Parameters on the Precipitation of Organic Nanoparticles by Drowning-Out. *Chemical Engineering Research and Design*. 75(2):237–244.

Poletto F. S., et al. (2008). Controlling the size of poly(hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) nanoparticles prepared by emulsification–diffusion technique using

ethanol as surface agent. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 324(1–3):105–112.

Potencial Z: Un curso completo en 5 minutos. Tomado el 29-09-2012 de: http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/PotencialZeta_1246.pdf

Prior S., et al. (2000). Gentamicin encapsulation in PLA/PLGA microspheres in view of treating Brucella infections. *International Journal of Pharmaceutics*. 196, 115-125.

Qi, L.F., et al. (2004). Preparation and antibacterial activity of chitosan nanoparticles. *Carbohydrate Research*. 339: 2693–2700.

Quintanar-Guerrero D., et al. (1997). A mechanistic study of the formation of polymer nanoparticles by emulsification-diffusion technique. *Colloid and Polymer Science*. 275: 640-647

Quintanar-Guerrero D. et al. (1998) Preparation techniques and mechanisms of formation of biodegradable nanoparticles from preformed polymers. *Drug Development and Industrial Pharmacy*. 24: 1113-1117.

Quintanar-Guerrero D., et al. (2005). Adaptation and optimization of the emulsification-diffusion technique to prepare lipidic nanospheres. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 26(2):211-218.

Rabea E. I., et al. (2003). Chitosan as Antimicrobial Agent: Applications and Mode of Action. *Macromolecules*. 4(6), 1457-1465.

Refai H., et al. (2017). Development and characterization of polymer-coated liposomes for vaginal delivery of sildenafil citrate. *Drug Delivery*. 24(1), 278-288.

Rando R. F. (2006). Critical design features of phenyl carboxylate-containing polymer microbicides. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 50 (9): 3081-3089.

Ravani L., et al. (2013). Clotrimazole-loaded nanostructured lipid carrier hydrogels: thermal analysis and *in vitro* studies. *International Journal of Pharmaceutics*. 454, 695-702.

- Rencher F. W. (1999). Vaginal microbicide formulations workshop. Lippincott-Raven Publishers, 1-11.
- Rivera-Sánchez R., et al. (2006). Identificación de *Candida* causantes de vaginitis en la población mexicana. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 24(10), 634-636.
- Ritthidej G. C. (2011). Nasal Delivery of Peptides and Proteins with Chitosan and Related Mucoadhesive Polymers. *Peptide and Protein Delivery*. 47-68.
- Robo D. et al. (2016). Nanoparticle-Based Medicines: A Review of FDA-Approved Materials and Clinical Trials to Date. *Pharmaceutical Research*. 33, 2373–2387.
- Rodríguez C. M. I. (2010). Nanoparticle infiltration to prepare solvent-free controlled drug delivery systems. *International Journal of Pharmaceutics*. 371(1–2): 177–181.
- Rosas J. E., Pedraz J. L. (2007). Microesferas de PLGA: un sistema para la liberación controlada de moléculas con actividad inmunogénica. *Revista Colombiana de Ciencias Químico – Farmacéuticas*. 36(2).
- Rosenberg M. J., et al. (1995). Use and misuse of oral contraceptives: risk indicators for poor pill taking and discontinuation. *Contraception*. 51, 283–88.
- Rossi S., et al. (2017). Chitosan Ascorbate Nanoparticles for the Vaginal Delivery of Antibiotic Drugs in Atrophic Vaginitis. *Marine Drugs*. 15(10), 319.
- Saariaho M., et al. (1997). On lyotropic behavior of molecular bottle-brushes: a Monte Carlo computer simulation study. *Journal of Chemical Physics*. 107, 3267-3276.
- Sah H., et al. (2013). Concepts and practices used to develop functional PLGA-based nanoparticulate systems. *International Journal of Nanomedicine*. 8, 747-765.
- Salehizadeh H., et al. (2012). Synthesis and characterization of core-shell Fe O -gold-chitosan nanostructure. *Journal of Nanobiotechnology*. 10, 3.
- Sánchez-Hernández J.A., et al. (2017). Prevalencia de *Candida albicans* y su relación con cambios en el pH vaginal. *Atención Familiar*. 24 (1), 18-22.

Sankar R., Jain S. K. (2013). Development and characterization of gastroretentive sustained-release formulation by combination of swelling and mucoadhesive approach: a mechanistic study. *Drug Design, Development and Therapy*. 7, 1455-1469.

Sassi A. B. (2004). Permeability of tritiated water through human cervical and vaginal tissue. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 93.

Sharma S., et al. (2016). PLGA-based nanoparticles: a new paradigm in biomedical applications. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* . 80, 30-40.

Sherrington S. L. (2017). Adaptation of *Candida albicans* to environmental pH induces cell wall remodelling and enhances innate immune recognition. *PLOS Pathogens*. 13(15).

Shailesh S.C. et al. (2013). Self-Assembled, chitosan grafted PLGA nanoparticles for intranasal delivery: design, development and ex vivo characterization. *Polymer-Plastics Technology and Engineering*. 52: 368-380.

Sheehan J.K. (1986). Electron microscopy of cervical, gastric and bronchial mucus glycoproteins. *Biochemical Journal*. 239, 147-153.

Shuckla S. K., et al. (2013). Chitosan-based nanomaterials: a state-of-the-art review. *International Journal of Biological Macromolecules*. 59, 46-58.

Santos S. S., et al. (2013). Clotrimazole-loaded Eudragit® RS100 nanocapsules: Preparation, characterization and *in vitro* evaluation of antifungal activity against *Candida* species. *Materials Science and Engineering C*. 33: 1389–1394.

Saltzman W. M., et al. (1994). Antibody diffusion in human cervical mucus. *Biophysical Journal*. 66: 508-515.

Secretaría de Economía. (2008). Diagnóstico y Perspectiva de la Nanotecnología en México. Centro de Investigación en Materiales Avanzados S. C. Consultado el 19-06-2011 de:
<https://www.google.com.mx/search?q=Diagn%C3%B3stico+y+Perspectiva+de+la+Nanotecnolog%C3%ADa+en+M%C3%A9xico.+Centro+de+Investigaci%C3%B3n+en+Mat>

[eriales+Avanzados&oq=Diagn%C3%B3stico+y+Perspectiva+de+la+Nanotecnolog%C3%ADa+en+M%C3%A9xico.+Centro+de+Investigaci%C3%B3n+en+Materiales+Avanzados&aqs=chrome..69i57.526j0j8&sourceid=chrome&ie=UTF-8](#)

Secretaría de Salud (SSA). (2004). Manual para Capacitadores en el Manejo Sindromático de las Infecciones de Transmisión Sexual (ITS). CENSIDA. Segunda edición.

Secretaría de Salud (SSA). (2017). Notificación semanal de casos nuevos de enfermedades 2017. Reporte correspondiente a febrero de 2017. Consultado el 18/05/2017 de: https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/201651/2_Reporte_de_febrero_2017.pdf

Sherrington S. L., et al. (2017). Adaptation of *Candida albicans* to environmental pH induces cell wall remodelling and enhances innate immune recognition. *PLoS Pathogens*. 13(5).

Siepmann J., Peppas, N A. (2011). *International Journal of Pharmaceutics*. 418, 6-12.

Sobel J. D., et al. (1995). Single oral dose fluconazole compared with conventional clotrimazole topical therapy of *Candida* vaginitis. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. 172(4):1263-1268.

Sosnik A., et al. (2014). Mucoadhesive polymers in the design of nano-drug delivery systems for administration by non-parenteral routes: a review. *Progress in Polymer Science*, 39, 2030-2075.

Souto E. B., et al. (2004). Development of a controlled release formulation based on SLN and NLC for topical clotrimazole delivery. *International Journal of Pharmaceutic*. 278(1):71–77.

Strous G.J., Dekker J. (1992). Mucin-Type Glycoproteins. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*. 27(1-2).

Sudheesh K., et al. 2013. Chitosan-based nanomaterials: A State of the Art Review. *International Journal of Biological Macromolecules*. 59: 46–58.

Taghavi S., et al. (2017). Chitosan-modified PLGA nanoparticles tagged with 5TR1 aptamer for *in vivo* tumor-targeted drug delivery. *Cancer Letters*. 400, 1-8.

Takeuchi H., et al. (2005). Novel mucoadhesion tests for polymers and polymer-coated particles to design optimal mucoadhesive drug delivery systems. *Advanced Drug Delivery and Reviews*. 57(11), 1583-1594.

Thakur S., et al., (2015). Impact of pegylation on biopharmaceutical properties of dendrimers. *Polymer*. 59 (24), 67-92.

Torchilin V. P., et al. (1995). New synthetic amphiphilic polymers for steric protection of liposomes *in vivo*. *Journal of pharmaceutical Sciences*. 84(9). 1049-1053.

Trotta M., et al. (2003). Preparation of solid lipid nanoparticles by a solvent emulsification–diffusion technique. *International Journal of Pharmaceutics*. 257(1-2): 153-160.

Tur M.C., et al. (2013). La vulvovaginitis candidiásica recurrente. *Progresos de Obstetricia y Ginecología*. 56(2), 108-116.

Universidad Autónoma de San Luis Potosí (UASLP). (2013). Conteo celular y evaluación de viabilidad. Standard Operating Procedures (SOPs). Laboratorio de Genómica Viral y Humana. Facultad de Medicina, UASLP. Consultado el 20-05-2015 de: http://www.genomica.uaslp.mx/Protocolos/Cell_counts_SPA.pdf

Van de Ven, H., et al. (2012). PLGA nanoparticles and nanosuspensions with amphotericin B: Potent *in vitro* and *in vivo* alternatives to Fungizone and AmBisome. *Journal of Controlled Release*. 161(3), 795-803.

Vanić Ž., Škalko-Basnet N. (2017). Nanoformulations for Vaginal Therapy. *Nanotechnology Applied To Pharmaceutical Technology*. 183-221.

- Venditti I. (2017). Morphologies and functionalities of polymeric nanocarriers as chemical tools for drug delivery: A review. *Journal of King Saud University*. Available online el 1 de noviembre del 2017. Consultado el 27-03-2018 de: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S101836471730770X>
- Ventola, C. L. (2017). Progress in Nanomedicine: Approved and Investigational Nanodrugs. *P&T*. 42(12). Consultado el 15-07-2018 de: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5720487/>
- Vigil P.P. (2014). El moco cervical en la fisiología reproductiva. Selección de Temas en Ginecoobstetricia, Tomo III. Ediciones Publiimpacto. Santiago, pp. 325-34.
- Villafuerte-Robles L. (2009). Nanotecnología Farmacéutica. *Razón y Palabra*. 14, 1-20.
- Wang X.H., et al. 2004. Preparation, characterization and antimicrobial activity of chitosan-Zn complex. *Carbohydrate Polymers*. 56: 21–26.
- Weissig V., et al. (2014). Nanopharmaceuticals (part 1): products on the market. *International Journal of Nanomedicine*. 9, 4357-4373.
- Weissig V., Guzman-Villanueva D. (2015). Nanopharmaceuticals (part 2): products in the pipeline. *International Journal of Nanomedicine*. 10(1), 1245-1257.
- Wing D., et al. (1995). Misoprostol: an effective agent for cervical ripening and labor induction. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. 172:1811–1818.
- Woodrow K. A. (2009). Intravaginal gene silencing using biodegradable polymer nanoparticles densely loaded with small-interfering RNA. *Nature Materials*. 8. 526-533.
- Yamamoto T., et al. (2007). What are determining factors for stable drug incorporation into polymeric micelle carriers? Consideration on physical and chemical characters of the micelle inner core. *Journal of Controlled Release*. 123(1), 11-18.
- Yang R., et al. (2009). Cationic formulation of paclitaxel-loaded poly D,L-lactic-co-glycolic acid (PLGA) nanoparticles using an emulsion-solvent diffusion method. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 4(2): 89-95.

Yoncheva K., et al. (2011). Development of mucoadhesive poly(lactide-co-glycolide) nanoparticles for ocular application. *Pharmaceutical Development and Technology*. 16(1): 29–35.

Zhang L., et al. (2007). Nanoparticles in Medicine: Therapeutic Applications and Developments. *Clinical Pharmacology and Therapeutic*. 83(5).

Zhu A. P., et al. (2005). Viabilidad celular de hidrogeles semiinterpenetrados que contienen quitosano basados en PCL-PEG-PCL macrómero diacrilato. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*. 16, 301 – 316.

Zolnik B., Burgess D. J. (2007). Effect of acidic pH on PLGA microsphere degradation and release. *Journal of Controlled Release*. 122, 338-344.

9.0 ANEXOS

ANEXO 1. Propiedades fisicoquímicas de clotrimazol y fluconazol

Propiedades de clotrimazol:

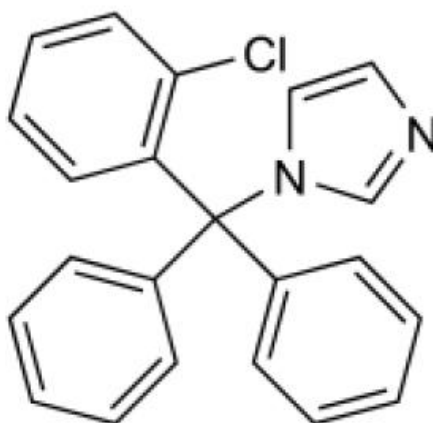


Figura 42. Estructura química de clotrimazol.

Punto de fusión: 147-149 °C.

Coefficiente de partición (Log P)= 6.3

pKa= 4.7 y 6.02 (Borhade V. *et al.*, 2012)

Solubilidad: Poco soluble en agua, benceno y tolueno; soluble en etanol, acetona, cloroformo y acetato de etilo; poco soluble en éter. (Moffat *et al.*, 2011).

Propiedades de fluconazol:

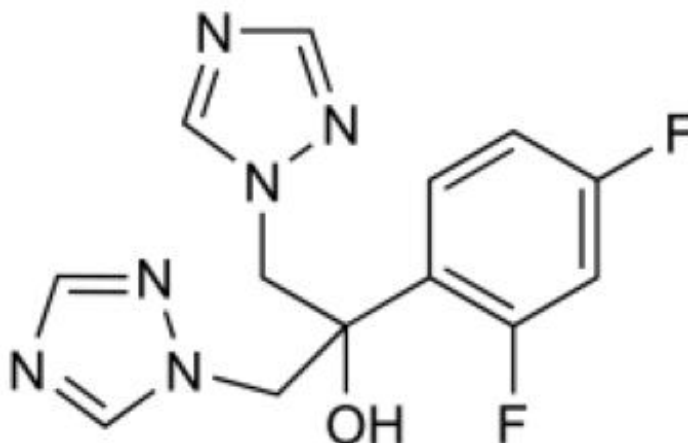


Figura 43. Estructura química de fluconazol.

Punto de fusión: 138 a 140 °C.

Coeficiente de partición (Log P)= 1.0

pKa= 2.03

Solubilidad: Poco soluble en agua. Soluble en acetona, acetato de etilo y alcohol (Moffat et al., 2011).

ANEXO 2.- Fórmula del Fluido Vaginal Simulado

Tabla 26. Composición química del Fluido Vaginal Simulado pH= 4.2. (Formulación tomada de Owen et al., 1999).

| Componente | Cantidad (g) |
|---------------------|---------------------------------|
| NaCl | 3.51 |
| KOH | 1.40 |
| Ca(OH) ₂ | 0.22 |
| Ácido láctico | 2.0 |
| Glicerol | 0.16 |
| Úrea | 0.40 |
| Glucosa | 5.0 |
| Ácido acético | el requerido para ajuste pH=4.2 |
| Agua destilada | 1 litro |

ANEXO 3.- Desarrollo del método de cuantificación de clotrimazol.

a) Especificidad para clotrimazol:

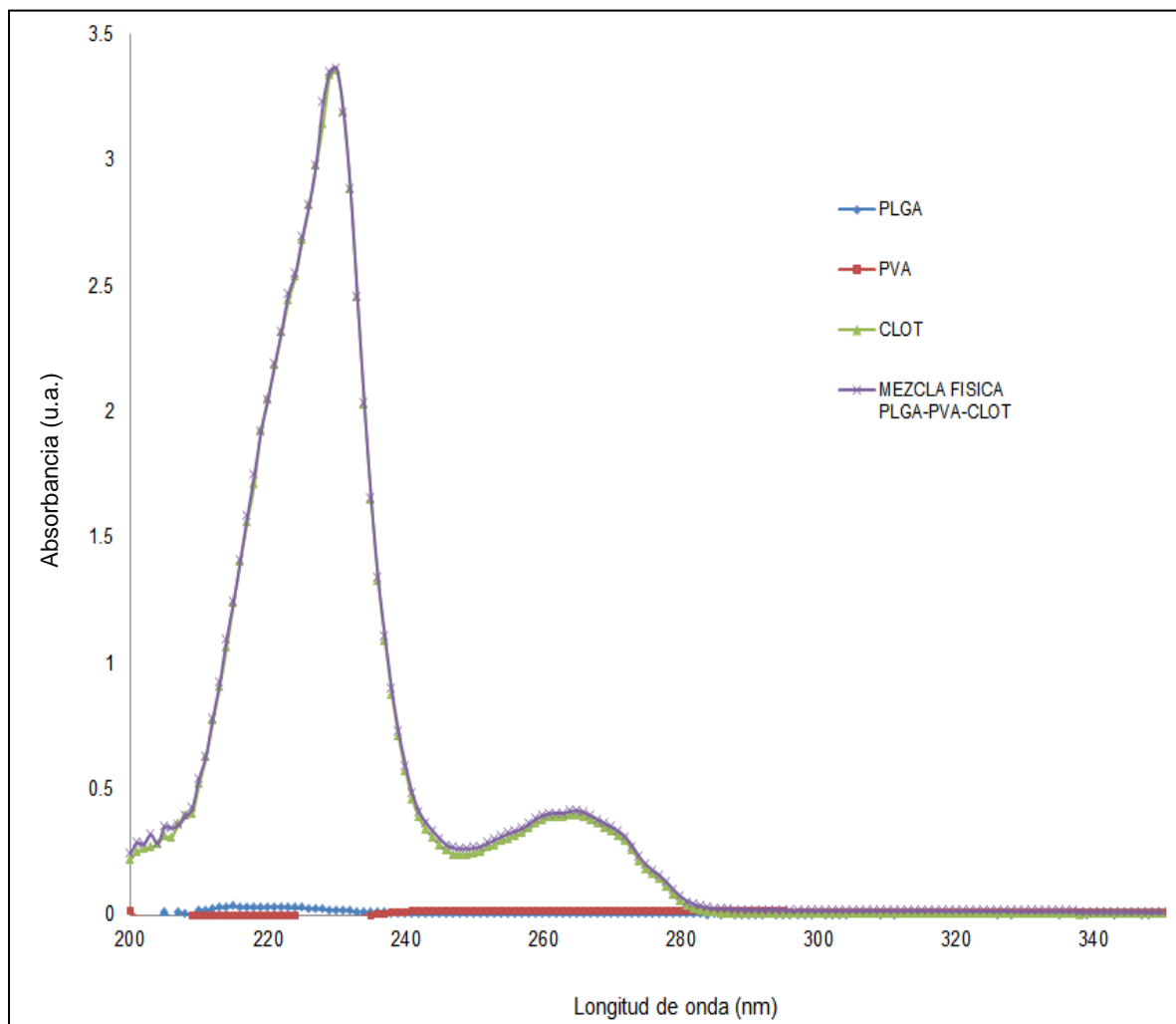


Figura 44. Especificidad de clotrimazol evaluado en medio FVS=4.2 y LSS al 0.5% (p/v).

Tabla 27. Linealidad del método de cuantificación de clotrimazol en FVS pH= 4.2.

| Concentración (mg/ml) | Absorbancia | Absorbancia / concentración |
|-----------------------|----------------------------|-----------------------------|
| 0.0503 | 0.125 | 2.485 |
| 0.0503 | 0.121 | 2.405 |
| 0.0503 | 0.123 | 2.445 |
| 0.1509 | 0.355 | 2.352 |
| 0.1509 | 0.353 | 2.339 |
| 0.1509 | 0.352 | 2.332 |
| 0.2515 | 0.587 | 2.334 |
| 0.2515 | 0.588 | 2.338 |
| 0.2515 | 0.588 | 2.338 |
| 0.3521 | 0.832 | 2.363 |
| 0.3521 | 0.826 | 2.345 |
| 0.3521 | 0.825 | 2.343 |
| 0.4527 | 1.066 | 2.354 |
| 0.4527 | 1.066 | 2.354 |
| 0.4527 | 1.063 | 2.348 |
| 0.503 | 1.17 | 2.326 |
| 0.503 | 1.172 | 2.330 |
| | Promedio | 2.360 |
| | Desviación Estándar | 0.043 |
| | % C.V. | 1.8525 |

Parámetros:

$r^2 = 0.999$

$m = 2.333$

$b = 0.003$

Análisis de Varianza para linealidad de clotrimazol.

H_0 : No existe una relación lineal entre la concentración del clotrimazol y su respectiva absorbancia.

H_1 : Existe una relación lineal entre la concentración del clotrimazol y su respectiva absorbancia.

Tabla 28. Análisis de Varianza para evaluar la linealidad del método de cuantificación de clotrimazol en FVS pH=4.2.

| | Grados de libertad | Suma de cuadrados | Promedio de los cuadrados | F _{cal} | Valor crítico de F |
|-----------|--------------------|-------------------|---------------------------|------------------|--------------------|
| Regresión | 1 | 2.26135884 | 2.26135884 | 122283.786 | 9.36922E-31 |
| Residuos | 15 | 0.00027739 | 1.8493E-05 | | |
| Total | 16 | 2.26163624 | | | |

Criterio de Aceptación:

$F_{cal} > F_{crit}$, se rechaza H_0

$F_{cal} < F_{crit}$, se acepta H_0

Prueba t Student para el intercepto

H_0 : El intercepto es igual a 0.

H_1 : El intercepto es diferente de 0.

