



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE
SAN NICOLÁS DE HIDALGO**



**DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO
FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA**

**FORMULACIÓN DE HIDROGELES NEUTRALIZADOS
PARA SU POTENCIAL USO EN LA SALUD VAGINAL**

TESIS presentada por:

DIANA BELEM ALANÍS GUTIÉRREZ

**A la división de estudios de posgrado de la facultad de
ingeniería química como requisito parcial**

para obtener el grado de:

MAESTRA EN CIENCIAS

EN

INGENIERÍA QUÍMICA

Director: Dr. Rafael Huirache Acuña (FIQ-UMSNH)

Co- Directora: Dra. Zaira Yunuen García Carvajal (CIATEJ)

Morelia, Mich.

Agosto 2022

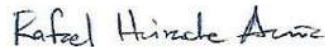
Asunto: Impresión de Tesis.

Lic. Ulises Gutiérrez Vázquez
Jefe del Departamento de Titulación de la
U.M.S.N.H.

Por este medio nos dirigimos a usted de la manera más atenta para notificarle, que después de haberle dado seguimiento al desarrollo de la tesis: "FORMULACIÓN DE HIDROGELES NEUTRALIZADOS PARA SU POTENCIAL USO EN LA SALUD VÁGINAL", después de haber revisado el manuscrito que presentó la alumna **Diana Belem Alanís Gutiérrez** con matrícula **2027809K** concluimos que cumple con los requisitos académicos y con lo establecido en el Reglamento General de Estudios de Posgrado para el desarrollo de su Tesis.

Por lo anterior este Comité Tutorial da el aval para su impresión final.

Director: Dr. Rafael Huirache Acuña 11000201



Codirector: Dra. Zaira Yunuen García Carvajal EXT21231



Vocales:



Dr. Rafael Maya Yescas 04002040



Dra. Ma del Carmen Chávez Parga 07001002



Dr. Javier Lara Romero 02000245

Atentamente.
Morelia, Michoacán a 04 de agosto de 2022.



DIVISION DE ESTUDIOS
DE POSGRADO



Dr. Luis Fernando Lira Barragán
Coordinador de la Maestría en Ciencias en Ingeniería Química.

LFLB/mcpa.



DEPARTAMENTO DE POSGRADO

Facultad de Ingeniería Química / Universidad San Nicolás de Hidalgo
Francisco J. Mújica S/N / Cal. Fechas del Río / C.P. 58060 / Morelia, Michoacán / Tel. y Fax: 443. 327 3564
<http://posgrado.fiq.umich.mx/>

RESUMEN

FORMULACIÓN DE HIDROGELES NEUTRALIZADOS PARA SU POTENCIAL USO EN LA SALUD VAGINAL.

Diana Belem Alanís Gutiérrez

Director: Dr. Rafael Huirache Acuña, Co-Directora: Dra. Zaira Yunuen García Carvajal

El uso de sistemas de hidrogel *in situ* para la administración vaginal es una estrategia importante en el tratamiento de afecciones asociadas a la atrofia vulvovaginal, no obstante, el formular algún dispositivo médico el cual incluya algún efecto terapéutico, conlleva ciertos criterios para la selección de los excipientes. Es importante emplear biomateriales que presenten características fisicoquímicas y compatibles con células vaginales, a su vez, que puedan hacer sinergia con microorganismos que presenten actividad probiótica. El propósito principal del presente proyecto de investigación fue formular y comparar una serie de hidrogeles neutralizados con diferentes bases neutralizantes (TEA, AMP, NaOH). Los hidrogeles se formularon principalmente con Carbopol y Goma Xantana, los cuales mostraron características fisicoquímicas y biocompatibles. Los hidrogeles obtenidos fueron caracterizados mediante monitoreo de pH, capacidad de amortiguamiento, viscosidad dinámica, comportamiento reológico e interacciones moleculares, lo anterior bajo tres condiciones (No estéril, estéril y estéril diluido en simulado de fluido vaginal (SFV)). Se evaluó la viabilidad de la bacteria probiótica *Lactococcus lactis* ATCC 11454 al ser incorporada a los hidrogeles estériles. También se determinó la citocompatibilidad de los mismos en un modelo 2D de células *HeLa* mediante la técnica de MTT y microscopia *Live/Dead*. En conclusión, se obtuvieron hidrogeles altamente reticulados y estables frente a cambios de pH, con un comportamiento reológico aceptable para evitar pérdidas y escurrimiento, pero con un cambio en la estructura física de los polímeros, sin perder la biocompatibilidad, sin embargo, el hidrogel que presentó mejores características fue F3 cuyo mecanismo de neutralización fue con Aminometil propanol.

Palabras clave: Hidrogeles, Neutralización, Carbopol, Xantana, Biocompatibilidad

ABSTRACT

FORMULACIÓN DE HIDROGELES NEUTRALIZADOS PARA SU POTENCIAL USO EN LA SALUD VAGINAL.

Diana Belem Alanís Gutiérrez

Asesor: Dr. Rafael Huirache Acuña, Co-Asesor: Dra. Zaira Yunuen García Carvajal

The use of in situ hydrogel systems for vaginal administration is an important strategy in the treatment of conditions associated with vulvovaginal atrophy, however, formulating a medical device which includes some therapeutic effect entails certain criteria for the selection of the excipients. It is important to use biomaterials that have physicochemical characteristics and are compatible with vaginal cells, in turn, that can synergize with microorganisms that have probiotic activity. The main purpose of this research project was to formulate and compare a series of hydrogels neutralized with different neutralizing bases (TEA, AMP, NaOH). The hydrogels were formulated mainly with Carbopol and Xanthan Gum, which showed physicochemical and biocompatible characteristics. The hydrogels obtained were characterized by monitoring pH, buffering capacity, dynamic viscosity, rheological behavior, and molecular interactions, under three conditions (non-sterile, sterile, and sterile diluted in simulated vaginal fluid (SFV)). The viability of the probiotic bacterium *Lactococcus lactis* ATCC 11454 when incorporated into sterile hydrogels was evaluated. Their cytocompatibility was also determined in a 2D model of HeLa cells using the MTT technique and Live/Dead microscopy. In conclusion, highly cross-linked and stable hydrogels were obtained against changes in pH, with acceptable rheological behavior to avoid losses and runoff, but with a change in the physical structure of the polymers, without losing biocompatibility, however, the hydrogel that presented better characteristics was F3 whose neutralization mechanism was with Aminomethyl propanol.

Keywords: Hydrogels, Neutralization, Carbopol, Xanthan, Biocompatibility

ÍNDICE

RESUMEN	III
ABSTRACT	IV
ÍNDICE	V
LISTA DE FIGURAS	IX
LISTA DE TABLAS.....	XII
NOMENCLATURA	XIII
AGRADECIMIENTOS	XV
1. INTRODUCCIÓN	1
2. MARCO TEÓRICO	3
2.1. Antecedentes	3
2.2. Salud Vaginal	4
2.2.1. Importancia de la salud vaginal.....	5
2.2.2. Lesiones vaginales	7
2.2.3. Virus del Papiloma Humano.....	8
2.3. Dispositivos Médicos.....	10
2.3.1. Clasificación de los dispositivos médicos.....	10
2.4. Formas farmacéuticas de aplicación Vaginal	10
2.5. Hidrogeles	12
2.5.1. Mecanismos de formación	13
2.5.2. Factores que afectan la gelificación de los polímeros.....	15
2.6. Clasificación de los geles	16
2.7. Componentes básicos de los geles.....	17
2.7.1. Polímeros más utilizados en geles de aplicación vaginal	18

2.7.2. Poliacrílatos.....	20
2.8. Factores físicos en la calidad de un gel vaginal	21
2.8.1. pH.	21
2.8.2. Capacidad de amortiguamiento	21
2.8.3. Viscosidad.....	21
2.8.4. Propiedades reológicas.....	22
2.8.5. Interacciones químicas	22
2.9. Factores Biológicos en la calidad de un gel vaginal.....	22
2.9.1. Mucoadhesión.....	22
2.9.2. Citotoxicidad	23
2.9.3. Viabilidad probiótica.....	23
2.10. Probióticos en formulaciones vaginales.....	24
2.10.1. <i>Lactococcus lactis</i> ATCC 11454	25
2.10.2. Bacteriocinas	25
3. JUSTIFICACIÓN	27
4. HIPÓTESIS.....	28
5. OBJETIVOS	29
5.1. Objetivo General	29
5.2. Objetivos específicos	29
6. MATERIALES Y MÉTODOS	30
6.1. Selección de excipientes.....	30
6.2. Diseño experimental factorial 2 ³	30
6.3. Preparación de hidrogeles pre-formulados	31
6.3.1. pH.....	31
6.3.2. Viscosidad dinámica	31

6.4.	Formulación de hidrogeles	32
6.5.	Caracterización Físicoquímica	33
6.5.1.	Preparación de los hidrogeles	33
6.5.2.	Análisis macroscópico	33
6.5.3.	Capacidad de amortiguamiento	33
6.5.4.	Viscosidad dinámica	33
6.5.5.	pH	34
6.5.6.	Propiedades Reológicas	34
6.5.7.	Interacciones Moleculares FT-IR	34
6.6.	Caracterización Biológica	35
6.6.1.	Cinética de crecimiento microbiano <i>L. lactis</i> ATCC 11454	35
6.6.2.	Tinción Gram	35
6.6.3.	Conteo de células viables	35
6.6.4.	Incorporación de <i>Lactococcus lactis</i> ATCC 11454 en los hidrogeles.	36
6.6.5.	Viabilidad de <i>Lactococcus lactis</i> ATCC 114545 en suspensión.	36
6.6.6.	Citocompatibilidad: método Live/Dead	36
6.6.7.	Viabilidad celular: método MTT	37
7.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	38
7.1.	Selección de excipientes	38
7.2.	Diseño experimental factorial 2 ³	39
7.3.	Preparación de hidrogeles pre-formulados	40
7.3.1.	pH	40
7.3.2.	Viscosidad dinámica	41
7.3.3.	Análisis estadístico asociado a la pre-formulación	41
7.4.	Formulación de los hidrogeles.	47

7.4.1. Mecanismos de formación de los hidrogeles	48
7.5. Caracterización fisicoquímica.....	50
7.5.1. Capacidad de amortiguamiento	50
7.5.2. Viscosidad de dinámica	52
7.5.3. pH.....	54
7.5.4. Propiedades Reológicas.....	56
7.5.5. Interacciones Moleculares.....	58
7.6. Caracterización Biológica.....	62
7.6.1. Cinética de Crecimiento Lactococcus lactis ATCC 11454.....	62
7.6.2. Tinción Gram.....	63
7.6.3. Conteo de viabilidad bacteriana.....	63
7.6.4. Incorporación del probiótico a los hidrogeles.....	65
7.6.5. Viabilidad del probiótico en suspensión.....	65
7.6.6. Citocompatibilidad: método Live/Dead.....	70
7.6.7. Viabilidad celular: método MTT	73
7.7 Resumen de Resultados obtenidos.....	75
8. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	78
9. REFERENCIAS.....	80

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1. Clasificación de lesiones cervicales premalignas basado en su histología.7	7
Figura 2.2. Clasificación de los hidrogeles.13	13
Figura 2.3. Estructura de la forma helicoidal de los grupos carboxílicos de un polímero gelificante.14	14
Figura 2.4. Disociación de los grupos carboxílicos del polímero por acción de una base.14	14
Figura 2.5. Mecanismo de formación de un hidrogel a base de ácido poliacrílico neutralizado con una base fuerte NaOH.14	14
Figura 2.6. Mecanismo de formación de un hidrogel a base de ácido poliacrílico neutralizado con una base débil Trietanolamina (TEA).15	15
Figura 2.7. Ácido poliacrílico previo y posterior al proceso de hidratación y neutralización20	20
Figura 7.1. Histograma de frecuencias de excipientes utilizados en formulaciones de aplicación vaginal en contexto comercial y publicaciones de divulgación científica JCR.38	38
Figura 7.2. Apariencia física de 3 de 9 hidrogeles pre-formulados [M-4; M-6; M-8]40	40
Figura 7.3. Resultados de pH correspondiente a los hidrogeles pre-formulados (25°C). los datos son promedio de n = 3, ± SD40	40
Figura 7.4. Resultados de la Viscosidad dinámica correspondiente a las pre-formulaciones [Spin 7, 20 RPM, 20°C] los datos son promedio de n = 3, ± SD41	41
Figura 7.5. Diagrama de Pareto estandarizada para viscosidad43	43
Figura 7.6. Grafica de efectos principales para viscosidad.44	44
Figura 7.7. Diagrama de Pareto estandarizada para pH46	46
Figura 7.8. Gráfica de efectos principales para pH46	46
Figura 7.9. Apariencia física de los hidrogeles no esterilizados F1:F5.47	47
Figura 7.10. Apariencia física de los hidrogeles esterilizados F1:F5.48	48
Figura 7.11. Mecanismos de neutralización en los hidrogeles.48	48
Figura 7.12. Capacidad de amortiguamiento relativa de los hidrogeles (F1:F5) no estériles y estériles, diluidos en SSF y SFV.51	51

Figura 7.13. Resultados de viscosidad dinámica de los hidrogeles F1:F5, no estériles, estériles y estériles diluidos en SFV, a 20°C, Spin 6-7, los datos son promedio de n = 3, ± SD, Tukey HSD (p>0.05).....	52
Figura 7.14. Resultados de pH de los hidrogeles F1:F5, no estériles, estériles y estériles diluidos en SFV, los datos son promedio de n = 3, ± SD, Tukey HSD (p>0.05).....	54
Figura 7.15. Resultados reológicos de las pruebas de barrido de frecuencia obtenidos a partir de los hidrogeles diluidos en SFV a 37 °C, los datos son promedio de n = 3, ± SD.	56
Figura 7.16. Resultados reológicos de las pruebas de barrido de deformación obtenidos a partir de los hidrogeles diluidos en SFV a 37 °C, los datos son promedio de n = 3, ± SD.	57
Figura 7.17. Espectros FTIR de los hidrogeles, no estériles, materias primas y neutralizantes.	60
Figura 7.18. Espectros FTIR de los hidrogeles, estériles, materias primas y neutralizantes.	61
Figura 7.21 Cinética de crecimiento de <i>Lactococcus lactis</i> ATCC 11454 (37°C-5%CO ₂), los datos son promedio de n = 3, ± SD.	62
Figura 7.22. Pruebas de tinción Gram en <i>Lactococcus lactis</i> ATCC 11454 (36.a-36c 40x; 36b-36d 100x)	63
Figura 7.23. Placas de Agar MRS con crecimiento de la cepa <i>Lactococcus lactis</i> ATCC 11454. a) dilución 10 ⁴ , b) dilución 10 ¹ , c) control de crecimiento.	64
Figura 7.24. Hidrogeles estériles adicionados con el probiótico <i>Lactococcus lactis</i> ATCC 11454 (T ₀), los datos son promedio de n = 3, ± SD.....	65
Figura 7.25. Placas de Agar MRS sin crecimiento aparente posterior a 24 h de incubación a 37°C – 5% CO ₂ correspondiente al T ₀	66
Figura 7.26. Resultados de la prueba de Halo de inhibición.	68
Figura 7.27. Apariencia física de los hidrogeles formulados para prueba de Halo de inhibición	69
Figura 7.28. Resultados de la segunda prueba de inhibición.....	70
Figura 7.29. Evaluación de la viabilidad celular frente a exposición directa con los hidrogeles a 24 h, 48 h y 72 h, imágenes de campo claro representativa de la observación	

morfológica de las células HeLa. Barra de escala, 100 μ m. tinción viva (verde)/muerta (roja).....	72
Figura 7.30. Resultados de viabilidad por MTT de los hidrogeles, a 5 diluciones a las 24 horas, los datos son promedio de n = 3, \pm SD.	73
Figura 7.31. Resultados de viabilidad celular por MTT de los hidrogeles, a 5 diluciones a las 48 horas, los datos son promedio de n = 3, \pm SD.....	74
Figura 7.32. Resultados de viabilidad celular por MTT de los hidrogeles, a 5 diluciones a las 72 horas, los datos son promedio de n = 3, \pm SD.....	74

LISTA DE TABLAS

Tabla 2.1. Organización de la microflora vaginal y su contribución a la homeostasis o disbiosis vaginal.	4
Tabla 2.2. Clasificación de los genotipos del Virus del papiloma humano de acuerdo con su nivel de riesgo y enfermedades asociadas.....	9
Tabla 2.3. Formas farmacéuticas comunes. Tomado de (FEUM,2011)	11
Tabla 2.4. Compilación de polímeros utilizados en formulaciones en gel para aplicación vaginal.....	18
Tabla 6.1. Niveles y factores correspondientes a la pre-formulación de los hidrogeles .	30
Tabla 6.2. Factores de conversión para viscosímetro de Brookfield	31
Tabla 6.3. Contenido de la formulación de los hidrogeles.....	32
Tabla 7.1. Resultados del diseño experimental.....	39
Tabla 7.2 Efectos estimados para viscosidad	42
Tabla 7.3. Análisis de Varianza para viscosidad	42
Tabla 7.4. Valores óptimos correspondiente al análisis de viscosidad.....	44
Tabla 7.5. Efectos estimados para pH.	44
Tabla 7.6. Análisis de varianza para pH.....	45
Tabla 7.7. Valores óptimos correspondientes al análisis de pH.....	47
Tabla 7.8. Resultados del conteo de dilución en placa de la muestra correspondiente a la fase de crecimiento inicial.	64
Tabla 7.9. Formulaciones de los hidrogeles de prueba para Halo de inhibición.	67
Tabla 7.10. Formulaciones de los hidrogeles de prueba para Halo de inhibición.....	68
Tabla 7.11. Resumen de los resultados obtenidos de las caracterizaciones fisicoquímicas y biológicas en comparación con lo reportado en la literatura.....	75

NOMENCLATURA

ADN Ácido Desoxirribonucleico

AMP Aminometilpropanol

ANOVA Análisis de Varianza

ATCC American Type Culture Collection

ATR Reflectancia Total Atenuada

cADN Ácido Desoxirribonucleico circular

c.b.p. Cantidad bastante para

CCU Cáncer cérvico uterino

CO₂ Dióxido de carbono

DMEM Duplecco's Modified Eagle Medium

DO Densidad óptica

EDTA Ácido etilendiaminotetraacético

FDA Food and Drug Administration

FEUM Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos

FTIR Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier

G' Módulo elástico o de almacenamiento

G'' Módulo viscoso o de pérdida

ICH International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use

JCR Journal Citation Reports

MTT (3-(4,5-Dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol

N/A No Aplica

NaOH Hidróxido de sodio

NCBI National Center for Biotechnology Information

SD Desviación estándar

SFV Simulado de fluido vaginal

SSF Solución salina fisiológica

TEA Trietanolamina

UFC Unidades formadoras de colonias

USP United States Pharmacopeia

Uv-vis Espectroscopia Ultravioleta visible

VPH Virus del papiloma humano

AGRADECIMIENTOS

A Dios que me permitió culminar los objetivos planteados en este proyecto, durante esta etapa de mi vida y de mi formación. Por brindarme salud y fuerzas para continuar a pesar de las complicaciones que pudieron presentarse en el camino, por coincidir con excelentes personas en el transcurso de estos años y por todo el conocimiento académico y personal.

A mi esposo, padres y hermanos que son un pilar fundamental en mi vida y siempre están brindándome su apoyo, cariño y tiempo, gracias a ellos tengo las bases para crecer en cada etapa de mi vida y seguir mejorando.

A mis amigos por su tiempo y consejos ya que siempre estuvieron apoyándome y alentándome a seguir adelante. Por los increíbles momentos de alegría y convivencia los cuales serán recordados siempre.

A la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo por brindarme la oportunidad de pertenecer al programa de Maestría en Ciencias en Ingeniería Química.

Al Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco por abrirme las puertas de sus instalaciones para poder desarrollar parte experimental de la presente investigación.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo otorgado para la realización de este proyecto.

A mis asesores, el Dr. Rafael Huirache Acuña, la Dra. Zaira Yunuen García Carvajal y el Dr. Jorge Bravo Madrigal por darme la oportunidad de trabajar con ellos en este proyecto de investigación, el cual me ha brindado un gran conocimiento sobre temas interesantes de ingeniería, biotecnología farmacéutica y microbiología.

A todos ustedes, ¡GRACIAS!

1. INTRODUCCIÓN

En la actualidad las enfermedades de transmisión sexual han trascendido notablemente, ya que su propagación a través de organismos causales (parásitos, bacterias, virus) cada vez es más frecuente. Estas enfermedades afectan tanto a hombres y a mujeres, no obstante, hay estudios que demuestran que los problemas ocasionados en la salud presentan mayor incidencia en mujeres, como ha sido el aumento de casos de cáncer cérvico uterino (CCU) asociado con afecciones causadas por el virus del papiloma humano (VPH). Además de características virales que contribuyen a la carcinogénesis. Se ha reportado que la existencia y persistencia de lesiones vaginales como: irritación, resequedad y dispareunia entre otros, son considerados factores de riesgo, por lo tanto, incrementa la probabilidad de que algún agente patógeno se pueda alojar. A pesar de que existen diversos tipos de virus causantes de las lesiones solo son ciertos tipos los que son potencialmente promotores del CCU. Debido a ello los especialistas en el tema han propuesto diversas alternativas para prevenir, disminuir y contrarrestar los efectos de esta enfermedad, entre ellos la educación sexual oportuna, campañas de vacunación y tratamientos convencionales, sin embargo, las situaciones sociales pueden llegar a individualizar cada caso, debido a lo anterior, expertos en formulaciones farmacéuticas han implementado diversos sistemas de aplicación empleando biomateriales novedosos, como pueden ser hidrogeles.

Los hidrogeles son biomateriales compuestos por uno o varios polímeros hidrófilos cuyas cadenas están entrecruzadas por uniones físicas o químicas capaces de formar una red tridimensional, su principal característica es la capacidad para captar fluidos acuosos del medio que los rodea, provocando un hinchamiento.

Dentro de la industria farmacéutica se han llegado a patentar y comercializar diversas formulaciones basadas en hidrogeles con aplicaciones como lentes de contacto, apósitos para heridas, sistemas de liberación de fármacos, ingeniería tisular, entre otros. Se estima que para el 2022 el mercado mundial de los hidrogeles pueda alcanzar un volumen de 27200 millones de dólares.

Es por ello que, en el presente proyecto de investigación se pretende formular un dispositivo médico de clase III en hidrogel empleando principalmente biomateriales que permita tener características fisicoquímicas y citocompatibles, con un posible efecto terapéutico frente a lesiones vaginales, dicho sistema en hidrogel estará compuesto por ingredientes que le confieren propiedades humectantes e hidratantes idóneos para la cavidad vaginal. En la presente investigación se pretende formular con base en lo establecido por las autoridades sanitarias FDA, y la normativa vigente Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos (FEUM), Farmacopea de los Estados Unidos de América (USP).

2. MARCO TEÓRICO

2.1. Antecedentes

La producción de materiales novedosos a base de polímeros biodegradables y polímeros ha sido objeto de un vasto interés debido a la excelente biocompatibilidad de estos. Un ejemplo se evidencia en un estudio realizado por (Arpa *et al.*,2020) donde se demuestra la compatibilidad del carbopol 940 como polímero principal en la formulación de diversos hidrogeles destinados a la aplicación en la salud vaginal, además de proporcionar propiedades reológicas adecuadas, su red polimérica y su estructura química permite adicionar principios activos debido a su liberación oportuna además una adecuada adhesión en sitios cubiertos de mucosidad como la cavidad vaginal (Asane *et al.*, 2008).

Sin embargo, la mucoadhesión y liberación sostenida y/o prolongada de los principios activos no son los únicos factores relevantes en una formulación vaginal, además la hidratación asociada a los componentes (ácido hialurónico, ácido láctico, ha demostrado relevancia e importancia (Carter *et al.*, 2020) (Barbed, 2007). Tal ha sido el caso del hidrogel Papilocare ® el cual al contener principios activos como *Coriolus versicolor*, centella asiática, ácido hialurónico entre otros promueve la hidratación y reepitelización del tejido dañado debido a afecciones provocadas por el virus del papiloma humano (Serrano *et al.*,2021).

