



Películas mucoadhesivas de quitosano para la liberación sostenida de nistatina en la cavidad bucal

Chitosan mucoadhesive films as controlled release system of nystatin for buccal application

Efraín Armenta Rojas¹ , José Manuel Cornejo Bravo¹ , Aracely Serrano Medina² , Eduardo Alberto López Maldonado¹ , Amelia Olivas Sarabia³ , Nydia Alejandra Castillo Martínez⁴ , Ayla Carolina Vea Barragán¹ 

¹Facultad de Ciencias Químicas e Ingeniería, Universidad Autónoma de Baja California, Unidad Otay, Tijuana, Baja California, México

²Facultad de Medicina y Psicología, Universidad Autónoma de Baja California, Unidad Otay, Tijuana, Baja California, México

³Centro de Nanociencias y Nanotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Ensenada, Baja California, México

⁴Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad Autónoma de Baja California, Unidad Valle de las Palmas, Tijuana, Baja California, México

Autor de correspondencia: Dr. José Manuel Cornejo Bravo, Facultad de Ciencias Químicas e Ingeniería, Universidad Autónoma de Baja California, Unidad Otay, Tijuana, Baja California, México. E-mail: jmcornejo@uabc.edu.mx. ORCID: 0000-0002-0013-8937.

Recibido: 12 de Noviembre del 2020

Aceptado: 12 de Enero del 2021

Publicado: 15 de Enero del 2021

Resumen. – *La candidiasis de orofaringe es la enfermedad micótica más prevalente a nivel mundial. Las formulaciones del fármaco de elección para su tratamiento cuentan con un tiempo de residencia y biodisponibilidad bajos en el sitio de la infección. El objetivo de este trabajo fue preparar y caracterizar films con capacidad mucoadhesiva de quitosano y ácido poligalacturónico por la técnica “evaporación del disolvente” conteniendo nistatina como un sistema de liberación sostenida en la cavidad bucal. Las películas obtenidas fueron caracterizadas para determinar sus características morfológicas, capacidad de adherencia, grado de hinchamiento y perfil de liberación del fármaco. La morfología de los films fue determinada por microscopía electrónica de barrido y la interacción entre los polímeros fue determinada por espectroscopía infrarroja, análisis termogravimétrico y calorimetría de escaneo diferencial, adicionalmente se determinó su actividad antimicrobiana contra dos especies de Candida. Las películas obtenidas mostraron capacidad de mucoadhesión y una liberación sostenida del fármaco explicada por el modelo de Korsmeyer-Peppas, también mostraron una actividad antimicrobiana significativa. Estos hallazgos sugieren que las películas con base en quitosano son un posible sistema de liberación de nistatina para la cavidad bucal.*

Palabras clave: Quitosano, Acido Poligalacturónico, Polielectrolitos, Nistatina, Películas, Mucoadhesivos, Candidiasis Orofaringea, Liberación Sostenida.

Abstract. - *Oropharyngeal candidiasis is the most prevalent fungal disease in the world. The formulations of the drug of choice for its treatment have a low residence time and bioavailability at the site of infection. The aim of this study was to prepare and characterize mucoadhesive films of chitosan and polygalacturonic acid by the “Solvent-Casting” technique loaded with nystatin as a sustained release*



system for the oral cavity. The films obtained were characterized to determine their morphological characteristics, adhesion capacity, and degree of swelling and release profile of the drug. The morphology of the films was determined by scanning electron microscopy, the interaction between the polymers was determined by infrared spectroscopy, thermogravimetric analysis, and differential scanning calorimetry, additionally its antimicrobial activity against two Candida species was tested. The obtained films showed mucoadhesion capacity and a sustained release of the drug explained by the Korsmeyer-Peppas model, also a significant antimicrobial activity was found. These findings suggest that chitosan-based films are a possible nystatin release system for the oral cavity.

Keywords: Chitosan, Polygalacturonic acid, Polyelectrolytes, Mucoadhesive, Films, Nystatin, Oropharyngeal Candidiasis, Sustained release.

1. Introducción

De acuerdo a la Organización Mundial de la Salud (OMS), la candidiasis orofaríngea (CO) es la infección fúngica más prevalente del mundo [1]. La CO ocurre cuando la levadura causal se adhiere y penetra en el tejido oral [2]. A pesar de que se han aislado diversas especies de *Candida* como *C. dubliniensis*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. kefyr*, *C. parapsilosis*, *C. stellatoidea*, and *C. tropicalis* de pacientes con CO [3], más del 80% de los casos son causados por *Candida albicans* debido a sus características de mayor adherencia y patogenicidad [4].

Hay diversos factores que favorecen el desarrollo de CO tales como el uso de dentaduras, inhaladores de corticosteroides, xerostomía, inmunosupresión causada por el Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH); leucemia; desnutrición; diabetes; quimioterapia; radioterapia; el uso de corticosteroides sistémicos, medicamentos inmunomoduladores y antibióticos de amplio espectro [5]–[7].

El tratamiento de elección para la CO es la nistatina (NIS), un antifúngico obtenido de *Streptomyces noursei* que tiene tanto actividad fungistática como fungicida, de acuerdo a su concentración; se ha documentado que el uso de este fármaco disminuye o previene la adherencia de la levadura a las células epiteliales evitando la colonización y por lo tanto el riesgo de infección [8]. Sin embargo, la NIS no se absorbe en el

tracto gastrointestinal y es tóxica cuando es administrada de forma sistémica [9]. Por lo tanto, su uso es limitado a infecciones superficiales. La mayoría de los pacientes con CO son tratados con suspensiones, tabletas orales o trociscos que requieren ser administrados con una alta frecuencia debido al corto tiempo de residencia en la mucosa oral y por lo tanto baja biodisponibilidad que disminuye adicionalmente por la dilución con la saliva; otras desventajas incluyen el mal sabor, consistencia viscosa y baja solubilidad del fármaco en medio acuoso [10].

Para tratar de manera efectiva la CO, se requiere una formulación que contenga el fármaco y lo libere en el sitio de la infección, esto aunado a la creciente resistencia antimicrobiana que ha obligado a la búsqueda de estrategias para asegurar el mantenimiento de niveles óptimos del fármaco *in situ*. Una de las posibles soluciones a este problema es el desarrollo de sistemas bioadhesivos de liberación controlada a base de polímeros naturales [11].

Los polímeros naturales son derivados de fuentes renovables y están compuestos por cadenas de polisacáridos, proteínas, lípidos, polifenoles, entre otros [12]. Estos han sido considerado para desarrollar sistemas de liberación de fármacos debido a su disponibilidad, compatibilidad y capacidad de degradación en condiciones naturales y fisiológicas, permitiendo que sean utilizados para una aplicación bioadhesiva [13], [14].



El fenómeno de mucoadhesión ha sido desarrollado en décadas recientes, al ser incorporado a formas farmacéuticas se obtiene un aumento en el tiempo de residencia del medicamento en el sitio de absorción, prolongando la efectividad de fármaco. Una de las estrategias utilizadas para el desarrollo de estas formas farmacéuticas es el uso de complejos de polielectrolitos (CPE) [15], [16]. Estos complejos son redes de una estructura no permanente resultante de una disolución acuosa de dos polielectrolitos con carga opuesta, que puede dar lugar a una asociación espontánea al formar interacciones electrostáticas, fuertes pero reversible [17]. La formación y estabilidad de los complejos de polielectrolitos depende de diversos factores tales como el grado de ionización de cada polímero, la densidad de cargas, su distribución en la cadena polimérica, la concentración de los polielectrolitos en solución y la naturaleza de los grupos iónicos [18], [19].