Tabla 29. Prueba t Student para el intercepto de la curva de linealidad del clotrimazol en FVS pH= 4.2.

| | Coeficientes | Error típico | t _{cal} | t crítica |
|--------------|--------------|--------------|------------------|-------------|
| Intercepción | 0.0035 | 0.0021 | 1.6599 | 0.117682491 |
| Variable X 1 | 2.3336 | 0.0066 | 349.6909 | 9.36922E-31 |

Criterio de Aceptación:

$t_{cal} > t_{crit}$, se acepta H_0

$t_{cal} < t_{crit}$, se rechaza H_0

Tabla 30. Exactitud del método de cuantificación de clotrimazol en FVS pH= 4.2.

| Concentración (mg/ml) | Absorbancia | Absorbancia / concentración | % Recobro |
|-----------------------|----------------------------|-----------------------------|-----------------------|
| 0.1887 | 0.447 | 2.368 | 100.69 |
| 0.1887 | 0.444 | 2.352 | 100.01 |
| 0.1887 | 0.447 | 2.368 | 100.69 |
| 0.1887 | 0.445 | 2.358 | 100.24 |
| 0.1887 | 0.444 | 2.352 | 100.01 |
| 0.1887 | 0.449 | 2.379 | 101.15 |
| 0.2516 | 0.598 | 2.376 | 101.23 |
| 0.2516 | 0.595 | 2.364 | 100.72 |
| 0.2516 | 0.596 | 2.368 | 100.89 |
| 0.2516 | 0.594 | 2.360 | 100.55 |
| 0.2516 | 0.596 | 2.368 | 100.89 |
| 0.2516 | 0.598 | 2.376 | 101.23 |
| 0.3145 | 0.745 | 2.368 | 101.02 |
| 0.3145 | 0.747 | 2.375 | 101.29 |
| 0.3145 | 0.746 | 2.372 | 101.15 |
| 0.3145 | 0.745 | 2.368 | 101.02 |
| 0.3145 | 0.744 | 2.365 | 100.88 |
| 0.3145 | 0.745 | 2.368 | 101.02 |
| | Promedio | <u>2.367</u> | <u>100.820</u> |
| | Desviación Estándar | 0.0076 | |
| | % C.V. | <u>0.319</u> | |

Tabla 31. Repetibilidad del método de cuantificación de clotrimazol en FVS pH= 4.2.

| Concentración (mg/ml) | Absorbancia | Absorbancia/ concentración |
|-----------------------|---------------------|----------------------------|
| 0.1887 | 0.447 | 2.368 |
| 0.1887 | 0.444 | 2.352 |
| 0.1887 | 0.445 | 2.358 |
| 0.1866 | 0.432 | 2.315 |
| 0.1866 | 0.431 | 2.309 |
| 0.1866 | 0.429 | 2.299 |
| 0.1881 | 0.432 | 2.296 |
| 0.1881 | 0.434 | 2.307 |
| 0.1881 | 0.436 | 2.317 |
| 0.2516 | 0.598 | 2.376 |
| 0.2516 | 0.596 | 2.368 |
| 0.2516 | 0.594 | 2.360 |
| 0.2488 | 0.577 | 2.319 |
| 0.2488 | 0.583 | 2.343 |
| 0.2488 | 0.582 | 2.339 |
| 0.2508 | 0.579 | 2.308 |
| 0.2508 | 0.580 | 2.312 |
| 0.2508 | 0.580 | 2.312 |
| 0.3145 | 0.747 | 2.375 |
| 0.3145 | 0.745 | 2.368 |
| 0.3145 | 0.744 | 2.365 |
| 0.3110 | 0.725 | 2.331 |
| 0.3110 | 0.728 | 2.340 |
| 0.3110 | 0.730 | 2.347 |
| 0.3135 | 0.727 | 2.319 |
| 0.3135 | 0.727 | 2.319 |
| 0.3135 | 0.723 | 2.306 |
| | Promedio | <u>2.334</u> |
| | Desviación Estándar | 0.026 |
| | % C.V. | <u>1.117</u> |

Tabla 32. Límites de cuantificación y determinación para la determinación de clotrimazol en medio FVS pH= 4.2.

| Concentración (mg/ml) | Absorbancia | Absorbancia/concentración |
|-----------------------|----------------------------|---------------------------|
| 0.0098 | 0.026 | 2.653 |
| 0.0098 | 0.026 | 2.653 |
| 0.0098 | 0.027 | 2.755 |
| 0.0294 | 0.076 | 2.585 |
| 0.0294 | 0.075 | 2.551 |
| 0.0294 | 0.075 | 2.551 |
| 0.0490 | 0.124 | 2.530 |
| 0.0490 | 0.125 | 2.551 |
| 0.0490 | 0.125 | 2.551 |
| 0.0686 | 0.174 | 2.536 |
| 0.0686 | 0.174 | 2.536 |
| 0.0686 | 0.174 | 2.536 |
| 0.0882 | 0.224 | 2.539 |
| 0.0882 | 0.223 | 2.528 |
| 0.0882 | 0.225 | 2.551 |
| | Promedio | 2.574 |
| | Desviación Estándar | 0.064 |
| | % C.V. | 2.488 |

$$r^2 = 0.999$$

$$m = 2.520$$

$$b = 0.001$$

$$\text{Límite de cuantificación (LC)} = \frac{10 \cdot b}{m} = 0.0054224 \text{ mg/ml}$$

Análisis de Varianza para límites de cuantificación de clotrimazol.

H_0 : No existe una relación lineal entre la concentración del clotrimazol y su respectiva absorbancia.

H_1 : Existe una relación lineal entre la concentración del clotrimazol y su respectiva absorbancia.

Criterio de Aceptación:

$$\underline{F_{cal} > F_{crit}, \text{ se rechaza } H_0} \quad F_{cal} < F_{crit}, \text{ se acepta } H_0$$

Tabla 33. Análisis de Varianza para evaluar límites de cuantificación de clotrimazol.

| | Grados de libertad | Suma de cuadrados | Promedio de los cuadrados | Fcal | Valor crítico de F |
|-----------|--------------------|-------------------|---------------------------|-------------|--------------------|
| Regresión | 1 | 0.0732 | 0.0732 | 192920.3514 | 1.66771E-28 |
| Residuos | 13 | 4.9333E-06 | 3.7949E-07 | | |
| Total | 14 | 0.0732 | | | |

Prueba t Student para el intercepto

H_0 : El intercepto es igual a 0.

H_1 : El intercepto es diferente de 0.

Criterio de Aceptación:

$$\underline{t_{cal} > t_{crit}, \text{ se acepta } H_0} \quad t_{cal} < t_{crit}, \text{ se rechaza } H_0$$

Tabla 34. Prueba de prueba t de Student para evaluar el intercepto en la curva de determinación de límites de cuantificación de clotrimazol.

| | Coefficientes | Error típico | tcal | t crítica |
|--------------|---------------|--------------|----------|-------------|
| Intercepción | 0.0013 | 0.0003 | 4.2305 | 0.0009 |
| Variable X 1 | 2.5204 | 0.0057 | 439.2269 | 1.66771E-28 |

ANEXO 4.- Desarrollo del método de cuantificación para fluconazol

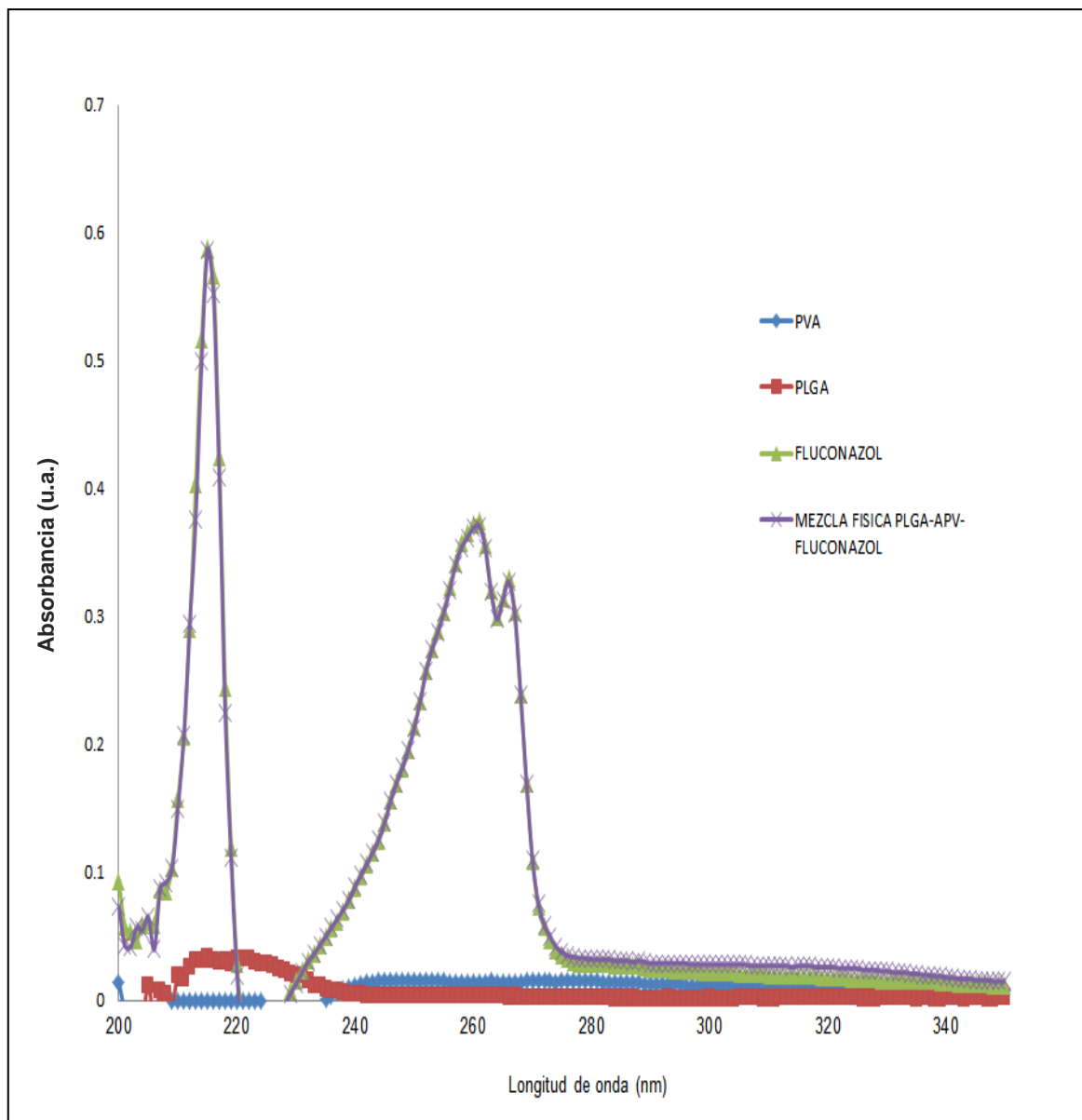


Figura 45. Especificidad del método de cuantificación de Fluconazol en medio FVS pH=4.2.

Tabla 35. Linealidad del método de cuantificación de fluconazol en FVS pH= 4.2.

| Concentración (mg/ml) | Absorbancia | Absorbancia / concentración |
|-----------------------|----------------------------|-----------------------------|
| 0.0505 | 0.107 | 2.118 |
| 0.0505 | 0.105 | 2.079 |
| 0.0505 | 0.111 | 2.198 |
| 0.1515 | 0.321 | 2.118 |
| 0.1515 | 0.324 | 2.138 |
| 0.1515 | 0.320 | 2.112 |
| 0.2525 | 0.536 | 2.122 |
| 0.2525 | 0.534 | 2.114 |
| 0.2525 | 0.535 | 2.118 |
| 0.3535 | 0.755 | 2.135 |
| 0.3535 | 0.753 | 2.130 |
| 0.3535 | 0.753 | 2.130 |
| 0.4545 | 0.957 | 2.105 |
| 0.4545 | 0.960 | 2.112 |
| 0.4545 | 0.956 | 2.103 |
| | Promedio | 2.122 |
| | Desviación Estándar | 0.025 |
| | % C. V. | 1.200 |

$r^2 = 0.999$

$m = 2.110$

$b = 0.0021$

Análisis de varianza del método de cuantificación de fluconazol en FVS pH= 4.2.

H_0 : No existe una relación lineal entre la concentración del fluconazol y su respectiva absorbancia.

H_1 : Existe una relación lineal entre la concentración del fluconazol y su respectiva absorbancia.

Tabla 36. Análisis de Varianza del método de cuantificación de fluconazol en FVS pH= 4.2.

| | Grados de libertad | Suma de cuadrados | Promedio de los cuadrados | Fcal | Valor crítico de F |
|-----------|--------------------|-------------------|---------------------------|------------|--------------------|
| Regresión | 1 | 1.3636 | 1.3636272 | 101568.871 | 1.07889E-26 |
| Residuos | 13 | 0.0001 | 1.3426E-05 | | |
| Total | 14 | 1.3638 | | | |

Criterio de Aceptación:

$F_{cal} > F_{crit}$, se rechaza H_0 .

$F_{cal} < F_{crit}$, se acepta H_0

Prueba t Student para el intercepto:

H_0 : El intercepto es igual a 0.

H_1 : El intercepto es diferente de 0.

Tabla 37. Prueba t Student para el intercepto de la curva de linealidad del método de cuantificación de fluconazol en FVS pH= 4.2.

| | Coeficientes | Error típico | Tcal | Valor crítico de t |
|--------------|--------------|--------------|----------|--------------------|
| Intercepción | 0.0021 | 0.0019 | 1.1102 | 0.2870 |
| Variable X 1 | 2.1108 | 0.0066 | 318.6987 | 1.0789E-26 |

Criterio de Aceptación:

$t_{cal} > t_{crit}$, se acepta H_0

$t_{cal} < t_{crit}$, se rechaza H_0

Tabla 38. Exactitud del método de cuantificación de fluconazol en FVS pH= 4.2.

| Concentración (mg/ml) | Absorbancia | Absorbancia / concentración | % Recobro |
|-----------------------|----------------------------|-----------------------------|----------------|
| 0.1884 | 0.409 | 2.170 | 102.307 |
| 0.1884 | 0.402 | 2.133 | 100.546 |
| 0.1884 | 0.404 | 2.144 | 101.049 |
| 0.1884 | 0.402 | 2.133 | 100.546 |
| 0.1884 | 0.402 | 2.133 | 100.546 |
| 0.1884 | 0.408 | 2.165 | 102.055 |
| 0.2512 | 0.534 | 2.125 | 100.303 |
| 0.2512 | 0.537 | 2.137 | 100.869 |
| 0.2512 | 0.535 | 2.129 | 100.492 |
| 0.2512 | 0.537 | 2.137 | 100.869 |
| 0.2512 | 0.535 | 2.129 | 100.492 |
| 0.2512 | 0.538 | 2.141 | 101.058 |
| 0.3140 | 0.669 | 2.130 | 100.610 |
| 0.3140 | 0.670 | 2.133 | 100.761 |
| 0.3140 | 0.665 | 2.117 | 100.007 |
| 0.3140 | 0.666 | 2.121 | 100.158 |
| 0.3140 | 0.669 | 2.130 | 100.610 |
| 0.3140 | 0.670 | 2.133 | 100.761 |
| | Promedio | 2.136 | 100.780 |
| | Desviación Estándar | 0.013 | |
| | % C. V. | 0.624 | |

Tabla 39. Repetibilidad del método de cuantificación de fluconazol en FVS pH= 4.2.

| Concentración (mg/ml) | Absorbancia | Absorbancia / concentración |
|-----------------------|----------------------------|-----------------------------|
| 0.1884 | 0.404 | 2.144 |
| 0.1884 | 0.404 | 2.144 |
| 0.1884 | 0.409 | 2.170 |
| 0.1881 | 0.411 | 2.185 |
| 0.1881 | 0.412 | 2.190 |
| 0.1881 | 0.409 | 2.174 |
| 0.1878 | 0.407 | 2.167 |
| 0.1878 | 0.399 | 2.124 |
| 0.1878 | 0.399 | 2.124 |
| 0.2512 | 0.535 | 2.129 |
| 0.2512 | 0.537 | 2.137 |
| 0.2512 | 0.534 | 2.125 |
| 0.2508 | 0.547 | 2.181 |
| 0.2508 | 0.546 | 2.177 |
| 0.2508 | 0.545 | 2.173 |
| 0.2504 | 0.528 | 2.108 |
| 0.2504 | 0.525 | 2.096 |
| 0.2504 | 0.528 | 2.108 |
| 0.3140 | 0.669 | 2.130 |
| 0.3140 | 0.666 | 2.121 |
| 0.3140 | 0.670 | 2.133 |
| 0.3135 | 0.683 | 2.178 |
| 0.3135 | 0.687 | 2.191 |
| 0.3135 | 0.687 | 2.191 |
| 0.3130 | 0.661 | 2.111 |
| 0.3130 | 0.662 | 2.115 |
| 0.3130 | 0.660 | 2.108 |
| | Promedio | 2.146 |
| | Desviación Estándar | 0.030 |
| | % C. V. | 1.441 |

Tabla 40. Límites de cuantificación y determinación de fluconazol en medio FVS pH= 4.2.

| Concentración (mg/ml) | Absorbancia | Absorbancia / concentración |
|-----------------------|----------------------------|-----------------------------|
| 0.0099 | 0.025 | 2.525 |
| 0.0099 | 0.024 | 2.424 |
| 0.0099 | 0.023 | 2.323 |
| 0.0297 | 0.071 | 2.390 |
| 0.0297 | 0.070 | 2.356 |
| 0.0297 | 0.072 | 2.424 |
| 0.0495 | 0.114 | 2.303 |
| 0.0495 | 0.115 | 2.323 |
| 0.0495 | 0.113 | 2.282 |
| 0.0693 | 0.161 | 2.323 |
| 0.0693 | 0.160 | 2.308 |
| 0.0693 | 0.161 | 2.323 |
| 0.0891 | 0.209 | 2.345 |
| 0.0891 | 0.204 | 2.289 |
| 0.0891 | 0.208 | 2.334 |
| | Promedio | 2.351 |
| | Desviación Estándar | 0.064 |
| | % C. V. | 2.750 |

$$r^2=0.999$$

$$m=2.30134$$

$$b= 0.00141$$

$$\text{Límite de cuantificación (LC)} = \frac{10 \cdot b}{m} = 0.0061558 \text{ mg/ml}$$

Análisis de varianza para límites de cuantificación del método de cuantificación de fluconazol.

H_0 : No existe una relación lineal entre la concentración del fluconazol y su respectiva absorbancia.

H_1 : Existe una relación lineal entre la concentración del fluconazol y su respectiva absorbancia.

Tabla 41. Análisis de Análisis de Varianza para límites de cuantificación del método de cuantificación de fluconazol.

| | Grados de libertad | Suma de cuadrados | Promedio de los cuadrados | Fcal | Valor crítico de F |
|-----------|--------------------|-------------------|---------------------------|------------|--------------------|
| Regresión | 1 | 0.0622 | 0.06228963 | 25544.6446 | 8.4814E-23 |
| Residuos | 13 | 0.0000 | 2.4385E-06 | | |
| Total | 14 | 0.0623 | | | |

Criterio de Aceptación:

$F_{cal} > F_{crit}$, se rechaza H_0

$F_{cal} < F_{crit}$, se acepta H_0

Tabla 42. Prueba *t* Student para el intercepto de la curva de límites de cuantificación del método de cuantificación de fluconazol.

| | Coeficientes | Error típico | tcal | t crítica |
|--------------|--------------|--------------|----------|------------|
| Intercepción | 0.0014 | 0.0008 | 1.7299 | 0.1072 |
| Variable X 1 | 2.3013 | 0.0143 | 159.8269 | 8.4814E-23 |

H_0 : El intercepto es igual a 0.

H_1 : El intercepto es diferente de 0.

Criterio de Aceptación:

$t_{cal} > t_{crit}$, se acepta H_0

$t_{cal} < t_{crit}$, se rechaza H_0

ANEXO 5. Complejo PVAL-H₃BO₃-I₂-KI a 640 nm.

Tabla 43. Curva de calibración del complejo PVAL-H₃BO₃-I₂-KI a 640 nm.

| Concentración (mg/ml) | Absorbancia | Absorbancia/ concentración |
|-----------------------|----------------------------|-------------------------------|
| 0.0068 | 0.209 | 30.343 |
| 0.0068 | 0.212 | 30.779 |
| 0.0068 | 0.211 | 30.634 |
| 0.0206 | 0.610 | 29.521 |
| 0.0206 | 0.603 | 29.182 |
| 0.0206 | 0.618 | 29.908 |
| 0.0344 | 1.038 | 30.140 |
| 0.0344 | 1.037 | 30.111 |
| 0.0344 | 1.037 | 30.111 |
| 0.0482 | 1.439 | 29.845 |
| 0.0482 | 1.442 | 29.908 |
| 0.0482 | 1.428 | 29.617 |
| 0.0619 | 1.881 | 30.343 |
| 0.0619 | 1.883 | 30.375 |
| 0.0619 | 1.884 | 30.392 |
| 0.0688 | 2.106 | 30.576 |
| 0.0688 | 2.096 | 30.430 |
| 0.0688 | 2.102 | 30.517 |
| | Promedio | 30.140 |
| | Desviación estándar | 0.433 |
| | %C.V. | 1.436 |

Parámetros:

$$r^2=0.999$$

$$m=29.9533$$

$$b= 0.009538$$

Análisis de varianza para linealidad del complejo PVAL-H₃BO₃-I₂-KI:

H₀: No existe una relación lineal entre la concentración del complejo PVAL-H₃BO₃-I₂-KI y su respectiva absorbancia.

H₁: Existe una relación lineal entre la concentración del complejo PVAL-H₃BO₃-I₂-KI y su respectiva absorbancia.

Tabla 44. Análisis de Varianza para evaluar la linealidad del complejo PVAL-H₃BO₃-I₂-KI.

| | Grados de libertad | Suma de cuadrados | Promedio de los cuadrados | F _{cal} | Valor crítico de F |
|-----------|--------------------|-------------------|---------------------------|------------------|--------------------|
| Regresión | 1 | 7.76800 | 7.7680 | 52267.7169 | 1.5107E-29 |
| Residuos | 16 | 0.00237 | 0.0001 | | |
| Total | 17 | 7.77038 | | | |

Criterio de Aceptación:

$F_{cal} > F_{crit}$, se rechaza H₀

$F_{cal} < F_{crit}$, se acepta H₀

Prueba t Student para el intercepto:

H₀: El intercepto es igual a 0.

H₁: El intercepto es diferente de 0.