Además de las propiedades fisicoquímicas y biológicas de los hidrogeles, como las mencionadas anteriormente, en el mercado se ha popularizado el uso de probióticos (Tachedjian *et al.*, 2017) (Anukam *et al.*,2006) (Cribby *et al.*, 2008) y prebióticos (Hakimi *et al.*, 2017) (Sanjeevani Shekhar *et al.*, 2022) en las formulaciones de aplicación vaginal, (Borges & Teixeira, 2014) (Donders *et al.*,2020) demostraron que el uso del hidrogeles el cual contienen cepas bacterianas como *Pediococcus pentosaceus* SB83, *Lactobacillus plantarum* YUN-V2.0 , *Lactobacillus pentosus* YUN-V1.0 y *Lactobacillus rhamnosus* YUN-S1 promueven el equilibrio de la microflora vaginal. Aunado a lo anterior y realizando una búsqueda exhaustiva del estado del arte no hay en el mercado o en investigaciones

recientes un hidrogel diseñado para la coexistencia de la bacteria *Lactococcus lactis* ATCC 11454, no obstante, (Bodaszewska – Lubas *et al.*, 2012) menciona que esta bacteria tiene un potencial antagonismo con microorganismos patógenos que interfieren en la homeostasis vaginal debido a la producción de bacteriocinas.

2.2. Salud Vaginal

Se puede definir como salud vaginal como el estado de la vagina que mantiene las condiciones fisiológicas adecuadas a la evolución de la edad de la mujer, que no produce sintomatología local, y permite una vida sexual satisfactoria (Baquedano, 2014).

Desde el primer estudio microbiológico de la vagina humana, publicado por (Döderlein, 1892), se ha avanzado de manera notable en el conocimiento de la microflora vaginal, formada por especies que permiten mantener un equilibrio en la mujer sana. La alteración de este equilibrio, causado por la reducción de la población de bacterias probióticas o por el sobrecrecimiento de otras especies, se manifiesta en la presencia de síntomas y signos asociados a afecciones vaginales (Baquedano, 2014). El conocimiento de los mecanismos que regulan el mantenimiento del equilibrio de la microflora vaginal, ayudará a establecer medidas preventivas, o finalmente terapéuticas.

Si bien es sabido que la microflora vaginal es de gran relevancia en la preservación de la salud vaginal y la defensa de huéspedes que pueden tornarse patógenos, en la actualidad y con el avance tecnológico y gracias al uso de técnicas moleculares ha sido posible clasificar el microbiota vaginal de tras a nueve grupos discretos, entre ellos destacan las bacterias del género *Lactobacillus* como se muestra en la Tabla 2.1.

Tabla 2.1. Organización de la microflora vaginal y su contribución a la homeostasis o disbiosis vaginal.

<i>pH Vaginal</i>	<i>Tipo de bacteria</i>	<i>Contribución del microorganismo a la homeostasis o disbiosis</i>
4.0	<i>L. crispatus</i>	Prevención de enfermedades urogenitales. Adhesión a células epiteliales, producción de compuestos con propiedades antimicrobianas (H ₂ O ₂)

5.0	<i>L. gasseri</i>	Estimula la enzima deshidrogenasa láctica, Disminución del pH, Ambiente protector de Bacteriocinas
4.4	<i>L. iners</i>	Propiedades comunes asociadas a la declaración disbiótica. Adhesión a células epiteliales, Tolerancia antibiótica.
4.4	<i>G. vaginalis</i> <i>A. vaginae</i> <i>Prevotella spp</i>	Producción de citosinas, Producción de aminas, alcalinización por pH, Mejora la degradación de la superficie mucosa

2.2.1. Importancia de la salud vaginal

Un factor muy importante en la salud vaginal es la microbiota vaginal, esta microbiota en un estado de balance puede prevenir las infecciones del tracto genital inferior; diversos estudios han revelado que la falta de lactobacilos favorece el desarrollo de vaginosis bacteriana e infecciones de transmisión sexual asociados a un desequilibrio de la microbiota entre otros factores tales como el virus de la inmunodeficiencia humana y virus del papiloma humano (Behbakht *et al.*,2002) (Gao *et al.*,2013).

Un estudio demuestra que las mujeres con afecciones provocados por el virus del papiloma Humano (VPH) presentaron en sus microbiotas aumento del contenido de *L. gasseri* y *Gardnerella vaginalis* (Silva, Cerqueira & Medeiros, 2014). En cambio, los microbiotas balanceados demuestran mayor cantidad de *L. crispatus* (Oh *et al.*,2015) (Seo *et al.*, 2016). Algunos factores cotidianos, como las duchas vaginales o las relaciones sexuales, y factores biológicos, como la Vaginosis Bacteriana (VB) (Gillet *et al.*, 2011) (Guo *et al.*, 2012) o infecciones de transmisión sexual (Vriend *et al.*, 2015), alteran el microambiente vaginal y han sido identificados como cofactores en la persistencia de la infección por VPH. Esto sugiere que factores adicionales actúan en conjunto con el virus de VPH para influenciar en el riesgo del desarrollo de cáncer cervical. Uno de los posibles mecanismos por los cuales puede relacionarse el impacto de la microbiota en la oncogénesis la cual se debe al desarrollo de la inflamación crónica, la cual se asocia con las neoplasias cervicales.

Lactobacillus spp. son bacterias anaerobias Gram positivas tienen la capacidad de colonizar la mucosa vaginal, impidiendo que exista un desarrollo excesivo de otros microorganismos que pueden llegar a ser potencialmente patógenos para la huésped. Esta protección se realiza a través de dos mecanismos:

- (a) por la adhesión específica a las células epiteliales.
- (b) por la producción de compuestos con propiedades antimicrobianas.

En varias investigaciones se ha buscado describir la capacidad de los *lactobacilos* para autoagregarse y adherirse al epitelio vaginal a través de glicoproteínas presentes en la superficie de las células epiteliales, esto se logra gracias a una unión que se ve favorecida por un ambiente de pH ácido (Nagy *et al.*, 1992). Aunque son necesarios más estudios, se cree que, además del epitelio celular del huésped, las proteínas, los carbohidratos, las glicoproteínas, los ácidos lipoteicoicos y los cationes divalentes de las especies de microbiota también juegan un papel importante (Boris *et al.*, 1998).

Además se ha reportado que la presencia de ácido láctico es clave para una homeostasis saludable de la cavidad vaginal y su producción proviene de dos fuentes diferentes: por el epitelio vaginal (principalmente L-lactato que representa el 20% del ácido láctico total) y por la microbiota, responsable de metabolizar aproximadamente el 80% del glucógeno que produce las dos isoformas de ácido láctico con predominio del ácido D-láctico (Smith *et al.*, 2016) (Boskey *et al.*, 2001) Cuando el epitelio escamoso requiere energía en forma de ATP, el glucógeno de las células epiteliales vaginales se convierte en glucosa, luego en piruvato y de éste en ácido láctico, que se libera en el lumen vaginal a medida que el epitelio se descama (Mossop *et al.*, 2011).

El segundo mecanismo de producción de ácido láctico tiene origen del glucógeno que se encuentra en el lumen vaginal, el cual es catabolizado por las enzimas alfa amilasas para producir maltosa, maltotriosa y alfa dextrinas, que posteriormente se convierten en ácido láctico, debido a la acción de los *Lactobacillus*-deshidrogenasa láctica estimulada ((Mossop *et al.*, 2011) (Amabebe & Anumba, 2018). De acuerdo con la investigación realizada por (Martín *et al.*, 2008) (Lewis *et al.*, 2011) la presencia de ácido láctico en el lumen vaginal tiene como consecuencia que el pH vaginal se mantenga

ácido, en niveles de aproximadamente 3.5 a 4.5, generando un ambiente protector en la mucosa que, parcial o totalmente, inhibe el crecimiento de microorganismos patógenos. Además, se ha comprobado que existen compuestos producidos por microorganismos del género *Lactobacillus* que desempeñan un control secundario en la flora vaginal, estos compuestos son el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y las bacteriocinas (Martín *et al.*, 2008) (Strus *et al.*, 2006). Aunado a lo anterior (Martín *et al.*, 2008) (Borgogna & Yeoman, 2017) sugieren que algunas cepas de lactobacilos vaginales pueden producir H_2O_2 protegiendo la mucosa frente a alteraciones provocadas por microorganismos oportunistas, incluidos los causantes de infecciones de transmisión sexual. Por otro lado, las bacteriocinas son polipéptidos sintetizados a nivel ribosómico cuya actividad antimicrobiana solo ha sido demostrada in vitro.

2.2.2. Lesiones vaginales

La neoplasia intraepitelial cervical se define como una lesión pre invasora más común del cuello uterino (Medina-Villaseñor *et al.*, 2014), esta lesión suele ser infrecuente y asintomática. Los cambios escamosos atípicos ocurren en la zona de transformación del cérvix con cambios leves, moderados o severos de acuerdo a la profundidad, es decir, estas lesiones se pueden clasificar en función del grado de afección intraepitelial. Lesiones de bajo grado, lesiones de alto grado y cáncer de cérvix (Massad, 2008). Ver figura 2.1.

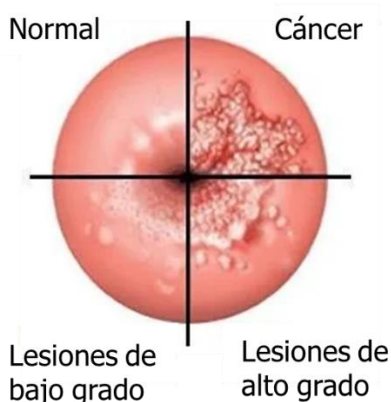


Figura 2.1. Clasificación de lesiones cervicales premalignas basado en su histología.

Existe la incertidumbre aun sobre la propensión de las lesiones de bajo grado de progresar a lesiones de alto grado, sin embargo, de acuerdo con (Uzcátegui *et al.*, 2012)

es menos probable, aunque para las neoplasias intraepiteliales cervicales. Las mujeres con lesiones de bajo grado tienden a ser más jóvenes que las que presentan lesiones de alto grado. Se piensa que las lesiones de bajo grado representan una proliferación más benigna, en tanto que las de alto grado se consideran como un precursor verdadero de cáncer (Apgar *et al.*,2013). Aunque las lesiones pueden ocurrir a cualquier edad, las tasas de incidencia más altas se observan en mujeres mayores de 60 años (Uzcátegui *et al.*, 2012).

Diversos estudios revelan que existe un alto porcentaje respecto a la correlación de lesiones intraepiteliales, que también tienen presencia invasora en vulva, vagina y cuello uterino, las cuales están relacionadas con infección por el virus de papiloma humano de alto riesgo oncogénico en un 81.3 % de los casos (Uzcátegui *et al.*, 2012).

El virus del papiloma humano es capaz de infectar las células escamosas epiteliales, las cuales tienden a proliferar y acceder a las células basales a través de micro traumas o pequeñas lesiones (Vidal-Torres,2022).

2.2.3. Virus del Papiloma Humano.

El Virus del Papiloma Humano (VPH) pertenece a la familia *Papillomaviridae*, los cuales son pequeñas partículas icosaédricas de ácido desoxirribonucleico (ADN) sin envoltura que miden aproximadamente 55nm, epiteliotropos; su estructura genómica está compuesta por dobles cadenas de cADN estructuradas por 7,500-8,000 pares de bases (Domínguez - Bauta *et al.*, 2018) Las infecciones causadas por este virus presenta consecuencias adversas que se pueden clasificar dependiendo del tipo de virus o bien del grado de afección.

La infección por el virus del papiloma Humano (VPH) se puede catalogar como la infección de transmisión sexual más frecuente (CDCP, 2021) cuya infección afecta a hombres y mujeres, sin embargo, las incidencias más fuertes están reportadas en mujeres, de acuerdo con (Sánchez, s.f.) Los VPH tipo 31, 33, 45, 52, y 58 juntos causan 15% de los cánceres cervicales. El VPH-6 y el VPH-11 son los dos principales tipos de bajo riesgo (no carcinogénicos) y causan las verrugas anogenitales. La mujer puede ser infectada por más de un tipo al mismo tiempo.

El VPH está condicionado a infecciones latentes durante un intervalo de tiempo dependiendo directamente de el genotipo de virus. Se han caracterizado más de 200 genotipos distintos dentro de los cuales se puede agrupar de acuerdo a un punto de vista clínico en bajo y alto riesgo oncogénico (McQuillan *et al.*,2017). El tipo de bajo riesgo solo presenta papilomas o verrugas, hiperplasia con engrosamiento de la capa espinosa del epitelio y proliferación capilar (Vega – García *et al.*,2018) (Cuevas - González *et al.*, 2018). Dichos genotipos son (VHP 6 y 11) los cuales se considerarían como VPH benignos (Egawa, & Doorbar, 2017).

Mientras algunos otros subtipos presentan un potencial riesgo oncogénico, principalmente se encuentran (VPH 16 y 18) (Montero, 2018) los cuales se han catalogado como responsables de alrededor del 70% de los casos de Cáncer Cérvico Uterino (Vega *et al.*, 2017). Además del 16 y 18 existen otros diez genotipos también clasificados como de alto riesgo los cuales son (VPH 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58 y 59) (IARC, 1996). En la tabla 2.2. se puede observar una clasificación donde involucran los tipos y los factores de riesgo.

Tabla 2.2. Clasificación de los genotipos del Virus del papiloma humano de acuerdo con su nivel de riesgo y enfermedades asociadas.

<i>Nivel de riesgo</i>	<i>Genotipos de VPH</i>	<i>Enfermedad asociada</i>
<i>Oncogénico de alto riesgo</i>	16, 18, 31, 35, 39, 45, 51, 52, 56,58, 59	Cáncer cervical, anal, vaginal, vulva, peniano, orofaríngeo y lesiones precursoras asociadas
<i>Tipos de bajo riesgo</i>	6, 11	Condilomas acuminados, papilomatosos laríngea recurrente
<i>Carcinogénico probable</i>	68	Cáncer cervical
	5,8	Carcinoma escamo celular de piel en epidermo-displasia verruciforme.

26, 30, 34, 53, 66, 67, 69, 70, 73, 82, 85, 97	Asociación a cáncer y lesiones precancerosas no confirmadas
---	---

2.3. Dispositivos Médicos

Se define como la sustancia, mezcla de sustancias, material, aparato o instrumento empleado solo o en combinación en el diagnóstico, monitoreo o prevención de enfermedades en humanos o auxiliares en el tratamiento de las mismas y de la discapacidad, así como los empleados en el reemplazo, corrección, restauración o modificación de la anatomía o procesos fisiológicos humanos ([NOM-241-SSA1-2012](#)).

2.3.1. Clasificación de los dispositivos médicos

De acuerdo con la norma oficial mexicana ([NOM-241-SSA1-2012](#)), los dispositivos médicos se clasifican de la siguiente forma.

Clase I: define a aquellos dispositivos médicos conocidos en la práctica médica cuya seguridad y eficacia están comprobadas y, que generalmente no se introducen en el organismo.

Clase II: define a aquellos dispositivos médicos conocidos en la práctica médica y que pueden tener variaciones en el material con el que están elaborados o en su concentración y, generalmente, se introducen al organismo permaneciendo menos de treinta días.

Clase III: define a aquellos dispositivos médicos nuevos o recientemente aceptados en la práctica médica, o bien que se introducen al organismo y permanecen en él, por más de treinta días.

2.4. Formas farmacéuticas de aplicación Vaginal

Dentro de los sistemas de administración vaginal disponibles comercialmente se incluyen una gran variedad de formas farmacéuticas como pueden ser semisólidos, tabletas, cápsulas, óvulos, preparaciones líquidas, films vaginales, anillos, espumas y tampones.

Las preparaciones más utilizadas para la liberación de fármacos de aplicación vaginal son las formas semisólidas (cremas, pomadas y geles) cuyas ventajas son la aceptabilidad, factibilidad y bajo costo. Por otra parte, la incomodidad y las pérdidas por escurrimiento son sus mayores inconvenientes (Hussain & Ahsan ,2005).

Un fármaco administrado por vía vaginal para ejercer un efecto local o sistémico debe poseer al menos un grado de solubilidad en el flujo vaginal. Por lo tanto, es importante tener en cuenta la naturaleza del flujo vaginal y sus características las cuales pueden repercutir en la absorción del fármaco (Touitou & Barry, 2006)

Para desarrollar formas farmacéuticas de administración vaginal, se deben tener en cuenta las siguientes consideraciones:

1. El mantenimiento de un pH óptimo para el epitelio vaginal
2. Facilidad de aplicación
3. Distribución del fármaco
4. Retención en la vagina
5. Compatibilidad con la coadministración de otros medicamentos

Existen varios tipos de preparaciones vaginales como se ha mencionado anteriormente, sin embargo, las más comunes junto con su definición se encuentran en la tabla 2.3. La descripción de las formas farmacéuticas se encuentra en la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos.

Tabla 2.3. Formas farmacéuticas comunes. Tomado de (FEUM,2011)

<i>Forma farmacéutica</i>	<i>Descripción</i>	<i>Aplicación</i>
<i>Cápsula</i>	Cuerpo hueco, obtenido por moldeo de gelatina, que puede ser de textura dura o blanda; dentro de la cual se dosifica el o los principios activos y aditivos en forma sólida.	Oral Vaginal
<i>Crema</i>	Preparación líquida o semisólida que contiene el o los principios activos y aditivos necesarios para	Tópico

<i>Espuma</i>	<p>obtener una emulsión generalmente aceite en agua, con un contenido de agua superior al 20%.</p> <p>Preparación líquida o semisólida que contiene el o los principios activos y aditivos, y otra gaseosa que lleva gas propulsor para que el producto salga en forma de nube.</p>	Vaginal
<i>Gel</i>	<p>Preparación semisólida que contiene los principios activos y aditivos, constituido por lo general por macromoléculas dispersas en un líquido que puede ser agua, alcohol o aceite, que forman una red que atrapa el líquido y que restringe su movimiento, por lo tanto, son preparaciones viscosas</p>	Tópico Vaginal
<i>Óvulo</i>	<p>Presentación sólida a temperatura ambiente que contiene los principios activos y aditivos de forma ovoide o cónica, con un peso de 5 o 10 g, preparado generalmente con gelatina glicerinada o con polietilenglicoles.</p>	Vaginal

2.5. Hidrogeles

De acuerdo con (FEUM,2011) los hidrogeles son sistemas semisólidos con un alto contenido acuoso o hidroalcohólico y baja o media viscosidad conferida por un agente gelificante, en la industria farmacéutica se usan principalmente para la administración de principios activos en forma tópica o en el interior de cavidades corporales, los cuales pueden clasificarse de acuerdo a diversos factores como se muestra en la figura 2.3.

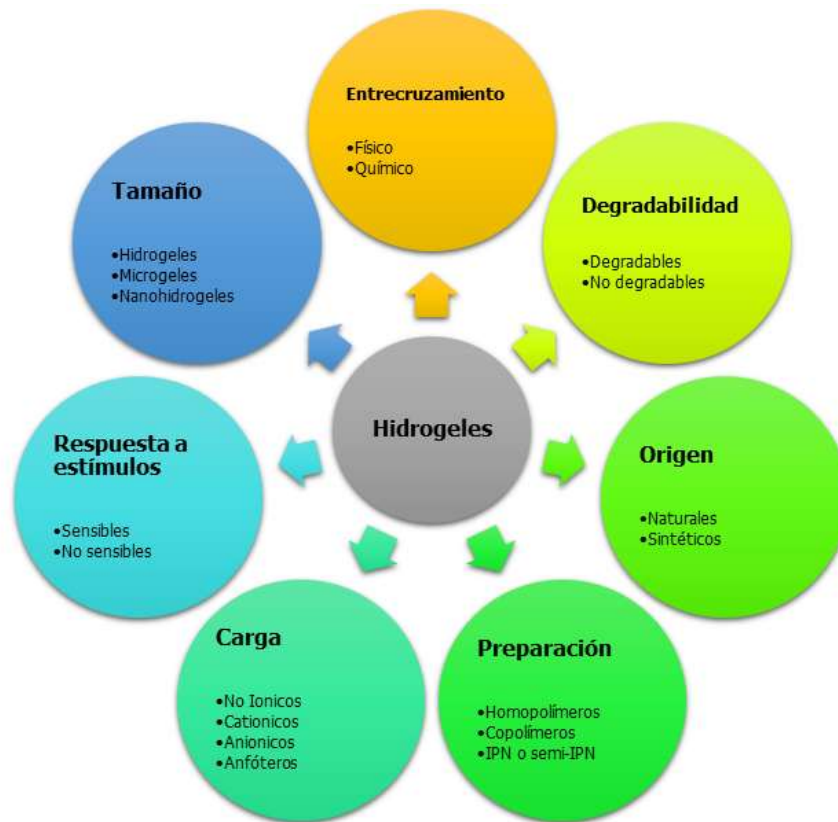


Figura 2.2. Clasificación de los hidrogeles.

2.5.1. Mecanismos de formación

El mecanismo de gelificación se puede clasificar de la siguiente manera:

- **Polímeros dependientes del pH del medio**

A bajos valores de pH se disocia una pequeña porción de los grupos carboxílicos del polímero, formando una especie de espiral figura 2.4.

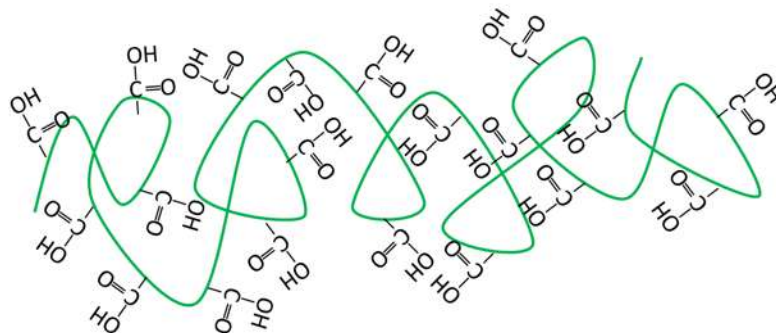


Figura 2.3. Estructura de la forma helicoidal de los grupos carboxílicos de un polímero gelificante.

La adición de una base fuerte produce la disociación de los grupos carboxílicos mediante una reacción de ionización, creando una repulsión electrostática entre las regiones cargadas, dando como resultado la expansión de la molécula, haciendo una consistencia más rígida Figura 2.5.

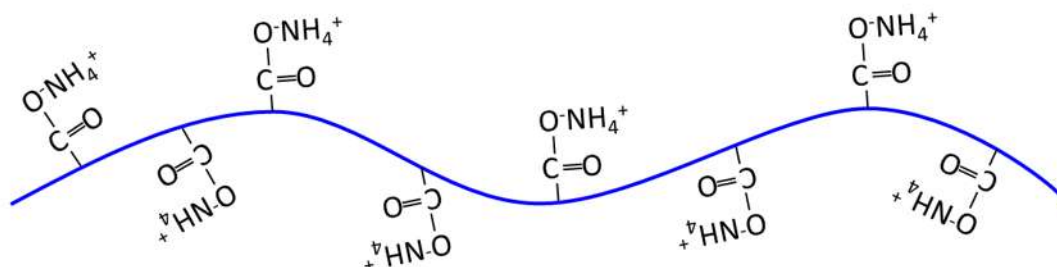


Figura 2.4. Disociación de los grupos carboxílicos del polímero por acción de una base.

Pasando de una estructura en forma helicoidal a una más extendida. Cabe resaltar que si se excede en la concentración de base se puede producir un aumento considerable de la viscosidad del sistema debido a la neutralización de los ácidos carboxílicos.

Este tipo de geles se consideran como geles químicos (Martínez, 2016) o reticulados químicamente. En comparación con los geles físicos estos son más estables e irreversibles y se forman por enlaces covalentes entre las cadenas de polímero (Hennink & Van Nostrum, 2022).

Una base fuerte puede desprotonar completamente un ácido carboxílico, por ejemplo, el hidróxido de sodio puede desprotonar el ácido poliacrílico y así formar una red reticulada extendida en solución (Wade, 2004) en la figura 2.6. Se muestra un mecanismo de formación asociado a esta reacción.

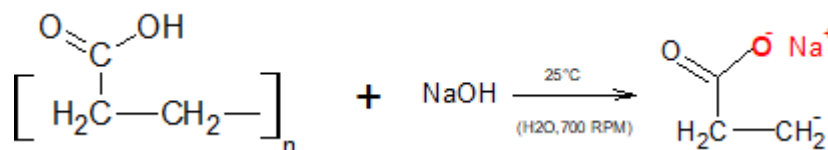


Figura 2.5. Mecanismo de formación de un hidrogel a base de ácido poliacrílico neutralizado con una base fuerte NaOH.

Sin embargo, en este tipo de procesos también puede tener un efecto neutralizador una base débil como una amina, y por consecuencia un cambio en la estructura molecular del polímero, es decir, en sistemas acuosos el método más común para inducir el espesamiento a través de este mecanismo es la introducción de bases orgánicas (aminas) e inorgánicas (hidróxido de sodio), que aumentan el pH y son capaces de ionizar los grupos ácidos a lo largo de la estructura polimérica formando iones carboxilato negativos y desencadenando la repulsión iónica (Ethier *et al.*,2019). Tal como se muestra en la figura 2.7.