El quitosano es el polímero principalmente utilizado para el desarrollo de estos complejos, es obtenido de la desacetilación de la quitina y existe con diferentes grados de desacetilación y pesos moleculares, los grupos catiónicos amino que posee pueden interactuar electrostáticamente con los grupos aniónicos de otros polielectrolitos para formar complejos de polielectrolitos. Algunos de los polianiones que pueden interactuar con el quitosano incluyen al ácido poligalacturónico, alginato de sodio, carragenina, carboximetilcelulosa entre otros [20]. Estos han sido utilizados recientemente para el desarrollo de sistemas de liberación de fármacos específicos de acuerdo a las propiedades requeridas por el sistema, tales como nanopartículas para liberación de fármacos anticancerígenos [21]. El objetivo de este estudio fue desarrollar y evaluar un sistema mucoadhesivo de un complejo de polielectrolitos basado en quitosano y ácido poligalacturónico, para la liberación

sostenida de nistatina en la cavidad oral que sea de aplicación cómoda, y mejore el tiempo de residencia y concentraciones del fármaco en el sitio de acción.

2. Metodología

2.1 Materiales

Quitosano de bajo peso molecular 75-85% desacetilado (Sigma-Aldrich), ácido poligalacturónico (Sigma-Aldrich), Nistatina +85% (Acros Organics BVBA), fosfato de potasio monobásico (Fermont), fosfato de potasio dibásico (Mallinckrodt), agar nutritivo (BBL); *Candida albicans* ATCC 14053, ATCC 90028 y *Candida krusei* obtenida de una muestra clínica, fueron suministrados por el Laboratorio de Análisis Microbiológico de la Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad Autónoma de Baja California. Todos los demás reactivos utilizados fueron de grado analítico o farmacéutico.

2.2 Preparación de películas de CPE cargadas con nistatina

Las películas de CPE se prepararon utilizando la técnica de evaporación del disolvente [22]. Se preparó una solución de quitosano (QUI) añadiendo lentamente 750mg del polímero a 15 mL de ácido acético al 0,1% en agitación constante hasta que se disolvió por completo; La misma cantidad de ácido poligalacturónico (APG) también se disolvió en 15 mL de agua destilada. El CPE se obtuvo mediante la adición gradual de la solución de APG a la solución de QUI con agitación continua, utilizando un homogeneizador a 5000 rpm durante 10 min. Para la obtención de las películas conteniendo nistatina (NIS) se añadió la solución del fármaco, preparada a partir de 25 mg del fármaco en 20 mL de etanol. La mezcla se vertió en placas de vidrio silanizado mediante el método



descrito por Seed [23], niveladas horizontalmente (10 x 10 cm), secándose en un horno a 40°C durante 48h. Las películas secas fueron cuidadosamente retiradas de las placas y verificadas visualmente en busca de imperfecciones o burbujas de aire. Las películas fueron almacenadas a temperatura ambiente.

2.3 Estudios de hinchamiento

El grado de hinchamiento de las películas CPE fue evaluado gravimétricamente. Se obtuvieron secciones de 2x2cm de las películas placebo y de NIS. 3 cuadrados de cada película se pesaron individualmente y se les permitió hincharse en una solución buffer de fosfatos pH 6,75 a 37 °C. El peso de las películas se determinó en diferentes intervalos de tiempo (0.25, 0.5, 1, 2, 3, 5 y 6 h). La captación de agua se calculó utilizando la siguiente ecuación:

$$Q = \frac{P_t - P_0}{P_0} \quad (1)$$

donde Q es la capacidad de absorción de agua de la película, P_t es el peso de la muestra hinchado después del tiempo t y P_0 es el peso original. Las mediciones se llevaron a cabo por triplicado y se determinó la media y desviación estándar de los grados de hinchamiento.

2.4 Contenido de fármaco

Se tomaron secciones de la película de 2x2cm de diferentes áreas. Los cortes se disolvieron en 100 ml de pH 6,75 tampón de fosfato. Las soluciones obtenidas se analizaron para el contenido de NIS espectrofotométricamente a una longitud de onda predeterminada (406nm) y la concentración del fármaco se calculó en función de la curva de calibración adecuada construida en el mismo buffer.

2.5 Espectroscopia FT-IR

Se obtuvieron los espectros FT-IR (FT-IR Nicolet™ iS™ 5, 650–4000 cm⁻¹) de QUI, APG, sus mezclas físicas y de las películas obtenidas.

2.6 Calorimetría diferencial de barrido y análisis termogravimétrico

Se realizaron estudios de calorimetría diferencial de barrido (DSC) y análisis termogravimétrico (TGA) (SDT Q600, TA Instruments, EE. UU.) para confirmar la formación de los CPE. Se realizaron estudios para las películas placebo, películas cargadas con el fármaco, la mezcla física de los polímeros en estado sólido y el fármaco. Las muestras (1,5-3 mg) se colocaron en celdas de aluminio y se calentaron a una velocidad de 10 °C/min en un rango de temperatura de 26 a 600 °C, en una atmósfera de nitrógeno.

2.7 Características morfológicas de las películas utilizando microscopía electrónica de barrido

Las características superficiales de las películas de placebo y conteniendo fármaco se estudiaron utilizando un microscopio electrónico de barrido (SEM) (JIB-4500, Jeol, Japón). Las muestras fueron montadas utilizando cinta adhesiva de doble cara y luego cubiertas con una capa de oro [24].

2.8 Estudios de liberación in vitro de NIS de las películas

Las películas fueron masadas y cortadas en cuadrados de 2x2cm, el experimento se hizo por triplicado, cada cuadrado fue masado y colocado en un vaso de precipitados de 500 mL que contenía 400 mL de tampón de fosfatos pH 6.75, previamente calentado a 37 °C. En diferentes intervalos de tiempo (5 min, 10min, 15min, 0.5,



1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 20 y 24 h) se tomó una muestra de 5mL del medio de liberación y se reemplazó por un volumen igual de solución tampón fresco. Las muestras fueron probadas para el contenido de NIS espectrofotométricamente como se describió anteriormente.

2.9 Determinación in vitro de la actividad antibacteriana

Se probó la actividad antibacteriana de las películas placebo y conteniendo NIS utilizando placas de Agar Müller-Hinton adicionado con 2% de glucosa y 0.5mg/ml de azul de metileno [25] inoculado con *Candida albicans* y *Candida krusei* de la siguiente manera: se utilizaron tres círculos de 7mm de diámetro para cada formulación que fueron transferidos a la superficie de una placa de agar inoculado y fueron incubados a 37 °C. Se midieron los diámetros de la zona de inhibición a las 24h. Se calcularon las medias de las zonas de inhibición y su desviación estándar.

2.10 Propiedades de adhesión de las películas

La determinación de las propiedades mucoadhesivas se realizó mediante un texturómetro (CT3, Brookfield, Canadá). La adherencia de cada película se obtuvo midiendo la fuerza necesaria para separar cada formulación de un disco de mucosa intestinal de conejo recién extirpada. Un fragmento de cada película (2x2cm) se adhirió al extremo de una sonda cilíndrica con ayuda de cinta adhesiva doble y se colocaron discos de mucosa de conejo previamente hidratadas por 5 min en solución amortiguadora de fosfatos pH 6.75 directamente debajo utilizando el accesorio adecuado.

El tiempo de contacto entre las películas y la mucosa fue de 1s y luego la sonda se retiró a una velocidad de 1.0 mm/s.

La fuerza necesaria para separar la película de la superficie de la mucosa se encontró a través del análisis de la fuerza máxima (F; N) y el trabajo de adhesión (Tad; (N-mm) se calculó a partir del área bajo la curva [26].

2.11 Análisis estadístico

Todos los experimentos se realizaron por triplicado. Los resultados se expresan como media \pm DE. Las pruebas se llevaron a cabo utilizando el software Graphpad Prism 8 para determinar la significancia estadística de los estudios se consideró un $P < 0,05$.

3 Resultados y Discusiones

3.1 Caracterización de las películas de CPE

Características físicas de las películas CPE: apariencia y textura

A la inspección visual, las películas placebo de QUI/APG, muestran una coloración amarilla, superficie irregular y textura rígida y quebradiza (Figura 1a), mientras que las películas de la misma formulación conteniendo NIS muestran una superficie aparentemente más heterogénea y un color más intenso (Figura 1b).