Tabla 45. Prueba t Student para el intercepto de la curva de linealidad del complejo PVAL-H₃BO₃-I₂-KI.

| | Coefficientes | t _{cal} | Probabilidad |
|--------------|---------------|------------------|--------------|
| Intercepción | -0.0095 | 1.5905 | 0.1312 |
| Variable X 1 | 29.9533 | 228.6213 | 1.5107E-29 |

Criterio de Aceptación:

$t_{cal} > t_{crit}$, se acepta H₀

$t_{cal} < t_{crit}$, se rechaza H₀

ANEXO 6.- Desarrollo del método de cuantificación de quitosán a partir de nanoesferas de clotrimazol-PLGA-quitosán

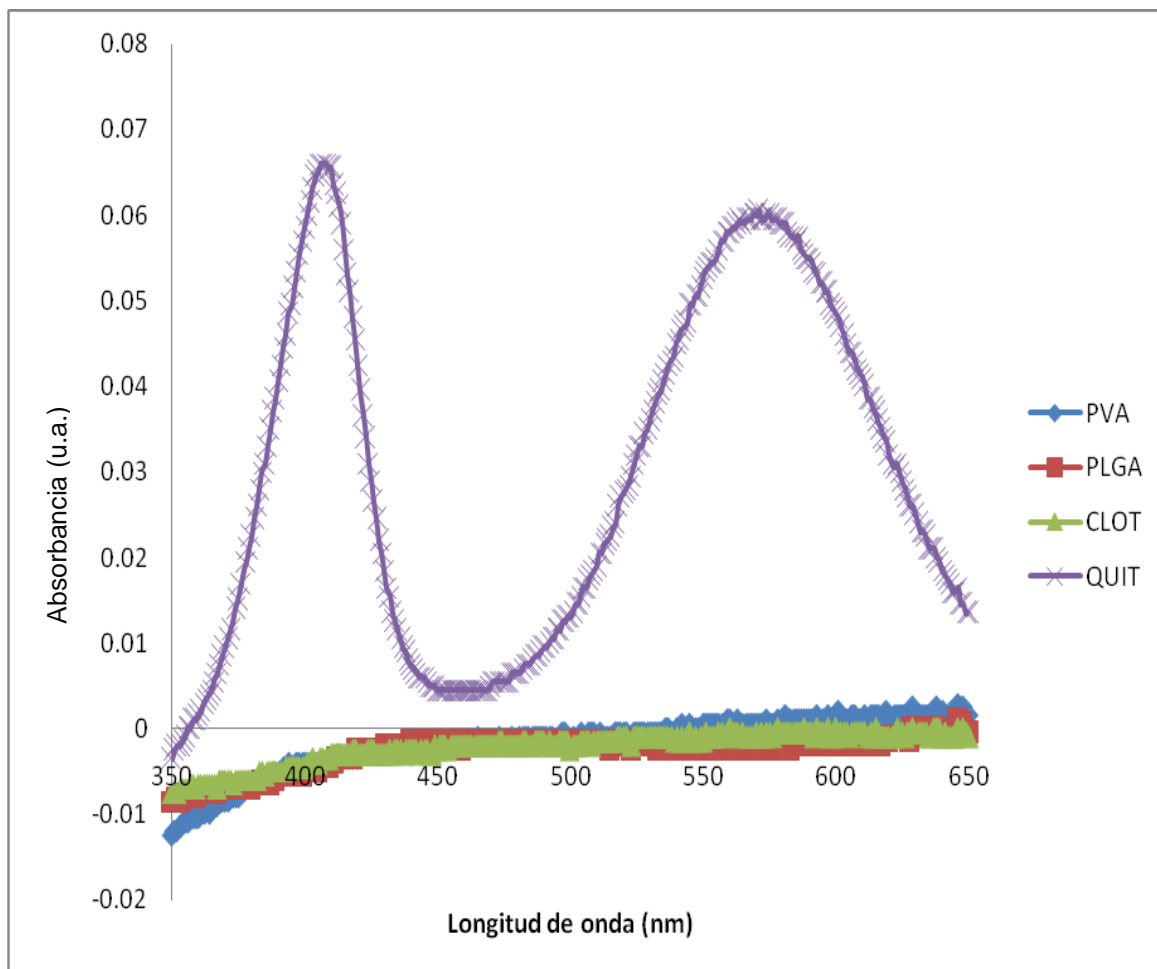


Figura 46. Especificidad de quitosán evaluado en medio FVS=4.2.

Tabla 46. Linealidad del método de cuantificación de quitosán por medio del complejo quitosán-nihidrina a 572 nm en ácido acético al 0.5% v/v.

| Concentración (mg/ml) | Absorbancia | Absorbancia/concentración |
|-----------------------|----------------------------|---------------------------|
| 0.0069 | 0.126 | 18.243 |
| 0.0069 | 0.135 | 19.546 |
| 0.0069 | 0.136 | 19.691 |
| 0.0138 | 0.271 | 19.619 |
| 0.0138 | 0.266 | 19.257 |
| 0.0138 | 0.275 | 19.908 |
| 0.0207 | 0.401 | 19.353 |
| 0.0207 | 0.395 | 19.064 |
| 0.0207 | 0.398 | 19.208 |
| 0.0276 | 0.535 | 19.365 |
| 0.0276 | 0.539 | 19.510 |
| 0.0276 | 0.525 | 19.003 |
| 0.0345 | 0.657 | 19.025 |
| 0.0345 | 0.647 | 18.736 |
| 0.0345 | 0.653 | 18.909 |
| | Promedio | 19.229 |
| | Desviación Estándar | 0.421 |
| | % C.V. | <u>2.188</u> |

Parámetros:

$r^2=0.999$

m= 18.8562

b= 0.0066

Análisis de varianza para linealidad del complejo quitosán-nihidrina

H_0 : No existe una relación lineal entre la concentración del complejo quitosán-nihidrina y su respectiva absorbancia.

H_1 : Existe una relación lineal entre la concentración del complejo quitosán-nihidrina y su respectiva absorbancia.

Criterio de Aceptación:

$F_{cal} > F_{crit}$, se rechaza H_0

$F_{cal} < F_{crit}$, se acepta H_0

Tabla 47. Análisis de varianza para evaluar la linealidad del complejo quitosán-nihidrina.

| | Grados de libertad | Suma de cuadrados | Promedio de los cuadrados | Fcal | Valor crítico de F |
|-----------|--------------------|-------------------|---------------------------|------------|--------------------|
| Regresión | 1 | 0.50882163 | 0.50882163 | 11954.9634 | 1.1758E-20 |
| Residuos | 13 | 0.00055330 | 4.2562E-05 | | |
| Total | 14 | 0.50937493 | | | |

H_0 : El intercepto es igual a 0.

H_1 : El intercepto es diferente de 0.

Tabla 48. Tabla de prueba t Student para el intercepto de la curva de linealidad del complejo quitosán-nihidrina.

| | Coeficientes | Error típico | tcal | t critica |
|-----------------------|--------------|--------------|------------|------------|
| Intercepción | 0.00656667 | 0.00395043 | 1.66226629 | 0.12036883 |
| Concentración (mg/ml) | 18.8561776 | 0.17245649 | 109.338755 | 1.1758E-20 |

Criterio de Aceptación:

$t_{cal} > t_{crit}$, se acepta H_0

$t_{cal} < t_{crit}$, se rechaza H_0

Tabla 49. Exactitud del método de cuantificación de quitosán por medio del complejo quitosán-nihidrina a 572 nm en ácido acético al 0.5% v/v.

| Concentración (mg/ml) | Absorbancia | Absorbancia/concentración | % Recobro |
|-----------------------|----------------------------|---------------------------|----------------------|
| 0.0172 | 0.313 | 18.229 | 94.935 |
| 0.0172 | 0.315 | 18.346 | 95.541 |
| 0.0172 | 0.316 | 18.404 | 95.845 |
| 0.0172 | 0.328 | 19.103 | 99.484 |
| 0.0172 | 0.319 | 18.579 | 96.755 |
| 0.0172 | 0.322 | 18.754 | 97.665 |
| 0.0215 | 0.397 | 18.491 | 96.688 |
| 0.0215 | 0.399 | 18.584 | 97.175 |
| 0.0215 | 0.403 | 18.770 | 98.149 |
| 0.0215 | 0.401 | 18.677 | 97.662 |
| 0.0215 | 0.396 | 18.444 | 96.444 |
| 0.0215 | 0.408 | 19.003 | 99.367 |
| 0.0258 | 0.481 | 18.672 | 97.864 |
| 0.0258 | 0.477 | 18.517 | 97.050 |
| 0.0258 | 0.487 | 18.905 | 99.084 |
| 0.0258 | 0.492 | 19.099 | 100.102 |
| 0.0258 | 0.468 | 18.168 | 95.219 |
| 0.0258 | 0.475 | 18.439 | 96.643 |
| | Promedio | 18.621 | <u>97.315</u> |
| | Desviación Estándar | 0.278 | |
| | % C.V. | <u>1.491</u> | |

Tabla 50. Repetibilidad del método de cuantificación de quitosán por medio del complejo quitosán-nihidrina a 572 nm en ácido acético al 0.5% v/v.

| Concentración (mg/ml) | Absorbancia | Absorbancia/ concentración |
|-----------------------|----------------------------|-------------------------------|
| 0.0172 | 0.316 | 18.404 |
| 0.0172 | 0.319 | 18.579 |
| 0.0172 | 0.319 | 18.579 |
| 0.0215 | 0.399 | 18.584 |
| 0.0215 | 0.396 | 18.444 |
| 0.0215 | 0.401 | 18.677 |
| 0.0258 | 0.477 | 18.517 |
| 0.0258 | 0.481 | 18.672 |
| 0.0258 | 0.475 | 18.439 |
| 0.0189 | 0.351 | 18.591 |
| 0.0189 | 0.349 | 18.485 |
| 0.0189 | 0.355 | 18.803 |
| 0.0236 | 0.439 | 18.602 |
| 0.0236 | 0.435 | 18.432 |
| 0.0236 | 0.441 | 18.686 |
| 0.0283 | 0.531 | 18.750 |
| 0.0283 | 0.526 | 18.573 |
| 0.0283 | 0.525 | 18.538 |
| 0.0166 | 0.305 | 18.329 |
| 0.0166 | 0.317 | 19.050 |
| 0.0166 | 0.312 | 18.750 |
| 0.0208 | 0.389 | 18.702 |
| 0.0208 | 0.401 | 19.279 |
| 0.0208 | 0.394 | 18.942 |
| 0.0250 | 0.481 | 19.271 |
| 0.0250 | 0.479 | 19.191 |
| 0.0250 | 0.473 | 18.950 |
| | Promedio | 18.697 |
| | Desviación Estándar | 0.262 |
| | % C.V. | <u>1.399</u> |

Tabla 51. Límite de cuantificación para la determinación de quitosán por medio del complejo quitosán-nihidrina a 572 nm en ácido acético al 0.5% v/v.

| Concentración (mg/ml) | Absorbancia | Absorbancia/concentración |
|-----------------------|----------------------------|---------------------------|
| 0.0021 | 0.038 | 18.015 |
| 0.0021 | 0.041 | 19.437 |
| 0.0021 | 0.039 | 18.489 |
| 0.0042 | 0.081 | 19.200 |
| 0.0042 | 0.078 | 18.489 |
| 0.0042 | 0.083 | 19.674 |
| 0.0063 | 0.119 | 18.805 |
| 0.0063 | 0.122 | 19.279 |
| 0.0063 | 0.125 | 19.753 |
| 0.0084 | 0.165 | 19.556 |
| 0.0084 | 0.170 | 20.149 |
| 0.0084 | 0.167 | 19.793 |
| 0.0105 | 0.204 | 19.343 |
| 0.0105 | 0.206 | 19.532 |
| 0.0105 | 0.210 | 19.912 |
| | Promedio | 19.295 |
| | Desviación Estándar | 0.600 |
| | % C.V. | 3.111 |

Análisis de varianza para evaluar el límite de cuantificación del complejo quitosán-nihidrina.

H_0 : No existe una relación lineal entre la concentración del complejo quitosán-nihidrina y su respectiva absorbancia.

H_1 : Existe una relación lineal entre la concentración del complejo quitosán-nihidrina y su respectiva absorbancia.

Criterio de Aceptación:

$F_{cal} > F_{crit}$, se rechaza H_0

$F_{cal} < F_{crit}$, se acepta H_0

Tabla 52. Análisis de varianza para evaluar el límite de cuantificación del complejo quitosán-nihidrina.

| | Grados de libertad | Suma de cuadrados | Promedio de los cuadrados | Fcal | Valor crítico de F |
|-----------|--------------------|-------------------|---------------------------|------------|--------------------|
| Regresión | 1 | 0.05325653 | 0.05325653 | 8062.90683 | 1.5164E-19 |
| Residuos | 13 | 8.5867E-05 | 6.6051E-06 | | |
| Total | 14 | 0.0533424 | | | |

ANEXO 7.- Valores de cantidades adsorbidas y no adsorbidas de quitosán sobre NEs-PLGA-CLT-QTS.

Tabla 53. Valores promedio ($n=3$) de cantidad adsorbida de quitosán sobre NEs-PLGA-CLT-QTS (q) y concentración de quitosán en el equilibrio (C_e) sobre NEs-PLGA-CLT-QTS utilizados para en la evaluación de los modelos de adsorción.

| Cantidad de quitosán adicionada*100 mg de NEs (mg) | Cantidad de quitosán adsorbida (q) *100 mg de NEs (mg) | Concentración de quitosán en el equilibrio (C_e =mg/l) | C_e (mol/l) | q (mg/g) | q (mol/g) |
|--|--|---|---------------|------------|-------------|
| 9.776 | 2.070 | 453.283 | 5.151E-06 | 20.704 | 2.353E-07 |
| 19.552 | 2.193 | 1021.169 | 1.160E-05 | 21.925 | 2.491E-07 |
| 39.105 | 7.953 | 1832.454 | 2.082E-05 | 79.530 | 9.038E-07 |
| 58.657 | 10.528 | 2831.138 | 3.217E-05 | 105.278 | 1.196E-06 |
| 78.210 | 15.537 | 3686.615 | 4.189E-05 | 155.371 | 1.766E-06 |
| 97.762 | 18.572 | 4658.228 | 5.293E-05 | 185.720 | 2.110E-06 |
| 117.314 | 25.327 | 5411.033 | 6.149E-05 | 253.267 | 2.878E-06 |
| 136.867 | 26.232 | 6507.914 | 7.395E-05 | 262.321 | 2.981E-06 |

ANEXO 8.- Modelos de las isotermas de adsorción de quitosán sobre la superficie de NEs-PLGA-CLT-QTS.

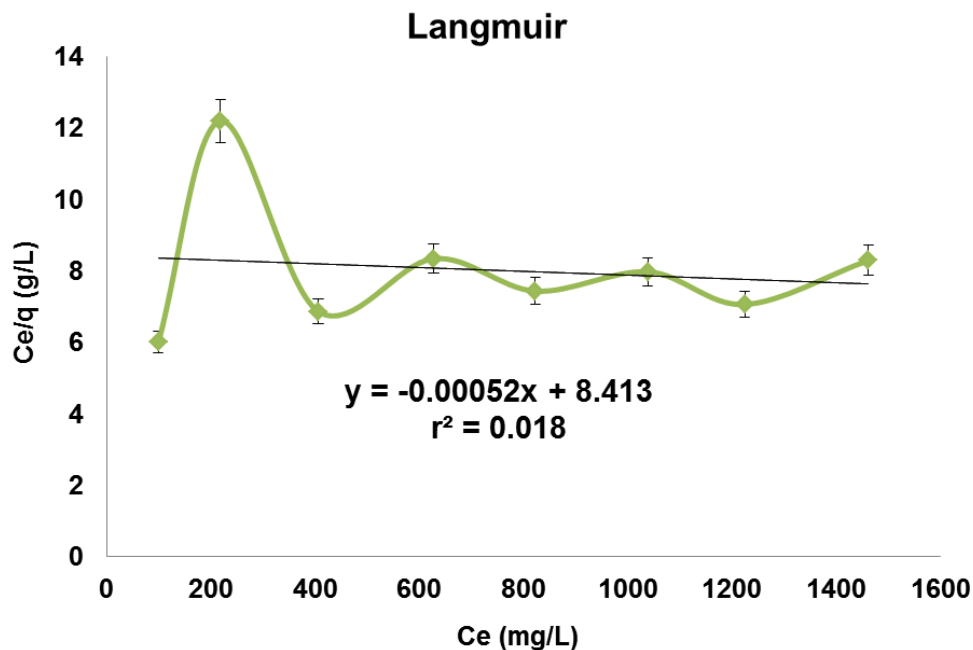


Figura 47. Modelo de Isotherma de Langmuir para evaluar la adsorción de quitosán sobre la superficie de NEs-PLGA-CLTQTS. Donde: q= cantidad adsorbida de quitosán; C_e = Concentración de quitosán en el equilibrio.

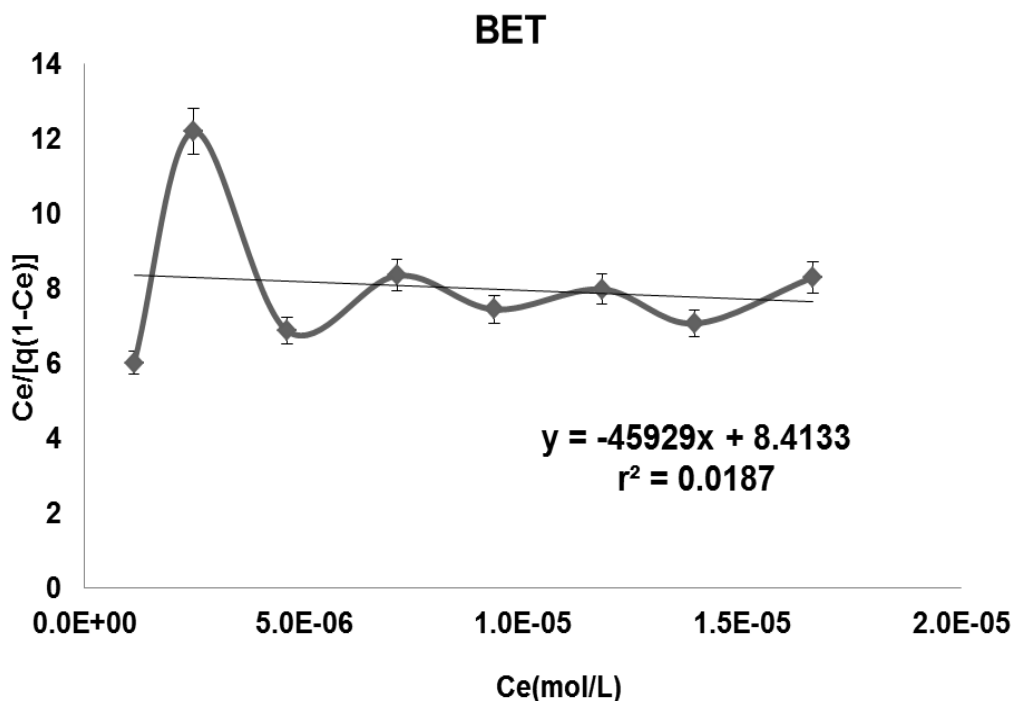


Figura 48. Modelo de Isotherma de BET para evaluar la adsorción de quitosán sobre la superficie de NEs-PLGA-CLT-QTS. Donde: Donde: q= cantidad adsorbida de quitosán; C_e = Concentración de quitosán en el equilibrio.

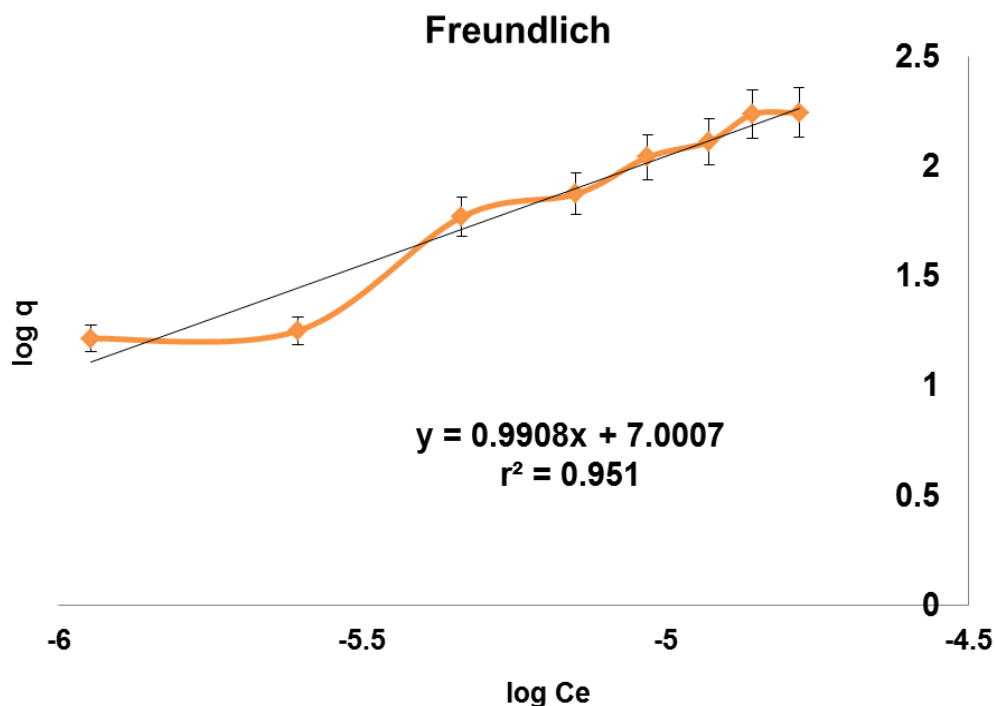


Figura 49. Modelo de Isotherma de Freundlich para evaluar la adsorción de quitosán sobre la superficie de NES-PLGA-CLT-QTS. Donde: Donde: q= cantidad adsorbida de quitosán; Ce= Concentración de quitosán en el equilibrio.