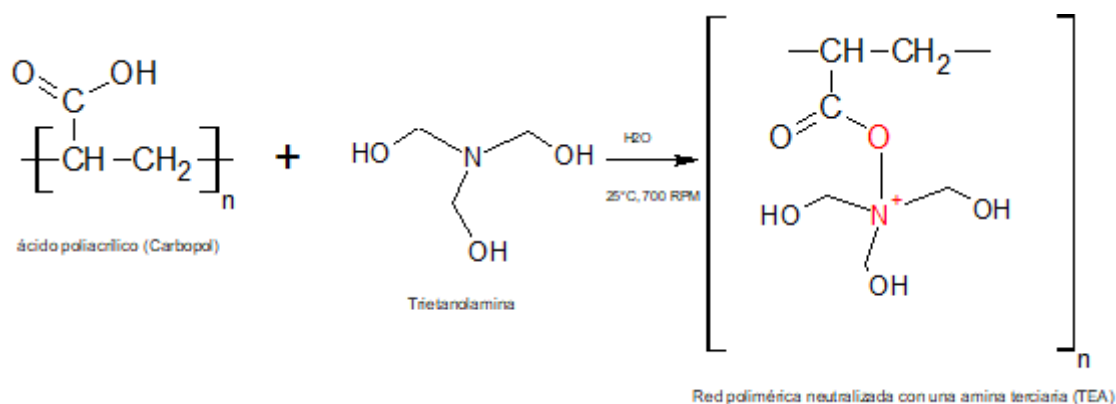


Figura 2.6. Mecanismo de formación de un hidrogel a base de ácido poliacrílico neutralizado con una base débil Trietanolamina (TEA).

- **Polímeros independientes del pH del medio**

Estos polímeros son capaces de gelificar sin ser neutralizados, es decir, no es indispensable de la acción de una base. Este tipo de geles forman puentes de hidrógeno entre el solvente y los grupos carboxílicos del polímero.

2.5.2. Factores que afectan la gelificación de los polímeros

De acuerdo con (De la Cadena, 2011) los factores que causan complicaciones en el proceso de gelificación, tales como separación de fases, precipitación y gelificación de las soluciones de los polímeros son:

- **Temperatura:** El aumento de la temperatura de un gel es directamente proporcional a la separación de fases.

- **Concentración del polímero:** La concentración alta del polímero incide directamente en la consistencia semisólida del gel, es decir, aumenta la viscosidad del sistema.
- **Peso molecular del polímero:** Los polímeros en polvo que son disueltos en agua frecuentemente producen la formación temporal de los geles dicha particularidad provoca que el proceso de gelificación se ralentice, este fenómeno se debe a la mala difusión del agua a través de los grumos de polvo y solamente gelifica las partículas de la capa externa del grumo, lo que provoca que se encapsule polvo seco.

2.6. Clasificación de los geles

Existen varias formas de clasificar los geles, entre los que destacan:

a) Dependientes de su comportamiento sobre el agua

- *Geles hidrófilos o hidrogeles:* Se trata de materiales poliméricos entrecruzados en forma de red tridimensional, pueden ser de origen natural o sintético, este tipo de materiales se hinchan en contacto con el agua, glicerol, propilenglicol, entre otros, formando materiales blandos y elásticos, al ser gelificados con polímeros como la goma tragacanto, almidón, derivados de la celulosa, polímeros de carboxivinilo o silicatos de magnesio y aluminio. El gel formulado en la presente investigación pertenece a este grupo.
- *Geles hidrófobos u oleogeles o lipogeles:* Están constituidos por parafina líquida adicionada de polietileno por aceites grasos gelificados por anhídrido silícico o por jabones de aluminio y zinc, son vehículos oleosos oclusivos, este tipo de geles se emplea generalmente en dermatología y preparados oftálmicos.

b) Según el número de fases

- *Monofásicos:* Consisten en geles compuestos por macromoléculas orgánicas distribuidas de modo uniforme a través de un líquido de manera que no existen barreras aparentes entre las moléculas dispersas en el líquido. Este tipo de geles pueden obtenerse de macromoléculas o gomas

naturales, el medio líquido lo constituye una sola fase o líquidos miscibles: agua-alcohol, solución hidroalcohólica, aceite, etc. (Gennaro, 2003).

- *Bifásicos*: se presenta cuando un gel está constituido por una red de partículas pequeñas separadas, el gel se clasifica como un sistema bifásico, por ejemplo, gel de hidróxido de aluminio. En sistema bifásico, se considera que, si el tamaño de las partículas es relativamente grande, se designa el nombre de magna, por ejemplo, magna de bentonita. Este tipo de geles están constituidos por dos fases líquidas inmiscibles, formándose una estructura transparente con propiedades de semisólido. (Gennaro, 2003).
- c) Por su viscosidad: el grado de viscosidad de los geles depende de diversos factores como el tipo de polímero, la temperatura de operación y la relación con el soluto. (García *et al.*,2012). La viscosidad es una propiedad reológica del material la cual mide la intensidad de disipación de energía necesaria para mantener la deformación continua de un fluido (Macosko, 1994).

Geles fluidos: Geles con la característica principal es una viscosidad típica se encuentra en un intervalo de 1.00 Pa*s (García *et al.*,2012).

Geles semisólidos: Geles con un valor de viscosidad η en un intervalo de 30500 a 39.400 Pa*s cuando el agente gelificante es carbopol (USP XXVIII, 2004).

Geles sólidos: Geles con apariencia sólida que presentan parámetros fisicoquímicos que difieren en comparación de los dos anteriores.

2.7. Componentes básicos de los geles

- *Principio activo*: se considera como una sustancia en esencia químicamente definida, o bien, microbiológicamente definida cuando el principio activo se trata de un microorganismo, la principal función es esencialmente para ser aprovechados sus efectos terapéuticos.
- *Vehículo*: Sustancias inertes de naturaleza acuosa u oleosa. Cuando la fórmula farmacéutica es líquida, el diluyente se conoce como vehículo, que puede ir o no acompañado de otros excipientes, el vehículo es el elemento imprescindible de estas formulaciones.

- *Agente neutralizante:* Generalmente se incorporan a la formulación de geles pH dependientes como es el caso del gel de la presente investigación. En la mayoría de los casos se trata de bases orgánicas o inorgánicas, tales como NaOH, trietanolamina (TEA) o aminometilpropanol (AMP). La naturaleza de la base neutralizante puede influir en ocasiones en el tacto y en la transparencia final del preparado, en líneas generales, cuanto más fuerte es la base, más rígidos y transparentes son los geles obtenidos.
- *Agentes conservantes:* su función es la de mantener las características organolépticas y microbiológicas del dispositivo médico el mayor tiempo posible.
- *Agente gelificante:* Son sustancias poliméricas orgánicas capaces de formar estructuras tridimensionales en medio líquido, es decir, al entrar en contacto con una sustancia con la cual forma una interacción química puede provocar un cambio de viscosidad

2.7.1. Polímeros más utilizados en geles de aplicación vaginal

Existe una amplia variedad de excipientes farmacéuticos para la formulación de geles de aplicación vaginal, sin embargo, cada uno de ellos se caracteriza por poseer particularidades específicas, en la tabla 2.4 se muestra una recopilación de aquellos polímeros que han sido empleados en formulaciones vaginales.

Tabla 2.4. Compilación de polímeros utilizados en formulaciones en gel para aplicación vaginal.

Origen	Nombre del polímero	Definición	Característica
Natural	Quitosano	Copolímero poli catiónico natural formado por glucosamina y N-acetilglucosamina, este polímero es obtenido por desacetilación parcial de quitina, la cual tiene origen del exoesqueleto de crustáceos.	La presencia de grupos amino permite la adhesión a la mucosa mediante enlaces de hidrógeno.
	Pectina	Polímeros naturales que son obtenidos a partir de la pared celular de diversos vegetales, consisten en heteropolisacáridos formados por cadenas lineales de ácido	Por su composición permite a los sistemas constituidos por pectinas generar geles

		galacturónico 1-4 que interactúan hinchables, mucoadhesivos y ramnosas 1-2 que a su vez pueden biocompatibles. incorporar arabinosas o galactosas,
	Ácido hialurónico	Es un polisacárido natural con diversas propiedades fisicoquímicas, este polisacárido lineal presenta unidades repetitivas de disacárido de ácido glucurónico y N-acetilglucosamina y se encuentra en la matriz extracelular de los tejidos conectivos.
	Goma Xantana	La goma xantana es un polisacárido natural y un importante biopolímero industrial. Su cadena principal consta de unidades de β -D-glucosa unidas en las posiciones 1 y 4. La estructura química de la cadena principal es idéntica a la de la celulosa.
Semisintético	Derivados de la celulosa	Polímeros obtenidos por tratamiento y modificación de la celulosa, tales como la Carboximetilcelulosa, la Metilcelulosa y la hidroxipropilmetilcelulosa, siendo el primero de ellos de carácter iónico al ser un poli anión.
	Polisacáridos sulfatados	Compuestos polianiónicos cuyo origen es extraído de algas marinas.
Sintético	Poliacrílatos	Derivados sintéticos de ácidos poliacrílicos derivados de la polimerización de ésteres y sales de ácido acrílico.
		Presenta alta biocompatibilidad además se ha caracterizado por ser un agente capaz de modular la liberación del fármaco.
		Fácil hidratación para producir geles débiles con propiedades de adelgazamiento por cizallamiento.
		Permanencia de tiempo prolongado sobre la mucosa sin presentar efectos tóxicos ni modificaciones fisiológicas.
		Los compuestos polianiónicos tienen la capacidad de inhibir la replicación del Virus del Herpes Simplex.
		Presentan excelentes características reológicas y de hinchamiento.

2.7.2. Poliacrilatos

El poliacrilato sódico es un tipo de polímero de síntesis química utilizado a nivel mundial en diferentes tipos de productos, una de las características principales es absorber. Es por ello que este compuesto es altamente popular en el mercado debido a su capacidad absorbente, pues tiene se ha reportado anteriormente su solubilidad en agua y otros solventes.

El Carbopol es un poliacrilato que se identifica en una familia de polímeros basada en la química del ácido acrílico reticulado modificado. Los polímeros se producen a partir de partículas de polímero primario de aproximadamente 0,2 a 6,0 μm de diámetro promedio (Di Giuseppe *et al.*, 2015). Cada partícula se puede apreciar como una estructura de red de cadenas poliméricas interconectadas a través de enlaces cruzados. Estos polímeros, disponibles como polvos blancos esponjosos (Figura 2.8.), absorben agua, se hidratan y se hinchan. Son modificadores de la reología (Chen *et al.*, 2019) que se utilizan para impartir beneficios de espesamiento, suspensión y estabilización. Los grupos carboxilo proporcionados por la columna vertebral de ácido acrílico del polímero son responsables de los beneficios del producto.



Figura 2.7. Ácido poliacrílico previo y posterior al proceso de hidratación y neutralización

Cuando el carbopol se dispersa en agua, cada molécula de polímero individual se hincha hasta 1000 veces su volumen anterior (Laftah, Hashim & Ibrahim, 2011; Opong y de Bruyn, 2011) formando una apariencia bastante parecida a un mucílago. Al dispersarse en agua, la molécula comienza a hidratarse por presión osmótica y desenrollarse generando un ligero aumento de la viscosidad. El intervalo de pH típico durante la dispersión inicial es de 2,8 a 3,2 debido a la naturaleza ácida del polímero. El

pKa de estos polímeros es $6,0 \pm 0,5$ con los grupos de ácido carboxílico ionizándose para extender la molécula (Ethier *et al.*,2019). Para que los polímeros se desenrollen completamente, debe ocurrir una repulsión iónica en la columna vertebral del polímero.

2.8. Factores físicos en la calidad de un gel vaginal

2.8.1. pH.

El mantenimiento de un pH ácido contribuye a la fisiología y microbiota vaginal en homeostasis, así como a una respuesta inmunitaria equilibrada. Los productos vaginales deben presentar compatibilidad con el pH vaginal e, idealmente, mantenerlo o incluso ayudar a su restablecimiento (p. ej., en casos de vaginitis bacteriana o mujeres menopáusicas (Wu *et al.*, 2007) (Fiorilli *et al.*,2005).

2.8.2. Capacidad de amortiguamiento

Además de la compatibilidad con el pH, los productos vaginales deben ser capaces de permitir el mantenimiento del ambiente ácido vaginal y generar resistencia a los cambios, en especial de aumento del pH. De hecho, se ha propuesto el uso de geles tamponadores de ácido para el restablecimiento del pH en casos de infección (Simoes *et al.*, 2006) o atrofia menopáusica (Sinha & Ewies, 2013).

2.8.3. Viscosidad

Es difícil acotar un valor ideal de la viscosidad de los geles vaginales, sin embargo, los geles vaginales idealmente deberían poseer una excelente capacidad para cubrir la mucosa vaginal además con una capacidad de retención de la formulación *in situ* (Stanković *et al.*,2012). Existen diversos factores físicos que afectan la viscosidad de los geles vaginales, en primer lugar, la composición de los geles, es decir, los polímeros base de las formulaciones, la temperatura (especialmente importante para los geles termolábiles), el valor del pH vaginal, el líquido que se puede encontrar en la vagina (líquido vaginal, semen) entre otros. La temperatura, el valor del pH y las interacciones con los fluidos presentes en la vagina pueden causar cambios en la viscosidad, lo que debe tenerse en cuenta cuando se diseñan las formulaciones. Se encontró que pequeñas variaciones en la composición del gel conducen a cambios en su viscosidad (Neves *et al.*,2009).

2.8.4. Propiedades reológicas

La caracterización reológica de los geles vaginales generalmente se dificulta debido a su naturaleza viscoelástica inherente. Utilizando técnicas como la reología oscilatoria y de fluencia, es posible cuantificar las propiedades viscosas y elásticas de los geles en diferentes escalas de tiempo, temperatura o pH y, por lo tanto, comprender las propiedades dinámicas y estructurales de estos sistemas (Yu *et al.*, 2011). Aunque suele ser complicada, la viscoelasticidad es de particular interés para la administración vaginal de fármacos o dispositivos médicos. La modulación del equilibrio visco-elástico permite que la formulación de geles que poseen altos niveles de elasticidad y aún conservan el carácter de flujo viscoso bajo altas cargas de estrés (Hombach & Bernkop-Schnürch, 2009). Por lo tanto, a través de una selección cuidadosa de los excipientes, los geles pueden diseñarse para ofrecer facilidad de aplicación, una distribución intravaginal adecuada y una mayor residencia debido a una capacidad mejorada para resistir el estrés *in vivo*, particularmente después de la dilución (Andrews, Laverty & Jones, 2009).

2.8.5. Interacciones químicas

La espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier de reflexión total atenuada (ATR FTIR) generalmente se utiliza para caracterizar las materias primas. En el estudio FTIR además se obtiene información sobre las interacciones entre los diversos componentes de los hidrogeles.

2.9. Factores Biológicos en la calidad de un gel vaginal

2.9.1. Mucoadhesión.

La mucoadhesión se define como la capacidad de unión de un polímero sintético o natural al tejido biológico (Jiménez-Castellanos, Zia & Rhodes, 1993). Hasta el momento, se ha buscado diseñar formulaciones mucoadhesivos para diversas vías de administración, vaginal (Valenta *et al.*, 2001) (Cevher *et al.*, 2008) (Lee & Chien, 2013) y otras vías. Los sistemas de administración de fármacos mucoadhesivos son capaces de aumentar la biodisponibilidad de los compuestos activos al extender su tiempo de residencia y además controlar la liberación del fármaco en la región deseada (Smart *et al.*, 1984) (Lee & Chien, 1996). Es importante destacar que existe un alto contacto entre el material mucoadhesivos y el tejido biológico es crucial para que se produzca la

mucoadhesión. Debido al efecto humectante de la superficie intermedia, el polímero se hincha provocando la interpenetración mutua y la formación de enlaces químicos de baja energía entre la mucosidad y el material polimérico (Park & Robinson, 1985). Los ejemplos de polímeros mucoadhesivos usados en sistemas de administración vaginal de fármacos incluyen Quitosano, almidón, colágeno, gelatina, derivados de celulosa, alginato de sodio y ácidos poliacrílicos.

2.9.2. Citotoxicidad

La citotoxicidad celular se puede comprender como una alteración de las funciones celulares básicas que conlleva a un daño que puede ser detectado (MY & Nizam WA, 2020). Diferentes autores han desarrollado distintas pruebas *in vitro* para predecir los efectos tóxicos de diversos compuestos como fármacos, extractos vegetales etc., utilizando como modelos experimentales cultivos primarios como líneas celulares establecidas.

Uno de los métodos más empleados para determinar la citotoxicidad de un material es el ensayo MTT, el cual consiste en un método de tinción celular con el fin de estimar de manera indirecta el número de células viables presentes después de un tratamiento. (Escobar *et al.*, 2010).

El ensayo MTT se basa en la reducción de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolio bromuro. Este colorante amarillo pálido, soluble en agua, es reducido tempranamente en células viables, por componentes de la cadena respiratoria, a cristales de formazan cuya característica principal es su color azul violeta el cual es insoluble en agua, este fenómeno es dado por la cadena respiratoria y su flujo de electrones, lo cual es intrínsecamente tóxico para las células (Putnam *et al.*, 2002) (Bernas & Dobrucki, 2002).

2.9.3. Viabilidad probiótica

Debido a las características beneficiosas de las bacterias ácido lácticas, existe un gran interés creciente en el uso potencial de estas bacterias como probióticos para mantener una salud urogenital normal (Anukam, 2007). La Organización Mundial de la Salud y la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación han

definido a los probióticos como “microorganismos vivos que, cuando se administran en cantidades adecuadas, propician un beneficio para la salud del huésped” (Iannitti & Palmieri, 2010).

Un probiótico puede ser capaz de tener efectos indirectos sobre el tratamiento y la prevención de la vaginosis bacteriana recurrente o directamente mediante la secreción de sustancias (p. ej., peróxido de hidrógeno, bacteriocinas y ácido láctico) que inhiben los patógenos (Bolton *et al.*, 2008).

Las formas de dosificación vaginal disponibles incluyen cremas, geles, tabletas, cápsulas, pesarios, espumas, ungüentos, películas, tampones, anillos y duchas vaginales. Si bien la mayoría de los medicamentos vaginales hasta ahora se han presentado en forma de geles, para poder garantizar la viabilidad de los probióticos en las formulaciones, el método de diluciones en placa utilizando medio de agar MRS (Borges & Teixeira, 2014).

2.10. Probióticos en formulaciones vaginales

La microbiota vaginal está conformada principalmente por una población densa de microorganismos. En la vagina, las cantidades y categorías de microorganismos residentes fluctúan de acuerdo con ciertos factores, como los niveles hormonales, el contacto sexual, las prácticas de duchas vaginales, la dieta, entre otros (Reid, 2003). La microbiota vaginal es fundamental en la salud ginecológica, debido a que las bacterias pueden permanecer en un estado homeostático a un estado disbiótico provocando un proceso patogénico (Chenoll *et al.*, 2019). La Vaginosis Bacteriana es la principal causa de disbiosis vaginal, considerada la infección del tracto genital más común en las mujeres a lo largo de su vida reproductiva, este suceso mantiene una relación estrecha con resultados adversos graves para la salud reproductiva y obstétrica, como parto prematuro y adquisición o transmisión de varios agentes de transmisión sexual (Thoma *et al.*, 2011). Al ser de naturaleza microbiana en la cual interfieren diversas especies, la vaginosis bacteriana se caracteriza por una disminución de lactobacilos positivos y un aumento significativo en el número de microorganismos anaerobios, entre ellos *Gardenella vaginalis*, *Atopobium vagiane*, *Molbiluncus spp.*, *Bacteroides spp.*, *Prevotella spp.* Entre otros.

La vaginosis bacteriana incluye la existencia de una gruesa biopelícula conformada por diversos microorganismos endémicos de la cavidad vaginal, en la que *G. vaginalis* es la especie más confluyente (Castro, Machado & Cerca, 2016). La frecuencia de atención para la vaginosis bacteriana consiste en una terapia antibiótica basada en metronidazol o clindamicina convencionalmente, la cual es incapaz de erradicar por completo las biopelículas vaginales, lo que puede explicar la existencia de altas tasas de recurrencia de la reinfección (Chetwin *et al.*, 2019). Además, la terapia prolongada con antibióticos también puede dañar la microbiota vaginal saludable (Castro, Machado & Cerca, 2016). Estas cuestiones generaron la aparición de diferentes e interesantes estrategias terapéuticas, como el uso de prebióticos y/o probióticos (Al-Ghazzewi & Tester, 2016). Los probióticos se usan con más frecuencia para mejorar la salud gastrointestinal, sin embargo, se ha demostrado que pueden ser beneficiosos para prevenir o tratar problemas gineco-obstétricos. Los probióticos son microorganismos vivos, en su mayoría pertenecen al género *Lactobacillus*, los cuales se utilizan principalmente para restaurar la microbiota vaginal fisiológica para tratar, además de la vaginosis bacteriana y la candidiasis vulvovaginal (Buggio *et al.*, 2019).

2.10.1. *Lactococcus lactis* ATCC 11454

Es una bacteria ácida láctica que principalmente se encuentra en la leche y productos lácteos (Martínez, 1996), se caracteriza por producir nisina el cual tiene un efecto antimicrobiano, la nisina ha sido usada como conservante cosmético y alimenticios (Mauricio *et al.*, 2017). Estudios realizados por (Nami *et al.*, 2015) demuestran que exhiben una adherencia favorable frente a líneas celulares además de presentar efectos inhibitorios y actividad antimicrobiana sobre cepas de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Shigell flexneri*.

2.10.2. Bacteriocinas

Las bacteriocinas son péptidos de bajo peso molecular que pueden ser secretados por líneas bacterianas selectas que posiblemente tienen actividad antagónica para degradar células sensibles presentes en el mismo ecosistema que compiten por alimentos y otros nutrientes (Juturu & Wu, 2018). Además, existen pocas bacteriocinas asociadas con su propiedad antimicrobiana nativa también exhiben propiedades

antivirales y antifúngicas. Las bacteriocinas generalmente son producidas por bacterias Gram positivas, Gram negativas y otros microorganismos como las arqueas (Cotter *et al.*,2005). Las Bacteriocinas de bacterias Gram positivas, especialmente de bacterias productoras de ácido láctico han sido recientemente investigadas considerando su gran bioseguridad y amplitud sobre aplicaciones industriales. Las bacteriocinas que metabolizan bacterias productoras de ácido láctico generalmente son aisladas de leche fermentada y productos lácteos, rumen de animales y suelo mediante un ensayo de antagonismo diferido. (Juturu & Wu, 2018).

La nisina es la única bacteriocina aprobada por la FDA para su aplicación como conservante de alimentos, que es producida por la bacteria *Lactococcus lactis* (De Arauz *et al.*,2009) .Su estructura cristalina muestra que sus propiedades antimicrobianas se deban a la unión del amino terminal a la molécula de lípido II que inhibe la síntesis de peptidoglucano y terminal carboxilo forma poros en la membrana celular bacteriana que conduce a la lisis celular (Scherer *et al.*,2015) (Hsu *et al.*, 2004).

3. JUSTIFICACIÓN

Hoy en día, es muy común que los expertos en salud diagnostiquen infecciones relacionadas con atrofia vulvovaginal, causado por agentes patógenos en relación con el estilo de vida de las pacientes, sin embargo, este es un tema controversial y de bastante preocupación. Diversos estudios han demostrado que la atrofia vulvovaginal y el desequilibrio en la microbiota vaginal aumenta la probabilidad de contraer una infección de transmisión sexual como lesiones causadas por el VPH.

Es por ello que, en los últimos años, las industrias farmacéuticas han mostrado interés en la síntesis de productos innovadores a base de biomateriales funcionales. En la presente investigación se busca formular un hidrogel neutralizado para aplicación vaginal considerando principalmente un sistema sintético/natural (carbopol 940/ Goma Xantana), el cual deberá cumplir con características y especificaciones farmacotécnicas en concordancia con la normativa ICH, Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos (FEUM), Farmacopea de los Estados Unidos de América (USP).

4. HIPÓTESIS

La concentración de Carbopol 940 y Goma Xantana permitirá formular un hidrogel neutralizado con características fisicoquímicas y biológicas adecuadas para su potencial aplicación en la salud vaginal.

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo General

Formular un hidrogel a base de Carbopol 940 y Goma Xantana para su potencial uso en la salud vaginal.