Resultados similares han sido publicados por diversos autores [27]–[29], la resistencia o fragilidad de las películas se debe a la proporción de polielectrolito libre que no formó parte del CPE [30]. Es deseable que las películas para aplicación bucal cuenten con cierta flexibilidad para adaptarse al relieve y estructuras de la boca sin romperse o agrietarse, ya que esto modificaría la liberación del fármaco, en este caso, a pesar de la rigidez en seco que muestran las películas obtenidos; al ser hidratadas con solución amortiguadora de fosfatos, adquieren la flexibilidad necesaria para adaptarse al relieve de



la mucosa bucal, lo cual coincide con las características deseables de estas formulaciones.

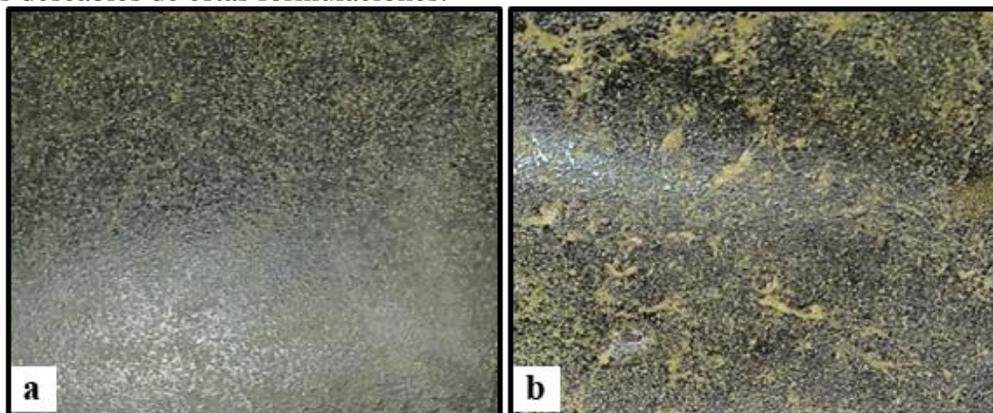


Figura 1. Características macroscópicas de las películas CPE. **a.** Película QUI-APG Placebo **b.** Película QUI-APG cargado con NIS

Características morfológicas utilizando SEM

La morfología de todas las películas CPE se evaluó utilizando microfografías SEM, de superficie y de sección transversal que se muestran en la Fig.2. Las películas mostraron una superficie irregular de características globulares y una sección transversal de espesor variable (Figura 2c), con la adición del fármaco se

observaron en la superficie de la película cristales de NIS (Figura 2b). El espesor de las películas está relacionado con la cantidad de fármaco contenido y la capacidad de hinchamiento. Siendo esta última uno de los aspectos fundamentales que determina las propiedades adhesivas del material [31].

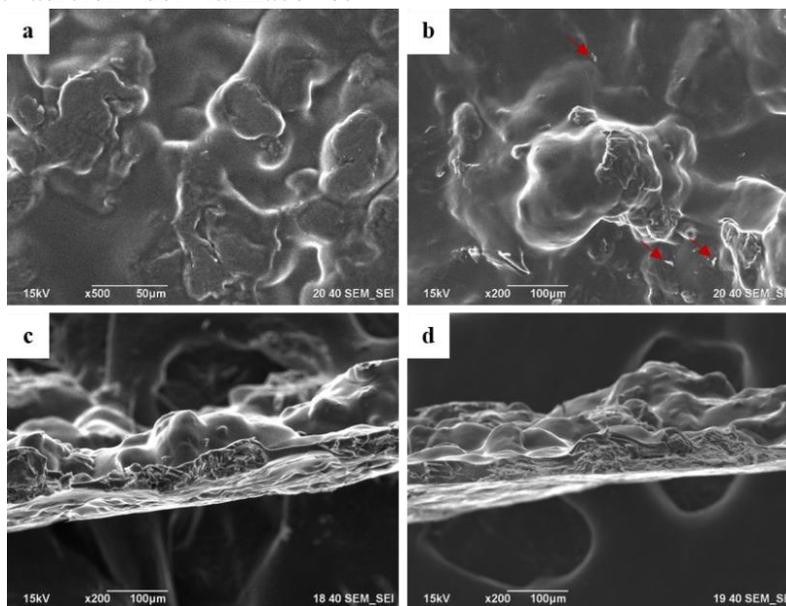


Figura 2. Micrografías electrónicas de las películas CPE. **a.** Superficie de película QUI-APG Placebo **b.** Superficie película QUI-APG cargado con NIS. **c.** Corte transversal película QUI-APG Placebo **d.** Corte transversal película QUI-APG cargado con NIS. Las flechas indican cristales de fármaco precipitado.



Contenido de fármaco y grado de hinchamiento de las películas CPE

Ambas películas mantuvieron su integridad durante el período del experimento y mostraron una gran capacidad de absorción de agua. El contenido de fármaco de las películas fue de $0.1476 \pm 0.029 \text{ mg/cm}^2$. La captación de agua de las películas fue rápida durante las primeras 2 h seguida de una segunda fase de liberación más lenta (Figura 3). Esto podría explicarse por la resistencia de la estructura de la red polimérica al

movimiento de moléculas de agua [32]. Se ha reportado que la interacción entre un polication y un polianión causa un endurecimiento de la red, lo que resultaría en una menor capacidad de hinchamiento [33].

La formulación placebo mostró una captación de agua mayor y más rápida que la formulación conteniendo NIS, esto debido a que el fármaco presenta características de muy baja solubilidad en agua (0.36 mg/L) [34] e interfiere con la absorción de agua del CPE.

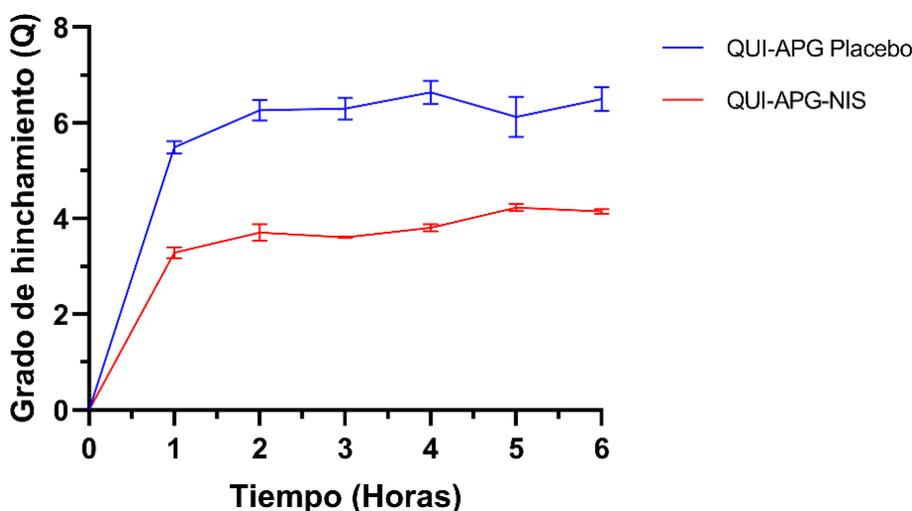


Figura 3. Grado de hinchamiento de las películas sintetizadas.

Espectroscopia FT-IR

En la Figura 4 se observan los principales picos de NIS debido a las vibraciones esqueléticas. La banda que se encuentra en 1701.1 cm^{-1} está relacionada con el estiramiento de las vibraciones de la unión C-O de un grupo de éster, la banda ancha a 3353 cm^{-1} está relacionada con la superposición de los grupos -OH y -NH [35]. Los picos de QUI situados alrededor de 1644 cm^{-1} , 1577 cm^{-1} estaban relacionados con la amida I, y las bandas de amida II del grupo N-H respectivamente [36] y el pico a 1730 cm^{-1} correspondía a la vibración de los grupos

carboxílicos no ionizados C-O del APG (Figura 4).