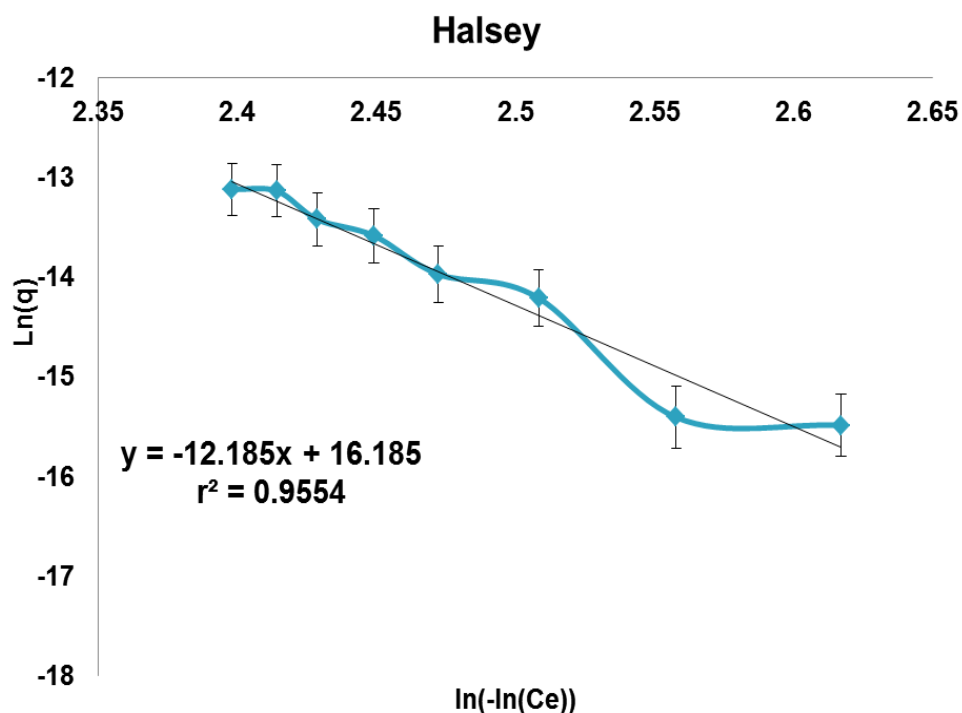


Figura 50. Modelo de Isotherma de Halsey para evaluar la adsorción de quitosán sobre la superficie de NES-PLGA-CLT-QTS. Donde: Donde: q= cantidad adsorbida de quitosán; Ce= Concentración de quitosán en el equilibrio.

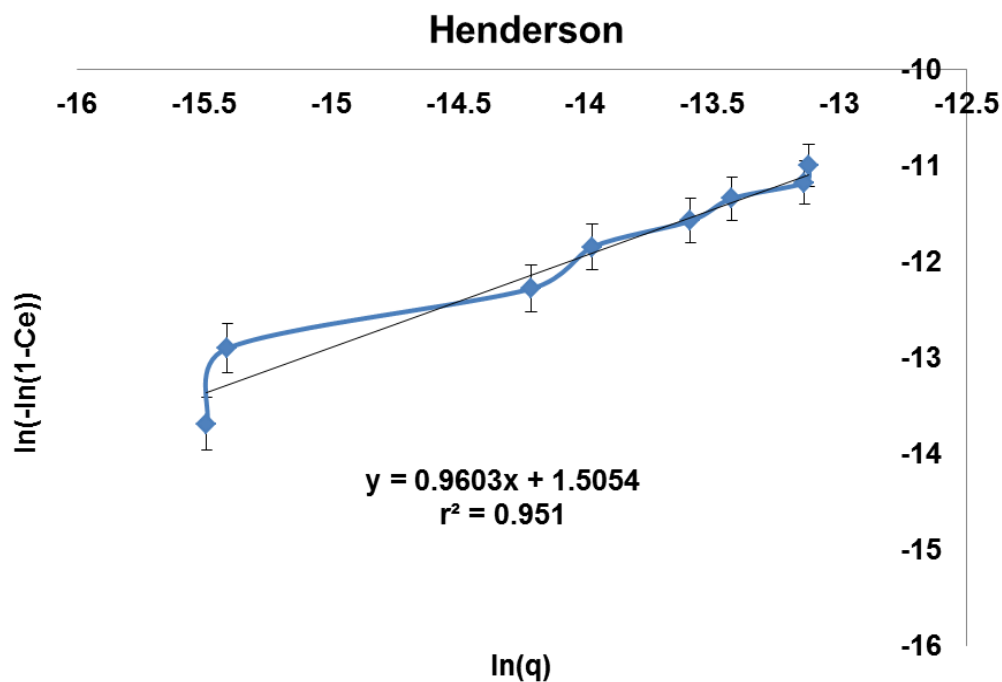


Figura 51. Modelo de Isotherma de Henderson para evaluar la adsorción de quitosán sobre la superficie de NEs-PLGA-CLT-QTS. Donde: Donde: q= cantidad adsorbida de quitosán; Ce= Concentración de quitosán en el equilibrio.

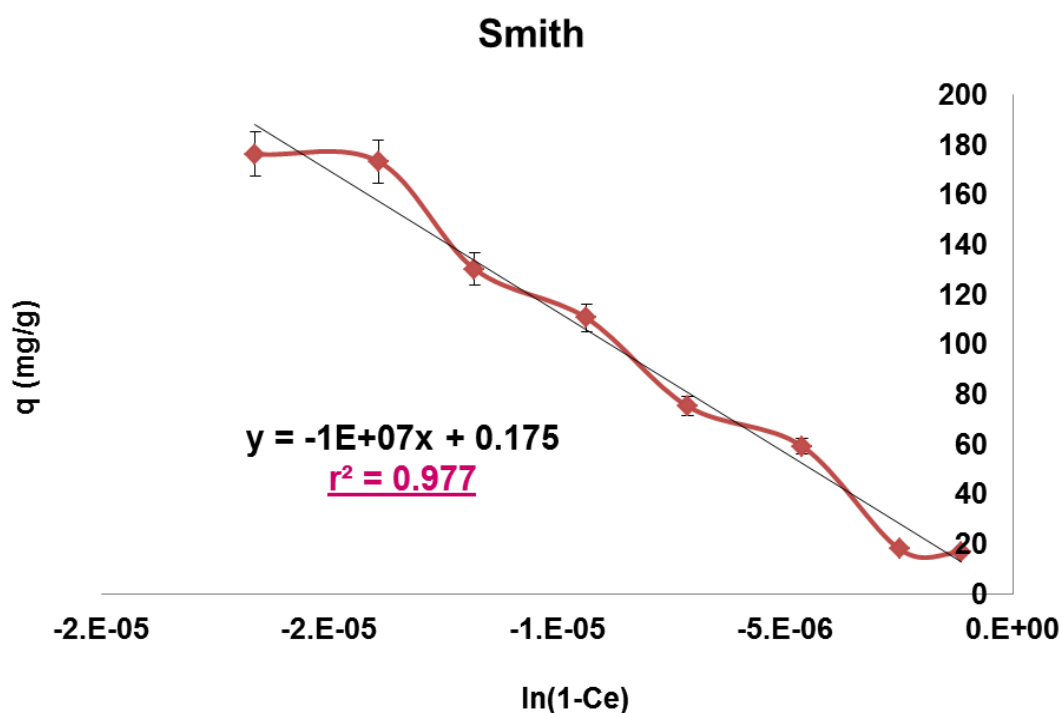


Figura 52. Modelo de Isotherma de Smith para evaluar la adsorción de quitosán sobre la superficie de NEs-PLGA-CLT-QTS. Donde: Donde: q= cantidad adsorbida de quitosán; Ce= Concentración de quitosán en el equilibrio.

ANEXO 9.- Porcentajes de liberación *in vitro* de clotrimazol a partir de las NEs-PLGA.

Tabla 54. Porcentajes de liberación de clotrimazol a partir de NEs-PLGA-CLT.

| Tiempo (h) | Réplica 1 | Réplica 2 | Réplica 3 | Promedio | Tiempo (h) | Réplica 1 | Réplica 2 | Réplica 3 | Promedio |
|-------------|-----------|-----------|-----------|----------|------------|-----------|-----------|-----------|----------|
| 0.25 | 3.097 | 4.851 | 4.975 | 4.308 | 76 | 37.962 | 39.063 | 39.357 | 38.794 |
| 0.5 | 13.840 | 10.022 | 9.983 | 11.282 | 80 | 39.210 | 42.063 | 41.063 | 40.779 |
| 1 | 12.548 | 11.163 | 11.494 | 11.735 | 96 | 40.860 | 42.081 | 43.138 | 42.026 |
| 1.5 | 12.049 | 14.058 | 14.275 | 13.461 | 100 | 41.274 | 43.802 | 42.778 | 42.618 |
| 2 | 13.627 | 13.569 | 13.833 | 13.677 | 104 | 43.776 | 45.980 | 44.030 | 44.596 |
| 2.5 | 12.720 | 15.217 | 14.603 | 14.180 | 168 | 47.587 | 49.924 | 52.705 | 50.072 |
| 3 | 13.878 | 14.308 | 15.385 | 14.524 | 176 | 52.743 | 56.115 | 59.132 | 55.997 |
| 4 | 13.799 | 15.956 | 15.766 | 15.174 | 192 | 55.325 | 58.831 | 60.932 | 58.363 |
| 5 | 15.809 | 16.776 | 14.501 | 15.695 | 200 | 58.733 | 60.429 | 63.271 | 60.811 |
| 6 | 16.187 | 18.041 | 15.247 | 16.492 | 216 | 58.234 | 66.175 | 64.958 | 63.122 |
| 7 | 18.245 | 17.170 | 16.005 | 17.140 | 224 | 60.208 | 68.378 | 67.481 | 65.356 |
| 8 | 19.511 | 17.990 | 18.833 | 18.778 | 240 | 60.525 | 69.258 | 65.790 | 65.191 |
| 24 | 22.061 | 23.576 | 24.614 | 23.417 | 248 | 64.601 | 73.325 | 67.995 | 68.640 |
| 26 | 25.512 | 25.853 | 28.077 | 26.481 | 264 | 67.079 | 70.849 | 71.341 | 69.756 |
| 28 | 27.367 | 28.612 | 31.211 | 29.063 | 272 | 72.535 | 79.003 | 75.157 | 75.565 |
| 30 | 27.996 | 31.432 | 34.416 | 31.281 | 336 | 73.489 | 77.860 | 78.197 | 76.515 |
| 32 | 31.147 | 31.289 | 32.339 | 31.592 | 360 | 77.372 | 80.495 | 76.390 | 78.086 |
| 48 | 31.428 | 32.418 | 34.297 | 32.714 | 384 | 79.226 | 82.279 | 77.348 | 79.618 |
| 52 | 32.118 | 32.695 | 35.466 | 33.426 | 408 | 82.353 | 78.049 | 80.988 | 80.463 |
| 56 | 34.068 | 32.960 | 36.648 | 34.559 | 432 | 82.586 | 83.092 | 83.757 | 83.145 |
| 72 | 33.533 | 34.076 | 37.018 | 34.876 | 480 | 81.103 | 84.702 | 85.751 | 83.852 |

Tabla 55. Porcentajes de liberación de clotrimazol a partir de NEs-PLGA-CLT-QTS.

| Tiempo (h) | Réplica 1 | Réplica 2 | Réplica 3 | Promedio | Tiempo (h) | Réplica 1 | Réplica 2 | Réplica 3 | Promedio |
|-------------|-----------|-----------|-----------|----------|------------|-----------|-----------|-----------|----------|
| 0.25 | 0.136 | 0.130 | 0.104 | 0.123 | 76 | 1.398 | 1.381 | 1.420 | 1.400 |
| 0.5 | 0.421 | 0.345 | 0.359 | 0.375 | 80 | 1.444 | 1.410 | 1.483 | 1.445 |
| 1 | 0.447 | 0.385 | 0.414 | 0.415 | 96 | 1.488 | 1.544 | 1.603 | 1.545 |
| 1.5 | 0.490 | 0.485 | 0.515 | 0.497 | 100 | 1.639 | 1.606 | 1.666 | 1.637 |
| 2 | 0.488 | 0.468 | 0.499 | 0.485 | 104 | 1.687 | 1.654 | 1.625 | 1.655 |
| 2.5 | 0.455 | 0.526 | 0.527 | 0.503 | 168 | 1.811 | 1.747 | 1.867 | 1.808 |
| 3 | 0.497 | 0.494 | 0.555 | 0.515 | 176 | 1.908 | 1.872 | 1.890 | 1.890 |
| 4 | 0.494 | 0.521 | 0.539 | 0.518 | 192 | 1.939 | 1.950 | 1.985 | 1.958 |
| 5 | 0.566 | 0.579 | 0.522 | 0.556 | 200 | 2.060 | 2.053 | 1.937 | 2.017 |
| 6 | 0.474 | 0.503 | 0.549 | 0.509 | 216 | 2.175 | 2.079 | 2.169 | 2.141 |
| 7 | 0.649 | 0.589 | 0.577 | 0.605 | 224 | 2.248 | 2.194 | 2.196 | 2.213 |
| 8 | 0.650 | 0.573 | 0.635 | 0.619 | 240 | 2.366 | 2.296 | 2.271 | 2.311 |
| 24 | 0.829 | 0.810 | 0.889 | 0.843 | 248 | 2.442 | 2.325 | 2.360 | 2.376 |
| 26 | 0.939 | 0.829 | 0.791 | 0.853 | 264 | 2.503 | 2.428 | 2.465 | 2.466 |
| 28 | 1.006 | 0.983 | 1.123 | 1.037 | 272 | 2.580 | 2.489 | 2.632 | 2.567 |
| 30 | 1.089 | 1.081 | 1.135 | 1.102 | 336 | 2.778 | 2.879 | 2.832 | 2.830 |
| 32 | 1.069 | 1.136 | 1.191 | 1.132 | 360 | 2.950 | 2.890 | 2.857 | 2.899 |
| 48 | 1.243 | 1.252 | 1.279 | 1.258 | 384 | 2.960 | 2.989 | 3.031 | 2.993 |
| 52 | 1.301 | 1.265 | 1.277 | 1.281 | 408 | 3.060 | 3.044 | 3.103 | 3.069 |
| 56 | 1.240 | 1.323 | 1.365 | 1.310 | 432 | 3.100 | 3.085 | 3.100 | 3.095 |
| 72 | 1.341 | 1.367 | 1.335 | 1.348 | 480 | | | | |

Tabla 56. Porcentajes de liberación de clotrimazol libre.

| Tiempo (h) | Réplica 1 | Réplica 2 | Réplica 3 | Promedio |
|--------------|-----------|-----------|-----------|----------|
| 0.083 | 0.946 | 4.889 | 4.100 | 3.312 |
| 0.25 | 31.644 | 19.239 | 20.027 | 23.637 |
| 0.5 | 48.471 | 29.647 | 19.554 | 32.557 |
| 1 | 50.489 | 40.843 | 28.701 | 40.011 |
| 2 | 59.856 | 47.151 | 29.174 | 45.394 |
| 3 | 76.809 | 65.286 | 38.636 | 60.244 |
| 4 | 79.421 | 66.548 | 45.259 | 63.743 |
| 5 | 83.674 | 67.810 | 62.763 | 71.416 |
| 6 | 87.827 | 69.702 | 63.867 | 73.799 |
| 7 | 90.733 | 70.175 | 66.390 | 75.766 |
| 8 | 93.819 | 77.271 | 71.752 | 80.948 |
| 24 | 93.977 | 92.253 | 77.745 | 87.991 |

ANEXO 10.- Desarrollo del método microbiológico placa-cilindro de NEs-PLGA contra *Candida albicans*.

Tabla 57. Diámetros del halo de inhibición para evaluar la linealidad del método microbiológico de clotrimazol contra *Candida albicans*.

| Concentración (µg/ml) | Halo de inhibición (cm) | | | | | | | | | \bar{x} | D.E. | % C.V. |
|-----------------------|-------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----------|------|--------|
| | | | | | | | | | | | | |
| 60 | 2.8 | 2.8 | 2.8 | 2.9 | 3 | 2.9 | 3 | 3 | 3.1 | 2.92 | 0.11 | 3.74 |
| 50 | 2.7 | 2.8 | 2.9 | 2.6 | 2.7 | 2.8 | 2.6 | 2.7 | 2.8 | 2.73 | 0.10 | 3.66 |
| 40 | 2.5 | 2.5 | 2.5 | 2.5 | 2.6 | 2.3 | 2.6 | 2.7 | 2.5 | 2.52 | 0.11 | 4.33 |
| 30 | 2.3 | 2.1 | 2.2 | 2.3 | 2.4 | 2.3 | 2.3 | 2.2 | 2.3 | 2.27 | 0.09 | 3.82 |
| 20 | 2 | 1.9 | 2 | 1.9 | 1.9 | 2 | 2.1 | 2 | 1.9 | 1.97 | 0.07 | 3.60 |
| 15 | 1.6 | 1.7 | 1.6 | 1.6 | 1.7 | 1.6 | 1.6 | 1.6 | 1.7 | 1.63 | 0.05 | 3.06 |

\bar{x} = promedio; D.E.: Desviación estándar; C.V.: Coeficiente de variación

Tabla 58. Diámetros del halo de inhibición para evaluar la repetibilidad del método microbiológico de clotrimazol contra *Candida albicans*.

| Concentración (µg/ml) | Día 1 | | | | | | Día 2 | | | | | | Día 3 | | | | | | \bar{x} | D.E. | % C.V. |
|-----------------------|-------|----|----|----|----|----|-------|----|----|----|----|----|-------|----|----|----|----|----|-----------|-------|--------|
| 25 | 22 | 23 | 22 | 21 | 22 | 21 | 22 | 23 | 21 | 22 | 23 | 22 | 24 | 23 | 23 | 21 | 24 | 22 | 22.28 | 0.093 | 4.180 |
| 20 | 19 | 20 | 21 | 20 | 20 | 21 | 20 | 20 | 20 | 21 | 22 | 20 | 21 | 21 | 22 | 20 | 21 | 19 | 20.44 | 0.083 | 4.067 |
| 15 | 16 | 16 | 15 | 16 | 16 | 16 | 18 | 17 | 16 | 16 | 16 | 18 | 16 | 16 | 17 | 16 | 17 | 16 | 16.33 | 0.075 | 4.563 |

\bar{x} = promedio; D.E.: Desviación estándar; C.V.: Coeficiente de variación

Tabla 59. Diámetros del halo de inhibición para evaluar la reproducibilidad del método microbiológico de clotrimazol contra *Candida albicans*.

| Concentración (µg/ml) | Día 1 | | | | | | Día 2 | | | | | | Día 3 | | | | | | \bar{x} | D.E. | % C.V. |
|-----------------------|-------|----|----|----|----|----|-------|----|----|----|----|----|-------|----|----|----|----|----|-----------|------|--------|
| 25 | 22 | 22 | 23 | 21 | 22 | 23 | 22 | 21 | 23 | 20 | 21 | 21 | 22 | 23 | 23 | 21 | 21 | 23 | 21.89 | 0.1 | 4.40 |
| 20 | 21 | 21 | 20 | 20 | 21 | 20 | 19 | 20 | 21 | 21 | 20 | 19 | 21 | 20 | 22 | 19 | 19 | 22 | 20.33 | 0.1 | 4.77 |
| 15 | 15 | 16 | 15 | 16 | 17 | 16 | 16 | 16 | 18 | 16 | 16 | 16 | 17 | 16 | 16 | 17 | 16 | 16 | 16.17 | 0.07 | 4.37 |

\bar{x} = promedio; D.E.: Desviación estándar; C.V.: Coeficiente de variación

Tabla 60. Diámetros del halo de inhibición para evaluar el límite de cuantificación del método microbiológico de clotrimazol contra *Candida albicans*.

| Concentración (µg/ml) | Día 1 | | | | | | Día 2 | | | | | | Día 3 | | | | | | \bar{x} | D.E. | % C.V. |
|-----------------------|-------|----|----|----|----|----|-------|----|----|----|----|----|-------|----|----|----|----|----|-----------|-------|--------|
| 30 | 21 | 20 | 22 | 22 | 23 | 23 | 22 | 22 | 23 | 21 | 23 | 22 | 21 | 22 | 20 | 21 | 23 | 23 | 2.189 | 0.102 | 4.672 |
| 25 | 21 | 20 | 22 | 22 | 20 | 19 | 21 | 21 | 22 | 20 | 20 | 21 | 21 | 21 | 21 | 21 | 22 | 21 | 2.089 | 0.083 | 3.985 |
| 20 | 19 | 19 | 19 | 19 | 21 | 19 | 18 | 19 | 19 | 18 | 21 | 19 | 18 | 19 | 20 | 19 | 21 | 20 | 1.928 | 0.096 | 4.971 |
| 15 | 16 | 16 | 15 | 17 | 16 | 15 | 17 | 16 | 17 | 16 | 18 | 17 | 17 | 16 | 17 | 16 | 18 | 16 | 1.644 | 0.086 | 5.203 |
| 10 | 6 | 6 | 6 | 7 | 6 | 6 | 6 | 6 | 6 | 6 | 7 | 6 | 6 | 6 | 6 | 6 | 6 | 6 | 0.611 | 0.032 | 5.292 |
| 5 | 6 | 6 | 6 | 6 | 6 | 7 | 6 | 6 | 6 | 6 | 6 | 6 | 6 | 7 | 6 | 6 | 6 | 6 | 0.611 | 0.032 | 5.292 |

ANEXO 11.- Determinación de CMI NES-PLGA contra *Candida albicans*

Tabla 61. Diámetros del del halo de inhibición para determinar la CMI de NES-PLGA-CLT contra *Candida albicans*.

| Concentración (µg/ml) | Día 1 | | | Día 2 | | | Día 3 | | | \bar{x} | D.E. | % C.V. |
|-----------------------|-------|----|----|-------|----|----|-------|----|----|-----------|-------|--------|
| 30 | 20 | 21 | 19 | 20 | 22 | 20 | 21 | 20 | 19 | 20.222 | 0.916 | 4.531 |
| 20 | 18 | 19 | 18 | 19 | 18 | 17 | 18 | 19 | 18 | 18.222 | 0.629 | 3.449 |
| 10 | 14 | 15 | 14 | 15 | 14 | 15 | 14 | 14 | 15 | 14.444 | 0.497 | 3.440 |
| 5 | 11 | 11 | 12 | 11 | 11 | 12 | 11 | 11 | 12 | 11.333 | 0.471 | 4.159 |
| 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

\bar{x} = promedio; D.E.: Desviación estándar; C.V.: Coeficiente de variación

Tabla 62. Diámetros del halo de inhibición para determinar la CMI de NEs-PLGA-CLT-QTS contra *Candida albicans*.

| Concentración (µg/ml) | Día 1 | | | Día 2 | | | Día 3 | | | \bar{x} | D.E. | % C.V. |
|-----------------------|-------|----|----|-------|----|----|-------|----|----|-----------|-------|--------|
| 30 | 26 | 26 | 27 | 25 | 27 | 26 | 26 | 25 | 27 | 26.111 | 0.737 | 2.823 |
| 20 | 23 | 24 | 23 | 25 | 23 | 24 | 23 | 25 | 23 | 23.667 | 0.816 | 3.450 |
| 10 | 20 | 19 | 20 | 19 | 20 | 20 | 20 | 21 | 19 | 19.778 | 0.629 | 3.178 |
| 5 | 15 | 15 | 14 | 15 | 15 | 15 | 14 | 16 | 15 | 14.889 | 0.567 | 3.805 |
| 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