5.2. Objetivos específicos

- Formular hidrogeles de Carbopol 940 y Goma Xantana neutralizados con diferentes bases (TEA, AMP, NaOH).
- Evaluar las propiedades fisicoquímicas de los hidrogeles bajo tres condiciones (No esterilizado, esterilizado y esterilizado diluido en SFV), de acuerdo a parámetros fisicoquímicos: pH, viscosidad, capacidad de amortiguamiento, interacciones moleculares mediante espectroscopia FTIR y propiedades reológicas.
- Determinar la viabilidad bacteriana de la cepa *Lactococcus lactis* ATCC 11454 en dilución directa de los hidrogeles mediante conteo en placa.
- Evaluar la citocompatibilidad *in vitro* en células *HeLa* cultivadas sobre los hidrogeles, a través de microscopia de fluorescencia (Kit *Live-Dead*®) y la técnica de MTT.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. Selección de excipientes

Basado en los siguientes modelos de excipientes se pretende diseñar una pre-formulación para poder establecer un diseño experimental en un software que permita definir las cantidades y combinaciones óptimas para formular un hidrogel con las siguientes características: Hidratante, no susceptible a cambios de pH, promueva la epitelización, Biocompatible con bacterias probióticas, cito-compatible con líneas celulares del entorno vaginal, propiedades reológicas.

Además, es pertinente realizar una búsqueda en el estado del arte en publicaciones JCR y en productos comerciales para obtener una selección eficaz sobre los excipientes con el fin de obtener un gel con las características requeridas.

6.2. Diseño experimental factorial 2³

Para la presente investigación se propone una pre-formulación en la cual se propone como factor inicial para el diseño experimental factorial 2³ teniendo como factores la concentración de los polímeros (Carbopol 940 y Goma Xantana), analizando los niveles altos 1% y niveles bajos 0.5%. La concentración de neutralizante dependerá de la cantidad suficiente para obtener un pH de 5 - 6. Ver tabla 6.1. El análisis estadístico del diseño exclusivamente para la pre-formulación se llevó a cabo en el software Statgraphics Centurion ®.

Tabla 6.1. Niveles y factores correspondientes a la pre-formulación de los hidrogeles

	Muestra 1		Muestra 2		Muestra 3	
Niveles y Factores	Sin neutralizante		Trietanolamina (TEA) c.b.p [pH – Viscosidad]		Aminometil propanol (AMP) c.b.p [pH – Viscosidad]	
	Carbopol 940	Xantana	Carbopol 940	Xantana	Carbopol 940	Xantana
Alto	1%	1%	1%	1%	1%	1%

Bajo 0.5% 0.5% 0.5% 0.5% 0.5% 0.5%

6.3. Preparación de hidrogeles pre-formulados

De acuerdo con lo establecido en el diseño experimental factorial 2^3 se establecieron como variables de respuesta la viscosidad y el pH, puesto que para propósitos del experimento y por especificación del viscosímetro de Brookfield se requiere un mínimo de muestra de 600 gr.

Se pesó el carbopol 940 (Balanza analítica Cobos) y se tamizó con tamaño de poro de 0.5 milímetros. En agitación magnética (Parrilla magnética Corning) a 700 rpm se agregó el carbopol 940 previamente tamizado dejando caer sobre el vórtice, posteriormente se dejó reposar 24 h para garantizar la solubilidad del carbopol. Posterior al tiempo se pesó la cantidad necesaria de goma xantana y se agregó a la solución de carbopol dejando reposar 4 h. transcurrido el tiempo se realizó una agitación manual hasta obtener una mezcla homogénea.

6.3.1. pH

Se tomaron alícuotas de cada una de las muestras para registrar su valor de pH (Potenciómetro Bante Instruments modelo 210) sumergiendo el electrodo del potenciómetro en cada una de las muestras, manteniendo la temperatura a 25°C.

6.3.2. Viscosidad dinámica

La medición de la viscosidad de loa hidrogeles se realizó en un viscosímetro Brookfield modelo RVP No. de serie 68721. El hidrogel se hace rotar a 20 rpm durante 3 minutos, se registró la lectura del spin correspondiente, para determinar la viscosidad en Pa*s, se toman en cuenta los valores de la tabla 6.2 y la viscosidad se calcula mediante la ecuación 6.1.

Tabla 6.2. Factores de conversión para viscosímetro de Brookfield

SPIN	2 rpm	4 rpm	10 rpm	20 rpm	50 rpm
1	50	25	10	5	2

2	200	100	40	20	8
3	500	250	100	50	20
4	1000	500	200	100	40
5	2000	1000	400	200	80
6	50000	2500	1000	500	200
7	20000	10000	4000	2000	800

$$\text{Viscosidad} = \text{Lectura} * \text{Factor} \tag{6.1}$$

6.4. Formulación de hidrogeles

Posterior a los resultados y análisis del diseño experimental se determinó que las concentraciones óptimas de Carbopol 940 y goma xantana son 1% y 0.5% respectivamente.

Por lo tanto, se proponen las siguientes formulaciones definitivas para las caracterizaciones fisicoquímicas y biológicas además de considerar el proceso de esterilización por autoclave para cada una de las formulaciones, como se describe en la Tabla 6.3.

Tabla 6.3. Contenido de la formulación de los hidrogeles

	F₁	F₂	F₃	F₄	F₅
<i>Carbopol 940</i>	1%	1%	1%	1%	1%
<i>Xantana</i>	0.5%	0.5%	0.5%	0.5%	0.5%
<i>Glicerina</i>	10%	10%	10%	10%	10%
<i>Neutralizante</i>	-----	TEA	AMP	NaOH	NaOH
<i>Nisina</i>	0.05%	0.05%	0.05%	0.05%	0.05%
<i>EDTA</i>	0.1%	0.1%	0.1%	0.1%	-----
<i>Ácido Láctico</i>	1.5 %	1.5 %	1.5 %	1.5 %	-----
<i>Ácido Hialurónico</i>	0.125%	0.125%	0.125%	0.125%	0.125%

6.5. Caracterización Fisicoquímica

6.5.1. Preparación de los hidrogeles

Se pesó carbopol 940 y se dispersó en una mezcla de agua destilada y glicerina, la dispersión se mantuvo en reposo durante 24 horas para permitir una hidratación completa. Luego se mezcló con la Goma Xantana y se mantuvo en agitación constante a 700 rpm, al observar una solubilidad completa se adicionaron los principios activos (Ácido hialurónico y ácido láctico) se lleva continuamente a agitación constante a 700 rpm, posteriormente se mezclaron los conservantes (Nisina, EDTA) la dispersión obtenida se neutralizó con la base correspondiente.

6.5.2. Análisis macroscópico

Las formulaciones preparadas se inspeccionan visualmente para comprobar su color, homogeneidad, consistencia y capacidad de esparcimiento.

6.5.3. Capacidad de amortiguamiento

La capacidad amortiguadora de los productos se evaluó mediante titulación ácido-base a temperatura ambiente, como se describió previamente por ([Garg et al., 2002](#)). Brevemente, se añadió hidróxido de sodio 1N en incrementos de 20 μ L a 1 g de muestra previamente diluida en 10 mL de solución salina normal y con agitación. El pH se registró después de cada adición y después de la estabilización, hasta alcanzar un valor de pH máximo de 10 o bien hasta romper la capacidad de amortiguamiento. El mismo conjunto de experimentos se realizó además utilizando un simulador de fluido vaginal (SFV) como medio de dispersión para los productos considerados. El SFV se preparó de acuerdo con ([Owen & Katz, 1999](#)) y contenía cloruro de sodio (3,51 g), hidróxido de potasio (1,40 g), hidróxido de calcio (0,222 g), albúmina bovina (0,018 g), ácido láctico (2,00 g), ácido acético glacial (1,00 g), glicerina (0,16 g), urea (0,4 g), dextrosa (5,0 g) y agua (suficiente para completar un litro). El pH se ajustó a 4,2 con ácido clorhídrico.

6.5.4. Viscosidad dinámica

La medición de la viscosidad de las formulaciones se realizó en un viscosímetro Brookfield modelo RVP No. de serie 68721. El hidrogel se hizo rotar a 20 rpm durante 3

minutos, se registró la lectura del spin correspondiente. Las mediciones se realizaron bajo 3 condiciones Hidrogeles no esterilizados, esterilizados y esterilizados diluidos en SFV en una relación de 5mL de gel en 0,75mL de SFV. Para determinar la viscosidad en Pa*s, se tomaron en cuenta los valores de la tabla 6, para determinar el valor de la viscosidad se utilizó la ecuación 6.1.

6.5.5. pH

El pH de las formulaciones se midió a 25° C sumergiendo directamente un electrodo (Potenciómetro Bante Instruments modelo 210) en las muestras. Las mediciones se realizaron bajo 3 condiciones Hidrogeles no esterilizados, esterilizados y esterilizados diluidos en SFV en una relación de 5mL de gel en 0,75mL de SFV.

6.5.6. Propiedades Reológicas

Utilizando un reómetro rotatorio AR 1000 (TA Instruments, CIATEJ Zapopan) utilizando una geometría cónica de 60 mm de diámetro y 1°1'1" en el modo de oscilación con barrido de frecuencia de 0.1 a 10 Hz y porcentaje de deformación con una temperatura fija de 37°C para evaluar el efecto de la dilución por secreciones vaginales sobre la capacidad de gelificación del hidrogel *in situ*, se llevaron a cabo medidas similares en las mezclas de los geles con simulado de fluido vaginal en la relación de 5mL de gel en 0,75mL de SFV. Se preparó SFV de acuerdo con la metodología descrita por (Owen & Katz, 1999). El Cálculo del módulo G' y G'' se realizó en el software TA instruments.

6.5.7. Interacciones Moleculares FT-IR

Se utilizó espectrometría ATR FT-IR para examinar el espectro de las interacciones moleculares de los hidrogeles para demostrar si hubo alguna alteración en las sustancias posterior al proceso de esterilización. Los espectros se analizaron a una resolución espectral de 4 cm⁻¹ en el rango de frecuencias de 4,000 – 400 cm⁻¹ utilizando un espectrómetro ATR-FTIR (Nicolet 6700, CFTA-UNAM, México). La posición de los picos se determinó utilizando el software Origin 2019b.

6.6. Caracterización Biológica

6.6.1. Cinética de crecimiento microbiano *L. lactis* ATCC 11454

Se preparó medio de cultivo caldo MRS (Sigma) previamente esterilizado en autoclave (Yamato Scientific America SK-310C) a 121°C, 103,421.39 Pa, 15 minutos. De un cultivo en placa se preparó un per-inóculo overnight a 37°C 5% CO₂, posteriormente se midió la densidad óptica del preinoculo en un espectrofotómetro uv-vis (Thermo Scientific Genesys 10 uv) a 600 nm. Se realizaron los cálculos pertinentes para que el cultivo de la cinética iniciara con una densidad óptica de 0.02, se llevó a incubar a 37°C y 5% CO₂ las mediciones de densidad óptica se estarían realizando cada hora durante 32 horas.

6.6.2. Tinción Gram

Con una asa bacteriológica se tomó una gota de cultivo líquido para formar un frotis bacteriano, sobre el frotis se agregó colorante Cristal Violeta (Kit sigma) durante 1 minuto, posteriormente se enjuagó con agua destilada, inmediatamente se agregó Lugol (Kit sigma) durante un minuto, se retiró el exceso con una mezcla acetona-etanol 50% hasta eliminar totalmente el color, nuevamente se realizó un lavado con agua destilada, se agregó el colorante de contraste safranina (kit sigma) durante 1 minuto, se realizó el lavado final con agua destilada y se dejó secar en condiciones normales, finalmente se observó con los objetivos 40x y 100x en un Microscopio Óptico Olympus (CIATEJ Zapopan).

6.6.3. Conteo de células viables

De una muestra de la cinética de crecimiento microbiano en la cual el microorganismo se encuentre en el inicio de la fase exponencial, en este caso Absorbencia = 0.2 se realiza un conteo en placa para determinar las UFC aproximado que hay en dicha muestra. Se prepararon diluciones ($10^1 - 10^{-7}$) en solución salina 0.85% estéril (J.T. Baker), posteriormente estas diluciones se sembraron en medio Agar MRS (Sigma) y se llevaron a incubar a 37°C 5% CO₂ durante 24 h. Posterior al tiempo se realiza el conteo de UFC en un microscopio estereoscópico. Para determinar las UFC es necesario realizar el cálculo utilizando la ecuación 6.2.

$$UFC = \text{Num de colonias} * \text{inverso de la dilución} \quad (6.2)$$

6.6.4. Incorporación de *Lactococcus lactis* ATCC 11454 en los hidrogeles.

Basado en la metodología de (Borges & Teixeira, 2014) después del crecimiento de *Lactococcus lactis* ATCC 11454 en caldo MRS, los cultivos se recolectaron mediante centrifugación a 4900 rpm durante 10 min a 4 °C y se lavaron dos veces con agua desionizada estéril. Luego, se agregó 500 µl de glicerol (Sigma) y 500 µL de solución salina 0.85% (J.T. Baker) al sedimento de bacterias para producir una suspensión celular concentrada, esta suspensión se re-suspende en 10 gr de cada formulación previamente esterilizadas. El almacenamiento de las formulaciones se estudió a 4°C y 25°C durante 12 semanas.

6.6.5. Viabilidad de *Lactococcus lactis* ATCC 114545 en suspensión.

Utilizando el método de cuenta en placa tomando como referencia la metodología utilizada por (Borges & Teixeira, 2014). Se prepararon medios de cultivo Agar MRS (Sigma) para permitir el crecimiento de las colonias, posteriormente se tomó una muestra de los hidrogeles con la bacteria previamente suspendida, se realizó una serie de diluciones (10^{-1} - 10^{-3}) se colocó 100 µL del hidrogel directo en las placas extendiendo por toda la superficie con un asa de Digrafsky, posteriormente se realizaron las diluciones en solución salina 0.85% (J.T. Baker) y se agita vigorosamente, se toman 100 µL de cada dilución y se realiza nuevamente un extendido en la placa, se llevan a incubar a 37°C 5% CO₂ durante 24 horas.

6.6.6. Citocompatibilidad: método Live/Dead

La viabilidad celular se examinó con un kit de imágenes Live/Dead (ThermoFisher Scientific). En resumen, se sembraron 500.000 células por pocillo en una placa de 12 pocillos y se incubaron a 37°C y 5% CO₂ overnight. Al día siguiente, los hidrogeles se diluyeron con medio de cultivo a concentraciones de 10 mg/mL. Después de una incubación de 24, 48 y 72 h, los componentes A y B del kit de imágenes Live/Dead se mezclaron y agregaron a cada pocillo, seguido de una incubación de 15 min. A

continuación, la placa se colocó bajo un microscopio de fluorescencia para la observación y el recuento de células.

6.6.7. Viabilidad celular: método MTT

De acuerdo con la metodología establecida por la norma ISO-10993-5 se utilizó tripsina EDTA (Sigma) para disociar las células y re-suspenderlas en medio de cultivo DMEM (ThermoFisher Scientific) suplementado (10% de suero fetal bovino y estreptomycin), posteriormente se determina el número de células por pozo. Utilizando cajas de 96 pozo se sembraron células acordes al paso anterior por pozo (10,000 células). Se incubaron a 37°C y 5% de CO₂ durante 24 horas para permitir su adherencia. Se preparó el extracto a diferentes concentraciones (100 %, 75%, 50% 25% y 12.5%) se agregaron 100 µL de cada dilución en el pozo, posteriormente se incubaron a 37°C y 5% de CO₂ durante 24, 48 y 72 h para permitir que actúe la sustancia en todas las células. Una vez transcurrido el tiempo se descartó el medio, se colocaron 100 µL de MTT (0.5 mg/ml) en solución tampón libre de calcio y magnesio, se incubó de 3 a 4 horas a 37°C y 5%CO₂ para permitir la formación de los cristales de formazan, luego se eliminó el sobrenadante, posteriormente se añadió 100 µL de isopropanol ácido previamente preparado y se dejaron los cultivos a temperatura ambiente hasta que los cristales de formazan fueron disueltos. Finalmente, la lectura de densidad óptica se realizó en un espectrofotómetro (ThermoFisher Scientific Multiskan 60) a longitud de onda de 570 nm.

El porcentaje de viabilidad se obtuvo empleando la ecuación 6.3.:

$$\% \text{ viabilidad} = \frac{DO \text{ células tratadas}}{DO \text{ células control}} * 100 \quad (6.3)$$

El ensayo tuvo un (n=3) con controles negativos (solvente), controles positivos (Tritón X- 100) y células no tratadas.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1. Selección de excipientes

Se realizó una búsqueda exhaustiva en el estado del arte y productos comerciales para poder determinar los polímeros base para las formulaciones a evaluar, para ello se utilizaron los buscadores Scholar Google y NCBI utilizando como palabras clave “*Vaginal Gel Excipients*” teniendo un tamaño de muestra de 24 publicaciones y 24 productos comerciales.

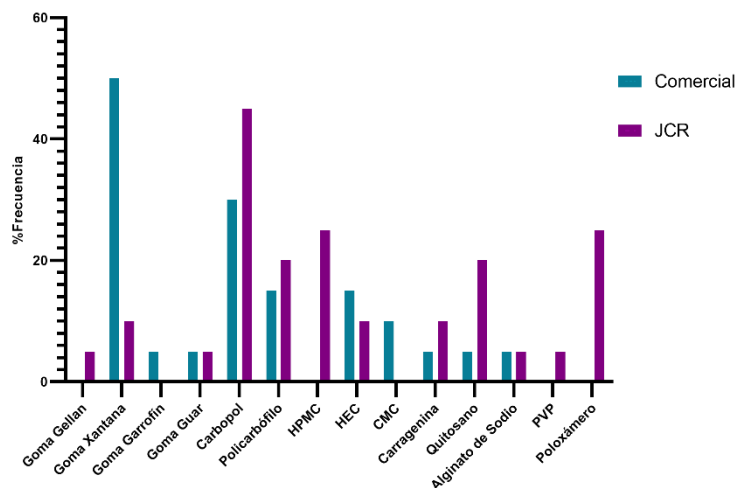


Figura 7.1. Histograma de frecuencias de excipientes utilizados en formulaciones de aplicación vaginal en contexto comercial y publicaciones de divulgación científica JCR.

En la figura 7.1, se observan los polímeros más frecuentemente utilizados en formulaciones en gel para aplicaciones vaginales. Es importante considerar para la selección de excipientes diversos aspectos, por ejemplo, comenzar por el alcance y el impacto que este pueda tener comercialmente. Algunos de los excipientes mostrados en el histograma pueden presentar excelentes propiedades y características, sin embargo, la correlación costo-adquisición para un futuro escalamiento, podría ocasionar una desventaja a futuro, es por ello que de acuerdo con (Lopes *et al.*,2015) (Baruffaldi *et al.*,2021) el costo de la goma xantana y Carbopol cumple con los requerimientos para ser potenciales polímeros en formulaciones vaginales, incluso en aquellas formulaciones

donde implica el contenido de probióticos (Tomás *et al.*,2020) (Kwiecień & Kwiecień, 2018).

7.2. Diseño experimental factorial 2³

Se prepararon 9 muestras de 600 gr cada una de acuerdo con lo establecido en el diseño experimental, los resultados obtenidos se muestran en la tabla 7.1.

Tabla 7.1. Resultados del diseño experimental

Muestra	Carbopol 940	Xantana	Neutralizantes	Viscosidad	pH
	%	%	%	Pa*s	U
M-2	1.0	1.0	1.0	32.65	5.37
M-13	0.5	0.5	0.0	3.26	3.35
M-9	0.5	1.0	0.0	6.58	3.44
M-14	0.5	0.5	1.0	23.18	5.40
M-6	1.0	0.5	1.0	37.30	4.90
M-10	0.5	1.0	1.0	22.33	6.02
M-1	1.0	1.0	0.0	10.05	3.70
M-5	1.0	0.5	0.0	4.77	3.47
M-4	1.0	1.0	1.0	34.50	5.02
M-15	0.5	0.5	0.0	3.28	3.35
M-11	0.5	1.0	0.0	6.72	3.46
M-16	0.5	0.5	1.0	22.08	5.45
M-8	1.0	0.5	1.0	49.20	5.32
M-12	0.5	1.0	1.0	22.02	6.04
M-3	1.0	1.0	0.0	9.60	3.30
M-7	1.0	0.5	0.0	5.56	4.28

7.3. Preparación de hidrogeles pre-formulados

Con base en la metodología establecida y lo expresado en la tabla 8, se obtuvieron 16 diferentes mezclas de hidrogeles cuyo propósito es conocer las concentraciones óptimas de los polímeros base de las formulaciones, la apariencia física se muestra en la figura 7.2. Se presentan 3 de las 16 muestras, la apariencia de los hidrogeles es color claro no transparente debido a la concentración de Goma Xantana. Además de presentar homogeneidad y un olor neutro característico del carbopol.

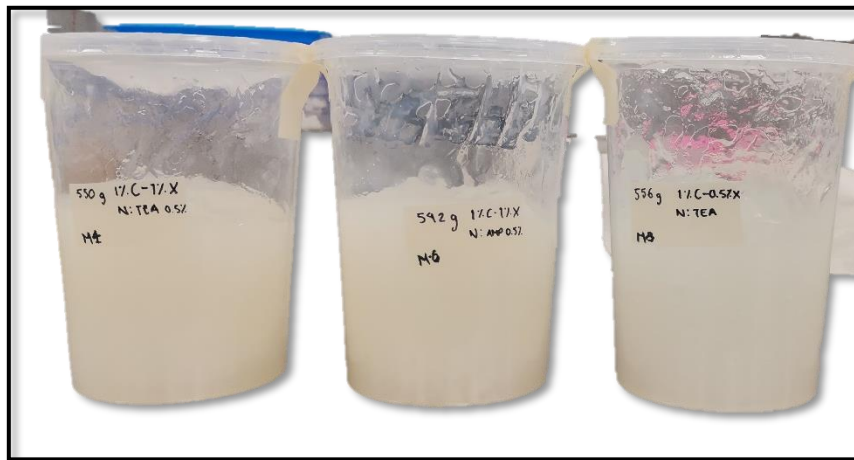


Figura 7.2. Apariencia física de 3 de 9 hidrogeles pre-formulados [M-4; M-6; M-8]

7.3.1. pH

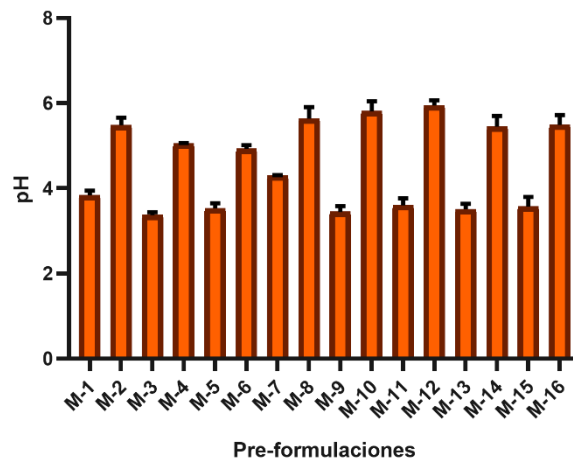


Figura 7.3. Resultados de pH correspondiente a los hidrogeles pre-formulados (25°C). los datos son promedio de $n = 3$, \pm SD

En la figura 7.3 se observan las mediciones de pH que se realizaron, es claro el incremento de pH de las muestras que no contienen neutralizante (M-1, M-3, M-7 M-9, M-11, M-13 y M-15) en comparación con las muestras que fueron neutralizadas, se observa que las muestras M-10 y M-12 son las que presentan un pH más alto (6.02 y 6.04), sin embargo, asociado el pH a la viscosidad la muestra M-8 no es la más alcalina pH = 5.32 tomando en consideración que es la muestra que presenta mayor viscosidad, cabe la posibilidad de que esto sucede debido a la interacción molecular entre el neutralizante y la concentración del carbopol 940, sin embargo, cumple con ambos parámetros.

7.3.2. Viscosidad dinámica

Se determinó la viscosidad de acuerdo con lo establecido previamente en la sección de metodología obteniendo los siguientes resultados mostrados en la figura 7.4. En la cual se observa que la muestra que presenta mayor viscosidad es la muestra M-8 la cual fue neutralizado con AMP, la cantidad estimada por gota fue de 120 gotas llegando a un pH de 5.32.

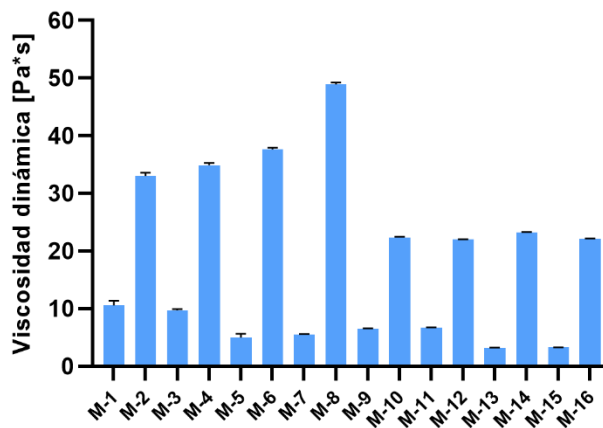


Figura 7.4. Resultados de la Viscosidad dinámica correspondiente a las pre- formulaciones [Spin 7, 20 RPM, 20°C] los datos son promedio de $n = 3$, \pm SD

7.3.3. Análisis estadístico asociado a la pre-formulación

Utilizando el software Statgraphics Centurion se realizó el análisis estadístico para obtener la concentración de polímeros necesaria para obtener un pH en un intervalo de 5-6 (Rupp, Rosenthal & Stanberry,2007) (Kurian *et al.*,2016) y un valor de viscosidad en el intervalo de 35.00-65.000 Pa*s (Stanković *et al.*,2012) (Mohamed *et al.*,2022).