Por otro lado, se observa una superposición de que las bandas de QUI a 1644 cm^{-1} y 1579.99 cm^{-1} después de la formación del complejo de polielectrolitos. En el caso de APG la banda a 1730 cm^{-1} se desplazó a 1541 cm^{-1} . Los cambios en la longitud de onda y la amplitud en las bandas pueden explicarse por vibraciones asimétricas y simétricas de deformación N-H en aminas protonadas, vibraciones de estiramiento asimétricas en bandas de amida I y amida II e iones carboxilatos después de la formación del



CPE [37]. Los cambios de pico correspondientes a los grupos -COOH indican la formación del complejo. Según la literatura [38], los picos pertenecientes al estiramiento C-O asimétrico se pueden cambiar a un valor más alto en presencia

de iones divalentes. La banda a 1419 cm^{-1} también cambió a un valor más alto, indicando una interacción entre los polímeros.

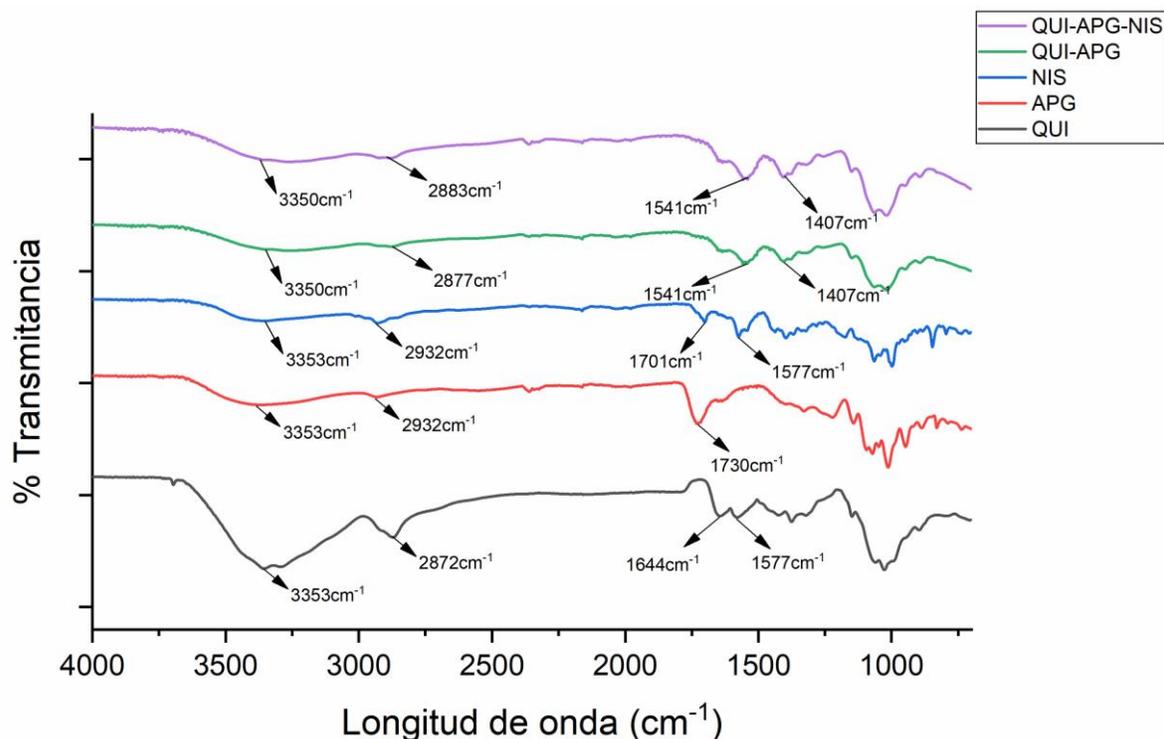


Figura 4. a. Espectros FT-IR de QUI, APG, NIS, QUI-APG y QUI-APG-NIS, b. Espectros de QUI, GA, NIS, QUI-GA y QUI-GA-NIS.

Análisis termogravimétrico (TGA)

La Figura 5 muestra los termogramas de QUI, APG, su mezcla física (en estado sólido) y las películas obtenidas. La temperatura de degradación de QUI fue de $299.6\text{ }^{\circ}\text{C}$, mientras que la de APG fue de $240\text{ }^{\circ}\text{C}$. La mezcla de ambos mostró dos temperaturas, una a $229\text{ }^{\circ}\text{C}$ y

otra a $288\text{ }^{\circ}\text{C}$. La película mostró temperaturas de degradación en $231\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $284\text{ }^{\circ}\text{C}$, sin embargo, la temperatura de $284\text{ }^{\circ}\text{C}$ correspondiente a la degradación del QUI se observó como un pico considerablemente reducido, lo que demuestra la dispersión del polímero y la formación del CPE con el APG.

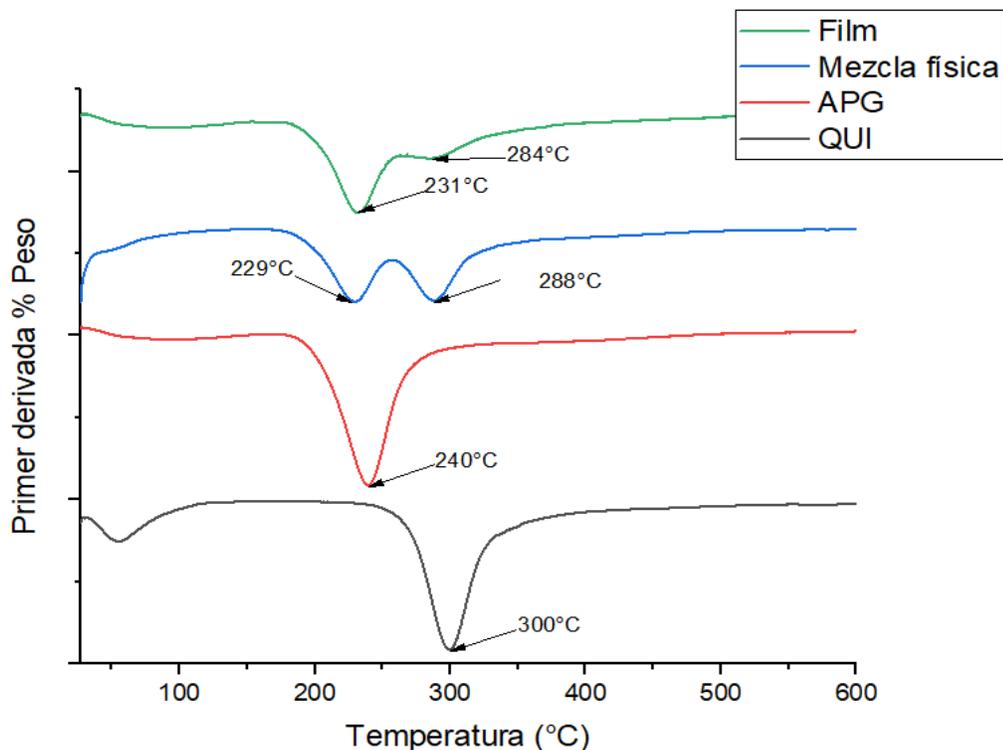


Figura 5. Termograma de TGA de QUI, APG, Mezcla física y película.

Calorimetría de escaneo diferencial (DSC)

En la Figura 6. Se muestra el comportamiento térmico de los sistemas estudiados. Todos presentaron un evento endotérmico gradual entre los 50 y 100°C que indica la evaporación de agua presente en la muestra; se observaron picos endotérmicos a 296 y 247°C del QUI y APG respectivamente, esto corresponde a la temperatura de fusión de los materiales y a su vez

demuestra la naturaleza semi-cristalina de los polímeros [39]. La mezcla física de los polímeros y de la película mostraron picos similares a 232, 285 °C para la mezcla y 235, 280°C para la película, sin embargo, los picos endotérmicos de la película se observan considerablemente menos intensos que los de la mezcla física, lo que indica la pérdida de la organización de la estructura al formarse el CPE.