\bar{x} = promedio; D.E.: Desviación estándar; C.V.: Coeficiente de variación

ANEXO 12.- Tamaño de partícula y potencial Z de NEs-PLGA de los estudios de mucoadhesión de las NEs con mucina

Tabla 63. Tamaño de partícula promedio de NEs-PLGA para realizar los estudios de mucoadhesión con mucina.

| Muestra | Tamaño promedio (nm) | Muestra | Tamaño promedio (nm) |
|------------------|----------------------|-------------------------------|----------------------|
| NEs-PLGA | 279.5 | Mucin (0.1%) - NEs-PLGA | 400.7 |
| | 286.3 | | 417.8 |
| | 283.3 | | 417.8 |
| $\bar{x} =$ | 283.03±2.78 | $\bar{x} =$ | 412.10±8.06 |
| NEs-PLGA-CLT | 391.4 | Mucin (0.1%)-NEs-PLGA-CLT | 472.7 |
| | 379.9 | | 478 |
| | 377.3 | | 470.8 |
| $\bar{x} =$ | 382.87±6.13 | $\bar{x} =$ | 473.83±3.04 |
| NEs-PLGA-CLT-QTS | 494.6 | Mucin (0.1%)-NEs-PLGA-CLT-QTS | 428.2 |
| | 485.1 | | 421.4 |
| | 495.1 | | 423.7 |
| $\bar{x} =$ | 491.60±4.60 | $\bar{x} =$ | 424.43±2.82 |
| Mucina (0.1%) | 522 | Mucin (1%)-NEs-PLGA | 527 |
| | 520 | | 513.9 |
| | 521.5 | | 514.7 |
| $\bar{x} =$ | 521.17±0.85 | $\bar{x} =$ | 518.53±5.99 |
| Mucin (1%) | 844.1 | Mucin (1%)-NEs-PLGA-CLT | 700.3 |
| | 852.6 | | 728.1 |
| | 850.2 | | 749.5 |
| $\bar{x} =$ | 815.63±3.58 | $\bar{x} =$ | 725.97±20.14 |
| | | Mucin (1%)-NEs-PLGA-CLT-QTS | 798.7 |
| | | | 788.8 |
| | | | 790.7 |
| | | $\bar{x} =$ | 792.73±4.28 |

\bar{x} = promedio ± desviación estándar

Tabla 64. Potencial Z de NEs-PLGA para realizar los estudios de mucoadhesión con mucina.

| Lote | Potencial Z (mV) | Lote | Potencial Z (mV) |
|------------------|-------------------|-------------------------------|-------------------|
| NEs-PLGA | -0.70 | Mucin (0.1%) - NEs-PLGA | -2.72 |
| | -0.80 | | -2.84 |
| | -0.90 | | -2.07 |
| $\bar{x} =$ | -0.80±0.08 | $\bar{x} =$ | -2.54±0.33 |
| NEs-PLGA-CLT | -0.80 | Mucin (0.1%)-NEs-PLGA-CLT | -1.72 |
| | -0.90 | | -2.70 |
| | -0.80 | | -1.64 |
| $\bar{x} =$ | -0.83±0.05 | $\bar{x} =$ | -2.02±0.48 |
| NEs-PLGA-CLT-QTS | 20.60 | Mucin (0.1%)-NEs-PLGA-CLT-QTS | -2.76 |
| | 20.70 | | -2.52 |
| | 20.30 | | -3.13 |
| $\bar{x} =$ | 20.53±0.17 | $\bar{x} =$ | -2.80±0.25 |
| Mucina (0.1%) | -5.35 | Mucin (1%)-NEs-PLGA | -2.78 |
| | -4.71 | | -2.66 |
| | -5.97 | | -2.44 |
| $\bar{x} =$ | -5.34±0.51 | $\bar{x} =$ | -2.63±0.14 |
| Mucin (1%) | -3.13 | Mucin (1%)-NEs-PLGA-CLT | -2.49 |
| | -2.33 | | -2.57 |
| | -3.16 | | -2.38 |
| $\bar{x} =$ | -2.87±0.38 | $\bar{x} =$ | -2.48±0.78 |
| | | Mucin (1%)-NEs-PLGA-CLT-QTS | -2.09 |
| | | | -2.10 |
| | | | -2.79 |
| | | $\bar{x} =$ | -2.33±0.33 |

\bar{x} = promedio ± desviación estándar

ANEXO 13.- Resultados de la citometría de células epiteliales vaginales para la determinación de la viabilidad celular de NEs-PLGA

Tabla 65. Resultados del conteo de células epiteliales vaginales por cuadrante de la cámara de Neubauer para evaluar la viabilidad celular de clotrimazol (concentraciones: 1: 1µg/ml, 2:10 µg/ml, 3:50 µg/ml, 4:100 µg/ml, 5:200 µg/ml).

| Muestra | No. Cuadrante | 1 | | | | | 2 | | | | | 3 | | | | |
|---------|---------------|----|----|----|----|-------|----|----|----|----|-------|----|----|----|----|-------|
| | | 1 | 2 | 3 | 4 | TOTAL | 1 | 2 | 3 | 4 | TOTAL | 1 | 2 | 3 | 4 | TOTAL |
| CONTROL | Vivas | 83 | 61 | 90 | 47 | 281 | 84 | 76 | 54 | 62 | 276 | 58 | 67 | 43 | 73 | 241 |
| | Muertas | 3 | 0 | 1 | 0 | 4 | 4 | 3 | 0 | 4 | 11 | 0 | 5 | 0 | 0 | 5 |
| CLT 1 | Vivas | 65 | 40 | 42 | 57 | 204 | 71 | 35 | 42 | 49 | 197 | 44 | 35 | 69 | 65 | 213 |
| | Muertas | 4 | 0 | 0 | 4 | 8 | 3 | 0 | 1 | 7 | 11 | 3 | 3 | 4 | 0 | 10 |
| CLT 2 | Vivas | 63 | 52 | 80 | 54 | 249 | 60 | 65 | 59 | 47 | 231 | 62 | 79 | 54 | 61 | 256 |
| | Muertas | 2 | 3 | 5 | 0 | 10 | 3 | 2 | 0 | 7 | 12 | 4 | 8 | 0 | 5 | 17 |
| CLT 3 | Vivas | 64 | 49 | 51 | 87 | 251 | 45 | 68 | 7 | 59 | 179 | 76 | 63 | 82 | 54 | 275 |
| | Muertas | 8 | 7 | 4 | 10 | 29 | 5 | 7 | 4 | 8 | 24 | 4 | 4 | 10 | 8 | 26 |
| CLT 4 | Vivas | 41 | 48 | 35 | 56 | 180 | 73 | 49 | 54 | 72 | 248 | 53 | 55 | 72 | 48 | 228 |
| | Muertas | 12 | 8 | 0 | 10 | 30 | 15 | 12 | 10 | 15 | 52 | 12 | 9 | 8 | 7 | 36 |
| CLT 5 | Vivas | 57 | 64 | 64 | 45 | 230 | 53 | 46 | 58 | 65 | 222 | 61 | 68 | 45 | 53 | 227 |
| | Muertas | 19 | 18 | 25 | 10 | 72 | 14 | 18 | 15 | 12 | 59 | 20 | 18 | 12 | 15 | 65 |

Tabla 66. Resultados del conteo de células epiteliales vaginales por cuadrante de la cámara de Neubauer para evaluar la viabilidad celular de NEs-PLGA (concentraciones: 1: 1µg/ml, 2:10 µg/ml, 3:50 µg/ml, 4:100 µg/ml, 5:200 µg/ml).

| Muestra | No. Cuadrante | 1 | | | | | 2 | | | | | 3 | | | | |
|------------|---------------|----|----|----|----|-------|----|----|----|----|-------|----|----|----|----|-------|
| | | 1 | 2 | 3 | 4 | TOTAL | 1 | 2 | 3 | 4 | TOTAL | 1 | 2 | 3 | 4 | TOTAL |
| NEs-PLGA 1 | Vivas | 55 | 73 | 62 | 47 | 237 | 77 | 66 | 3 | 55 | 201 | 59 | 87 | 63 | 42 | 251 |
| | Muertas | 5 | 8 | 0 | 0 | 13 | 6 | 4 | 5 | 1 | 16 | 0 | 8 | 1 | 3 | 12 |
| NEs-PLGA 2 | Vivas | 33 | 58 | 67 | 71 | 229 | 51 | 66 | 67 | 73 | 257 | 61 | 56 | 65 | 53 | 235 |
| | Muertas | 0 | 3 | 2 | 4 | 9 | 0 | 4 | 7 | 6 | 17 | 10 | 4 | 3 | 1 | 18 |
| NEs-PLGA 3 | Vivas | 62 | 43 | 57 | 70 | 232 | 64 | 56 | 61 | 43 | 224 | 61 | 56 | 47 | 78 | 242 |
| | Muertas | 0 | 5 | 4 | 3 | 12 | 8 | 5 | 7 | 6 | 26 | 10 | 9 | 5 | 8 | 32 |
| NEs-PLGA 4 | Vivas | 77 | 68 | 64 | 52 | 261 | 49 | 48 | 58 | 73 | 228 | 60 | 52 | 48 | 81 | 241 |
| | Muertas | 6 | 5 | 4 | 2 | 17 | 1 | 5 | 3 | 3 | 12 | 7 | 9 | 0 | 8 | 24 |
| NEs-PLGA 5 | Vivas | 54 | 74 | 48 | 63 | 239 | 45 | 53 | 73 | 60 | 231 | 68 | 72 | 59 | 46 | 245 |
| | Muertas | 8 | 5 | 0 | 5 | 18 | 7 | 5 | 5 | 4 | 21 | 0 | 3 | 5 | 8 | 16 |

Tabla 67. Resultados del conteo de células epiteliales vaginales por cuadrante de la cámara de Neubauer para evaluar la viabilidad celular de NES-PLGA-CLT (concentraciones: 1: 1µg/ml, 2:10 µg/ml, 3:50 µg/ml, 4:100 µg/ml, 5:200 µg/ml).

| Muestra | No. Cuadrante | 1 | 2 | 3 | 4 | TOTAL | 1 | 2 | 3 | 4 | TOTAL | 1 | 2 | 3 | 4 | TOTAL |
|----------------|---------------|----|----|----|----|-------|----|----|----|----|-------|----|----|----|----|-------|
| NES-CLT-PLGA 1 | Vivas | 65 | 71 | 45 | 53 | 234 | 84 | 57 | 78 | 47 | 266 | 70 | 65 | 61 | 40 | 236 |
| | Muertas | 6 | 5 | 0 | 8 | 19 | 10 | 5 | 7 | 3 | 25 | 10 | 8 | 1 | 8 | 27 |
| NES-CLT-PLGA 2 | Vivas | 45 | 93 | 79 | 56 | 273 | 75 | 88 | 96 | 59 | 318 | 48 | 60 | 63 | 53 | 224 |
| | Muertas | 8 | 5 | 3 | 0 | 16 | 6 | 5 | 8 | 6 | 25 | 4 | 4 | 0 | 3 | 11 |
| NES-CLT-PLGA 3 | Vivas | 48 | 45 | 69 | 72 | 234 | 63 | 70 | 61 | 64 | 258 | 40 | 62 | 47 | 56 | 205 |
| | Muertas | 5 | 3 | 8 | 7 | 23 | 5 | 8 | 12 | 10 | 35 | 3 | 8 | 4 | 7 | 22 |
| NES-CLT-PLGA 4 | Vivas | 86 | 90 | 76 | 82 | 334 | 61 | 54 | 87 | 46 | 248 | 68 | 47 | 52 | 90 | 257 |
| | Muertas | 12 | 16 | 15 | 5 | 48 | 7 | 5 | 8 | 9 | 29 | 10 | 4 | 3 | 10 | 27 |
| NES-CLT-PLGA 5 | Vivas | 81 | 78 | 89 | 76 | 324 | 83 | 90 | 68 | 72 | 313 | 80 | 75 | 65 | 49 | 269 |
| | Muertas | 16 | 15 | 20 | 10 | 61 | 12 | 15 | 12 | 20 | 59 | 22 | 25 | 20 | 15 | 82 |

Tabla 68. Resultados del conteo de células epiteliales vaginales por cuadrante de la cámara de Neubauer para evaluar la viabilidad celular de NES-PLGA-CLT-QTS.

| Muestra | No. Cuadrante | 1 | 2 | 3 | 4 | TOTAL | 1 | 2 | 3 | 4 | TOTAL | 1 | 2 | 3 | 4 | TOTAL |
|--------------------|---------------|----|----|----|----|-------|----|----|----|----|-------|----|----|----|----|-------|
| NES-CLT-PLGA-QTS 1 | Vivas | 65 | 51 | 40 | 83 | 239 | 92 | 75 | 63 | 55 | 285 | 68 | 49 | 57 | 89 | 263 |
| | Muertas | 5 | 8 | 0 | 0 | 13 | 4 | 7 | 5 | 0 | 16 | 4 | 0 | 0 | 3 | 7 |
| NES-CLT-PLGA-QTS 2 | Vivas | 83 | 95 | 67 | 40 | 285 | 72 | 69 | 53 | 65 | 259 | 56 | 73 | 61 | 70 | 260 |
| | Muertas | 8 | 12 | 0 | 15 | 35 | 0 | 8 | 0 | 12 | 20 | 9 | 10 | 0 | 12 | 31 |
| NES-CLT-PLGA-QTS 3 | Vivas | 42 | 83 | 36 | 43 | 204 | 32 | 55 | 48 | 77 | 212 | 61 | 73 | 50 | 73 | 257 |
| | Muertas | 5 | 8 | 8 | 11 | 32 | 15 | 17 | 8 | 10 | 50 | 15 | 5 | 12 | 7 | 39 |
| NES-CLT-PLGA-QTS 4 | Vivas | 62 | 97 | 81 | 47 | 287 | 52 | 78 | 65 | 84 | 279 | 57 | 79 | 58 | 63 | 257 |
| | Muertas | 24 | 15 | 16 | 19 | 74 | 15 | 18 | 5 | 10 | 48 | 16 | 18 | 15 | 11 | 60 |
| NES-CLT-PLGA-QTS 5 | Vivas | 68 | 72 | 79 | 63 | 282 | 56 | 45 | 61 | 75 | 237 | 49 | 58 | 63 | 48 | 218 |
| | Muertas | 12 | 19 | 27 | 25 | 83 | 14 | 12 | 15 | 22 | 63 | 12 | 15 | 19 | 15 | 61 |

Tabla 69. Resultados del conteo de células epiteliales vaginales por cuadrante de la cámara de Neubauer para evaluar la viabilidad celular de quitosán (concentraciones: 1: 1µg/ml, 2:10 µg/ml, 3:50 µg/ml, 4:100 µg/ml, 5:200 µg/ml).

| Muestra | No. Cuadrante | 1 | 2 | 3 | 4 | TOTAL | 1 | 2 | 3 | 4 | TOTAL | 1 | 2 | 3 | 4 | TOTAL |
|---------|---------------|----|----|----|----|-------|----|----|----|----|-------|----|----|----|----|-------|
| QTS 1 | Vivas | 83 | 42 | 50 | 41 | 216 | 57 | 51 | 59 | 54 | 221 | 48 | 60 | 46 | 48 | 202 |
| | Muertas | 0 | 3 | 2 | 0 | 4 | 2 | 3 | 3 | 0 | 8 | 0 | 1 | 0 | 3 | 4 |
| QTS 2 | Vivas | 44 | 91 | 51 | 38 | 224 | 69 | 39 | 40 | 92 | 240 | 75 | 54 | 56 | 87 | 272 |
| | Muertas | 2 | 3 | 2 | 1 | 8 | 2 | 0 | 3 | 5 | 10 | 0 | 0 | 2 | 1 | 3 |
| QTS 3 | Vivas | 59 | 84 | 71 | 85 | 299 | 73 | 64 | 40 | 89 | 266 | 49 | 40 | 92 | 73 | 254 |
| | Muertas | 4 | 6 | 3 | 5 | 18 | 3 | 2 | 5 | 4 | 14 | 3 | 4 | 3 | 4 | 14 |
| QTS 4 | Vivas | 49 | 74 | 67 | 73 | 263 | 59 | 60 | 80 | 42 | 241 | 47 | 87 | 42 | 59 | 235 |
| | Muertas | 5 | 7 | 8 | 5 | 25 | 6 | 3 | 5 | 4 | 18 | 6 | 1 | 9 | 8 | 24 |
| QTS 5 | Vivas | 40 | 81 | 68 | 69 | 258 | 81 | 66 | 91 | 66 | 304 | 66 | 87 | 67 | 54 | 274 |
| | Muertas | 6 | 11 | 9 | 6 | 32 | 10 | 5 | 14 | 6 | 35 | 4 | 5 | 12 | 8 | 29 |

ANEXO 14. PUBLICACIÓN

Martínez Pérez Beatriz; Quintanar-Guerrero David, Tapia-Tapia Melina, Cisneros Tamayo Ricardo, Zambrano-Zaragoza María-L., Alcalá-Alcalá Sergio, Mendoza-Muñoz Néstor, Piñón-Segundo Elizabeth. (2018). Controlled-release biodegradable nanoparticles: From preparation to vaginal applications. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 115(30), 185-195.



Contents lists available at ScienceDirect

European Journal of Pharmaceutical Sciences

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ejps



Controlled-release biodegradable nanoparticles: From preparation to vaginal applications



Beatriz Martínez-Pérez^a, David Quintanar-Guerrero^b, Melina Tapia-Tapia^c,
Ricardo Cisneros-Tamayo^d, María L. Zambrano-Zaragoza^e, Sergio Alcalá-Alcalá^f,
Néstor Mendoza-Muñoz^g, Elizabeth Piñón-Segundo^{a,*}

^a Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán (FES-Cuautitlán), Laboratorio de Sistemas Farmacéuticos de Liberación Modificada, Km. 2.5 Carretera Cuautitlán-Teoloyucan, San Sebastián Xhala, C.P. 54714 Cuautitlán Izcalli, Edo. de México, Mexico

^b UNAM, FES-Cuautitlán, Laboratorio de Posgrado en Tecnología Farmacéutica, Av. 1o de mayo s/n, C.P. 54740 Cuautitlán Izcalli, Edo. de México, Mexico

^c Centro Conjunto de Investigación Química Sustentable UAEM-UNAM (CCIQS), Carretera Toluca-Atzacomulco Km. 14.5, Unidad San Cayetano, C.P. 50200 Toluca, Edo. de México, Mexico

^d Universidad Politécnica del Valle de México, División de Ingeniería en Nanotecnología, Av. Mexiquense s/n, esq. Universidad Politécnica, Col. Villa Esmeralda, C.P. 54910 Tultitlán, Edo. de México, Mexico

^e UNAM, FES-Cuautitlán, Laboratorio de Procesos de Transformación y Tecnologías Emergentes en Alimentos, Km. 2.5 Carretera Cuautitlán-Teoloyucan, San Sebastián Xhala, C.P. 54714 Cuautitlán Izcalli, Edo. de México, Mexico

^f Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Facultad de Farmacia, Av. Universidad 1001, Col. Chamilpa, C.P. 62209 Cuernavaca, Morelos, Mexico

^g Universidad de Colima, Facultad de Ciencias Químicas, Laboratorio de Farmacia, Carretera Colima-Coquimatlán Km. 9, C.P. 28400 Coquimatlán, Colima, Mexico

ARTICLE INFO

Chemical compounds studied in this article:
Clotrimazole (PubChem CID: 2812)

Keywords:

Biodegradable nanoparticles
Clotrimazole
Mucoadhesion
PLGA-chitosan nanoparticles
Vaginal administration

ABSTRACT

This study aimed to prepare poly (D,L-lactide-co-glycolide) (PLGA) nanoparticles (NPs) with chitosan (CTS) surface modification to be used as a vaginal delivery system for antimycotic drugs. Clotrimazole was encapsulated with entrapment efficiencies of 86.1 and 68.9% into Clotrimazole-PLGA-NPs (CLT-PLGA-NPs) and PLGA-NPs with CTS-modified surface (CLT-PLGA-CTS-NPs), respectively. The later NPs exhibited a larger size and higher positive zeta potential (Z potential) in comparison to unmodified NPs. *In vitro* release kinetic studies indicated that Clotrimazole was released in percentages of > 98% from both nanoparticulate systems after 18 days. Antifungal activity and mucoadhesive properties of NPs were enhanced when CTS was added onto the surface. In summary, these results suggested that Clotrimazole loaded into PLGA-CTS-NPs has great potential for vaginal applications in treating vaginal infections generated by *Candida albicans*.

1. Introduction

Vaginal infections commonly affect women at reproductive age, thereby resulting to the most frequent reason for gynecological consultations. Although vaginal infections do not have a high mortality rate, these disorders may be associated with pre-term birth, spontaneous abortion, pelvic inflammatory disease, endometritis, and the acquisition or contagion of several sexually transmitted diseases (Machado et al., 2016). According to Hernández et al. (2008), the prevalence of vaginitis in Mexican women ranges from 50 to 70%. These authors indicate that 75% of patients presented vaginitis originated by yeasts. The most frequently identified species from Mexican patients with vaginal candidiasis were *Candida albicans* (39.0%), *Candida glabrata* (35.9%), and *Candida tropicalis* (16.2%) (Rivera Sánchez et al., 2006). Cararach Tur et al. (2013) reported that inherent factors in

the pathogenicity of *Candida* spp. include its development at 37 °C, adhesion ability toward receptors on epithelial vagina cells by adhesins, and their ability to produce pseudohyphae. Even more so, these authors indicated that 5–8% of women will develop vulvovaginal candidiasis, with four or more occurrences within 1 year. Therefore, the recurrence of vaginitis could result in low success with the conventional forms of vaginal administration because these forms generate discomfort and irritation in the vaginal epithelium. Another drawback of these conventional forms is poor drug distribution and the inability to modulate the rate of active compounds once they are released into the cervicovaginal mucus (das Neves et al., 2015). Furthermore, drug retention is often not completely achieved due to vaginal dynamics. These disadvantages lead to an inability to completely eradicate the biofilm associated with *Candida* spp. (Palmeira-de-Oliveira et al., 2015).

Studies have shown that the pharmacological action of drugs is

* Corresponding author.

E-mail address: epinons@comunidad.unam.mx (E. Piñón-Segundo).