Tabla 7.2 Efectos estimados para viscosidad

Efecto	Estimado	Error Estd.	V.I.F.
<i>promedio</i>	18317.7	842.402	
A: Carbopol 940	9272.13	1684.8	1.0
B: Xantana	-522.875	1684.8	1.0
C: Neutralizante	24181.1	1684.8	1.0
AB	-1984.63	1684.8	1.0
AC	6736.38	1684.8	1.0
BC	-4543.63	1684.8	1.0
<i>bloque</i>	1604.63	1684.8	1.0

Esta tabla 7.2 se muestra las estimaciones para cada uno de los efectos estimados y las interacciones. También se muestra el error estándar de cada uno de estos efectos, el cual mide su error de muestreo. Note también que el factor de inflación de varianza (V.I.F.) más grande, es igual a 1.0 para un diseño perfectamente ortogonal, todos los factores serían igual a 1. Factores de 10 o más normalmente se interpretan como indicativos de confusión seria entre los efectos.

Tabla 7.3. Análisis de Varianza para viscosidad

Fuente	Suma de Gl cuadrados	Cuadrado medio	Razón- F	Valor-P	
A: Carbopol 940	3.43889E8	1	3.43889E8	30.29	0.0006
B: Goma Xantana	1.09359E6	1	1.09359E6	0.10	0.7642
C: Neutralizante	2.33891E9	1	2.33891E9	205.99	0.0000
AB	1.57549E7	1	1.57549E7	1.39	0.2727
AC	1.81515E8	1	1.81515E8	15.99	0.0040
BC	8.25781E7	1	8.25781E7	7.27	0.0272
<i>bloques</i>	1.02993E7	1	1.02993E7	0.91	0.3688
<i>Error total</i>	9.08341E7	8	1.13543E7		
<i>Total (corr)</i>	3.06487E9	15			

La tabla ANOVA presentada en la tabla 7.3 particiona la variabilidad de viscosidad en piezas separadas para cada uno de los efectos. entonces prueba la significancia estadística de cada efecto comparando su cuadrado medio contra un estimado del error experimental. En este caso, 4 efectos tienen una valor-P menor que 0.05, indicando que son significativamente diferentes de cero con un nivel de confianza del 95.0%.

El estadístico R-Cuadrada indica que el modelo, así ajustado, explica 97.0363% de la variabilidad en viscosidad. El estadístico R-cuadrada ajustada, que es más adecuado para comparar modelos con diferente número de variables independientes, es 94.443%. El error estándar del estimado muestra que la desviación estándar de los residuos es 3369.61. El error medio absoluto (MAE) de 1796.45 es el valor promedio de los residuos. El estadístico de Durbin-Watson (DW) prueba los residuos para determinar si haya alguna correlación significativa basada en el orden en que se presentan los datos en el archivo. Puesto que el valor-P es mayor que 5.0%, no hay indicación de autocorrelación serial en los residuos con un nivel de significancia del 5.0%.

La ecuación (7.1) corresponde al ajuste del modelo del diseño experimental de la variable de respuesta viscosidad:

$$\begin{aligned} \text{Viscosidad} = & -12538.4 + 16979.2(\text{Carbopol}) + 19949.2(\text{Xantana}) + \\ & 17602.9(\text{Neutralizante}) - 15877.0(\text{Carbopol}*\text{Xantana}) + \quad (7.1) \\ & 26945.5(\text{Carbopol}*\text{Neutralizante}) - 18174.5(\text{Xantana}*\text{Neutralizante}) \end{aligned}$$

Lo anterior se puede corroborar en el gráfico de efectos principales y el diagrama de Pareto. Ver figuras 7.5 y 7.6.

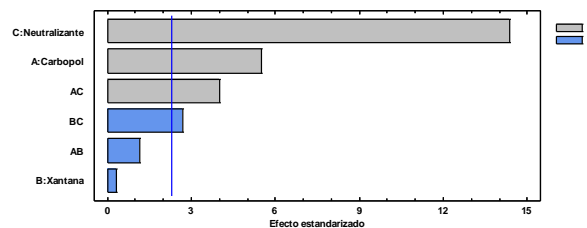


Figura 7.5. Diagrama de Pareto estandarizada para viscosidad

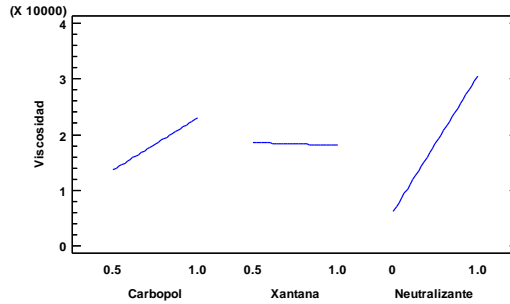


Figura 7.6. Gráfica de efectos principales para viscosidad.

De acuerdo con el análisis de optimización en la tabla 7.4 se sugieren las siguientes concentraciones para los polímeros.

Tabla 7.4. Valores óptimos correspondiente al análisis de viscosidad.

Factor	Bajo	Alto	Óptimo
Carbopol 940	0.5	1.0	1.0
Goma Xantana	0.5	1.0	0.5
Neutralizante	0.0	1.0	1.0
Valor Óptimo para viscosidad	41.938 Pa*s		

Los resultados del análisis del diseño correspondientes a la variable pH son los siguientes.

Tabla 7.5. Efectos estimados para pH.

Efecto	Estimado	Error Estd.	V.I.F.
promedio	4.49188	0.0649128	
A: Carbopol	-0.14375	0.129826	1.0
B: Xantana	0.10375	0.129826	1.0
C: Neutralizante	1.89625	0.129826	1.0
AB	-0.24875	0.129826	1.0
AC	-0.43125	0.129826	1.0
BC	0.24125	0.129826	1.0
bloque	0.07125	0.129826	1.0

Esta tabla 7.5 se muestra las estimaciones para cada uno de los efectos estimados y las interacciones. También se muestra el error estándar de cada uno de estos efectos,

el cual mide su error de muestreo. Note también que el factor de inflación de varianza más grande, es igual a 1.0, para un diseño perfectamente ortogonal, todos los factores serían igual a 1. Factores de 10 o más normalmente se interpretan como indicativos de confusión seria entre los efectos.

Tabla 7.6. Análisis de varianza para pH

Fuente	Suma de cuadrados	de GI	Cuadrado medio	Razón- F	Valor-P
A: Carbopol 940	0.0826563	1	0.0826563	1.23	0.3004
B: Goma Xantana	0.0430562	1	0.0430562	0.64	0.4473
C: Neutralizante	14.3831	1	14.3831	213.34	0.0000
AB	0.247506	1	0.247506	3.67	0.0917
AC	0.743906	1	0.743906	11.03	0.0105
BC	0.232806	1	0.232806	3.45	0.1002
bloques	0.0203063	1	0.0203063	0.30	0.5981
Error total	0.53935	8	0.0674187		
Total (corr)	16.2926	15			

La tabla ANOVA presentada en la tabla 7.6 particiona la variabilidad de pH en piezas separadas para cada uno de los efectos. Entonces prueba la significancia estadística de cada efecto comparando su cuadrado medio contra un estimado del error experimental. En este caso, 2 efectos tienen un valor-P menor que 0.05, indicando que son significativamente diferentes de cero con un nivel de confianza del 95.0%.

El estadístico R-Cuadrada indica que el modelo, así ajustado, explica 96.6896% de la variabilidad en pH. El estadístico R-cuadrada ajustada, que es más adecuado para comparar modelos con diferente número de variables independientes, es 93.793%. El error estándar del estimado muestra que la desviación estándar de los residuos es 0.259651. El error medio absoluto (MAE) de 0.135938 es el valor promedio de los residuos. El estadístico de Durbin-Watson (DW) prueba los residuos para determinar si haya alguna correlación significativa basada en el orden en que se presentan los datos

en el archivo. Puesto que el valor-P es mayor que 5.0%, no hay indicación de autocorrelación serial en los residuos con un nivel de significancia del 5.0%.

La ecuación (7.2) corresponde al ajuste del modelo del diseño experimental de la variable de respuesta viscosidad.

$$\begin{aligned} \text{pH} = & 2.19938 + 2.0675(\text{Carbopol}) + 1.2175(\text{Xantana}) + \\ & 2.46625(\text{Neutralizante}) - 1.99(\text{Carbopol}*\text{Xantana}) - \\ & 1.725(\text{Carbopol}*\text{Neutralizante}) + 0.965(\text{Xantana}*\text{Neutralizante}) \end{aligned} \quad (7.2)$$

Lo anterior se puede corroborar en el gráfico de efectos principales y el diagrama de Pareto. Ver figuras 7.7 y 7.8.

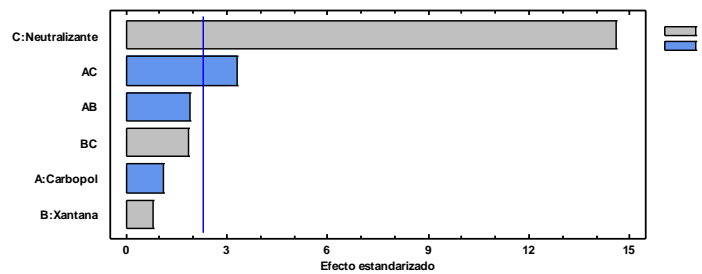


Figura 7.7. Diagrama de Pareto estandarizada para pH

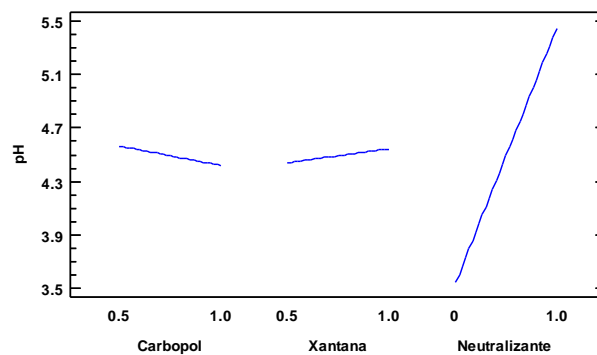


Figura 7.8. Gráfica de efectos principales para pH

De acuerdo con el análisis de optimización en la tabla 7.7 se sugieren las siguientes concentraciones para los polímeros.

Tabla 7.7. Valores óptimos correspondientes al análisis de pH

Factor	Bajo	Alto	Óptimo
Carbopol 940	0.5	1.0	1.0
Goma Xantana	0.5	1.0	0.5
Neutralizante	0.0	1.0	1.0
Valor Óptimo para pH	5.81		

Con base en lo anterior se puede establecer un sistema de formulaciones considerando la concentración base de carbopol 940 al 1% y de Goma xantana al 0.5%, sin embargo, es imprescindible analizar y comparar el efecto de distintos neutralizantes, base inorgánica (NaOH) y bases orgánicas (TEA-AMP).

7.4. Formulación de los hidrogeles.

Se prepararon una serie de cinco hidrogeles, de acuerdo con lo establecido en el capítulo 6 (ver tabla 6.3). La apariencia de los hidrogeles es color claro no transparente, presenta homogeneidad y un olor neutro. En la figura 7.9. Se muestran los hidrogeles F1:F5 previamente a ser esterilizados con vapor.



Figura 7.9. Apariencia física de los hidrogeles no esterilizados F1:F5.

El proceso de esterilización se realizó por vapor en autoclave a 120°C, 103,421.39 Pa y 15 min, para poder realizar las pruebas biológicas pertinentes. En la figura 7.10 se puede observar la apariencia física de los hidrogeles F1:F5 enseguida del proceso de esterilización en la cual se perdió el 1.5 % ± 0.2 de peso, este efecto puede asociarse a la pérdida de agua durante el proceso, además es observable la presencia de burbujas en el hidrogel F3.



Figura 7.10. Apariencia física de los hidrogeles esterilizados F1:F5.

Un cambio importante que se observó tras el proceso de esterilización, fue la disminución de la viscosidad en la mayoría de los hidrogeles, (ver sección 7.5.2).

7.4.1. Mecanismos de formación de los hidrogeles

En sistemas acuosos conteniendo Carbopol, la mejor manera de lograr una actividad gelificante y lograr formar un gel, es mediante la neutralización del polímero con una base, ya sea orgánica o inorgánica. Durante la formación de los hidrogeles ocurre una reacción en la cual, la neutralización ioniza el polímero y genera cargas a lo largo de la columna vertebral del polímero. Las repulsiones de cargas similares provocan entonces el desenrollamiento de la molécula en una estructura extendida. Esta reacción es rápida y da espesamiento instantáneo y formación/estabilización de un hidrogel (Park & Shlepr,2006). Ver figura 7.11.

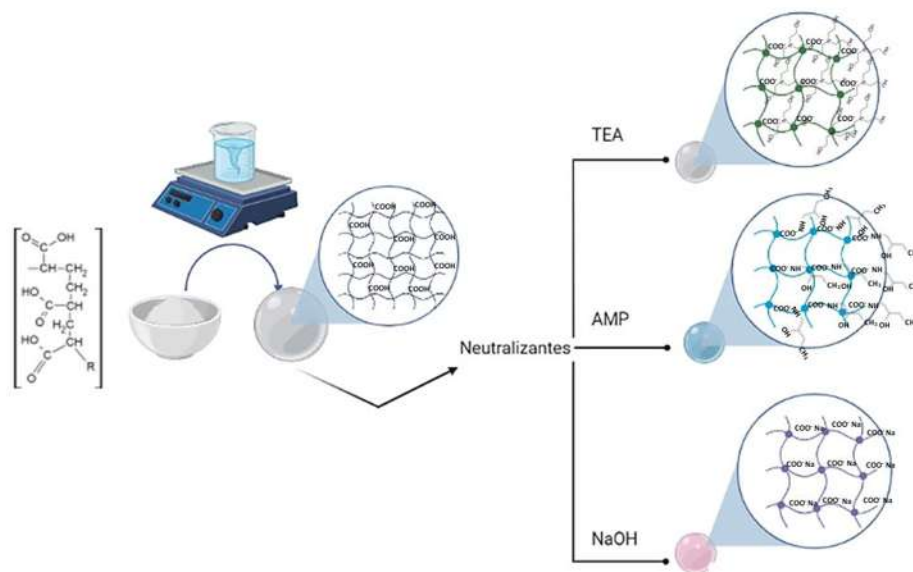


Figura 7.11. Mecanismos de neutralización en los hidrogeles.

A pesar de que todas las formulaciones presentadas en este trabajo funcionan con el mismo mecanismo de neutralización, cada neutralizante exhibe diferentes valores de pH, capacidades de amortiguamiento, características reológicas, interacciones químicas y, en consecuencia, la formación de los hidrogeles será diferente.

Las características en la gelificación de los diferentes hidrogeles, dependerá en gran medida del tipo de neutralizante y su grado de neutralización (pH y capacidad de amortiguamiento); así como de la fuerza iónica de la solución acuosa de partida. Bases inorgánicas, como hidróxido de sodio o hidróxido de potasio, o bien aminas de bajo peso molecular y las alcanolaminas proporcionarán una neutralización satisfactoria. Algunas de las bases amínicas eficaces como neutralizantes incluyen: NaOH (hidróxido de sodio), TEA (trietanolamina), AMP®-95 (aminometilpropanol), Tris Amino® (trometamina), Neutrol® TE (tetrakis-2-hidroxipropil etilendiamina), etc. ([The Lubrizol Corporation,2011](#))

Pero también, en la mayoría de los casos en los que se usa el Carbopol para la formación de geles, se recomienda que el Carbopol esté totalmente hidratado para que exista una solvatación del mismo y las cadenas poliméricas se desenrollen de manera eficiente en el sistema acuoso, de esta manera es posible facilitar que exista un mayor número de enlaces de hidrógeno, y se favorezca una mejor neutralización del sistema. Algunos ingredientes que forman enlaces de hidrógeno con la molécula del polímero (Carbopol), que hace que se desenrollen son los donantes de iones hidroxilo como, por ejemplo: polioles (glicerina, propilenglicol y polietilenglicol), alcoholes de azúcar (manitol, sorbitol), tensioactivos no iónicos con cinco o más grupos etoxi, óxido de polietileno, y alcohol polivinílico totalmente hidrolizado, entre otros.

Las dispersiones del polímero Carbopol se puede espesar mediante neutralización y/o enlaces de hidrógeno. Primeramente, habrá que permitir que el carbopol se desenrolle mediante la solvatación y una vez añadido el neutralizante (base inorgánica u orgánica-aminas) se comienza con la formación del hidrogel, formándose una sal que se hinchará. El agente neutralizante es muy importante, ya que las sales formadas pueden precipitar y no formarse el gel. El mecanismo de gelificación por la formación de enlaces de hidrógeno y posterior neutralización es lento, y puede tomar de una a cuatro horas para alcanzar la viscosidad máxima.

Esto activa la funcionalidad iónica del polímero, provocando que el polímero se hinche a través de la repulsión de carga (hidrodinámica expansión de volumen), produciendo una asociación hidrofóbica controlada a través de la combinación del lado semi-hidrofóbico e hidrofóbico en sitios específicos de las cadenas poliméricas, tanto del Carbopol como de la Goma Xantana.

7.5. Caracterización fisicoquímica

Se estableció en la metodología experimental realizar una caracterización de los hidrogeles y comparar sus cambios fisicoquímicos tras el proceso de esterilización, es decir, se evaluaron las características de los hidrogeles no esterilizados y esterilizados.

7.5.1. Capacidad de amortiguamiento

Las curvas de titulación obtenidas se utilizaron para determinar la capacidad amortiguadora correspondiente, definida previamente como la cantidad de hidróxido de sodio necesaria para alcanzar un valor de pH de 10, o bien hasta romper la capacidad de amortiguar los cambios de pH. En general, la capacidad amortiguadora está relacionada con la presencia de polímeros ácidos en la composición de los lubricantes (Cunha *et al.*,2014), como es el caso de los hidrogeles desarrollados en este proyecto, debido a la presencia de carbopol, esta característica ácida influye directamente en la capacidad amortiguadora, esto ocurre directamente por la funcionalidad iónica del polímero. Los ácidos de bajo peso molecular como el ácido láctico bien pueden funcionar como un sistema amortiguador ideal para las formulaciones vaginales. Algunos probióticos lo producen naturalmente *in vivo* y es el principal responsable del pH ácido de la vagina (Boskey *et al.*,2001) (Bonferoni *et al.*,2006). Para comprender mejor la capacidad amortiguadora relativa de los productos simulando el pH vaginal además de diluir los hidrogeles en SSF, se realizó la misma evaluación usando SFV como medio de dispersión, esto con la finalidad de obtener una respuesta más acertada sobre la resistencia que los hidrogeles poseen a los cambios de pH, ya que (Leyva-Gómez *et al.*,2019) reportan que la cavidad vaginal es un ambiente muy variable, en el cual, el pH es uno de los más frecuentes. En la figura 7.12 se muestra la capacidad amortiguadora relativa de los hidrogeles.

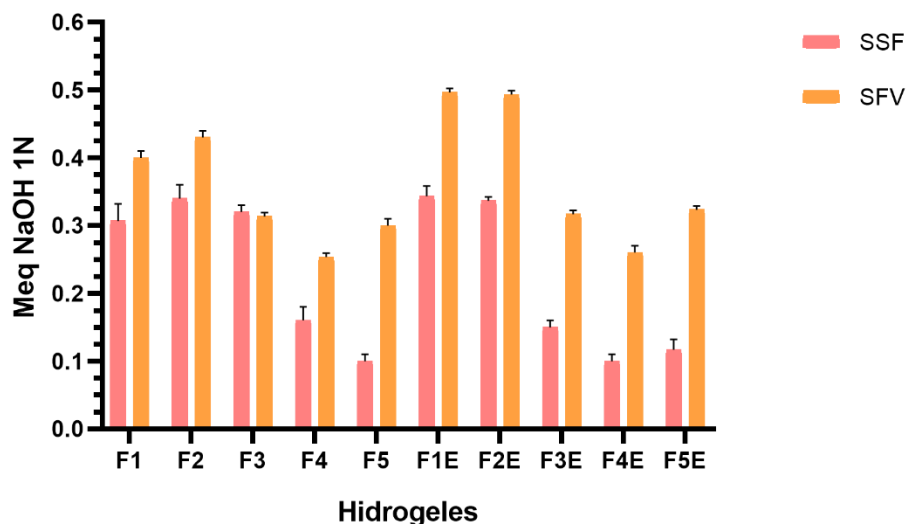


Figura 7.12. Capacidad de amortiguamiento relativa de los hidrogeles (F1:F5) no estériles y estériles, diluidos en SSF y SFV.

Como era de esperar, todos los hidrogeles mostraron una mayor capacidad amortiguadora después de ser mezclados con SFV debido al efecto intrínseco de este fluido, en comparación con la capacidad de la SSF. Además, es importante destacar los cambios físicos a los cuales fueron expuestos los hidrogeles, tras el proceso de esterilización, sin embargo, se podría manifestar un análisis más detallado en las formulaciones estériles, ya que el propósito de los hidrogeles es la administración vaginal, por lo tanto, una formulación no estéril no es posible su aplicación.

Para el caso de la dilución en SSF, los hidrogeles F4 y F5 no estériles presentaron una capacidad de amortiguamiento baja, y en la condición de esterilidad F3, F4 y F5 también mostraron baja capacidad de amortiguamiento. Este resultado indica que estos hidrogeles no modificarían el pH vaginal ([Kristmundsdóttir, Sigurdsson & Thormar, 2003](#)). Por otro lado, la capacidad amortiguadora del hidrogel F3, disminuyó tras el proceso de esterilización, situación que podría estar asociado al cambio molecular (ver sección 7.5.5.). Pero al analizar el comportamiento de este hidrogel no estéril diluido en SFV y SSF, no presentan un cambio significativo entre sí, sin embargo, el hidrogel F3 esterilizado si presenta una diferencia significativa al estar diluido en SSF y SFV.

En el caso de los hidrogeles F1 y F2 mayor capacidad de amortiguamiento, teniendo un incremento significativo después de ser esterilizados, sin embargo, en

relación con el pH inicial, la viscosidad dinámica y sus propiedades reológicas, F1 no presenta características selectivas para aplicación vaginal. Para F2 el comportamiento parcialmente similar a F3, ya que F2 no estéril si presenta un cambio significativo diluido en SSF y SFV, pero al igual que F3, su capacidad amortiguadora aumenta posterior a ser esterilizados, por lo tanto, los dos hidrogeles con mejores condiciones de capacidad de amortiguamiento son F2 y F3. La similitud esta probablemente asociada al mecanismo de neutralización con alcanolaminas; TEA y AMP, respectivamente.

Los resultados anteriores se determinaron de acuerdo con un análisis ANOVA de dos vías se comprobó que estadísticamente existen diferencias significativas entre la condición (SSF-SFV) y la esterilidad, mediante una prueba de Tukey HSD, en ambos factores el valor $p > 0.05$ con un R-cuadrado de 92.31%.

7.5.2. Viscosidad de dinámica

La viscosidad dinámica en las formulaciones vaginales, específicamente los hidrogeles, es una propiedad muy importante para aplicaciones *in situ*, por lo que el hidrogel no debe ser demasiado fluido (Patel & Patel 2015; Velázquez et al. 2019). En la figura 7.13 se muestran los cambios de viscosidad sujetos a tres distintas condiciones de los cinco hidrogeles; esterilizados, no esterilizados y esterilizados diluidos en SFV.