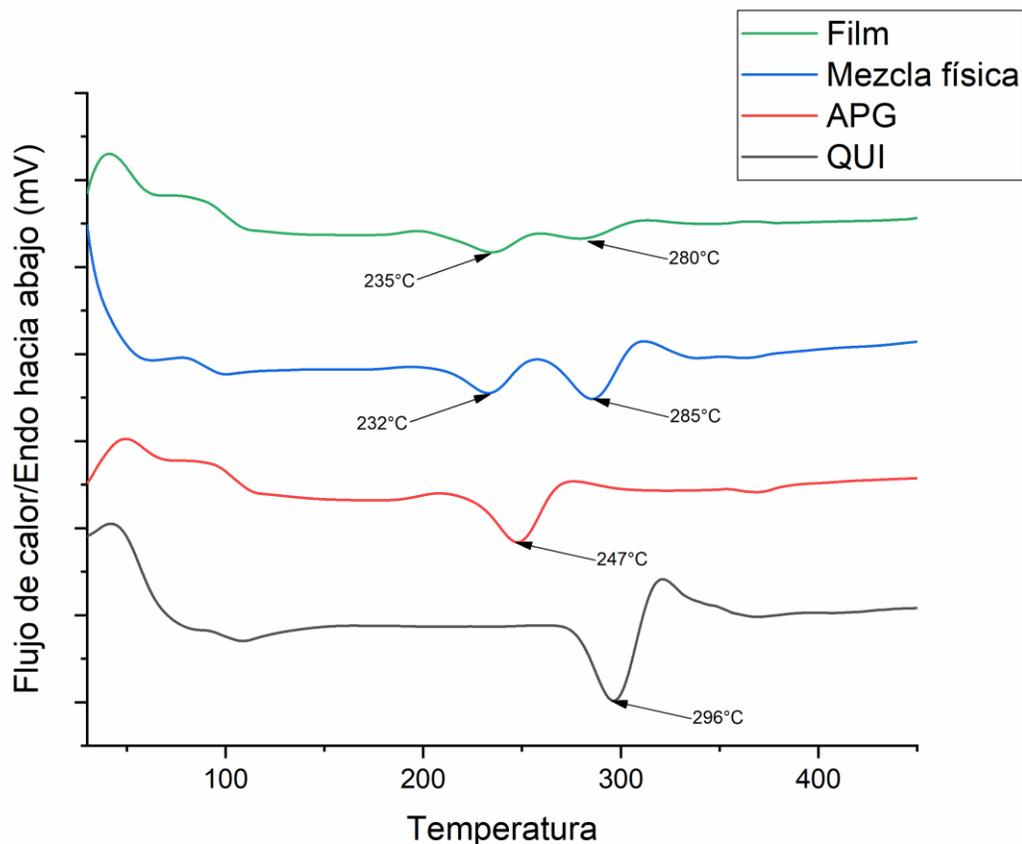


Figura 6. Termograma de DSC de QUI, APG, Mezcla física y película.

Estudios de liberación in vitro de NIS de las películas

Se observó una liberación inicial rápida de NIS (Figura 7). Las micrografías electrónicas de barrido confirmaron que el fármaco está disperso en la superficie de la película de CPE y esto podría dar cuenta de la liberación inicial. Pasado este primer paso se observa un perfil de liberación moderado, que puede ser beneficioso en la aplicación bucal, ya que una tasa de liberación más alta en la etapa inicial de

lanzamiento podría alcanzar un nivel terapéutico inmediato del fármaco seguido de una tasa de liberación más lenta para mantener la concentración por encima del mínimo inhibitorio. Este comportamiento se ha reportado en la liberación de tetraciclina para aplicación periodontal [30]. Los autores atribuyen esto a la rápida disolución en agua del fármaco de la superficie de la película. La formulación liberó cerca del 55% de la NIS a la segunda hora llegando a liberar 84% en 24 horas.

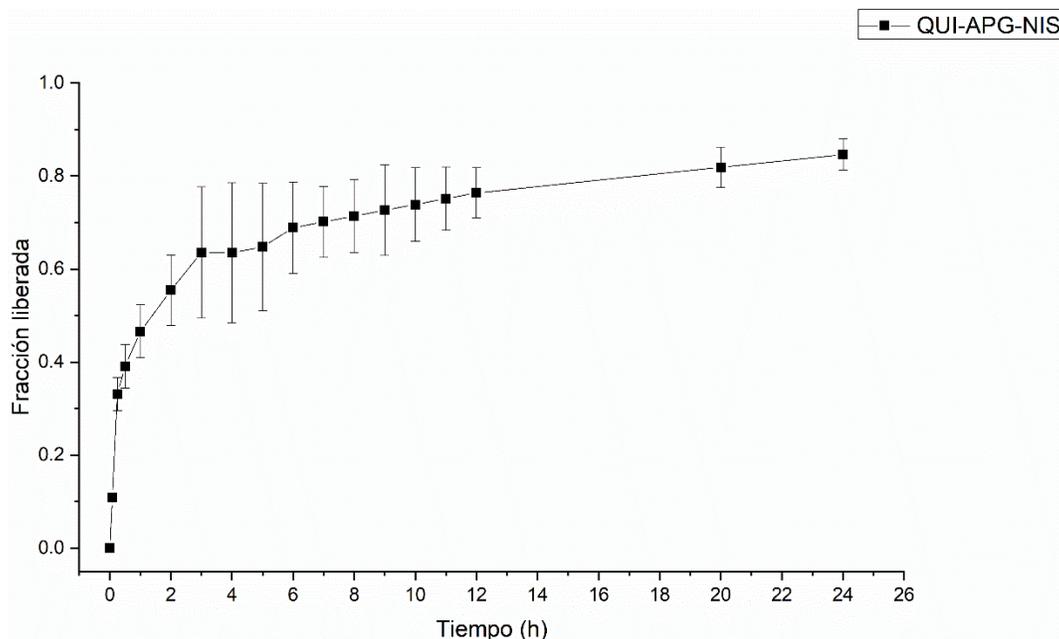


Figura 6. Perfil de liberación In-Vitro de QUI-APG-NIS.

Análisis cinético de los datos de liberación

Los datos obtenidos de los perfiles de liberación de fármacos se probaron con los modelos de Higuchi y Korsmeyer-Peppas y se compararon con algunos parámetros del modelo cinético, como la constante de velocidad de liberación (k), el coeficiente de determinación (R^2), el exponente de liberación (n), la suma residual de cuadrado (SRC) (Tabla 1). Un R^2 más alto y SRC más pequeño indica un mejor ajuste de los datos de liberación en el modelo.

Tabla 1. Coeficiente de determinación (R^2) y coeficientes obtenidos después de la regresión de los datos de liberación utilizando modelos matemáticos Higuchi y Korsmeyer-Peppas

Modelo		QUI-APG-NIS
Higuchi	K	0.2325
	R^2 Ajustado	0.5143
	SRC	0.4671
Korsmeyer-Peppas	K	0.4491
	n	0.2166
	R^2 Ajustado	0.9608
	SRC	0.0354

El modelo de Higuchi describe una proporcionalidad directa entre la fracción acumulada de fármaco con respecto al tiempo en un estado pseudoestacionario, por lo que la liberación del fármaco definida como la transferencia de masa del sistema de liberación al medio es una curva exponencial [40]. Por su parte el modelo Korsmeyer-Peppas se basa en la ley de Fick, y es útil cuando el mecanismo de liberación es controlado por la relajación de las cadenas de polímeros [41]. Según este modelo, el valor de n identifica el mecanismo específico de liberación. Los valores más pequeños por debajo de 0.5 pueden deberse a la difusión de fármacos parcialmente a través de una matriz hinchada y poros hidratados, como lo observado en esta formulación. Este modelo se aplica a menudo para el análisis del perfil de liberación de fármacos en sistemas poliméricos. De acuerdo al R^2 y la SRC, el modelo Korsmeyer-Peppas mostró un mejor ajuste que el de Higuchi, esto indica que la liberación de NIS depende de la hidrofiliidad de los polielectrolitos y no es



controlada únicamente por la difusión del fármaco hacia el medio.