<https://doi.org/10.1016/j.ejps.2017.11.029>

Received 14 May 2017; Received in revised form 24 November 2017; Accepted 30 November 2017

Available online 05 December 2017

0928-0987/ © 2018 Elsevier B.V. All rights reserved.

optimized when they are associated with a carrier system; the therapeutic effect is increased because the drug is directed toward its target so that a high concentration site is generated (Piñón-Segundo et al., 2005). Recently, there has been growing interest in vaginal drug nanocarriers because they offer features such as control release, adhesion to mucus modulation, specific targeting for mucosal tissue penetration, and intracellular delivery (das Neves et al., 2015). Pharmaceutical nanotechnology offers an alternative design for vaginal drug delivery; in order to achieve the latter, the drugs cross through the vaginal mucosa and linger there to assure therapeutic efficacy. Therefore, nanocarriers comprise a strategy for vaginal drug delivery because they possess desirable properties, such as small steric obstruction and, in addition, the drug could be deposited at extracellular or intracellular levels (Liu et al., 2015).

In this study, Clotrimazole was selected for incorporation into NPs. Clotrimazole is an imidazole widely used against vaginal infections generated by *Candida* spp. The therapeutic efficacy of Clotrimazole exceeds 85% on using doses of > 100 mg per day (Cararach Tur et al., 2013). The treatment time of Clotrimazole may last from 4 to 7 days to eradicate *Candida albicans* (Young and Jewell, 2001). However, the use of Clotrimazole at high doses for long periods of time can result in side effects such as pain and vaginal irritation (Kolling et al., 2013). Thus, the purpose of this study was to vectorize Clotrimazole with polymeric NPs to treat vaginitis.

Poly (D,L-lactide co-glycolide) (PLGA) was used in this study because this polymer has numerous advantages, such as biodegradability and biocompatibility; moreover, it has been approved for drug delivery by the U.S. Food and Drug Administration (FDA) and the European Medicine Agency (EMA) (Sharma et al., 2016). Even with the excellent properties of PLGA, its bioadhesivity is lower than that required to achieve efficient therapy through vaginal administration (Ndesendo et al., 2009). To tackle this limitation, the surface of PLGA-NPs was modified with CTS to improve its mucoadhesivity. CTS is a biopolymer with a large number of applications in pharmaceutical systems due to its virtues such as biocompatibility, mucoadhesivity, and microbicide properties (Shuckla et al., 2013).

For the purpose of this study, Clotrimazole was encapsulated into CLT-PLGA-NPs and CLT-PLGA-CTS-NPs by the emulsification-diffusion technique. Characterization of both types of NPs was performed by determination of particle size distribution, Z potential, Infrared (IR) spectroscopy, and *in vitro* drug release studies and morphology. Microbiological evaluation of the CLT-PLGA-NPs and CLT-PLGA-CTS-NPs was carried out using the microdilution method. A porcine epithelial model was developed to evaluate the effectiveness of these submicronic particles against *C. albicans*. CLT-PLGA-CTS-NPs showed properties such as controlled drug release and mucoadhesiveness, which that allowed them to remain in the vaginal site, offering an alternative to vaginitis treatment.

2. Materials and methods

2.1. Materials

PLGA (lactide:glycolide 50:50, MW 30,000–60,000), low molecular weight (LMW) CTS (50,000–190,000 Da, based on viscosity) and mucin from porcine stomach (type II, bound sialic acid, $\leq 1.2\%$) were purchased from Sigma-Aldrich Química, S. de RL. de CV. (México). Poly (vinyl alcohol) (PVAL) Mowiol® 40–88, MW 205,000 was obtained from Glomazza® (México). Clotrimazole was kindly donated by Globe Chemicals, S.A. de C.V. (México). Ninhydrin (triketohydrindene hydrate), boric acid, iodine, potassium iodide, phosphate buffer solution (Dulbecco's solution), Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), HAM F-12 medium, and trypan blue were from Sigma-Aldrich®. Ethyl acetate and other analytical grade reagents were supplied by Femont® (México).

2.2. CLT-PLGA-NPs preparation

CLT-PLGA-NPs were obtained by the emulsification-diffusion technique (Piñón-Segundo et al., 2005). Briefly, the organic solvent (ethyl acetate) and deionized water were mutually saturated. PLGA and Clotrimazole were dissolved in the water-saturated organic solvent. This solution was emulsified with a solvent-saturated aqueous solution containing 0.5% (w/v) of PVAL using a stirrer (Ultraturrax IKA®, Germany) at 8000 rpm for 10 min. Deionized water was added to the emulsion to induce diffusion of the organic solvent into the continuous phase. Then, the organic solvent was removed by vacuum steam distillation (Buchi®, Switzerland) at 40 °C. Residual PVAL was removed from the NPs with 2 cycles of ultracentrifugation at 20,000 rpm for 20 min (Optima LE-80 K; Beckman®, USA). Finally, the NPs were freeze-dried (Labconco®, USA).

2.3. CLT-PLGA-CTS-NPs preparation

The NPs were prepared by the emulsion-diffusion technique as previously described. After ultracentrifugation, an acetic solution (0.5% v/v; pH = 3.0) of CTS (3 mg/ml) was added to the CLT-PLGA-NPs suspension. After, this dispersion was maintained under magnetic stirring for 24 h, then ultracentrifuged at 20,000 rpm for 20 min, and finally, freeze-dried.

2.4. Particle size analysis and surface charge

Mean particle size and particle size distribution were determined by dynamic light scattering, and Z potential was determined by electrophoretic light scattering using a Zetasizer (Nano ZS90; Malvern®, U.K.). NPs dispersions were diluted with deionized water and placed within the instrument's sensitivity range. Size distribution was obtained by intensity mode. All measurements were carried out in triplicate and were performed at a scattering angle of 90° and at room temperature.

2.5. CLT-PLGA-CTS-NPs morphology

Atomic force microscopy studies were utilized to evaluate CLT-PLGA-CTS-NPs morphology. NPs were dispersed and diluted with deionized water. An aliquot (5 μ l) of diluted sample was spread onto a coverslip. The sample was allowed to dry at ambient temperature for 24 h. Tapping mode in air and scan speed at 1 Hz was carried out utilizing MULTIMODE 8 with NanoScope Analysis ver 1.5 software (Bruker Instruments, USA); RTSPA cantilever was employed. The area image was 10 μ m².

2.6. Stabilizer quantification

The residual PVAL associated with NPs was determined by a colorimetric method based on the formation of a complex between hydroxyl groups of PVAL and an iodine molecule (Sahoo et al., 2002). Approximately 5–10 mg of lyophilized NPs were hydrolyzed in 3 ml of 0.2 M NaOH for 48 h. The dispersion was neutralized (HCl 2 M) and filtered with a 0.2 μ m membrane. The filtrate volume was adjusted to 10 ml with deionized water. Then, 3 ml of 0.65 M of boric acid, 1 ml of I₂/KI (0.05 M/0.15 M), and 1 ml of deionized water were added into each 1 ml of the filtrate of the prepared sample. The absorbance of the resulting samples was measured at 640 nm in a spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Inc., USA). The measurements were interpolated in a previously prepared calibration curve (ranging from 6 to 60 μ g/ml; $r^2 = 0.999$).

2.7. Drug loading and entrapment efficiency

Approximately 5–10 mg of lyophilized NPs were digested in 3 ml of 1.3 M NaOH for 48 h; subsequently, the dispersion was neutralized with

2 M HCL. The volume was adjusted to 10 ml with Simulated Vaginal Fluid (SVF) pH = 4.2 containing Sodium Lauryl Sulfate (SLS, 0.5% w/v). The SVF was prepared according to Owen and Katz (1999). SLS was added to improve the solubility of Clotrimazole. The dispersion was maintained under magnetic stirring for 24 h and finally filtered through a 0.2 µm membrane. Clotrimazole content was quantified spectrophotometrically at 265 nm and interpolated in a calibration curve (range, 50–500 µg/ml; $r^2 = 0.999$).

Drug loading (DL) and entrapment efficiency (EE) were calculated according to Eqs. (1) and (2).

$$DL(\%) = \frac{\text{Amount of Clotrimazole in NPs}}{\text{Amount of NPs}} \times 100 \quad (1)$$

$$EE(\%) = \frac{DL(\%)}{(\text{Percentage of the initial Clotrimazole content})} \times 100 \times (1 - \text{fraction of residual PVAL}) \quad (2)$$

2.8. CTS quantification

Approximately 3–6 mg of lyophilized CLT-PLGA-CTS-NPs were dispersed in 10 ml of acetic solution (0.75% v/v, pH = 3.0). Nanoparticle dispersion was maintained under magnetic stirring for 48 h and then was filtered through a 0.2 µm membrane. Subsequently, 0.5 ml of filtrate was placed inside a test tube and 0.25 ml of ninhydrin reagent was added. This mixture was boiled for 10 min in a water bath. Then, 3 ml of 50:50 of ethanol-water mixture were added into the test tube. The amount of CTS desorbed from the NPs was determined spectrophotometrically at 572 nm and interpolated in a calibration curve (ranging from 10 to 70 µg/ml; $r^2 = 0.998$).

2.9. Fourier-Transform InfraRed (FTIR) spectroscopy analysis

FTIR measurements of CTS, Clotrimazole, PLGA-NPs, CLT-PLGA-NPs, and CLT-PLGA-CTS-NPs were recorded on a FTIR Spectrometer 100 (Perkin Elmer®, USA). Approximately 10 mg of each sample was scanned at a frequency of 400–4000 cm^{-1} at 25 °C.

2.10. In vitro release kinetic studies of Clotrimazole from CLT-PLGA-NPs and CLT-PLGA-CTS-NPs

A known amount of NPs (equivalent to 3 mg of Clotrimazole) was dispersed in 5 ml of SVF pH 4.2 with SLS 0.5% w/v and then placed in a dialysis bag (MW 6000–8000 Da). On the other hand, 5 ml of Clotrimazole solution (0.17 mg/ml) (CLT-SOL) were placed in a dialysis bag (MW 6000–8000 Da). Each of these bags were suspended in 30 ml of dissolution medium (SVF pH 4.2 with SLS 0.5% w/v) under sink conditions and maintained under magnetic stirring at 37 °C. At selected time intervals, 1 ml of the suspension was withdrawn and replaced with fresh medium. The absorbance of the samples was measured spectrophotometrically at 265 nm. Release experiments were carried out in triplicate. Clotrimazole solution was used for comparative purposes. Data were fitted to mathematical models (Fredenberg et al., 2011; Siepmann and Peppas, 2011).

2.11. Microbiological studies

Minimum inhibitory concentrations (MICs) of CLT-PLGA-NPs and CLT-PLGA-CTS-NPs vs. *C. albicans* were determined using a dilution method as described in Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) M27-A3 (Cantón et al., 2007). Five colonies ≥ 1 mm of a 24-h growth were taken with a loop of culture and suspended in sterile saline solution (0.9% w/v NaCl). Optical density was adjusted to 0.5 McFarland Turbidity Standard (1×10^6 – 5×10^6 yeasts per ml). This suspension was inoculated on a plate previously prepared with Sabouraud Dextrose Agar (SDA). Paper discs 6 mm in diameter were deposited

onto the plates. Then, 20 µl of solutions or dispersions of samples of each of the following systems: methanolic solutions of Clotrimazole (0–60 µg/ml); PLGA-NPs; CLT-PLGA-NPs, and CLT-PLGA-CTS-NPs (equivalent concentrations of Clotrimazole at 0–60 µg/ml) were added onto the discs. The plates were incubated at 37 °C for 24 h. Afterward, the inhibition zone was determined. Experiments were performed in triplicate.

2.12. Mucoadhesive properties of CLT-PLGA-CTS-NPs

The mucin particle method (das Neves et al., 2012; Takeuchi et al., 2005) was used in order to evaluate the mucoadhesive properties of CLT-PLGA-CTS-NPs. Mucin dispersions (0.1 and 1% w/v) were prepared in SVF pH = 4.2. The dispersions were maintained under incubation conditions of 37 °C and horizontal agitation at 150 rpm for 24 h. Subsequently, the dispersions were sonicated for 5 min (intensity of 40% and working frequency of 26 kHz) and centrifuged at 5000 rpm for 25 min. Supernatants were collected and particle size and Z potential were determined in triplicate. PLGA-NPs, CLT-PLGA-NPs, and CLT-PLGA-CTS-NPs systems (0.1% w/v) were added to previously prepared mucin dispersions. The nanoparticulate systems were maintained under the same conditions as those of mucin incubation for 2 h. Measurements of mean particle size and Z potential were determined in triplicate before and after being added to the mucin dispersions.

2.13. Establishment of porcine cell culture model from the cervix uteri

Porcine uterine cervixes were collected at a local slaughterhouse from healthy animals approximately 5 min after their death. The tissue was transported inside a Phosphate buffered saline (PBS) solution with 100 IU/ml Penicillin at 4 °C during 1 h (Miessen et al., 2012). The tissue was washed several times with PBS and penicillin (100 IU/ml Penicillin). The tissue was fragmented into 1 cm^2 pieces. Five pieces were placed in a Petri dish containing 20 ml of culture medium (Ham's F-10 solution supplemented with 10% Fetal bovine serum (FBS) and 100 IU/ml Penicillin). The samples were incubated at 37 °C and under 5% CO_2 concentration conditions. Changes of culture medium were performed every 72 h to remove cell dendrites. Following the third passage, the cells were disrupted and diluted; then, 1 ml of the sample was passed to a Petri dish with 20 ml of the same culture medium.

2.14. Cell viability

Cytometry was utilized to determine cell viability (Sigma® Life Science, 2014). The porcine cell culture model was employed to carry cell viability. Cell culture was dispersed and homogenized before use. Two hundred microliters of cell culture (equivalent to 7.5×10^5 cells) were taken and placed in 96-well plate. Fifty microliters of solutions or dispersions (CLT, CTS, PLGA-NPs, CLT-PLGA-NPs, and CLT-PLGA-CTS-NPs) in mucin dispersion 1% (w/v) were added to the plate. Five Clotrimazole concentration levels were prepared (1, 10, 50, 100, and 200 mg of Clotrimazole equivalent per ml of mucin dispersion at 1% w/v). Each sample was prepared in triplicate. The plate was maintained under incubation at 37 °C and 5% CO_2 during 24 h. Then, 80 µl of trypsin (0.05% w/v) solubilized in EDTA solution (0.004% w/v) was added. The plate was maintained under the same incubation conditions for 5 min. One hundred fifty microliters of Ham's F12 medium supplemented with Fetal bovine serum (FBS) 10% (v/v) were added. The samples were placed in 2 ml tubes and centrifuged at 900 rpm for 5 min. The supernatant was removed and 250 µl of PBS was added. The cell pellet was dispersed, 20 µl of the dispersion was taken, and 80 µl of trypan blue solution (0.4% w/v) was added. Ten microliters of this mixture were placed into a Neubauer chamber. The number of dead cells (blue-stained nuclei) and live cells (unstained nuclei) were counted and recorded in triplicate.

Cell viability and total number of cells were calculated according to

Table 1
 CLT-PLGA-CTS-NPs properties: mean size, polydispersity index (PDI), Z potential, drug loading (DL), residual-PVAL (R-PVAL), entrapment efficiency (EE), and adsorbed CTS.

| Lote | Mean size (nm) | PDI | Z potential (mV) | R-PVAL (%) | DL (%) | EE (%) | Adsorbed CTS (%) |
|------------------|-----------------------------|-----------------------------|----------------------------|-----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|
| CLT-PLGA-NPs | 391.40 | 0.020 | -0.80 | 1.70 | 86.50 | 87.40 | — |
| | 379.90 | 0.081 | -0.90 | 2.30 | 84.40 | 85.30 | — |
| | 377.30 | 0.123 | -0.80 | 1.60 | 84.80 | 85.60 | — |
| | $\bar{x} = 382.90 \pm 6.10$ | $\bar{x} = 0.07 \pm 0.04$ | $\bar{x} = -0.80 \pm 0.04$ | $\bar{x} = 1.90 \pm 0.30$ | $\bar{x} = 85.20 \pm 0.90$ | $\bar{x} = 86.10 \pm 0.90$ | — |
| CLT-PLGA-CTS-NPs | 494.60 | 0.16 | +20.60 | 1.60 | 69.50 | 70.30 | 15.50 |
| | 485.10 | 0.13 | +20.70 | 1.90 | 67.70 | 68.40 | 15.70 |
| | 495.50 | 0.23 | +20.30 | 1.30 | 67.50 | 68.10 | 15.30 |
| | | $\bar{x} = 491.70 \pm 4.70$ | $\bar{x} = 0.17 \pm 0.04$ | $\bar{x} = +20.50 \pm 0.20$ | $\bar{x} = 1.60 \pm 0.20$ | $\bar{x} = 68.20 \pm 0.90$ | $\bar{x} = 68.90 \pm 1.00$ |

\bar{x} = mean \pm standard deviation.

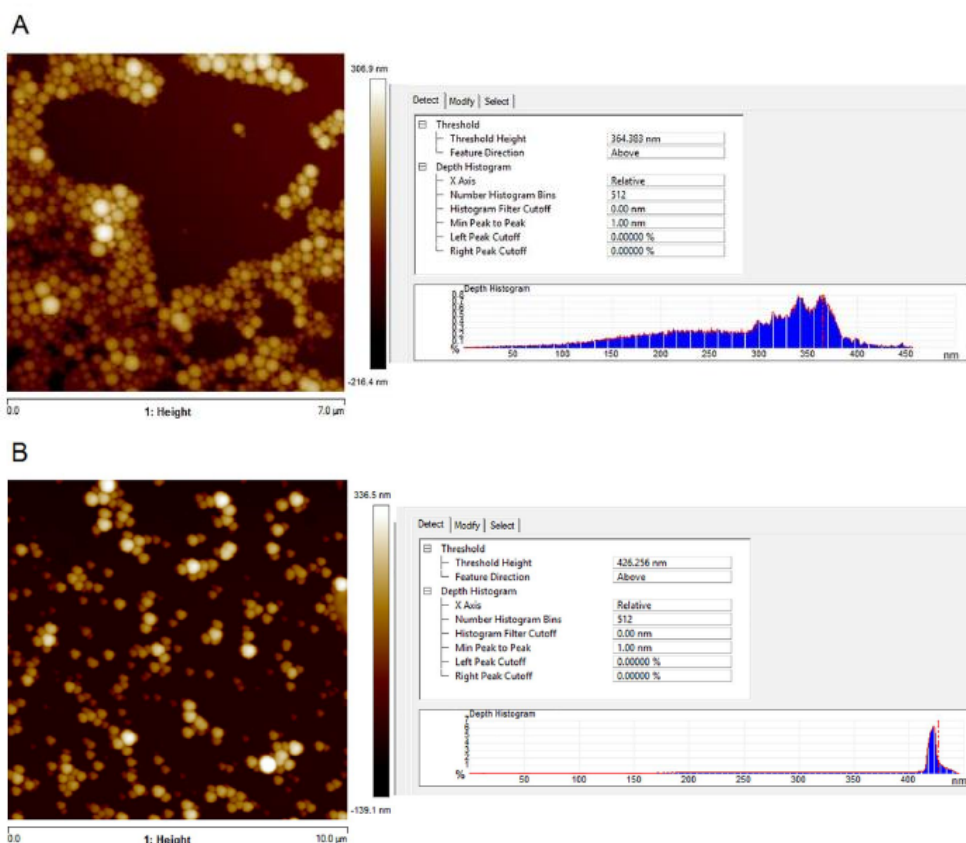


Fig. 1. AFM micrographs. (A) CLT-PLGA-NPs and (B) CLT-PLGA-CTS-NPs.

Eqs. (3) and (4):

$$\text{Cell viability (\%)} = \frac{\text{Total viable cells}}{\text{Total cells}} \times 100 \quad (3)$$

$$\text{Total cells} = [\text{The average count per square} \times \text{dilution factor} \times 10^4] \times 0.25\text{ml}. \quad (4)$$

3. Results and discussion

3.1. Particle size analysis and surface charge

The emulsification-diffusion method allowed the formation of PLGA- and CTS-PLGA-modified NPs with a low polydispersity index (range, 0.07–0.17). The average size of CLT-PLGA-NPs and CLT-PLGA-CTS-NPs were 382.9 and 491.7 nm, respectively (Table 1). This rise of the average size in CTS-PLGA-modified NPs indicates CTS adsorption onto NPs. This result is similar to that reported by Guo and Gemeinhart (2008), who studied the mechanism of CTS adsorption in PLGA-NPs and reported an increase in particle size as a function of CTS

concentrations ranging 0.12–2.4 g/l. These authors explained that increased particle size was due to the increased amount of adsorbed chitosan onto the PLGA-NPs surface.

The size and surface chemistry of NPs are important factors that determine their transport to the cervicovaginal mucus (das Neves and Sarmiento, 2015). Saltzman et al. (1994) found that particle sizes within the range of 100–1000 nm permit unhindered movement through the cervical mucus. Although Lai et al. (2007) suggested that NPs of up to least 500 nm could be distributed in the vaginal mucus. On the other hand, Meng et al. (2011) determined that there is no difference in mucoadhesion properties between sizes of 188 and 278 nm of Tenofovir-loaded CTS NPs, but vaginal mucoadhesion decreased to one half with 900 nm NPs. Therefore, the particle size obtained from CLT-PLGA-CTS-NPs confers great possibilities of being distributed in the vaginal mucus.

Z potential is another parameter able to indicate the adsorption of CTS onto the PLGA-NPs surface (Wang et al., 2013); values for CLT-PLGA-NPs and CLT-PLGA-CTS-NPs were -0.8 mV and $+20.5$ mV, respectively (Table 1). The positive value of the Z potential of CLT-PLGA-CTS-NPs was due to that the CTS amino groups under $\text{pH} < 5$ are protonated and acquired positive charges (Leane et al., 2004). Nanoparticle surface chemistry is one of the main factors that determine their diffusion behavior across vaginal mucus, due to the increase electrostatic interactions between NPs and mucin. The isoelectric point of mucin of around 2.3 thus acquires a negative charge at the vaginal pH (Lee et al., 2005). This physiological condition allows the use of CTS to modify the surface of PLGA-NPs in order to increase the interaction with mucin (da Silva et al., 2016; Pawar et al., 2013; Zhang et al., 2012).

3.2. CLT-PLGA-CTS-NPs morphology

The structural and morphological features of CLT-PLGA-CTS-NPs were analyzed with Atomic Force Microscopy (AFM) images (Fig. 1). CLT-PLGA-NPs exhibited a spherical shape and smooth surface; however, CLT-PLGA-CTS-NPs demonstrated less sphericity and smoothness, due to the CTS adsorbed onto the surface of the NPs. Furthermore, CLT-PLGA-CTS-NPs were observed as more dispersed and homogeneously distributed as individual NPs in contrast with the PLGA-NPs and CLT-PLGA-NPs, which were observed as more grouped. This could be explained by the Z potential values: the NPs adsorbed with CTS obtained a Z potential value of $+20.5$ mV, while CLT-PLGA-NPs had a Z potential of -0.8 mV.