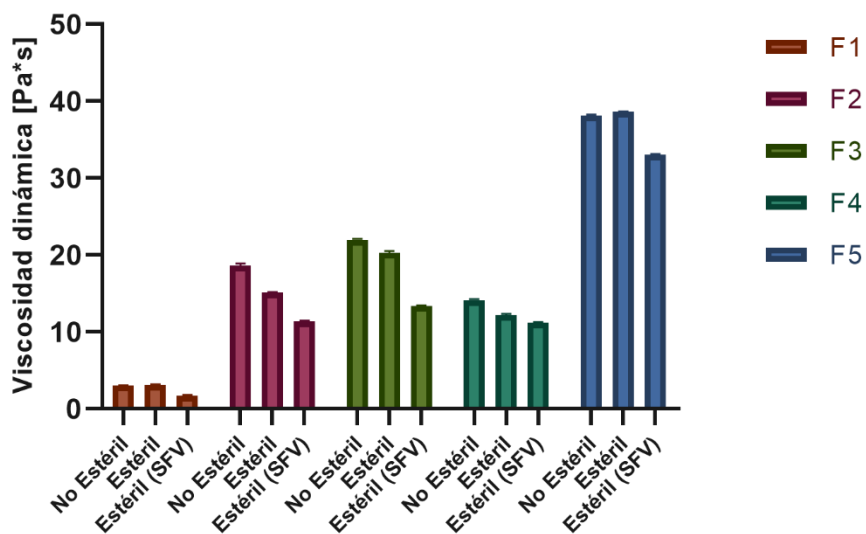


Figura 7.13. Resultados de viscosidad dinámica de los hidrogeles F1:F5, no estériles, estériles y estériles diluidos en SFV, a 20°C, Spin 6-7, los datos son promedio de $n = 3$, \pm SD, Tukey HSD ($p > 0.05$).

Visualmente existe una disminución de la viscosidad tras la esterilización con vapor y posterior a la dilución en SFV. Tras un análisis estadístico mediante una ANOVA de dos vías se comparó el efecto de la condición de esterilidad y dilución, la formulación y una correlación formulación-condición, en los 3 factores el valor $p < 0.05$, con un R-Cuadrado del 98%, por lo tanto, son significativamente diferentes. Al realizar una comparación de medias con una prueba de Tukey HSD, resulta que, respecto a la formulación los cinco hidrogeles son significativamente diferentes entre sí, respecto a los hidrogeles diluidos en las tres condiciones, son significativamente diferentes entre sí, mientras que en la correlación formulación-condición todas son significativamente diferentes a excepción de los hidrogeles F4 y F2 que estadísticamente son muy parecidos, así como F1 no estéril y F1 estéril.

El comportamiento de F1, en comparación con el resto de los hidrogeles era esperado, físicamente su grado fluidez es directamente proporcional al mecanismo de neutralización, por lo tanto, al no encontrarse entrecruzado su viscosidad es evidentemente baja en las tres condiciones; no estéril, estéril y estéril diluido en SFV, respectivamente (3.025 ± 0.043 , 3.110 ± 0.096 , 1.722 ± 0.11 Pa*s). Además, recordando que la viscosidad dinámica se encuentra estrechamente relacionada con el pH, es comprobable que F1, además de ser el hidrogel menos viscoso, es el más ácido. Observando la figura 7.13, F5 se muestra como un gel más viscoso en las tres condiciones (38.100 ± 0.18 , 38.58 ± 0.10 , 33.042 ± 0.12 Pa*s). y el que presenta el pH más alto, incluso considerándose dentro de los intervalos de neutralidad. Este resultado se encuentra asociado al mecanismo de neutralización (Hidróxido de sodio) y a la ausencia de ácido láctico. Por otro lado, F4 que también se neutralizó con hidróxido de sodio presentó una disminución significativa en la viscosidad (de 14.12 ± 0.15 , 12.19 ± 0.16 , 11.21 ± 0.12 Pa*s), debido a la presencia del ácido láctico, mientras que F2 y F3, que fueron neutralizados con alcanosaminas presentaron mayor viscosidad (18.58 ± 0.33 , 15.11 ± 0.07 , 11.33 ± 0.16 Pa*s) (21.98 ± 0.10 , 20.25 ± 0.25 , 13.38 ± 0.05 Pa*s), respectivamente, en comparación con F4, pero menor que F5.

Realizando una comparación con los geles de aplicación vaginal disponibles comercialmente y, reconocidos como productos de calidad, es comparable la viscosidad

de F5 con el gel Replens® que presentan una viscosidad aproximadamente 50.00 Pa*s. (Forbes, *et al.*, 2014).

7.5.3. pH

El pH es una variable muy importante para el control de calidad de los hidrogeles de aplicación vaginal, es por ello que es imprescindible el cuidado en estas mediciones. Al tratarse de hidrogeles neutralizados el cambio de pH es bastante sensible, en la figura 7.14 se presenta una comparativa de los cambios de pH asociados a las tres diferentes condiciones de dilución y proceso de esterilización. Un punto muy importante a considerar es el pH que contiene el SFV. Se preparó de acuerdo con la metodología de (Owen & Katz, 1999) donde sugieren que el pH del SFV sea ajustado a 4.2, por lo tanto, en la condición del hidrogel diluido en SFV es esperado un descenso en el pH. Existe una excepción en hidrogel F1, al no estar neutralizado, y por las características ácidas de las materias primas, el pH incrementó al ser diluido en SFV. El pH inicial de F1 es de 2.74 ± 0.06 y 2.83 ± 0.070 , no esterilizado y esterilizado, respectivamente. Y al ser diluido en SFV incrementó a 3.55 ± 0.12 . Mientras que los hidrogeles neutralizados presentaron de forma inversa dicho comportamiento, debido a la naturaleza alcalina de las bases orgánicas (TEA, AMP) e inorgánica (NaOH).

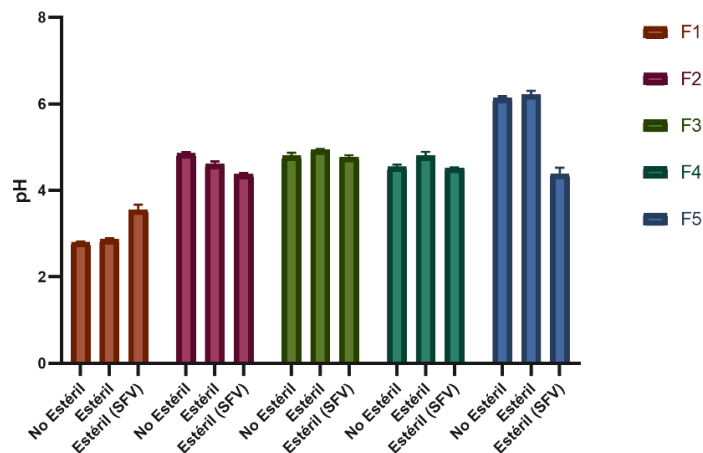


Figura 7.14. Resultados de pH de los hidrogeles F1:F5, no estériles, estériles y estériles diluidos en SFV, los datos son promedio de $n = 3$, \pm SD, Tukey HSD ($p > 0.05$).

Tras un análisis estadístico mediante una ANOVA de dos vías se comparó el efecto de la condición de esterilidad y dilución, la formulación y una correlación formulación-condición, en los tres factores el valor $p < 0.05$, con un R-Cuadrado del 99.63%, por lo tanto son significativamente diferentes, sin embargo; al realizar una comparación de medias con una prueba de Tukey HSD resulta que respecto a la formulación los hidrogeles F4 y F2 son iguales, pero significativamente distintos a los hidrogeles F1, F3 y F5, y estos son diferentes entre ellos. Respecto a los hidrogeles sujetos a las tres condiciones solo son significativamente diferentes después de la dilución en SFV, y no se encontró una diferencia significativa tras el proceso de esterilización.

Relacionando los resultados de viscosidad dinámica con pH, los valores de F1 se encuentran significativamente más bajos en comparación con el resto de los hidrogeles, sin embargo, F3, F2 y F4, son hidrogeles que no presenta alteraciones significativas en el pH bajo las 3 condiciones de estudio, asociando este comportamiento a la capacidad amortiguadora, F2 y F3 tienen un comportamiento ideal para soportar cambios de pH relacionados con el entorno vaginal. Por lo tanto, en este sentido, los hidrogeles neutralizados con alcano-aminas, presentan mejores características que los hidrogeles neutralizados con NaOH.

Realizando una comparación de pH con los geles de aplicación vaginal disponibles comercialmente, los hidrogeles F2, F3 y F4 son comparables con el gel Fillergyn® que presenta un pH de 4.5 ± 0.1 , mientras que F1 es comparable con Replens® y Deflagyn® que presentan un pH de 3.0 ± 0.1 . (Cunha *et al.*, 2014) (Muller & Sailer, 2021). Sin embargo, la condición ácida de F1 se ve afectada directamente sobre la viscosidad y sobre el crecimiento de probióticos ya que (N'Guessan *et al.*, 2020) probaron que el crecimiento óptimo de *Lactobacillus crispatus* fue de entre 6 y 7, esta variable puede afectar de manera positiva o negativa, (O'Hanlon *et al.*, 2013) demostraron que el pH alcalino de la vagina asociado a la presencia de líquido seminal reduce la acción protectora de la acidez vaginal contra los patógenos, además la OMS recomienda que los productos de aplicación vaginal deben ser ácidos, por lo tanto, se puede inferir que la

presencia de un hidrogel que no presente cierto grado de acidez podría propiciar un ambiente favorable para que microorganismos patógenos puedan proliferar.

7.5.4. Propiedades Reológicas

Se estudiaron las propiedades reológicas para poder determinar el comportamiento viscoelástico de los hidrogeles. Estas propiedades fueron evaluadas a través de un barrido de deformación a 37°C.

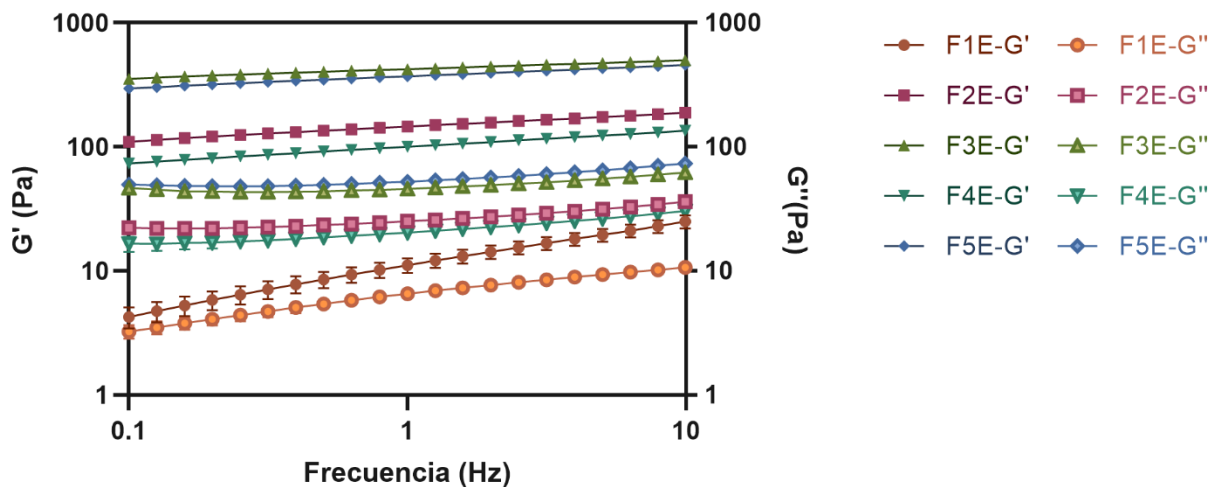


Figura 7.15. Resultados reológicos de las pruebas de barrido de frecuencia obtenidos a partir de los hidrogeles diluidos en SFV a 37 °C, los datos son promedio de $n = 3$, \pm SD.

En la Fig. 7.15 se presentan los valores del módulo elástico o de almacenamiento (G') y del módulo viscoso o de pérdida (G'') a 37°C, en función de la frecuencia (0-10 Hz) para las formulaciones esterilizadas, con las mismas proporciones de Carbopol: Xantana y con diferentes neutralizantes. Una de los hidrogeles se tomó como control negativo, sin neutralizar (F1), las otras se neutralizaron con TEA (F2), AMP (F3) y con NaOH 1N (F4). Además, uno de los hidrogeles no contenía ácido láctico (F5) y se neutralizó con NaOH 1N. Se observa que todos los hidrogeles (F1:F5) presentaron un módulo elástico (G') mayor que el módulo viscoso (G''), es decir $G' > G''$ en función de la frecuencia. $F5 (\approx 500 \text{ Pa}) > F3 (\approx 400 \text{ Pa}) > F2:F4 (\approx 90-100 \text{ Pa}) > F1 (\approx 40 \text{ Pa})$. (Mezger, 2013). Esto denota el carácter predominante de las formulaciones como un gel viscoelástico más que como un líquido, aun cuando las formulaciones hayan sido neutralizadas con diferentes neutralizantes (inorgánicos y orgánicos), esterilizadas por autoclave y diluidas en fluido

vaginal simulado (SFV). Esto es relevante, debido a que nos sugiere que podría existir un tiempo de residencia mayor en la vagina sin ser exudado de manera rápida de la cavidad (Xu *et al.*, 2013) (Nevez *et al.*, 2009).

El hidrogel F1 presentó valores menores para ambos módulos (G' / G''), mientras que F5 presentó valores mayores de G' / G'' . El hidrogel F1 al no ser neutralizado con ningún agente químico, por lo que el hidrogel formado es mucho más débil que las otras formulaciones. El hidrogel F3 que presentó un módulo G' mayor que los demás, ya que contiene un ácido orgánico débil, lo que ocasiona una expansión de las cadenas poliméricas en un ambiente ácido, debido a que se forman mayores concentraciones de sales residuales tras la neutralización y el gel formado es mucho más fuerte que los demás. Por lo que se corrobora que se observó un comportamiento similar al de un sólido con una microestructura tridimensional rígida bajo las condiciones evaluadas.

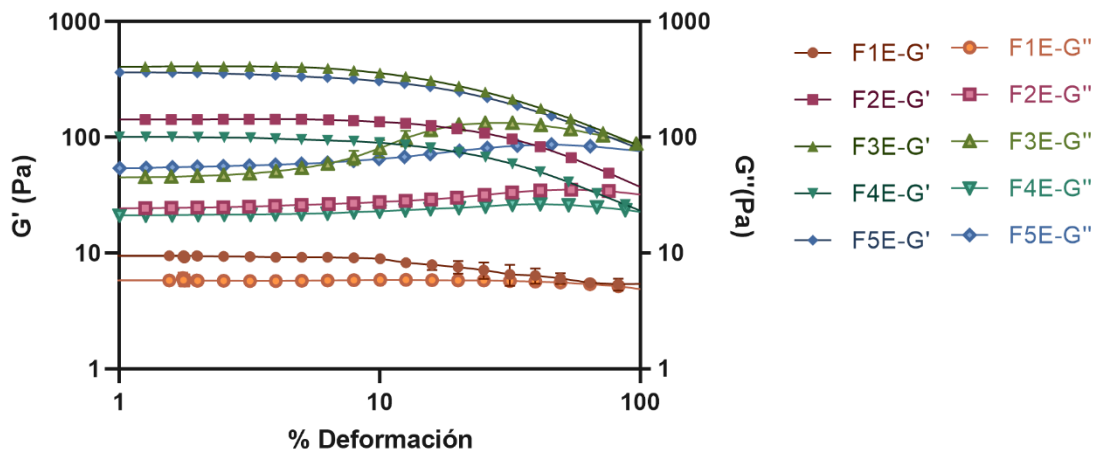


Figura 7.16. Resultados reológicos de las pruebas de barrido de deformación obtenidos a partir de los hidrogeles diluidos en SFV a 37 °C, los datos son promedio de $n = 3$, \pm SD.

En el barrido de deformación que se presenta en la figura 7.18 el hidrogel F3 tuvo un comportamiento similar a F5, los cuales fueron 45 veces más firmes que el hidrogel F1, este fenómeno se encuentra asociado a la neutralización ya que F3 y F5 fueron previamente neutralizados con AMP y NaOH 1N respectivamente, mientras que F1 no se encuentra neutralizado. El hidrogel F2 presentó un comportamiento más débil en comparación con F3, lo que demuestra que reológicamente la base AMP forma hidrogeles más fuertes que la TEA, Respecto a F4 la formación del hidrogel es

significativamente más débil que F5, debido a la presencia de ácido láctico, esto podría estar relacionado con una probable formación de sales de lactato de sodio. Todos los hidrogeles resistieron una deformación del 80% antes de presentar un cruce en sus módulos y mostrar características de un material líquido típico de $G' < G''$.

Estos resultados pueden atribuirse a la reacción química de ionización del ácido poliacrílico del carbopol, con los hidrogeles neutralizados, los resultados del hidrogel F1 se esperaban debido a que no está neutralizado se considera como un hidrogel sensible a movimientos mecánicos oscilatorios.

Además, estas diferencias reológicas observadas entre Carbopol 940 neutralizado con NaOH y bases orgánicas TEA y AMP pueden explicarse por los diferentes grados de ionización entre el ácido poliacrílico (Tamburic & Craig, 2011). En el caso del Carbopol 940, la adición de una base fuerte (NaOH) promueve la disociación del ácido poliacrílico, lo que provoca la repulsión de cargas similares y la formación de una red de hidrogel expandida. En el caso de los hidrogeles neutralizados con bases débiles, el grado de ionización es menor y, en consecuencia, se reducirá la hidratación y el desenrollamiento de las cadenas moleculares, dando lugar a una estructura menos elástica (Rossi *et al.*, 2011).

7.5.5. Interacciones Moleculares.

Se usó espectroscopia FTIR para comparar los cambios estructurales de los cinco hidrogeles tras el proceso de esterilización con vapor, además de una posible interacción entre las principales materias primas (Carbopol-Xantana). En la figura 7.17 se encuentran los espectros FTIR de los cinco hidrogeles no esterilizados, las materias primas (Carbopol y Goma Xantana) y los neutralizantes orgánicos (TEA y AMP), mientras que en la figura 7.18. se muestra el espectro de los cinco hidrogeles esterilizados, las materias primas y los neutralizantes orgánicos.

- a) Las bandas características del carbopol: 1700 cm^{-1} se debe al estiramiento del carbonilo (C=O) del grupo carboxílico del carbopol, 2956 cm^{-1} debido a la vibración de estiramiento de los grupos hidroxilo (OH) y al enlace de hidrógeno intermolecular. 1448 cm^{-1} debido a la vibración de estiramiento O-C-O. La banda

de 1247 cm^{-1} representa la vibración de estiramiento del grupo éter del ácido acrílico. (Sahoo *et al.*, 2011)

- b) El espectro infrarrojo de la goma xantana presentó una banda en 3440 cm^{-1} que se relaciona con las frecuencias de vibración de estiramiento de los grupos N-H y del O-H con enlaces de hidrógeno. Además, en la región de estiramiento C-H del espectro FTIR, la banda de baja intensidad en 2930 cm^{-1} se asignó a modos simétricos de CH_2 . Además, la banda característica de vibración de tipo tijera del CH_2 , que suele ocurrir a 1413 cm^{-1} , también estaba presente en la muestra. (Khan *et al.*, 2015)
- c) El espectro de TEA, presentó bandas de 1023 cm^{-1} , 1400 cm^{-1} y 1558 cm^{-1} que se atribuyen a las vibraciones de estiramiento de C-O, C-H y N-H, respectivamente. El pico ancho de 3430 cm^{-1} sugiere la presencia del grupo OH y también del grupo N-H. (Islam *et al.*, 2004)
- d) El espectro de AMP, presentó bandas de $3500\text{ cm}^{-1} - 3300\text{ cm}^{-1}$, que se atribuyen a vibraciones de estiramiento simétrico y asimétrico de N-H, además de la presencia del grupo OH. También una serie de bandas entre $1640 - 1500\text{ cm}^{-1}$ asociado a la flexión de N-H, mientras que las bandas de $1200 - 1000\text{ cm}^{-1}$ se debe a estiramiento C-N. (Budiman & Sebayang, 2010)

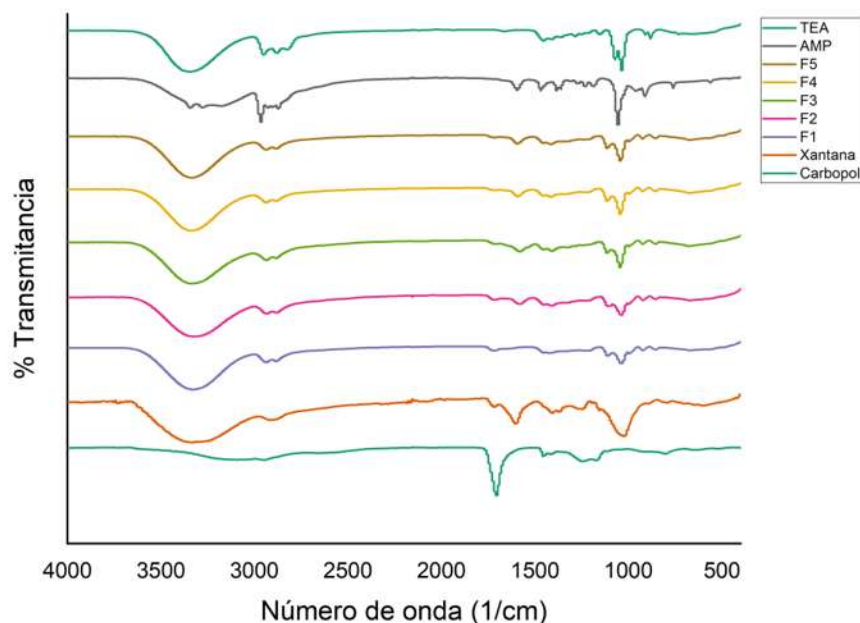


Figura 7.17. Espectros FTIR de los hidrogeles, no estériles, materias primas y neutralizantes.

De acuerdo con el análisis FTIR, la interacción molecular entre la goma xantana y el carbopol 940 es evidente en F1 (no neutralizado) en una banda que se encuentra en la región 1600 cm^{-1} , se infiere que el estiramiento del grupo hidroxilo del carbopol interactuó con el ion carbonilo del ácido pirúvico o ácido glucurónico de la goma xantana.

El hidrogel F1 que no se encuentra neutralizado, y el F2:F5 se observa una pequeña banda en la región 1650 cm^{-1} , por lo tanto, es posible que la banda característica de la neutralización se encuentre en esta región.

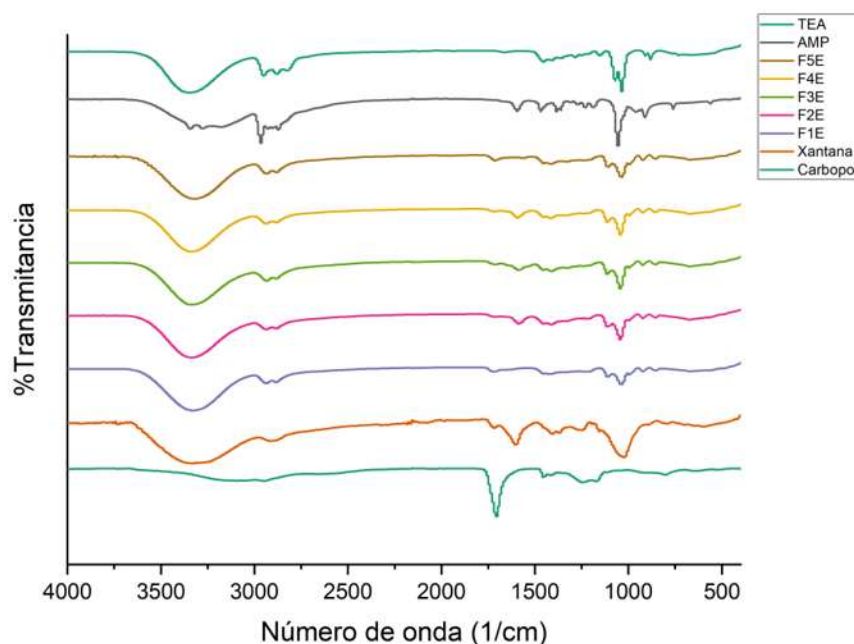


Figura 7.18. Espectros FTIR de los hidrogeles, estériles, materias primas y neutralizantes.

Los espectros FTIR mostrados en la figura 7.18 corresponden a los cambios moleculares que ocurrieron en los hidrogeles F1:F5 al ser esterilizados. La esterilización con vapor indujo cambios en los hidrogeles, que son corroboradas en los espectros FTIR. Se observaron bandas similares en los espectros de las muestras no esterilizadas ligadas a los grupos funcionales que se encuentran en la goma xantana y el carbopol. El desplazamiento y los cambios en las bandas de intensidad indican interacciones químicas entre los grupos funcionales. (Jarry *et al.*, 2002) sugirieron que los productos coloreados que aparecían como probable consecuencia de la reacción de Maillard entre los grupos amino y carbonilo, deberían ser cuidadosamente examinados en términos de su biocompatibilidad y citotoxicidad, además (Lim, Khor & Ling, 1999) mencionan que el desplazamiento de la banda amino estaba relacionada con el entrecruzamiento de estos mismos grupos, aunque la coloración no se aprecia a simple vista, por los resultados de los espectros FTIR, se puede inferir que dicho fenómeno ocurrió.