Determinación *in vitro* de la actividad antimicrobiana

La actividad antimicrobiana *in vitro* de las películas formulados se observó tras un período de 24 horas (Tabla 2). Las películas placebo no mostraron zonas de inhibición contra ninguna cepa mientras que las películas conteniendo NIS mostraron inhibición con diámetros entre 9 y 12mm.

Tabla 2. Pruebas de inhibición de películas de QUI-APG y QUI-APG-NIS.

Cepa	Diámetro de Inhibición (mm)	
	QUI-APG	QUI-APG-NIS
<i>C. albicans</i> ATCC 14053	0	12±2
<i>C. albicans</i> ATCC 90028	0	10±1
<i>C. Krusei</i>	0	9±2

La actividad antibacteriana de QUI ha sido descrita por otros autores [42]–[44] como resultado de su naturaleza catiónica. Aunque sólo se ha propuesto un mecanismo; la interacción electrostática entre los sitios R-N (CH₃)₃⁺ cargados positivamente en CHI y las membranas celulares microbianas cargadas negativamente, se prevé que sea responsable de la lisis celular y se asume como el principal mecanismo antimicrobiano [45], [46].

Propiedades de adhesión de las películas

Las propiedades mucoadhesivas de las películas se probaron utilizando mucosa intestinal de conejo recién extirpada, a la inspección visual se observó, que las películas poseen una gran capacidad mucoadhesiva en el modelo probado (Figura 7).

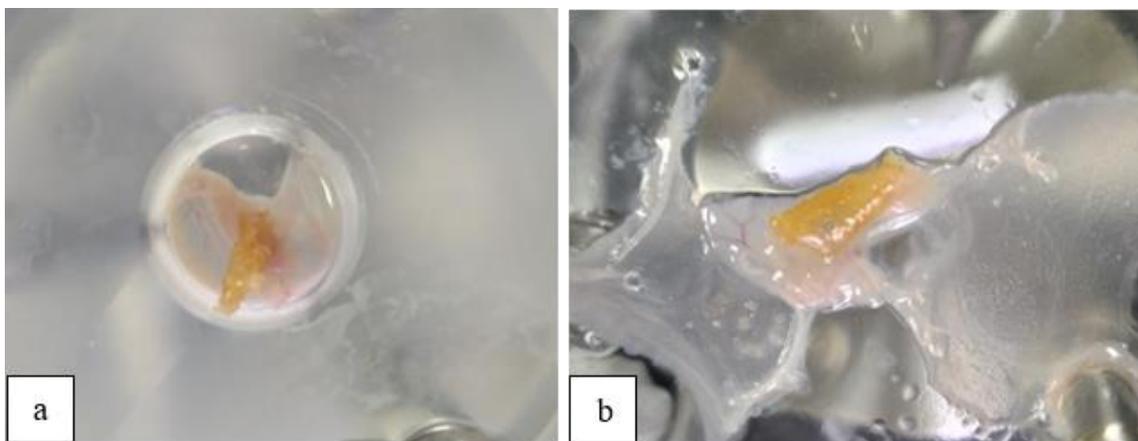


Figura 7. Películas de QUI-APG (a) y QUI-APG-NIS (b) adheridas a mucosa de intestino delgado de conejo.

A pesar de que la formulación placebo mostró resultados ligeramente superiores en Fuerza Máxima y Trabajo de Adhesión que la

formulación conteniendo NIS, no se encontró una diferencia significativa en ambos parámetros (Tabla 3, Figura 8).



Tabla 3. Pruebas de mucoadhesión de QUI-APG y QUI-APG-NIS.

Formulación	QUI-APG	QUI-APG-NIS	p
Fuerza Máxima (N)	3.78 ± 0.0351	3.66 ± 0.0416	0.8315
Trabajo de adhesión (mJ)	142.7 ± 74.44	140.3 ± 39.43	0.4381

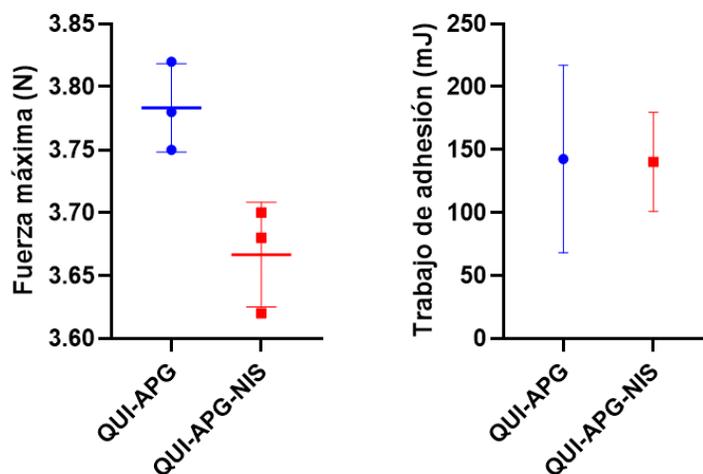


Figura 8. Fuerza máxima y Trabajo de adhesión de QUI-APG y QUI-APG-NIS.

La capacidad mucoadhesiva de las formulaciones puede atribuirse a la carga positiva de QUI obtenida de grupos amino que podrían interactuar con las cargas negativas de ácido siálico y los residuos de sulfato de mucina [47], la captación de agua por la película permite que los polímeros tengan una mayor movilidad que facilita su difusión hacia la capa mucosa; este fenómeno es uno de los mecanismos descritos responsables de la mucoadhesión [48]. En general, un mayor grado de hinchamiento se relaciona con una mejor adhesión ya que esto lleva a una rápida expulsión de agua por parte del tejido mucoso y la apertura de las cadenas del polímero para su difusión [49], por lo tanto la reducción en la capacidad de mucoadhesión de las películas conteniendo NIS podría deberse a la adición del fármaco a la formulación, ya que esto disminuye su grado de hinchamiento.

4. Conclusiones

En el presente trabajo se desarrolló y caracterizó un sistema en forma de película para liberación de nistatina con características de mucoadhesión y liberación sostenida a base de quitosano y ácido poligalacturónico.

Se evidenció la formación del complejo de polielectrolitos mediante FT-IR y DSC-TGA.

Las películas obtenidos mostraron una cinética de liberación sostenida explicada por el modelo de Korsmeyer-Peppas, con una liberación inicial rápida de fármaco seguido de una liberación más lenta que podría ser beneficiosa en la aplicación bucal, ya que es similar a la administración de una dosis de carga que alcance rápidamente concentraciones adecuadas del fármaco para después mantenerse por la liberación sostenida, por lo que este sistema



podría ser utilizado con otros fármacos de aplicación similar.

Únicamente la formulación que contenía nistatina mostró actividad antimicrobiana en las tres cepas de *Cándida* utilizadas, por lo que no se encontró un efecto antimicrobiano contra estas especies de *Cándida* en la formulación placebo. La formulación mostró una buena capacidad de mucoadhesión que no fue modificada por la adición del fármaco.

El realizar trabajos futuros con diversos fármacos antimicrobianos podría aumentar las posibles aplicaciones de este sistema de liberación.