3.3. Stabilizer quantification

Polyvinyl-alcohol (PVAL) is an emulsifier commonly used in the formulation of PLGA NPs because it prevents the latter from coalescence. According to Murakami et al. (1999), the strong PVAL adsorption onto PLGA surface is caused by the attachment between PVAL hydroxyl groups and PLGA acetyl groups through hydrophobic bonding. The development of this process is possible during organic-solvent removal and generates interpenetration of PVAL into the PLGA polymeric network. However, the formation of such a network causes a fraction of PVAL to remain associated with the NPs after washing. Residual PVAL is an important factor that influences the surface properties and the interaction between the cell surface and NPs (Sahoo et al., 2002). Values of residual PVAL of CLT-PLGA-NPs and CLT-PLGA-CTS-NPs were 1.6 and 1.9%, respectively (Table 1). These percentages are $< 2\%$, indicating that CTS adsorption onto CLT-PLGA-NPs does not influence PVAL removal; these data are consistent with those found by Pawar et al. (2013), who determined 3.2% residual PVAL for PLGA-CTS-modified NPs prepared by a modified double-emulsion solvent-evaporation technique. Piñón-Segundo et al. (2005) obtained values of 2–3% of residual PVAL for Triclosan-loaded PLGA-NPs prepared employing the emulsification-diffusion technique.

3.4. Drug loading and entrapment efficiency

Drug loading and encapsulation efficiency for CLT-PLGA-NPs were 85.2 and 86.1%, while that for CLT-PLGA-CTS-NPs were 68.2 and 68.9%, respectively (Table 1). These results reveal a decrease of encapsulation efficiency in CLT-PLGA-CTS-NPs. A similar diminution of encapsulation efficiency of poorly water-solubility drugs was observed in previous reports for CTS-PLGA-modified NPs. For example, Wang et al. (2013) observed that the encapsulation efficiency of 5-Fluorouracil decreased from 28% for PLGA-NPs to 20.5% for PLGA-CTS-NPs. These authors explained that during the fabrication process onto the PLGA-NPs surface, an interaction takes place between the positively charged CTS and the negatively charged drug. Parveen and Sahoo (2011) report that the entrapment efficiency (EE) of Paclitaxel decreased from 74.4 to 60.4% after adding CTS to modify PLGA-NPs. According to the authors, this decrease in efficiency is explained by the hydrophilic ability of CTS to hinder the entrapment of hydrophobic Paclitaxel during NPs preparation. For this study, it was proposed that the decrease of the encapsulation efficiency observed in CLT-PLGA-CTS-NPs was caused by a preliminary drug release during the adsorption of CTS onto NPs when CTS-modified PLGA-NPs were being prepared.

3.5. CTS quantification

A colorimetric method was utilized to quantify CTS by reacting ninhydrin and the primary amino groups of CTS to form a colored product, diketohydrindylidene-diketohydrindamine, denominated Ruhemann's purple (Leane et al., 2004). The percentage of CTS adsorbed onto CLT-PLGA-CTS-NPs was 15.5% (Table 1), which is similar to that observed by Belletti et al. (2012), who obtained 21–23% of CTS adsorbed onto Tenofovir-PLGA-CTS-NPs at $\text{pH} = 3$. However, Chakravarthi and Robinson (2011) reported an efficiency of 81% of CTS adsorption onto Paclitaxel-PLGA-NPs at $\text{pH} = 5.5$. Therefore, a higher pH value increases the amount of CTS adsorbed. If the pKa of lactic acid and oligomeric poly-lactic acid is 3.08, then that of glycolic acid is 3.83 (Williams and Martín, 2005) and the pKa of the primary amine group of CTS is 6.3–7.0 (Wang et al., 2006). Thus, at $\text{pH} = 5.5$, the carboxyl groups have a negative surface charge and CTS has a positive one. The electrostatic interaction between the negatively charged PLGA particles and the positively charged CTS is greater at $\text{pH} = 5.5$ than at $\text{pH} = 3.0$. Quemeneur et al. (2008) also found that pH determines the degree of CTS adsorption. These authors observed that CTS possesses a stronger affinity for zwitterionic membrane at $\text{pH} = 6.0$ than at $\text{pH} = 3.4$.

3.6. Fourier-Transform InfraRed (FTIR) spectroscopy analysis

FTIR analysis permits the evaluation of the interaction among the functional groups of different components of nanoparticle formulation (Mainardes et al., 2006). The Clotrimazole spectrum (Fig. 2b) demonstrates peaks within the range of $600\text{--}800\text{ cm}^{-1}$, indicating bending vibrations of the C–H of aromatic groups for the conjugated rings, 1564 cm^{-1} for N–O stretching, and 1266 cm^{-1} for C–O stretching. A similar spectrum for Clotrimazole was observed by Bilensoy et al. (2006). The PLGA spectrum (Fig. 2a) presents characteristic peaks at 1748.7 cm^{-1} and a range of $1087.2\text{--}1270\text{ cm}^{-1}$ associated with C=O and C–O stretching, respectively, these PLGA bands were reported by Kang et al. (2008). Therefore, the encapsulation of Clotrimazole is evident in the spectra of CLT-PLGA-NPs (Fig. 2e) and CLT-PLGA-CTS-NPs (Fig. 2f) within the range of $675\text{--}730\text{ cm}^{-1}$ and 1450 cm^{-1} , which indicate aromatic groups of Clotrimazole. The CTS spectrum (Fig. 2c) presents peaks at 3454 cm^{-1} , corresponding to OH and amine N–H symmetrical stretching vibrations. Similar peaks of the CTS spectrum were reported by Mourya et al. (2010) and Salehizadeh et al. (2012). CTS adsorption is observed in the spectrum of CLT-PLGA-CTS-NPs (Fig. 2f) at $3330\text{--}3350\text{ cm}^{-1}$, indicating primary amine groups of the CTS.

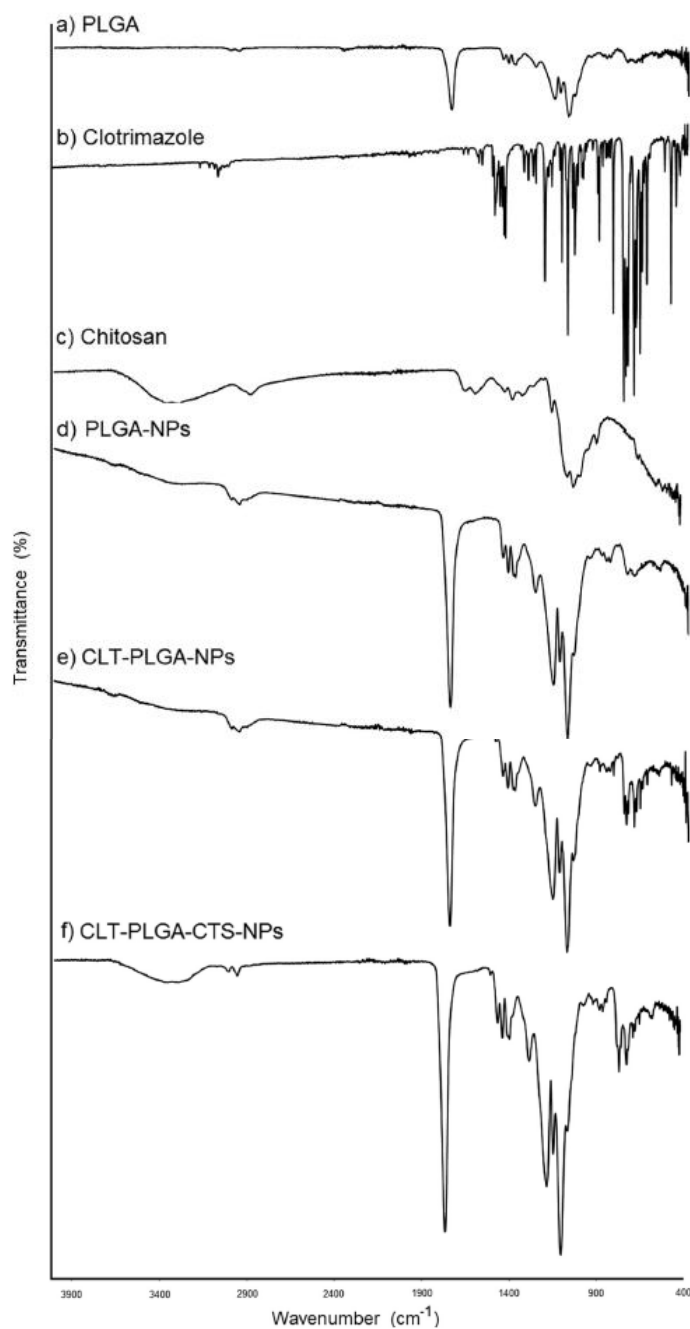


Fig. 2. FTIR measurement of PLGA, Clotrimazole, chitosan, PLGA-NPs, CLT-PLGA-NPs, and CLT-PLGA-CTS-NPs monitored from 400 to 4000 cm^{-1} .

3.7. *In vitro* release kinetic studies of Clotrimazole from CLT-PLGA-NPs and CLT-PLGA-CTS-NPs

The release profiles of CLT-PLGA-NPs and CLT-PLGA-CTS-NPs (Fig. 3) revealed similar behavior and offered a slower release than

drug solution. For the CLT-SOL profile, 80% of Clotrimazole was released within the first 8 h, following a first-order delivery ($r^2 = 0.982$). Despite the dialysis membrane could retain the drug; there was a remarkable difference between the release of free Clotrimazole and NPs, demonstrating that the release of Clotrimazole was not limited by the

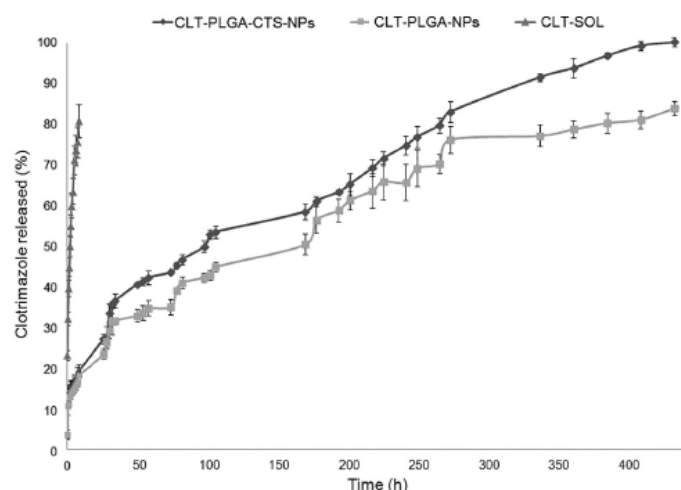


Fig. 3. *In vitro* release kinetic studies of Clotrimazole solution (CLT-SOL) and Clotrimazole from CLT-PLGA-NPs and CLT-PLGA-CTS-NPs (n = 3).

dialysis membrane. Additionally, Fig. 3 presents that graphs for Clotrimazole released from NPs exhibited bi-phasic profiles. The burst effects observed in the first hour (11% and 13% for CLT-PLGA-NPs and CLT-PLGA-CTS-NPs, respectively) could be attributed to non-encapsulated drug particles on the surface or drug molecules close to the surface, which was easily accessible by hydration (Fredenberg et al., 2011). During the first 30 h, 31% of Clotrimazole was released from CLT-PLGA-NPs and 35% from CLT-PLGA-CTS-NPs, exhibiting a zero-order delivery ($r^2 > 0.995$), due to the diffusion of drug molecules at the surface or in pores initially connected to the surface.

The rate of Clotrimazole release drastically decreased after 30 h. The maximal amount of Clotrimazole released at 432 h (18 days) was 83.15% from CLT-PLGA-NPs and 99.2% from CLT-PLGA-CTS-NPs. To elucidate the drug release mechanism, zero-order, first-order, Peppas, and Higuchi models were used to fit the release curves. According to the Peppas equation (Fredenberg et al., 2011; Siepmann and Peppas, 2011), the released fraction of a substance depends on a constant (K) and a diffusion coefficient (n), which describe its transport mechanism. The model indicates that for $n = 0.43$, the spherical systems follow a pure Fickian release, but when n values are between 0.43 and 0.85, an anomalous transport is showed. The values of n for CLT-PLGA-NPs and CLT-PLGA-CTS-NPs (32–432 h) were ≈ 0.43 (Table 2). Therefore, we are able to suggest that the Clotrimazole release mechanism of NPs is diffusional. In general, drug release from PLGA formulations is due to a chain of processes: water absorption; hydrolysis, and erosion. Water absorbed by PLGA chains, which generate their hydrolysis inside the PLGA matrix and create pores (Fredenberg et al., 2011). In our study, the rapid release of Clotrimazole from NPs in the first stage could be caused by faster diffusion due to the drug's being associated with the particle surface. In the second phase, PLGA erosion gradually increases the drug-transport rate and the release is described as diffusion controlled by means of the Clotrimazole movement across the polymer

matrix. In the second stage, the release rate was satisfactorily described by the Higuchi empirical model (M_t vs. $t^{1/2}$) (Fredenberg et al., 2011; Siepmann and Peppas, 2011; Piñón-Segundo et al., 2005).

Woodrow et al. (2009) reported the release of small-interfering RNA (siRNA) from PLGA NPs (100–300 nm) for 30 days, as well as their ability to penetrate and remain in the vaginal tissue for at least 14 days. The release of Clotrimazole controlled for 18 days by CLT-PLGA-CTS-NPs offers the opportunity for administration at a single dose and maintains the microbicidal effect during this period. However, we propose *in vivo* studies to evaluate the distribution of CLT-PLGA-CTS-NPs and to evaluate their penetration into the vaginal tissue. The release rate profiles of both batches of NPs reveal a statistically significant difference ($F_{crit} = 3.25 \times 10^{-10} < F_{cal} = 4.08$; $\alpha = 0.05$); these results indicate that CTS adsorbed onto CLT-PLGA-NPs increased the rate of Clotrimazole release more than those without CTS. Similar release behavior of CTS-modified PLGA-NPs has been previously reported (Chakravarthi and Robinson, 2011; Chen et al., 2016). Chakravarthi and Robinson (2011) observed a significant burst effect in Paclitaxel-PLGA-NPs, measuring 77% of the drug released within 6 h; however, with the CTS surface modified, the NPs-released drug was 87%. Chen et al. (2016) reported that 78% of Epirubicin was released from PLGA-NPs after 10 days; meanwhile, by using CTS-modified NPs, 84% of Epirubicin was released. Hydrophilic properties of CTS in the NPs allow a faster influx of water molecules and create a microporous matrix, which provides additional pathways for trapped-drug diffusion into the polymer matrix, resulting in faster drug release (Jain et al., 2010).

3.8. Microbiological studies

Minimum inhibitory concentration (MIC) values demonstrate an increment in antifungal activity inhibition against *Candida* spp. with CLT-NPs formulations compared to the methanolic solution of Clotrimazole (Table 3). Enhancement of the microbicidal activity of PLGA-NPs was also observed by Ravani et al. (2013). These authors observed an increase in the bactericide effect of Vancomycin-PLGA-nanoformulations against *Staphylococcus aureus* compared with the free drug. The MIC value obtained for CLT-PLGA-NPs and CLT-PLGA-CTS-NPs was 5 mg/ml. Although the MIC value is equal for both batches, there is a statistical difference ($F_{crit} = 3.96 < F_{cal} = 4.30$; $\alpha = 0.05$) of antifungal activity between both lots ranged from 5 to 30 $\mu\text{g/ml}$ concentration levels. The antifungal activity of CLT-PLGA-NPs could be due to the convenient size of the NPs for promoting the phagocytosis

Table 2
Parameter values of Higuchi and Peppas models.

| Batch | Peppas ($\ln M_t / M_\infty = \ln K + n \ln t$) | | Higuchi ($M_t = k t^{1/2}$) | |
|------------------|---|----------------|-------------------------------|----------------|
| | n | r ² | K (mg/h ^{1/2}) | r ² |
| CLT-PLGA-NPs | 0.4311 | 0.976 | 0.1355 | 0.982 |
| CLT-PLGA-CTS-NPs | 0.4121 | 0.971 | 0.1365 | 0.980 |

Table 3
MIC determination for Clotrimazole, chitosan, and PLGA-NPs against *Candida albicans* (n = 3).

| Concentration (µg/ml) | Inhibition zone (mm) | | | | |
|-----------------------|----------------------------------|----------------------------|----------|--------------|------------------|
| | Clotrimazole methanolic solution | CTS (acetic solution 0.5%) | PLGA-NPs | CLT-PLGA-NPs | CLT-PLGA-CTS-NPs |
| 30 | 23 ± 0.08 | 7 ± 0.05 | 6 ± 0.00 | 20 ± 0.08 | 26 ± 0.09 |
| 20 | 19 ± 0.07 | 6 ± 0.05 | 6 ± 0.00 | 19 ± 0.08 | 24 ± 0.07 |
| 10 | 6 ± 0.05 | 5 ± 0.00 | 0 | 14 ± 0.07 | 20 ± 0.05 |
| 5 | 0 | 0 | 0 | 11 ± 0.07 | 15 ± 0.05 |
| 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| % C.V. | 3.70 | 0.50 | 0.80 | 2.80 | 3.30 |

C.V. = coefficient of variation.

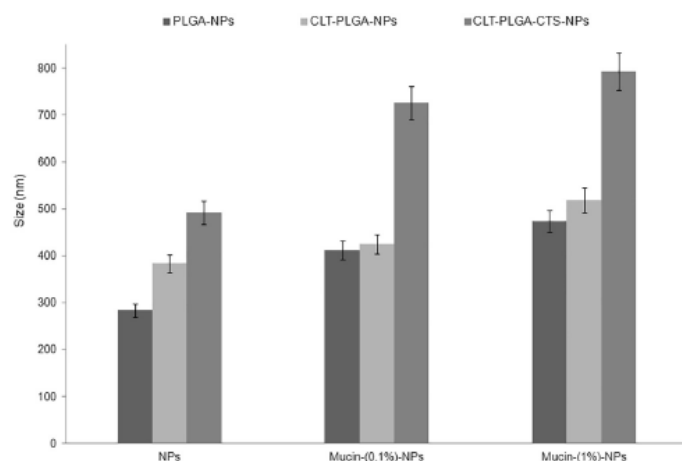


Fig. 4. Mean particle size of NPs and NPs in mucin dispersions (n = 3).

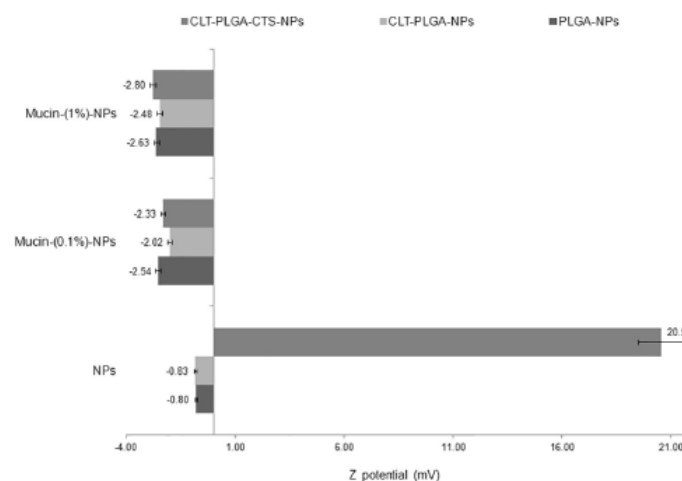


Fig. 5. Zeta potential values of NPs and NPs in mucin dispersions (n = 3).

process, therefore improving the cellular internalization of Clotrimazole. Prior et al. (2000) observed good antimicrobial activity of Gentamicin entrapped in PLA/PLGA NPs due to their suitable size for phagocytosis.

On the other hand, the increased antifungal effect of CLT-PLGA-CTS-NPs can be explained in part by the microbicide properties of chitosan. The cationic groups of this polymer could generate

interactions with negatively charged yeast cell walls. This interaction could result in further inhibition of bacterial growth. Furthermore, the solubility of chitosan in acetic acid plays an important role in its antibacterial activity (Chung et al., 2003). Li et al. (2008) reported that chitosan could bind with negative charged cell membranes, which would in turn lead to a decrease in the osmotic stability of the cell, followed by subsequent leakage of its intracellular constituents. In

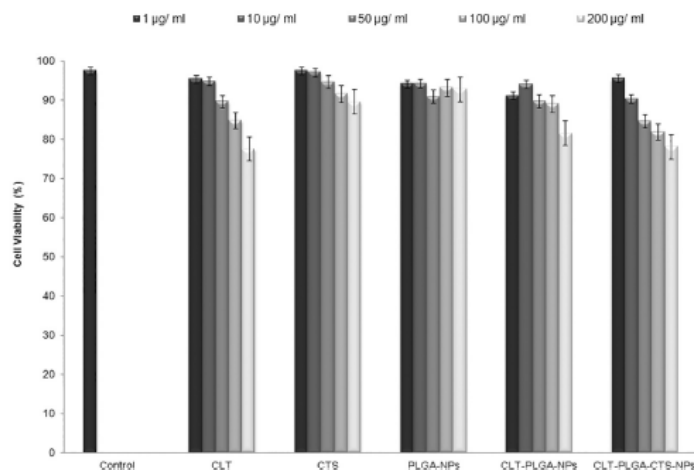


Fig. 6. Cell viability of vaginal epithelial cells depending on the variation of the concentrations of NPs and Clotrimazole ($n = 3$).

addition to the ability to adhere to the cell wall, chitosan could also inhibit the transcription of messenger RNA (mRNA) and protein synthesis by binding to bacterial DNA (Pelgrift and Friedman, 2013). In CLT-PLGA-CTS-NPs, the function of chitosan was to capture negatively charged bacteria on its surface in order to allow greater adhesion of CLT-PLGA-CTS-NPs to the cell wall and to cause further damage and inhibit the synthesis of ergosterol due to the Clotrimazole.