Relacionando las caracterizaciones anteriores con estos resultados, la viscosidad cae significativamente en ambos escenarios cuando. Esto podría deberse a la naturaleza de la goma xantana. La goma xantana tiene una estructura en forma de hélice. La

temperatura rompe esta naturaleza helicoidal, lo que resulta en una caída de la viscosidad (Jadhav, Bhitre & Inamdar, 2018). Por lo tanto, para la esterilización de hidrogeles que contienen goma xantana se pueden utilizar otras técnicas de esterilización, como la esterilización por radiación o gaseosa.

7.6. Caracterización Biológica.

Se realizó una caracterización biológica a los hidrogeles mediante ensayos de citotoxicidad empleando un modelo de células *HeLa*. Además, de los hidrogeles también se determinaron características importantes de la bacteria probiótica *Lactococcus lactis* ATCC 11454, con el propósito de incorporarla a los hidrogeles estériles y evaluar la viabilidad bacteriana en condiciones de almacenamiento a 25°C y 4°C. Sin embargo, los resultados mostraron actividad interesante relacionada con el pH y la inhibición de crecimiento debido a la presencia de conservantes EDTA y el principio activo ácido láctico.

7.6.1. Cinética de Crecimiento *Lactococcus lactis* ATCC 11454.

En la figura 7.21 se muestra una curva de crecimiento de la bacteria donde la fase exponencial comenzó a la hora 5 y terminó a la hora 27. Comportamiento muy similar al reportado por (Lv, Cong & Cai, 2004) (De Vuyust & Vandamme, 1992).

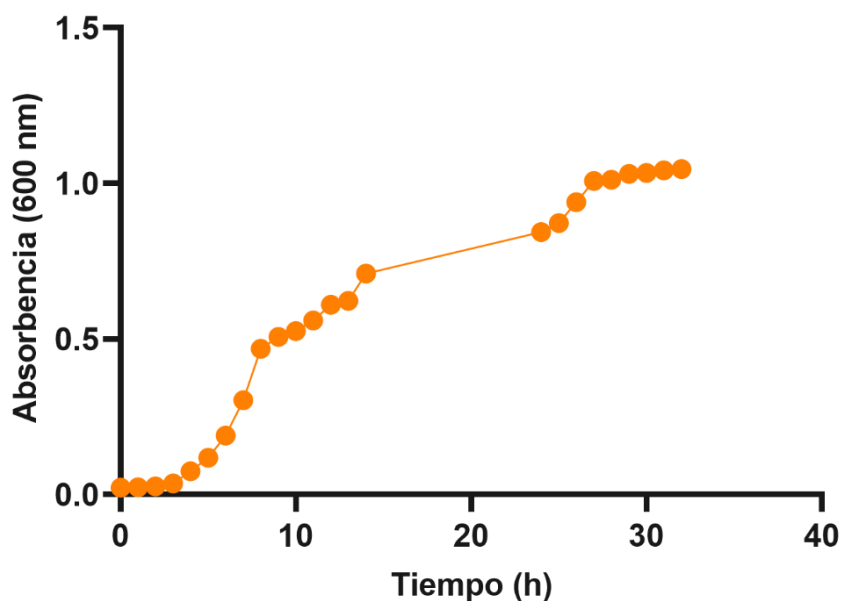


Figura 7.19 Cinética de crecimiento de *Lactococcus lactis* ATCC 11454 (37°C-5%CO₂), los datos son promedio de $n = 3$, \pm SD.

7.6.2. Tinción Gram.

En la figura 7.22 se observan formas tipo cocos característicos de la bacteria en estudio, además que se alcanza a apreciar la pared de peptidoglicano típica de las bacterias Gram positivas.

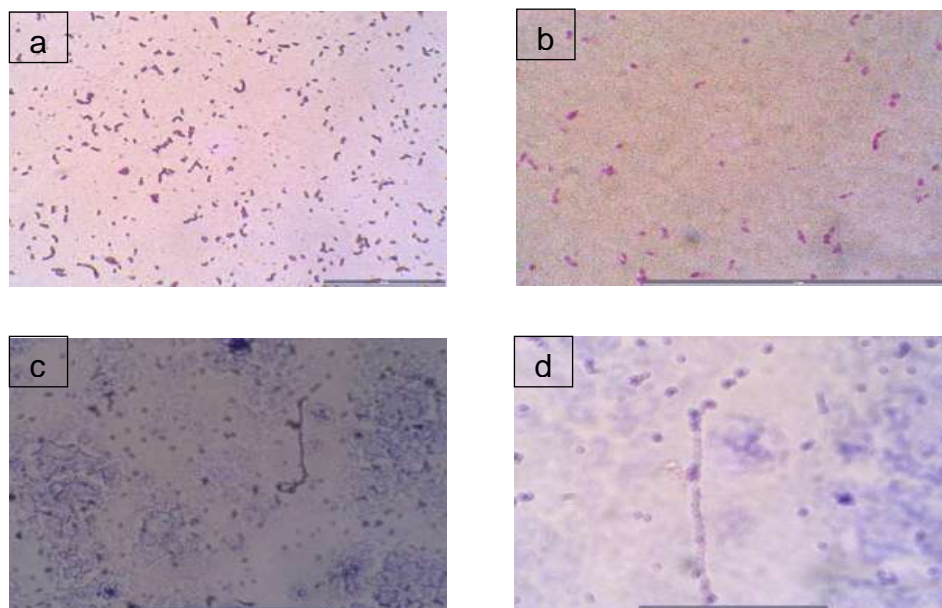


Figura 7.20. Pruebas de tinción Gram en *Lactococcus lactis* ATCC 11454 (36.a-36c 40x; 36b-36d 100x)

7.6.3. Conteo de viabilidad bacteriana.

Como se mencionó anteriormente, se tomó una muestra de la cinética de crecimiento a la hora 6, tomando como punto de partida que en la fase de crecimiento existe un mayor porcentaje de células bacterianas viables. A la hora 6 se presentó una absorbencia de 0.2. Este dato es importante, para poder determinar las UFC totales que se suspendieron en los hidrogeles. De acuerdo con (Oerlemans *et al.*,2020) se sugieren que la carga microbiana para un hidrogel de aplicación vaginal sea de 10^9 - 10^{10} UFC por gramo de hidrogel.

Se realizaron diluciones seriadas y el experimento se realizó por duplicado, en la tabla 7.8 se muestran los resultados del conteo.

Tabla 7.8. Resultados del conteo de dilución en placa de la muestra correspondiente a la fase de crecimiento inicial.

Dilución	UFC/mL
10^7	Incontable
10^6	Incontable
10^5	Incontable
10^4	9,820,000
10^3	329,000
10^2	136,150
10	525

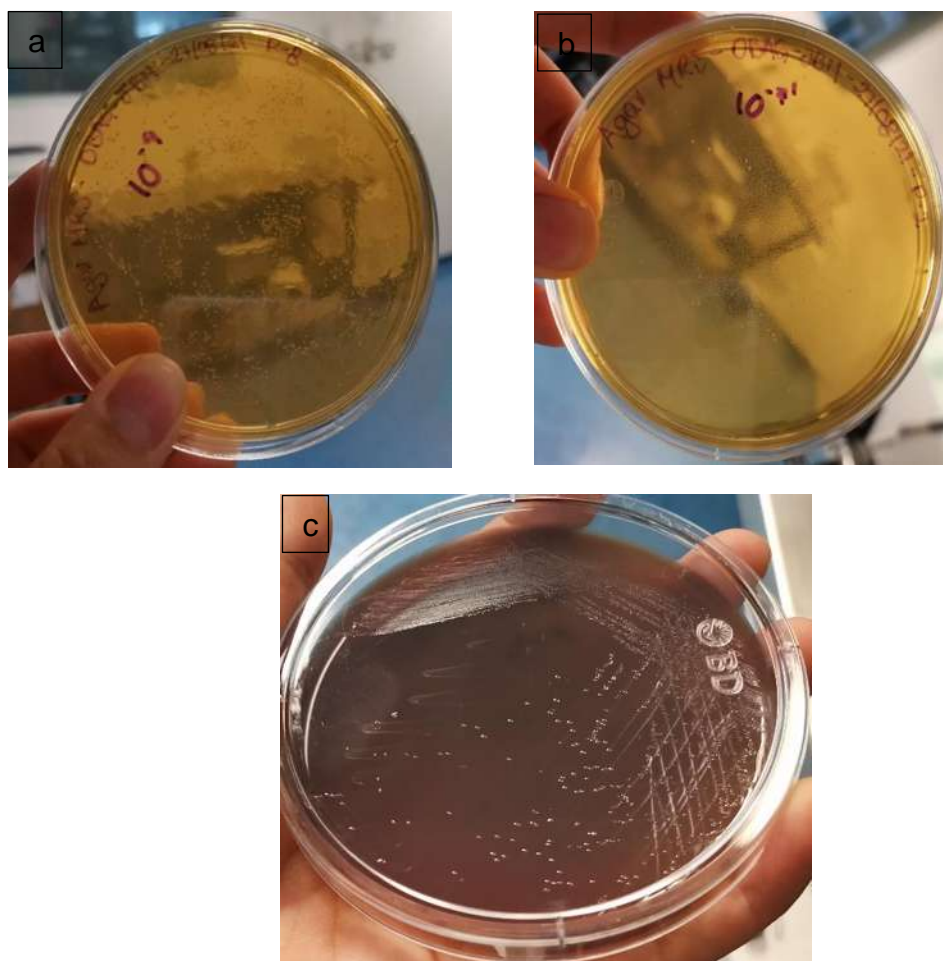


Figura 7.21. Placas de Agar MRS con crecimiento de la cepa *Lactococcus lactis* ATCC 11454. a) dilución 10^4 , b) dilución 10^1 , c) control de crecimiento.

En las figuras 7.23a y 7.23b, se muestra el crecimiento de la dilución 10^4 y 10^1 , respectivamente, las cuales pertenecen a los cultivos contables la más y la menos concentrada, observándose una forma redondeada esférica y de color blanquecino característico de la cepa, figura 7.23c.

7.6.4. Incorporación del probiótico a los hidrogel.

Se realizó la suspensión de la bacteria en una solución 50% glicerol 50% solución salina 0.85% y se incorporó en las formulaciones previamente esterilizados colocadas en un frasco de vidrio como se observa en la figura 7.24.



Figura 7.22. Hidrogel estériles adicionados con el probiótico *Lactococcus lactis* ATCC 11454 (T_0), los datos son promedio de $n = 3$, \pm SD.

7.6.5. Viabilidad del probiótico en suspensión.

En el tiempo inicial de las 12 semanas proyectadas, se sembró una muestra de cada hidrogel, sin embargo, a las 24 horas del experimento no se observó crecimiento en las cajas con Agar MRS. Ver figura 7.25.

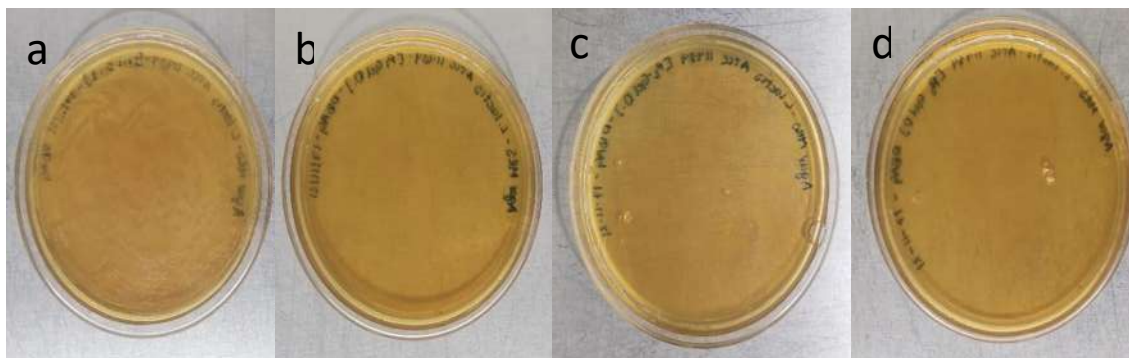


Figura 7.23. Placas de Agar MRS sin crecimiento aparente posterior a 24 h de incubación a 37°C – 5% CO₂ correspondiente al T₀.

Por lo tanto, en esta etapa de la formulación se propuso una estrategia adicional a la metodología establecida. Partiendo de posibilidades intrínsecas y extrínsecas a los hidrogeles, de acuerdo con lo reportado por (Hancock, 2005). Al tratarse de una bacteria gram positiva *Lactococcus lactis* ATCC 11454 se encuentra sensible a la lisis celular debido a la interacción de compuestos catiónicos que actúan con la membrana celular y destruyen la barrera penetrando al interior de la célula atacando objetivos internos, además algunos glicopéptidos bloquean la formación de la pared celular de peptidoglicano característico de las bacterias gram positivas, actuando directamente en la traducción y por ende afecta la síntesis de proteínas. Aunado a lo anterior y ya que el EDTA actúa como conservante y al tener 4 iones H⁺ es probable que su presencia en los hidrogeles tenga dicho efecto sobre *Lactococcus lactis* ATCC 11454. Además de acuerdo con los experimentos realizados durante la formulación de los hidrogeles el ácido láctico interfería en la reacción de neutralización debido a que tiene un efecto coagulante asociado al ion lactato que puede interferir con la ionización del ácido poliacrílico y sus neutralizantes, interfiriendo directamente en el pH. Por lo tanto, se planteó realizar una serie de pruebas mediante la técnica de halo de inhibición con las restricciones especificadas en la tabla 7.9.

Tabla 7.9. Formulaciones de los hidrogeles de prueba para Halo de inhibición.

Componentes	P4	P5	P6
<i>Carbopol 940</i>	1%	1%	1%
<i>Goma Xantana</i>	0.5%	0.5%	0.5%
<i>Glicerina</i>	10%	10%	10%
<i>Nisina</i>	0.05%	0.05%	0.05%
<i>Ac. Hialurónico</i>	0.125%	0.125%	0.125%
<i>Ac. Láctico</i>	1.5%	-----	-----
<i>Suspensión bacteriana</i>	10%	10%	10%
<i>EDTA</i>	0.1%	-----	-----
<i>Agua</i>	c.b.p.	c.b.p.	c.b.p.
<i>pH [Ajustado con NaOH 1 N]</i>	4.5	6.02	6.05
<i>Diámetro de inhibición</i>	22 mm	14 mm	12 mm

Se realizó un cultivo por extendido en medio sólido Agar MRS y se perfora con penicilindros previamente esterilizados, en las perforaciones se colocan 200 µL de hidrogel de prueba y se lleva a incubación durante 24 h.

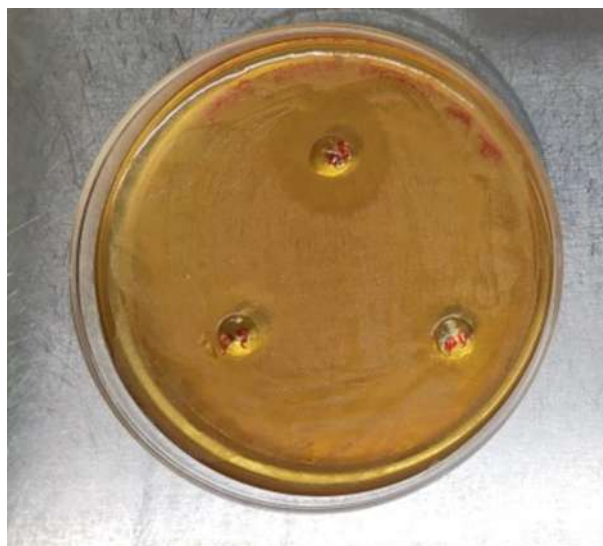


Figura 7.24. Resultados de la prueba de Halo de inhibición.

Como se observa en la Figura 7.26 y en la tabla 7.9 la formulación que presenta halo de inhibición de 12 mm, que es visiblemente mayor, correspondiente a la P4, la cual contiene ácido láctico y EDTA, además que su pH es más ácido en comparación con las formulaciones P5 y P6.

Por lo que se retomó la hipótesis que el factor determinante es el pH y, se realizaron más pruebas de inhibición ajustando a un pH más alcalino, presentando las características que se describen en la tabla 7.10.

Tabla 7.10. Formulaciones de los hidrogeles de prueba para Halo de inhibición.

Componentes	P7	P8	P9	P10	P11
Carbopol 940	1%	0.75%	0.5%	0.25%	0.10%
Goma Xantana	0.5%	0.5%	0.5%	0.5%	0.5%
Glicerina	10%	10%	10%	10%	10%
Nisina	0.05%	0.05%	0.05%	0.05%	0.05%
Ac. Hialurónico	0.125%	0.125%	0.125%	0.125%	0.125%
Suspensión bacteriana	10%	10%	10%	10%	10%

<i>Agua</i>	c.b.p.	c.b.p.	c.b.p.	c.b.p.	c.b.p.
<i>pH [Ajustado con NaOH 1 N]</i>	5.32	5.87	6.82	7.28	10.13
<i>Diámetro de inhibición</i>	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A

En la figura 7.27 se muestra la apariencia física de las formulaciones posterior al proceso de esterilización por autoclave, donde las formulaciones P10 y P11 mostraron un cambio en la coloración, dicho fenómeno ha sido relacionado con una reacción de hidrólisis de la goma xantana, de acuerdo con (Petitjean *et al.*,2020) la alteración en el color ocurre por efecto de una reacción de tipo Maillard, esto es frecuente cuando los materiales son sometidos a temperaturas elevadas, como es una esterilización por vapor.



Figura 7.25. Apariencia física de los hidrogeles formulados para prueba de Halo de inhibición

Los resultados de las pruebas de inhibición se muestran en la figura 7.28, en las cuales se muestra que no existe inhibición aparente a pesar del pH alcalino de las formulaciones, por lo que se comprobó que el factor determinante para inhibición bacteriana de la cepa en es el pH.

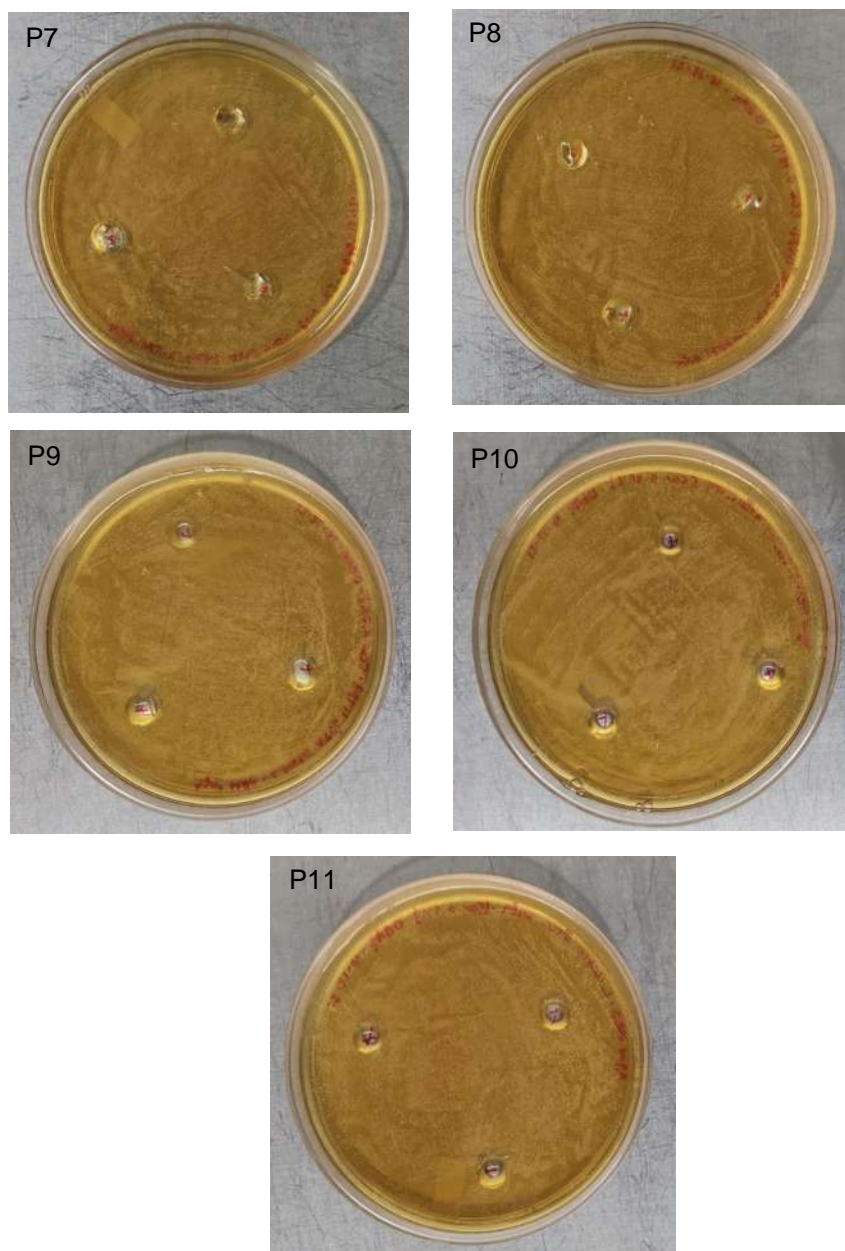


Figura 7.26. Resultados de la segunda prueba de inhibición.

7.6.6. Citocompatibilidad: método Live/Dead.

La capacidad de los hidrogeles para permitir el crecimiento de células *HeLa* sobre su superficie se ha evaluado mediante tinción con el kit de citotoxicidad/viabilidad *Live/Dead* y microscopía de las muestras. En la figura 7.29. se muestran las imágenes obtenidas con contraste de fases y con fluorescencia; mediante el filtro verde se observan

células vivas teñidas con calceína AM y con el filtro para rojo, las células muertas teñidas con el homodímero-1 de etidio. Como se puede ver en las imágenes, la mayor parte de las células siguen vivas tras las 72 horas de su sembrado, lo que demuestra la citocompatibilidad de los hidrogeles. (Sivaram *et al.*,2015) mencionan que la citocompatibilidad de nanogeles que contienen carbopol 940 en un modelo de células *HeLa* evaluados mediante la misma técnica, también se mostraron resultados positivos de citocompatibilidad. Cabe mencionar se observa mejor citocompatibilidad en los hidrogeles F3 y F5.

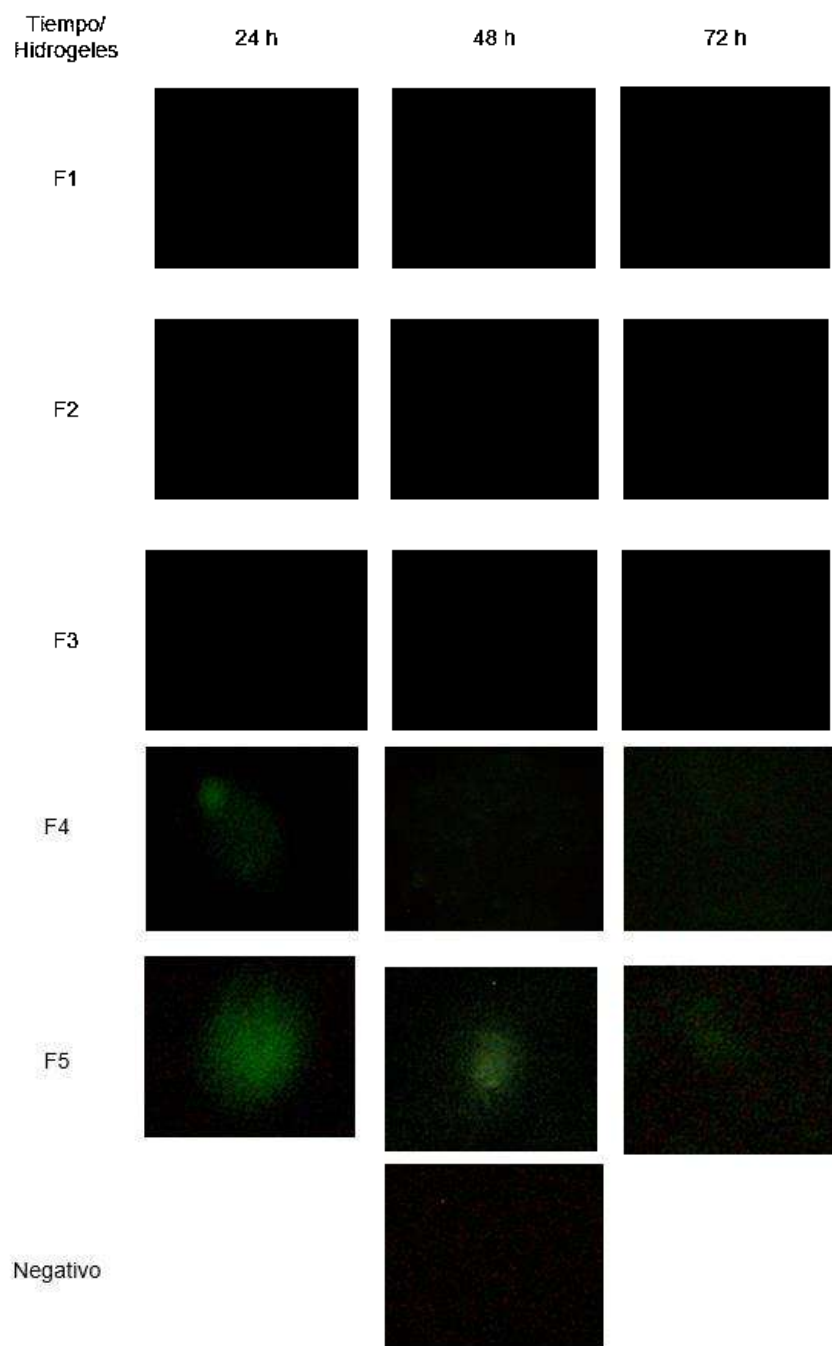


Figura 7.27. Evaluación de la viabilidad celular frente a exposición directa con los hidrogeles a 24 h, 48 h y 72 h, imágenes de campo claro representativa de la observación morfológica de las células HeLa. Barra de escala, 100 μm . tinción viva (verde)/muerta (roja)

7.6.7. Viabilidad celular: método MTT

La viabilidad celular de los hidrogeles se determinó mediante el porcentaje de supervivencia celular tras la exposición de células *HeLa* en una serie de cinco diluciones (100%, 75%, 50%, 25%, 12.5%), además esta misma exposición se evaluó durante 24, 48 y 72 horas de exposición, de acuerdo con la norma (ISO 10993-5).