5. Referencias

[1] WHO, "Antimicrobial resistance. Global report on surveillance," *World Heal. Organ.*, vol. 61, no. 3, pp. 383-394, 2014, <https://doi.org/10.1007/s13312-014-0374-3>

[2] J. C. Carmello et al., "Treatment of Oral Candidiasis Using Photodithazine®- Mediated Photodynamic Therapy In Vivo," *PLoS One*, vol. 11, no. 6, p. e0156947, Jun. 2016, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0156947>

[3] J. W. Hellstein and C. L. Marek, "Candidiasis: Red and White Manifestations in the Oral Cavity," *Head Neck Pathol.*, vol. 13, no. 1, pp. 25-32, 2019, <https://doi.org/10.1007/s12105-019-01004-6>

[4] J. W. Millsop and N. Fazel, "Oral candidiasis," *Clin. Dermatol.*, vol. 34, no. 4, pp. 487-494, 2016, <https://doi.org/10.1016/j.clindermatol.2016.02.022>

[5] A. A. Bedair, A. M. G. Darwazeh, and M. M. Al-Aboosi, "Oral *Candida* colonization and candidiasis in patients with psoriasis," *Oral Surg.*

Agradecimientos.

Agradecimientos especiales al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo provisto al Estudiante Becario en la realización de este trabajo, así como al Laboratorio de Análisis Microbiológico de la Facultad de Ciencias Químicas e Ingeniería y al departamento de Microbiología de la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad Autónoma de Baja California por las facilidades otorgadas para la realización de este proyecto.

Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol., vol. 114, no. 5, pp. 610-615, Nov. 2012, <https://doi.org/10.1016/j.oooo.2012.05.011>

[6] T. Vila, A. S. Sultan, D. Montelongo-Jauregui, and M. A. Jabra-Rizk, "Oral Candidiasis: A Disease of Opportunity," *J. Fungi*, vol. 6, no. 1, p. 15, Jan. 2020, <https://doi.org/10.3390/jof6010015>

[7] M. A. Jabra-Rizk et al., "Candida albicans Pathogenesis: Fitting within the Host-Microbe Damage Response Framework," *Infect. Immun.*, vol. 84, no. 10, pp. 2724-2739, Oct. 2016, <https://doi.org/10.1128/IAI.00469-16>

[8] A. M. Flattery, G. K. Abruzzo, C. J. Gill, J. G. Smith, and K. Bartizal, "New model of oropharyngeal and gastrointestinal colonization by *Candida albicans* in CD4+ T-cell-deficient mice for evaluation of antifungal agents.," *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 40, no. 7, pp. 1604 LP - 1609, Jul. 1996, <https://doi.org/10.1128/AAC.40.7.1604>

[9] C. P. Reis, L. V. Roque, M. Baptista, and P. Rijo, "Innovative formulation of nystatin particulate systems in toothpaste for candidiasis treatment," *Pharm. Dev. Technol.*, vol. 21, no. 3,



pp. 282-287, Apr. 2016,

<https://doi.org/10.3109/10837450.2014.999783>

[10] E. Scheibler, M. C. R. Garcia, R. Medina da Silva, M. A. Figueiredo, F. G. Salum, and K. Cherubini, "Use of nystatin and chlorhexidine in oral medicine: Properties, indications and pitfalls with focus on geriatric patients," *Gerodontology*, vol. 34, no. 3, pp. 291-298, Sep. 2017,

<https://doi.org/10.1111/ger.12278>

[11] V. Hearnden et al., "New developments and opportunities in oral mucosal drug delivery for local and systemic disease," *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 64, no. 1, pp. 16-28, 2012,

<https://doi.org/10.1016/j.addr.2011.02.008>

[12] A. George, P. A. Shah, and P. S. Shrivastav, "Natural biodegradable polymers-based nano-formulations for drug delivery: A review," *Int. J. Pharm.*, vol. 561, pp. 244-264, Apr. 2019,

<https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2019.03.011>

[13] A. C. K. Bierhalz, M. A. Da Silva, and T. G. Kieckbusch, "Natamycin release from alginate/pectin films for food packaging applications," *J. Food Eng.*, vol. 110, no. 1, pp. 18-25, 2012,

<https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2011.12.016>

[14] N. Inamdar, S. Edalat, and V. B. Kotwal, "EDITORIAL New year, new beginning REVIEW ARTICLES Herbal drugs in milieu of modern drugs Psidium guajava L: A review," *Int. J. Green Pharm.*, vol. 58, no. March 2008, 2014.

<https://doi.org/10.4103/0973-8258.39154>

[15] M. U. Adikwu, Y. Yoshikawa, and K. Takada, "Bioadhesive Delivery of Metformin Using Prosopis Gum with Antidiabetic Potential," *Biol. Pharm. Bull.*, vol. 26, no. 5, pp. 662-666, 2003,

<https://doi.org/10.1248/bpb.26.662>

[16] I. I. Rodríguez, I.C.; Cerezo, A.; Salem, "Sistemas de liberación Bioadhesivos Bioadhesive delivery systems," *Ars Pharm.*, pp. 115-128, 2000.

[17] N. Inamdar and V. K. Mourya, "Chitosan and anionic polymers - complex formation and applications," no. January 2011. 2010.

[18] N. Bhattarai, J. Gunn, and M. Zhang, "Chitosan-based hydrogels for controlled, localized drug delivery," *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 62, no. 1, pp. 83-99, 2010,

<https://doi.org/10.1016/j.addr.2009.07.019>

[19] M. George and T. E. Abraham, "Polyionic hydrocolloids for the intestinal delivery of protein drugs: Alginate and chitosan - a review," *J. Control. Release*, vol. 114, no. 1, pp. 1-14, 2006,

<https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2006.04.017>

[20] J. H. Hamman, "Chitosan based polyelectrolyte complexes as potential carrier materials in drug delivery systems," *Mar. Drugs*, vol. 8, no. 4, pp. 1305-1322, 2010,

<https://doi.org/10.3390/md8041305>

[21] P. R. Sarika and N. R. James, "Polyelectrolyte complex nanoparticles from cationised gelatin and sodium alginate for curcumin delivery," *Carbohydr. Polym.*, vol. 148, pp. 354-361, 2016,

<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.04.073>

[22] M. Kilicarslan, M. Ilhan, O. Inal, and K. Orhan, "Preparation and evaluation of clindamycin phosphate loaded chitosan/alginate polyelectrolyte complex film as mucoadhesive drug delivery system for periodontal therapy," *Eur. J. Pharm. Sci.*, vol. 123, no. August, pp. 441-451, 2018,