3.9. Mucoadhesive properties of CLT-PLGA-CTS-NPs

Mucoadhesion is a property of a system that determines its interaction with secreted mucus in a physiological system. The major components of mucus are proteins called mucins (Caramella et al., 2015; Sandri et al., 2012). According to Boddupalli et al. (2010), mucoadhesion of a polymer system is shown in the following phases: System contact with mucus (wetting and spreading) and consolidation (bonding mucin polymer chains by means of electrostatic interactions). Takeuchi et al. (2005) developed a method of assessing mucoadhesion with carbopol-CTS particles and its interaction with mucin. These authors determined the mucoadhesion of particles through variation of particle size and Z potential of mucin. Mucoadhesion evaluation in CLT-PLGA-CTS-NPs is of great importance to ensure the interaction of NPs with mucus plus vaginal retention and residence in the vaginal epithelium for increased antifungal effectiveness. Fig. 4 depicts a statistically significant difference ($F_{crit} = 5.32 < F_{cal} = 115.96$; $\alpha = 0.05$), increasing of particle size between CLT-PLGA-NPs and CLT-PLGA-CTS-NPs. A larger increase in particle size was observed with CLT-PLGA-CTS-NPs. The mucoadhesive properties of CTS are due to the formation of polyelectrolyte complexes with negatively charged mucins (Peppas and Huang, 2004). The higher increase in the hydrodynamic diameter of CLT-PLGA-CTS-NPs observed may be explained by electrostatic interactions between negatively charged mucin and positively charged surface of NPs due to amino groups of CTS. das Neves et al. (2012) also observed a significant increase of particle size when they studied the mucoadhesivity of Dapivirine-loaded polycaprolactone (PCL) NPs by the mucin particle method. In the same way, McGill and Smyth (2010) obtained an increase in size of polystyrene NPs and microparticles when they evaluated their interaction with mucin. These authors reported that interactions of NPs with mucin could be possible because nanometer sized particles present a large surface area so that contact with a greater number of binding areas with mucin polymeric strand is generated. This union could be for longer periods than in larger structures (Sosnik et al., 2014). The species that determine the electrostatic

properties of mucin are the following: glutamic and aspartic acids residues ($pK_a = 4$); sialic acid ($pK_a = 2.6$), and sulfate groups ($pK_a = 1.0$) (Lee et al., 2005). Therefore, mucin molecules are negatively charged in solutions with $pH > 2$. The interactions of mucoadhesive polymers with mucins could comprise (a) hydrogen-bonding, (b) hydrophobic interactions, (c) electrostatic interactions, and (d) lectin/sugar recognition (Peppas and Huang, 2004).

Fig. 5 illustrates a three-fold increase of Z potential NPs as a function of the increasing concentration of mucin. The interaction of mucin-NPs is more evident with CLT-PLGA-CTS-NPs due to a change in Z potential charge. Similar data behaviors in Z potential were also observed by Takeuchi et al. (2005) when the authors evaluated, by means of the mucin particle method, the mucoadhesive properties of CTS-coated liposomes. The change of Z potential demonstrates the binding between mucin and NPs, as well as a high affinity of mucin particles to cover the nanoparticle surface.

3.10. Cell viability

Cell viability studies are important for a pharmaceutical vaginal application system in order to determine the safety and low toxicity of the systems in the vaginal epithelium. The cellular behavior of bio-materials determines their biocompatibility (Zhu and Chan-Park, 2005). The porcine model of vaginal cells was suitable for cell viability studies. The results of Fig. 6 present the cell viability of all nanoparticulate systems of $> 75\%$. The results also reveal greater protection of the vaginal epithelium when Clotrimazole is encapsulated in the CLT-PLGA-NPs, as compared with the cellular toxicity of the free drug (100–200 $\mu\text{g/ml}$ range), with a significance level of 95%. A slight decrease in cell viability was observed in CLT-PLGA-CTS-NPs; this could be attributed to CTS. However, cell viability with CLT-PLGA-CTS-NPs remained at $> 80\%$ at concentrations $\leq 100 \mu\text{g/ml}$. Therefore, we are able to state that CTS is biocompatible with vaginal epithelial cells. da Silva et al. (2016) reported that CTS presented a good profile in terms of the cell viability of ARPE-19 and HCE-T cells on employing the Methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide conversion (MTT) assay. Andrade et al. (2011) reported that CTS presented non-toxicity, good cell membrane interaction, and cellular uptake without damage using MTT test. Subsequently, we consider CLT-PLGA-NPs and CLT-PLGA-CTS-NPs systems as biosafe in vaginal epithelium within the concentration range of 1–200 mg/ml .

4. Conclusion

In this study, PLGA-NPs were prepared with a CTS-modified surface for controlled release of Clotrimazole. A bi-phasic drug release profile was detected for CLT-PLGA-NPs and CLT-PLGA-CTS-NPs for 18 days. CTS adsorption onto CLT-PLGA-NPs surface enhances its microbicidal and bioadhesive properties. Microbiological testing indicate that Clotrimazole (at a level of 10 µg/ml) increase by four-fold its effectiveness against *C. albicans* when incorporated into PLGA-CTS-NPs. Mucoadhesive studies of CLT-PLGA-CTS-NPs indicated that the CTS-modified surface on CLT-PLGA-NPs increased twice in particle size and changed their Z potential values from positive to negative due to their interaction with mucin. CLT-PLGA-NPs have exhibited biocompatibility with vaginal epithelial cells and have permitted enhancement in the safety profile in terms of the free Clotrimazole (100–200 µg/ml). CLT-PLGA-NPs and CLT-PLGA-CTS-NPs entertain a high possibility of being an effective and safe formulation of vaginal administration and could comprise an alternative treatment for vaginal infections generated by *C. albicans*.

Acknowledgments

This work was supported by UNAM-DGAPA-PAPIIT IN221717 and IT203614; CONACYT CB 128799 and PIAP1 1641 (FES-Cuautitlán). Beatriz Martínez-Pérez acknowledges the financial support from CONACYT (206033) and appreciates the facilities provided by the Universidad Politécnica del Valle de México for carrying out some microbiological and cell culture studies.

References

Andrade, F., Antunes, F., Nascimento, A.V., da Silva, S.B., das Neves, J., Ferreira, D., Sarmento, B., 2011. Chitosan formulations as carriers for therapeutic proteins. *Curr. Drug Discov. Technol.* 8, 157–172. <http://dx.doi.org/10.2174/157016311796799035>.

Belletti, D., Tosì, G., Forni, F., Gamberini, M.C., Baraldi, C., Vandelli, M.A., Rouzi, B., 2012. Chemico-physical investigation of tenofovir loaded polymeric nanoparticles. *Int. J. Pharm.* 436, 753–763. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2012.07.070>.

Bilensoy, E., Abdur Rouf, M., Vural, I., Şen, M., Hincal, A.A., 2006. Mucoadhesive, thermosensitive, prolonged release vaginal gel for Clotrimazole: β -cyclodextrin complex. *AAFS PharmSciTech* 7 (2). <http://dx.doi.org/10.1208/pt070238>.

Boddupalli, B.M., Mohammed, Z.N.K., Nath, R.A., Banji, D.J., 2010. Mucoadhesive drug delivery system: an overview. *J. Adv. Pharm. Technol. Res.* 1, 381–387. <http://dx.doi.org/10.4103/0110-5558.76436>.

Cantón, L.E., Martín, M.E., Espinel-Ingroff, A., 2007. Métodos estandarizados por el CLSI para el estudio de la sensibilidad a los antifúngicos (documentos M27-A3, M38-A y M44-A). *Rev. Iberoam. Micol.* 15a-17. (ISBN: 978-84-611-8776-8). <http://www.guia.reviberoammicol.com/Capitulo15.pdf>, Accessed date: 20 February 2017.

Caramella, C.M., Rossi, S., Ferrari, F., Bonferoni, M.C., Sandri, G., 2015. Mucoadhesive and thermogelling systems for vaginal drug delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 92, 39–52. <http://dx.doi.org/10.1016/j.addr.2015.02.001>.

Cararath Tur, M., Comino, R., Davi, E., Marimon, E., Martínez, J.C., Palacios, S., Torres, J.M., 2013. La vulvovaginitis candidiásica recurrente. *Prog. Obstet. Ginecol.* 56, 108–116. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pog.2012.05.014>.

Chakravarthi, S.S., Robinson, D.H., 2011. Enhanced cellular association of paclitaxel delivered in chitosan-PLGA particles. *Int. J. Pharm.* 409, 111–120. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2011.02.034>.

Chen, H., Xie, L.Q., Qin, J., Jia, Y., Cai, X., Nan, W., Yang, W., Feng, L., Zhang, Q.Q., 2016. Surface modification of PLGA nanoparticles with biotinylated chitosan for the sustained *in vitro* release and the enhanced cytotoxicity of epirubicin. *Colloids Surf. B* 138, 1–9. <http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfb.2015.11.033>.

Chung, Y.C., Wang, H.L., Chen, Y.M., Li, S.L., 2003. Effect of abiotic factors on the antibacterial activity of chitosan against waterborne pathogens. *Bioresour. Technol.* 88, 179–184. [http://dx.doi.org/10.1016/S0960-8524\(03\)00002-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0960-8524(03)00002-6).

da Silva, S.B., Ferreira, D., Pintado, M., Sarmento, B., 2016. Chitosan-based nanoparticles for rosaromicin acid ocular delivery—*in vitro* tests. *Int. J. Biol. Macromol.* 84, 112–120. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.11.070>.

das Neves, J., Sarmento, B., 2015. Precise engineering of dapivirine-loaded nanoparticles for the development of anti-HIV vaginal microbicides. *Acta Biomater.* 18, 77–87. <http://dx.doi.org/10.1016/j.actbio.2015.02.007>.

das Neves, J., Rocha, C.M., Gonçalves, M.P., Carrier, R.L., Amiji, M., Bahia, M.F., Sarmento, B., 2012. Interactions of microbicide nanoparticles with a simulated vaginal fluid. *Mol. Pharm.* 9, 3347–3356. <http://dx.doi.org/10.1021/mp300408m>.

das Neves, J., Nunes, R., Machado, A., Sarmento, B., 2015. Polymer-based nanocarriers for vaginal drug delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 92, 53–70. <http://dx.doi.org/10.1016/j.addr.2014.12.004>.

Fredenberg, S., Wahlgren, M., Reslow, M., Axelsson, A., 2011. The mechanisms of drug release in poly(lactide-co-glycolic acid)-based drug delivery systems - a review. *Int. J. Pharm.* 415, 34–52. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2011.05.049>.

Guo, C., Gemeinhart, R., 2008. Understanding the adsorption mechanism of chitosan onto poly(lactide-co-glycolide) particles. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 70, 597–604. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejpb.2008.06.008>.

Hernández, B.J.A., Vázquez, A., Olguín, C., Dumet, P., Gutiérrez, M., De Zordo, D., 2008. Prevalencia de vaginitis mixta en mujeres latinoamericanas según la percepción de los médicos. Preferencia, efectividad e inocuidad de clindamicina más ketoconazol. *Ginecol. Obstet. Mex.* 76, 652–658.

Jain, G.K., Pathan, S.A., Akhter, S., Ahmad, N., Jain, N., Talegaonkar, S., Khar, R.K., Ahmad, F., 2010. Mechanistic study of hydrolytic erosion and drug release behaviour of PLGA nanoparticles: influence of chitosan. *Polym. Degrad. Stab.* 95, 2360–2366. <http://dx.doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2010.08.015>.

Kang, Y., Yin, G., Ouyang, P., Huang, Z., Yao, Y., Liao, X., Chen, A., Pu, X., 2008. Preparation of PLLA/PLGA microparticles using solution enhanced dispersion by supercritical fluids (SEDS). *J. Colloid Interface Sci.* 322, 87–94. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcis.2008.02.031>.

Kölling, W.M., McPherson, T.B., McJunkin, J.L., 2013. The use of extemporaneously compounded 1% tetracaine to improve adherence with clotrimazole 1% topical solution in the treatment of ear infection: a case report. *Am. J. Otolaryngol.* 34, 757–758. <http://dx.doi.org/10.1016/j.amjoto.2013.07.002>.

Lai, S.K., O'Hanlon, D.E., Harold, S., Man, S.T., Wang, Y.-Y., Cone, R., Hanes, J., 2007. Rapid transport of large polymeric nanoparticles in fresh undiluted human mucous. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 1482–1487. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0608611104>.

Leane, M.M., Nankervis, R., Smith, A., Illum, L., 2004. Use of the ninhydrin assay to measure the release of chitosan from oral solid dosage forms. *Int. J. Pharm.* 2004 (271), 241–249. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2003.11.023>.

Lee, S., Müller, M., Rezwan, K., Spencer, N.D., 2005. Porcine gastric mucin (PGM) as the water/poly(dimethylsiloxane) (PDMS) interface: influence of pH and ionic strength on its conformation, adsorption, and aqueous lubrication properties. *Langmuir* 21, 8344–8353. <http://dx.doi.org/10.1021/la050779w>.

Li, Q., Mahendra, S., Lyon, D.Y., Brunet, L., Liga, M.V., Li, D., Álvarez, P.J.J., 2008. Antimicrobial nanomaterials for water disinfection and microbial control: potential applications and implications. *Water Res.* 42, 4591–4602. <http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2008.08.015>.

Liu, M., Zhang, J., Shan, W., Huang, Y., 2015. Developments of mucus penetrating nanoparticles. *Asian J. Pharm. Sci.* 10, 275–282. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajps.2014.12.007>.

Machado, D., Castro, J., Palmeira-de-Oliveira, A., Martínez-de-Oliveira, J., Cerca, N., 2016. Bacterial vaginosis biofilms: challenges to current therapies and emerging solutions. *Front. Microbiol.* 6, 1528. <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2015.01528>.

Mainardes, R.M., Gremião, D.M.P., Evangelista, R.C., 2006. Thermoanalytical study of praziquantel-loaded PLGA nanoparticles. *Rev. Bras. Cienc. Farm.* 42, 523–530.

McGill, S., Smyth, H.D.C., 2010. Disruption of the mucus barrier by topically applied exogenous particles. *Mol. Pharm.* 7, 2280–2288. <http://dx.doi.org/10.1021/mp100242r>.

Meng, J., Sturgis, T.F., Youan, B.B., 2011. Engineering tenofovir loaded chitosan nanoparticles to maximize microbicidal mucoadhesion. *Eur. J. Pharm. Sci.* 44, 57–67. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejps.2011.06.007>.

Miessen, K., Einspainer, R., Shoen, J., 2012. Establishment and characterization of a differentiated epithelial cell culture model derived from the porcine cervix uteri. *BMC Vet. Res.* 8, 31. <http://dx.doi.org/10.1186/1746-6148-8-31>.

Mourya, V.K., Inamdar, N.N., Tiwari, A., 2010. Carboxymethyl chitosan and its applications. *Adv. Mater. Lett.* 1, 11–33. <http://dx.doi.org/10.5185/amlett.2010.3108>.

Murakami, H., Kobayashi, M., Takeuchi, H., Kawashima, Y., 1999. Preparation of poly(lactide-co-glycolide) nanoparticles by modified spontaneous emulsification solvent diffusion method. *Int. J. Pharm.* 187, 143–152. [http://dx.doi.org/10.1016/S0378-5173\(99\)00187-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0378-5173(99)00187-8).

Ndesendo, V.M.K., Pillay, V., Choonara, Y.E., Khan, R.A., Meyer, L., Buchmann, E., Rosin, U., 2009. *In vitro* and *ex vivo* bioadhesivity analysis of polymeric intravaginal caplets using physicmechanics and computational structural modeling. *Int. J. Pharm.* 370, 151–159. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2008.12.001>.

Owen, D.H., Katz, D.F., 1999. A vaginal fluid simulant. *Contraception* 59, 91–95. [http://dx.doi.org/10.1016/S0010-7824\(99\)0010-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0010-7824(99)0010-4).

Palmeira-de-Oliveira, R., Palmeira-de-Oliveira, A., Martínez-de-Oliveira, J., 2015. New strategies for local treatment of vaginal infections. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2015 (92), 105–122. <http://dx.doi.org/10.1016/j.addr.2015.06.008>.

Parveen, S., Sahoo, S.K., 2011. Long circulating chitosan/PEG blended PLGA nanoparticle for tumor drug delivery. *Eur. J. Pharmacol.* 670, 372–383. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejphar.2011.09.023>.

Pawar, D., Mangal, S., Goswami, R., Jaganathan, K.S., 2013. Development and characterization of surface modified PLGA nanoparticles for nasal vaccine delivery: effect of mucoadhesive coating on antigen uptake and immune adjuvant activity. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 85, 550–559. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejpb.2013.06.017>.

Pelgrift, R.Y., Friedman, A.J., 2013. Nanotechnology as a therapeutic tool to combat microbial resistance. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 65, 1803–1815. <http://dx.doi.org/10.1016/j.addr.2013.07.011>.

Peppas, N.A., Huang, Y., 2004. Nanoscale technology of mucoadhesive interactions. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 56, 1675–1687. <http://dx.doi.org/10.1016/j.addr.2004.03.001>.

Piñón-Segundo, E., Ganem-Quinanar, A., Alonso-Pérez, V., Quintanar-Guerrero, D., 2005. Preparation and characterization of trichloran nanoparticles for periodontal treatment. *Int. J. Pharm.* 294, 217–232. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2004.11.010>.

Prior, S., Gamazo, C., Trache, J.M., Merkle, H.P., Gander, B., 2000. Gentamicin encapsulation in PLA/PLGA microspheres in view of treating *Bruceella* infections. *Int. J.*

- Pham, 196, 115–125. [http://dx.doi.org/10.1016/S0378-5173\(99\)00448-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0378-5173(99)00448-2).
- Quemener, F., Rinaudo, M., Pépin-Donat, B., 2008. Influence of molecular weight and pH on adsorption of chitosan at the surface of large and giant vesicles. *Biomacromolecules* 9, 396–402. <http://dx.doi.org/10.1021/bm700943j>.
- Ravani, L., Esposito, E., Borjes, C., Lievin-Le, M., Loiseau, P., Djabourov, M., Cortesi, R., Bouchmal, K., 2013. Clotrimazole-loaded nanostructured lipid carrier hydrogels: thermal analysis and *in vitro* studies. *Int. J. Pharm.* 454, 695–702. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2013.06.015>.
- Rivera Sánchez, R., Flores-Paz, R., Arriaga Alba, M., 2006. Identificación de especies de *Candida* causantes de vaginitis en la población mexicana. *Enfem. Infecc. Microbiol. Clin.* 24, 634–636.
- Sahoo, S.K., Panyam, J., Pmbha, S., Labhasetwar, V., 2002. Residual polyvinyl alcohol associated with poly(D,L-lactide-co-glycolide) nanoparticles affects their physical properties and cellular uptake. *J. Control. Release* 82, 105–114. [http://dx.doi.org/10.1016/S0168-3659\(02\)00127-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0168-3659(02)00127-X).
- Salehizadeh, H., Hekmatian, E., Sadeghi, M., Kennedy, K., 2012. Synthesis and characterization of core-shell Fe₃O₄-gold-chitosan nanostructure. *J. Nanobiotechnol.* 10, 3. <http://dx.doi.org/10.1186/1477-3155-10-3>.
- Saltzman, W.M., Radomsky, M.L., Whaley, K.J., Cone, R.A., 1994. Antibody diffusion in human cervical mucus. *Biophys. J.* 66, 508–515.
- Sandri, G., Rossi, S., Bonferoni, M.C., Ferrari, F., Mori, M., Caramella, C., 2012. The role of chitosan as a mucoadhesive agent in mucosal drug delivery. *J. Drug Delivery Sci. Technol.* 22 (4), 275–284. [http://dx.doi.org/10.1016/S1773-2247\(12\)50046-8](http://dx.doi.org/10.1016/S1773-2247(12)50046-8).
- Sharma, S., Parmar, A., Kori, S., Sandhir, R., 2016. PLGA-based nanoparticles: a new paradigm in biomedical applications. *TrAC Trends Anal. Chem.* 80, 30–40. <http://dx.doi.org/10.1016/j.trac.2015.06.014>.
- Shuckla, S.K., Mishra, A.K., Arotiba, O.A., Mamba, B.B., 2013. Chitosan-based nanomaterials: a state-of-the-art review. *Int. J. Biol. Macromol.* 59, 46–58. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2013.04.043>.
- Siepmann, J., Peppas, N.A., 2011. Higuchi equation: derivation, applications, use and misuse. *Int. J. Pharm.* 418, 6–12.
- Sigma* Life Science, 2014. Cell culture manual. <http://www.sigmaldrich.com/ifb/life-science/ccm/cell-culture-manual.html>, Accessed date: 23 March 2017.
- Sosnik, A., das Neves, J., Sarmento, B., 2014. Mucoadhesive polymers in the design of nano-drug delivery systems for administration by non-parenteral routes: a review. *Prog. Polym. Sci.* 39, 2030–2075. <http://dx.doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2014.07.010>.
- Takeuchi, H., Thongborisute, J., Matsui, J., Sugihara, H., Yamamoto, H., Kawashima, Y., 2005. Novel mucoadhesion tests for polymers and polymer-coated particles to design optimal mucoadhesive drug delivery systems. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 57, 1583–1594. <http://dx.doi.org/10.1016/j.addr.2005.07.008>.
- Wang, Q.Z., Chen, X.G., Liu, N., Wang, S.X., Liu, C.S., Meng, X.H., Liu, C.G., 2006. Protonation constants of chitosan with different molecular weight and degree of deacetylation. *Carbohydr. Polym.* 65, 194–201. <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2006.01.001>.
- Wang, Y., Li, P., Kong, L., 2013. Chitosan-modified PLGA nanoparticles with versatile surface for improved. *AAPS PharmSciTech* 14, 585–592. <http://dx.doi.org/10.1208/s12249-013-9943-3>.
- Williams, S.F., Martin, D.P., 2005. Applications of polyhydroxyalkanoates (PHA) in medicine and pharmacy. *Biopolymers (Online)*. <https://doi.org/10.1002/352760035.bpol4004>.
- Woodrow, K.A., Cu, Y., Booth, C.J., Saucier-Sawyer, J.K., Wood, M.J., Saltzman, W.M., 2009. Intravaginal gene silencing using biodegradable polymer nanoparticles densely loaded with small-interfering RNA. *Nat. Mater.* 8, 526–533. <http://dx.doi.org/10.1038/nmat2444>.
- Young, G.L., Jewell, D., 2001. Topical treatment for vaginal candidiasis (thrush) in pregnancy. *Cochrane Database Syst. Rev.* 4, CD000225. <http://dx.doi.org/10.1002/14651858.CD000225>.
- Zhang, X., Sun, M., Zheng, A., Cao, D., Bi, Y., Sun, J., 2012. Preparation and characterization of insulin-loaded bioadhesive PLGA nanoparticles for oral administration. *Eur. J. Pharm. Sci.* 45, 632–638. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejps.2012.01.002>.
- Zhu, A.P., Chan-Park, M.B., 2005. Cell viability of chitosan-containing semi-interpenetrated hydrogels based on PCL-PEG-PCL diacrylate macromer. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* 16, 301–316. <http://dx.doi.org/10.1163/1568562053654149>.