<https://doi.org/10.1016/j.ejps.2018.08.007>



- [23] B. Seed, "Silanizing Glassware," in *Current Protocols in Immunology*, Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2001.
<https://doi.org/10.1002/0471142735.ima03ks21>
- [24] L. Wang, E. Khor, and L.-Y. Lim, "Chitosan-alginate-CaCl₂ system for membrane coat application," *J. Pharm. Sci.*, vol. 90, no. 8, pp. 1134-1142, Aug. 2001,
<https://doi.org/10.1002/jps.1067>
- [25] C. R. Sims, V. L. Paetznick, J. R. Rodriguez, E. Chen, and L. Ostrosky-Zeichner, "Correlation between Microdilution, E-test, and Disk Diffusion Methods for Antifungal Susceptibility Testing of Posaconazole against Candida spp," *J. Clin. Microbiol.*, vol. 44, no. 6, pp. 2105 LP - 2108, Jun. 2006,
<https://doi.org/10.1128/JCM.02591-05>
- [26] G. Tejada, G. N. Piccirilli, M. Sortino, C. J. Salomón, M. C. Lamas, and D. Leonardi, "Formulation and in-vitro efficacy of antifungal mucoadhesive polymeric matrices for the delivery of miconazole nitrate," *Mater. Sci. Eng. C*, 2017,
<https://doi.org/10.1016/j.msec.2017.05.034>
- [27] A. Kaur and G. Kaur, "Mucoadhesive buccal patches based on interpolymer complexes of chitosan-pectin for delivery of carvedilol," *Saudi Pharm. J.*, vol. 20, no. 1, pp. 21-27, 2012,
<https://doi.org/10.1016/j.jsps.2011.04.005>
- [28] J. M. Castro-Ruiz, "Diseño de un sistema bioadhesivo de clorhexidina empleando pullulan como matriz para uso en mucosa oral," *Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm.*, vol. 45, no. 1, pp. 35-36, 2014,
<https://doi.org/10.15446/rcciquifa.v45n1.58016>
- [29] A. Abruzzo et al., "Chitosan/alginate complexes for vaginal delivery of chlorhexidine digluconate," *Carbohydr. Polym.*, vol. 91, no. 2, pp. 651-658, 2013,
<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.08.074>
- [30] A. A. Kassem, F. A. Ismail, V. F. Naggar, and E. Aboulmagd, "Preparation and evaluation of periodontal films based on polyelectrolyte complex formation," *Pharm. Dev. Technol.*, vol. 20, no. 3, pp. 297-305, 2015,
<https://doi.org/10.3109/10837450.2013.862262>
- [31] I. G. Needleman and F. C. Smales, "In vitro assessment of bioadhesion for periodontal and buccal drug delivery," *Biomaterials*, vol. 16, no. 8, pp. 617-624, 1995,
[https://doi.org/10.1016/0142-9612\(95\)93859-C](https://doi.org/10.1016/0142-9612(95)93859-C)
- [32] S. P. PANOMSUK, T. HATANAKA, T. AIBA, K. KATAYAMA, and T. KOIZUMI, "A Study of the Hydrophilic Cellulose Matrix : Effect of Drugs on Swelling Properties," *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo).*, vol. 44, no. 5, pp. 1039-1042, 1996,
<https://doi.org/10.1248/cpb.44.1039>
- [33] G. S. Macleod, J. H. Collett, and J. T. Fell, "The potential use of mixed films of pectin, chitosan and HPMC for bimodal drug release," *J. Control. Release*, vol. 58, no. 3, pp. 303-310, Apr. 1999,
[https://doi.org/10.1016/S0168-3659\(98\)00168-0](https://doi.org/10.1016/S0168-3659(98)00168-0)
- [34] S. H. Yalkowsky, Y. He, and P. Jain, *Handbook of Aqueous Solubility Data*. CRC Press, 2016.
<https://doi.org/10.1201/EBK1439802458>
- [35] G. Mohammadi, E. Namadi, A. Mikaeili, P. Mohammadi, and K. Adibkia, "Preparation, physicochemical characterization and anti-fungal evaluation of the Nystatin-loaded Eudragit RS100/PLGA nanoparticles," *J. Drug Deliv. Sci. Technol.*, 2017,
<https://doi.org/10.1016/j.jddst.2017.02.004>



- [36] J. Yang, L. Xiong, M. Li, and Q. Sun, "Chitosan-Sodium Phytate Films with a Strong Water Barrier and Antimicrobial Properties Produced via One-Step-Consecutive-Stripping and Layer-by-Layer-Casting Technologies.," *J. Agric. Food Chem.*, vol. 66, no. 24, pp. 6104-6115, Jun. 2018,
<https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b01890>
- [37] M. Gierszewska, J. Ostrowska-Czubenko, and E. Chrzanowska, "pH-responsive chitosan/alginate polyelectrolyte complex membranes reinforced by tripolyphosphate," *Eur. Polym. J.*, vol. 101, no. November 2017, pp. 282-290, 2018,
<https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2018.02.031>
- [38] J. Mirtič, J. Ilaš, and J. Kristl, "Influence of different classes of crosslinkers on alginate polyelectrolyte nanoparticle formation, thermodynamics and characteristics," *Carbohydr. Polym.*, vol. 181, pp. 93-102, Feb. 2018,
<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.10.040>
- [39] Y. B. Sutar and V. N. Telvekar, "Chitosan based copolymer-drug conjugate and its protein targeted polyelectrolyte complex nanoparticles to enhance the efficiency and specificity of low potency anticancer agent," *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 92, no. January, pp. 393-406, 2018,
<https://doi.org/10.1016/j.msec.2018.07.001>
- [40] D. R. Paul, "Elaborations on the Higuchi model for drug delivery," *Int. J. Pharm.*, vol. 418, no. 1, pp. 13-17, Oct. 2011,
<https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2010.10.037>
- [41] R. W. Korsmeyer, R. Gurny, E. Doelker, P. Buri, and N. A. Peppas, "Mechanisms of solute release from porous hydrophilic polymers," *Int. J. Pharm.*, vol. 15, no. 1, pp. 25-35, May 1983,
[https://doi.org/10.1016/0378-5173\(83\)90064-9](https://doi.org/10.1016/0378-5173(83)90064-9)
- [42] S. H. Baien et al., "Antimicrobial and Immunomodulatory Effect of Gum Arabic on Human and Bovine Granulocytes Against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*," *Frontiers in Immunology*, vol. 10, p. 3119, 2020.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.03119>
- [43] J. Rosenblatt, R. Reitzel, R. Hachem, A.-M. Chaftari, and I. Raad, "Efficacy of a Novel Synergistic Polygalacturonic + Caprylic Acid + Nitroglycerin Antimicrobial Wound Ointment Against Common Wound Pathogens in a Time-to-Kill Biofilm Eradication Model," *Open Forum Infect. Dis.*, vol. 3, no. suppl_1, Oct. 2016,
<https://doi.org/10.1093/ofid/ofw172.1803>
- [44] R. C. Goy, S. T. B. Morais, and O. B. G. Assis, "Evaluation of the antimicrobial activity of chitosan and its quaternized derivative on *E. Coli* and *S. aureus* growth," *Brazilian J. Pharmacogn.*, vol. 26, no. 1, pp. 122-127, 2016,
<https://doi.org/10.1016/j.bjp.2015.09.010>
- [45] E. I. Rabea, M. E. T. Badawy, C. V. Stevens, G. Smagghe, and W. Steurbaut, "Chitosan as antimicrobial agent: Applications and mode of action," *Biomacromolecules*, vol. 4, no. 6, pp. 1457-1465, 2003,
<https://doi.org/10.1021/bm034130m>
- [46] R. C. Goy, D. De Britto, and O. B. G. Assis, "A review of the antimicrobial activity of chitosan," *Polimeros*, vol. 19, no. 3, pp. 241-247, 2009,
<https://doi.org/10.1590/S0104-14282009000300013>
- [47] J. D. Smart, "The basics and underlying mechanisms of mucoadhesion," *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 57, no. 11, pp. 1556-1568, 2005,
<https://doi.org/10.1016/j.addr.2005.07.001>
- [48] N. A. Peppas and J. J. Sahlin, "Hydrogels as



mucoadhesive and bioadhesive materials: a review," *Biomaterials*, vol. 17, no. 16, pp. 1553-1561, Jan. 1996,
[https://doi.org/10.1016/0142-9612\(95\)00307-X](https://doi.org/10.1016/0142-9612(95)00307-X)

and Mucosa," *Pharm. Chem. J.*, vol. 42, no. 7, pp. 392-399, 2008,
<https://doi.org/10.1007/s11094-008-0132-8>

[49] E. A. Kharenko, N. I. Larionova, and N. B. Demina, "Mucoadhesive Drug Delivery Systems: Quantitative Assessment of Interaction Between Synthetic and Natural Polymer Films



Este texto está protegido por una licencia [Creative Commons 4.0](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

Usted es libre para Compartir —copiar y redistribuir el material en cualquier medio o formato— y Adaptar el documento —remezclar, transformar y crear a partir del material— para cualquier propósito, incluso para fines comerciales, siempre que cumpla la condición de:

Atribución: Usted debe dar crédito a la obra original de manera adecuada, proporcionar un enlace a la licencia, e indicar si se han realizado cambios. Puede hacerlo en cualquier forma razonable, pero no de forma tal que sugiera que tiene el apoyo del licenciante o lo recibe por el uso que hace de la obra.

[Resumen de licencia - Texto completo de la licencia](#)