En la figura 7.30 se muestran los resultados de viabilidad celular a las 24 horas de exposición. La viabilidad para las células expuestas al hidrogel F1 se muestran relativamente menor en comparación con el resto de los hidrogeles, mientras que la viabilidad de F2 y F3 y F4, las cuales contienen fueron neutralizadas con: TEA, AMP, Hidróxido de sodio, además contienen ácido láctico se encuentran en un intervalo entre 90 y 150%, mientras que para F5 que no contiene ácido láctico. se encuentra por encima del 100%, incluso diluida al 12.5% supera el 150% de viabilidad.

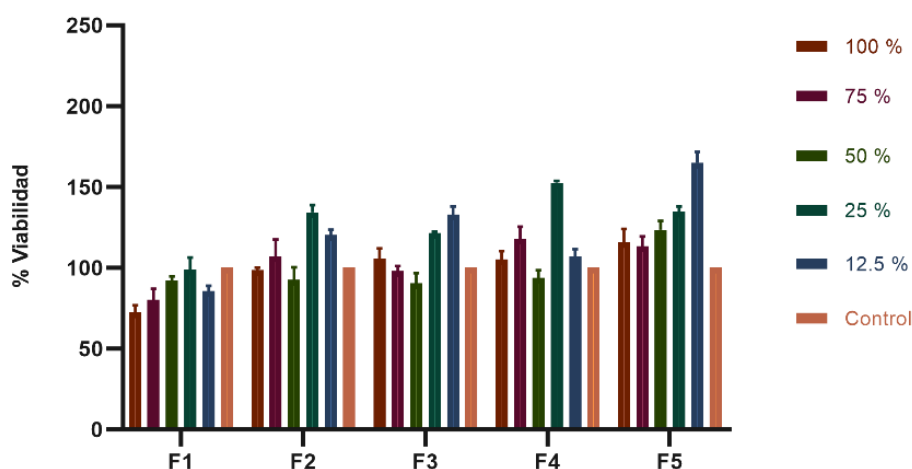


Figura 7.28. Resultados de viabilidad por MTT de los hidrogeles, a 5 diluciones a las 24 horas, los datos son promedio de $n = 3$, \pm SD.

La viabilidad celular a exposición durante 48 horas se muestra en la figura 7.31, presentó diversos cambios en comparación con los obtenidos a 24 horas, ya que para F1, F2 y F3 aumentó significativamente, puesto que a una dilución de 25 y 12.5% aumentó en un intervalo de 150 y 200 %, mientras que F5 presentó un comportamiento muy parecido a los resultados de exposición a las 24 horas, al igual que F1.

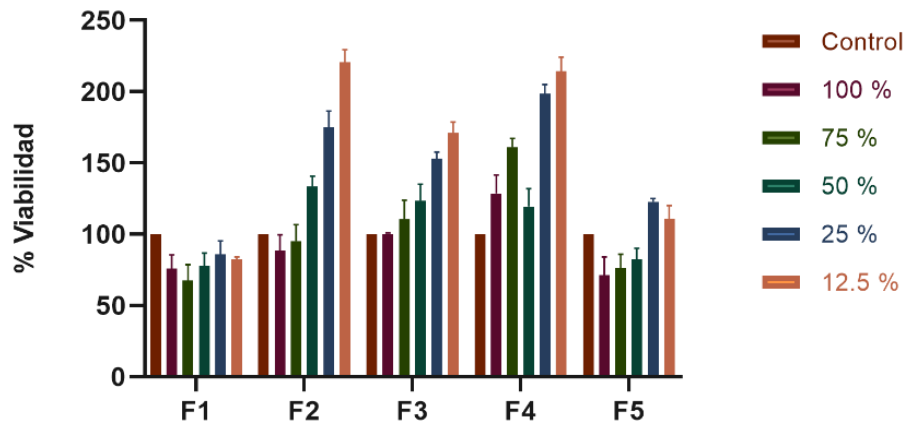


Figura 7.29. Resultados de viabilidad celular por MTT de los hidrogeles, a 5 diluciones a las 48 horas, los datos son promedio de $n = 3$, \pm SD.

En la figura 7.32 se muestra la viabilidad celular tras una exposición durante 72 h, en comparación con los resultados a 48 h de exposición, se puede observar una disminución de la viabilidad en F3, mientras que F2 y F4 mostraron un comportamiento muy parecido, por otro lado, F5 mostró un incremento significativo y F1 continuó con el mismo comportamiento.

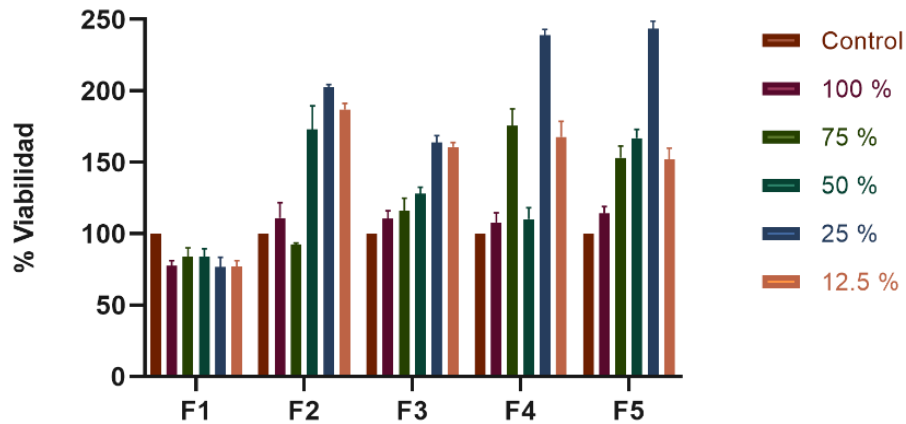


Figura 7.30. Resultados de viabilidad celular por MTT de los hidrogeles, a 5 diluciones a las 72 horas, los datos son promedio de $n = 3$, \pm SD.

La citocompatibilidad y la viabilidad celular son algunas de las propiedades más importantes de los biomateriales que tienen potencial aplicación directa con tejidos vivos. La prueba MTT se realizó para evaluar de forma indirecta la viabilidad de las células *HeLa* cultivadas a exposición de los hidrogeles, de acuerdo con los resultados obtenidos estos hidrogeles presentan una viabilidad positiva para las células *HeLa*. Además (Mirza *et al.*,2016) y (Dobaria & Mashru, 2009) reportaron valores de viabilidad celular comparables, disminución del 7% y 6%, respectivamente. Es importante mencionar que la neutralización asociada a los cambios de pH pueda estar relacionada con la viabilidad, aunque en el caso de F1, hidrogel no neutralizado el comportamiento de la viabilidad fue muy parecido a los tres tiempos de exposición evaluado, aunque no mostro un valor no viable (por debajo de 80%) de todas las formulaciones se consideraría el menos adecuado ya que es un hidrogel ácido y su comportamiento viscoelástico es muy débil en comparación con los hidrogeles F2:F5.

7.7 Resumen de Resultados obtenidos.

La caracterización fisicoquímica y biológica realizada en el presente proyecto de investigación fue extensa, en la tabla 7.11 se presenta un resumen de los resultados respecto a las caracterizaciones y a su vez una comparativa con lo reportado en la literatura, patentes y productos comerciales.

Tabla 7.11. Resumen de los resultados obtenidos de las caracterizaciones fisicoquímicas y biológicas en comparación con lo reportado en la literatura.

Características	Hidrogeles neutralizados (F2:F5)	Otros productos	Efectos terapéuticos recomendados
<i>Fisicoquímicas</i>			
pH	Los hidrogeles presentaron un valor de pH 4.5 y 6.2	Estos valores de pH son comparables con el gel vaginal comercial Fillergyn®	aliviar la sequedad vaginal y lubricación.
Viscosidad dinámica	La viscosidad dinámica del hidrogel F5 38.00 Pa*s es	Los valores de viscosidad dinámica de F5 son comparables con y	Replens: Alivio de sequedad vaginal

	evidentemente mayor que F2:F4 que son de (14.00, 18.00 y 15.00 Pa*s)	Replens (F2:F4) comparables con Gynofit	®, Gynofit: que restablecimiento son del microambiente vaginal.
Capacidad de amortiguamiento	Para romper la capacidad amortiguadora del hidrogel F2 son necesarios 0.5 Meq de NaOH 1 N, mientras que F3:F5 se necesitan 0.10 a 0.20 aproximadamente	Los valores de F2 son comparables con Geliofil classic® y F3:F5 son comparables con Replens®, Velastisa® Intim VG	Geliofil classic: contrarestar sequedad y aliviar ardores Velastisa Intim VG: Tratamiento no hormonal para aliviar sequedad.
Interacciones moleculares	Se observó una interacción entre el carbopol y la goma xantana en la región de 1600 cm ⁻¹ . Y una neutralización en 1550 cm ⁻¹	Actualmente las interacciones moleculares de hidrogeles a base de goma xantana y carbopol, han sido estudiados por separado, hasta el momento (Sahoo et al.,2011)	reportaron la interacción de ambos polímeros, sin embargo, el diseño del hidrogel se destinó para liberación de ciprofroxacino.
Propiedades reológicas	Los hidrogeles mostraron un comportamiento viscoelástico típico de un gel semisólido (G'>G'')	El comportamiento reológico de los hidrogeles F2:F5 tiene gran parecido con el gel RepHresh®, se infiere que los resultados son debido a que se encuentra formulado por polímeros ácidos.	Rephresh: equilibrar el pH y contrarrestar olor que se encuentra asociado con la proliferación de microorganismos patógenos.

<i>Biocompatibles</i>	Cito-compatibilidad	Los hidrogeles mostraron mayor confluencia de células teñidas de color verde (células vivas), lo que indica una cito compatibilidad positiva	La citocompatibilidad de los hidrogeles es comparable con lo reportado por (Sivaram et al., 2015) . Sin embargo, se enfocaron en formular nanogeles a base de carbopol y otros polímeros los cuales tienen aplicación general respecto a liberación de fármacos.
	Viabilidad celular	Tras el estudio de viabilidad celular todos los hidrogeles mostraron resultados positivos, es decir, por encima del 90% de viabilidad celular	La viabilidad celular es comparable con lo reportado por (Mirza et al., 2016) , quien reportaron una disminución del 7% de viabilidad en un gel cargado con itoconazol, mientras que (Dobaria & Mashru, 2009) reportaron una viabilidad por encima del 100 % para un hidrogel cargado con clindamicina. Itoconazol: tratamiento contra hongos y levaduras. Clindamicina: efecto antibiótico.

8. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

En este trabajo se mostró la formulación de hidrogeles neutralizados con diferentes bases (TEA, AMP y NaOH) para potencial aplicación en la salud vaginal. Tras un análisis de los diferentes mecanismos de neutralización y una caracterización fisicoquímica y biológica. El hidrogel F3, neutralizado con la alcanoamina Aminometil propanol (AMP) Presentó mejores capacidades de amortiguamiento tras la dilución con SFV y después de su esterilización.

En los resultados de pH, no hubo una alteración significativa en F3 al ser esterilizado con vapor, y su viscosidad dinámica se ve afectada únicamente tras ser diluido en SFV. Por lo tanto, se puede inferir que la neutralización de un sistema Carbopol – Goma Xantana con una alcanoamina primaria puede formar hidrogeles más estables, estructuralmente al tener dos posiciones disponibles, la sustitución de alquilo proporciona una mayor fuerza de base sobre las alcanoaminas terciarias como la TEA. Por otro lado, el hidrogel F5 presentó características comprables con F3, sin embargo, el efecto sobre la esterilización con vapor provocó un cambio estructural, lo cual se consideraría una desventaja, además de acuerdo con los resultados obtenidos de pH, F5 es bastante sensible a la dilución en SFV.

En general, el hidrogel F3 presenta mejores características fisicoquímicas y biocompatibles para una potencial aplicación en la salud vaginal, no obstante, es recomendable continuar con estudios respecto a otras caracterizaciones fisicoquímicas; un estudio que pueda evaluar los cambios en la osmolaridad bajo las tres condiciones estudiadas, asimismo, verificar la presencia de sales minerales mediante un estudio XRD. Evaluar más detalladamente el comportamiento reológico realizando un barrido de viscosidad vs esfuerzo cortante y poder determinar el índice de consistencia K y el factor n . Adicionalmente, es imprescindible explorar las características biocompatibles evaluando los efectos de viabilidad frente a otras líneas celulares vaginales (Queratinocitos vaginales).

Respecto a la viabilidad de bacterias probióticas, se recomienda una evaluación en un intervalo de pH ligeramente más neutro ($\text{pH} = 6$) y determinar cuantitativamente su permanencia suspendida en el hidrogel.

9. REFERENCIAS

- Al-Ghazzewi, F., & Tester, R. (2016). Biotherapeutic agents and vaginal health. *Journal of Applied Microbiology*, 121(1), 18–27. <https://doi.org/10.1111/jam.13054>
- Amabebe, E., & Anumba, D. O. C. (2018). Psychosocial Stress, Cortisol Levels, and Maintenance of Vaginal Health. *Frontiers in Endocrinology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00568>
- Andrews, G. P., Lavery, T. P., & Jones, D. S. (2009). Mucoadhesive polymeric platforms for controlled drug delivery. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 71(3), 505–518. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2008.09.028>
- Anukam, K. C. (2007). The potential role of probiotics in reducing poverty-associated infections in developing countries. *Journal of Infection in Developing Countries*, 1(2), 81-83.
- Anukam, K. C., Osazuwa, E. O., & Reid, G. (2006). Knowledge of probiotics by Nigerian clinicians. *International Journal of Probiotics and Prebiotics*, 1(1), 57.
- Apgar, B. S., Kaufman, A. H., Bettcher, C., & Parker-Featherstone, E. (2013). Gynecologic Procedures: Colposcopy, Treatments of Cervical Intraepithelial Neoplasia, and Endometrial Assessment. *American Family Physician*, 87(12), 836-843.
- Arpa, M. D., Yoltaş, A., Onay Tarlan, E., Şenyüz, C. A., Sipahi, H., Aydın, A., & Üstündağ Okur, N. (2020). New therapeutic system based on hydrogels for vaginal candidiasis management: formulation–characterization and *in vitro* evaluation based on vaginal irritation and direct contact test. *Pharmaceutical Development and Technology*, 25(10), 1238–1248. <https://doi.org/10.1080/10837450.2020.1809457>
- Asane, G. S., Nirmal, S. A., Rasal, K. B., Naik, A. A., Mahadik, M. S., & Rao, Y. M. (2008). Polymers for Mucoadhesive Drug Delivery System: A Current Status. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 34(11), 1246–1266. <https://doi.org/10.1080/03639040802026012>
- Baquedano, L., Beltrán, E., & Durán, M. (2014). Menopausia Salud Vaginal (AEEM). *Editor: Manubens M.*
- Barbed, L. A. (2007). Seguridad vaginal: opciones terapéuticas. *Farmacia profesional*, 21(4), 56-60.
- Baruffaldi, D., Pirri, C. F., & Frascella, F. (2021). 3D bioprinting of cell-laden carbopol bioinks. *Bioprinting*, 22, e00135. <https://doi.org/10.1016/j.bprint.2021.e00135>
- Behbakht, K., Friedman, J., Heimler, I., Aroutcheva, A., Simoes, J., & Faro, S. (2002). Role of the Vaginal Microbiological Ecosystem and Cytokine Profile in the Promotion of Cervical Dysplasia: A Case–Control Study. *Infectious Diseases in Obstetrics and Gynecology*, 10(4), 181–186. <https://doi.org/10.1155/s1064744902000200>

- Bernas, T., & Dobrucki, J. (2002). Mitochondrial and nonmitochondrial reduction of MTT: Interaction of MTT with TMRE, JC-1, and NAO mitochondrial fluorescent probes. *Cytometry*, *47*(4), 236–242. <https://doi.org/10.1002/cyto.10080>
- Bodaszewska-Lubas, M., Brzychczy-Wloch, M., Gosiewski, T., & Heczko, P. (2012). Antibacterial Activity of Selected Standard Strains of Lactic Acid Bacteria Producing Bacteriocins – Pilot Study. *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej*, *66*, 787–794. <https://doi.org/10.5604/17322693.1015531>
- Bolton, M., Van der Straten, A., & Cohen, C. R. (2008). Probiotics: Potential to Prevent HIV and Sexually Transmitted Infections in Women. *Sexually Transmitted Diseases*, *35*(3), 214–225. <https://doi.org/10.1097/olq.0b013e31815b017a>
- Bonferoni, M. C., Giunchedi, P., Scalia, S., Rossi, S., Sandri, G., & Caramella, C. (2006). Chitosan gels for the vaginal delivery of lactic acid: Relevance of formulation parameters to mucoadhesion and release mechanisms. *AAPS PharmSciTech*, *7*(4), E141-E147. <https://doi.org/10.1208/pt0704104>
- Borges, S., & Teixeira, P. (2014). *Pediococcus pentosaceus* SB83 as a potential probiotic incorporated in a liquid system for vaginal delivery. *Beneficial Microbes*, *5*(4), 421–426. <https://doi.org/10.3920/bm2013.0084>
- Borgogna, J. L. C., & Yeoman, C. J. (2017). The Application of Molecular Methods Towards an Understanding of the Role of the Vaginal Microbiome in Health and Disease. *Methods in Microbiology*, 37–91. <https://doi.org/10.1016/bs.mim.2017.08.003>
- Boris, S., Suárez, J. E., Vázquez, F., & Barbés, C. (1998). Adherence of Human Vaginal Lactobacilli to Vaginal Epithelial Cells and Interaction with Uropathogens. *Infection and Immunity*, *66*(5), 1985–1989. <https://doi.org/10.1128/iai.66.5.1985-1989.1998>
- Boskey, E., Cone, R., Whaley, K., & Moench, T. (2001). Origins of vaginal acidity: high d/l lactate ratio is consistent with bacteria being the primary source. *Human Reproduction*, *16*(9), 1809–1813. <https://doi.org/10.1093/humrep/16.9.1809>
- Budiman, N., & Sebayang, M. D. (2010). Study of Effect Ammonium Persulfate and Amino-Methylpropanol in grafting Maleic Anhydride on Polietilene in the Making Softener.
- Buggio, L., Somigliana, E., Borghi, A., & Vercellini, P. (2019). Probiotics and vaginal microecology: fact or fancy? *BMC Women's Health*, *19*(1). <https://doi.org/10.1186/s12905-019-0723-4>
- Carter, J., Baser, R. E., Goldfrank, D. J., Seidel, B., Milli, L., Stabile, C., Canty, J., Saban, S., Goldfarb, S., Dickler, M. N., Gardner, G. J., Jewell, E. L., Sonoda, Y., Kollmeier, M. A., & Alektiar, K. M. (2020). A single-arm, prospective trial investigating the effectiveness of a non-hormonal vaginal moisturizer containing hyaluronic acid in postmenopausal cancer survivors. *Supportive Care in Cancer*, *29*(1), 311–322. <https://doi.org/10.1007/s00520-020-05472-3>

- Castro, J., Machado, D., & Cerca, N. (2016). *Escherichia coli* and *Enterococcus faecalis* are able to incorporate and enhance a pre-formed *Gardnerella vaginalis* biofilm. *Pathogens and Disease*, 74(3), ftw007. <https://doi.org/10.1093/femspd/ftw007>
- Centers for Disease Control and Prevention- CDCP. (2021). *STD Facts - Human papillomavirus (HPV)*. Division of STD Prevention, National Center for HIV/AIDS, Viral Hepatitis, STD, and TB Prevention, Centers for Disease Control and Prevention Human Papillomavirus (HPV) Facts & Brochures HPV Fact Sheet HPV & Men Fact Sheet Vaccine Information for Young Women Statistics Treatment and Care Archive STDs Home Page Bacterial Vaginosis (BV) Chlamydia Gonorrhea Genital Herpes Hepatitis HIV/AIDS & STDs Human Papillomavirus (HPV) Pelvic Inflammatory Disease (PID) STDs & Infertility STDs & Pregnancy Syphilis Trichomoniasis Other STDs See Also CDC's HPV Topic Site HPV Vaccination Cancer Prevention and Control Cervical Cancer Screening CDC's National Breast and Cervical Cancer Early Detection Program Follow. <https://www.cdc.gov/std/HPV/STDFact-HPV.htm>
- Cevher, E., Taha, M. A., Orlu, M., & Araman, A. (2008). Evaluation of Mechanical and Mucoadhesive Properties of Clomiphene Citrate Gel Formulations Containing Carbomers and Their Thiolated Derivatives. *Drug Delivery*, 15(1), 57–67. <https://doi.org/10.1080/10717540701829234>
- Chen, Z., Zhao, D., Liu, B., Nian, G., Li, X., Yin, J., Qu, S., & Yang, W. (2019). 3D Printing of Multifunctional Hydrogels. *Advanced Functional Materials*, 29(20), 1900971. <https://doi.org/10.1002/adfm.201900971>
- Chenoll, E., Moreno, I., Sánchez, M., Garcia-Grau, I., Silva, N., González-Monfort, M., Genovés, S., Vilella, F., Seco-Durban, C., Simón, C., & Ramón, D. (2019). Selection of New Probiotics for Endometrial Health. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2019.00114>
- Chetwin, E., Manhanzva, M. T., Abrahams, A. G., Froissart, R., Gamielien, H., Jaspan, H., Jaumdally, S. Z., Barnabas, S. L., Dabee, S., Happel, A. U., Bowers, D., Davids, L., Passmore, J. A. S., & Masson, L. (2019). Antimicrobial and inflammatory properties of South African clinical *Lactobacillus* isolates and vaginal probiotics. *Scientific Reports*, 9(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-018-38253-4>
- Cotter, P. D., Hill, C., & Ross, R. P. (2005). Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Nature Reviews Microbiology*, 3(10), 777–788. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1273>
- Cribby, S., Taylor, M., & Reid, G. (2008). Vaginal Microbiota and the Use of Probiotics. *Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases*, 2008, 1–9. <https://doi.org/10.1155/2008/256490>

- Cuevas-González, M., Vega-Memije, M., Zambrano-Galván, G., García-Calderón, A. G., Escalante-Macías, L. H., Villanueva-Sánchez, F. G. (2018). Virus del papiloma humano, sus implicaciones en cavidad bucal; una revisión de la literatura. *Rev Nac Odontol*, 14 (27), 1-18.
- Cunha, A., Machado, R., Palmeira-de-Oliveira, A., Martínez-de-Oliveira, J., das Neves, J., & Palmeira-de-Oliveira, R. (2014). Characterization of Commercially Available Vaginal Lubricants: A Safety Perspective. *Pharmaceutics*, 6(3), 530–542. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics6030530>
- Criscuolo, A. A., Sesti, F., Piccione, E., Mancino, P., Belloni, E., Gullo, C., & Ciotti, M. (2020). Therapeutic Efficacy of a *Coriolus versicolor*-Based Vaginal Gel in Women with Cervical Uterine High-Risk HPV Infection: A Retrospective Observational Study. *Advances in Therapy*, 38(2), 1202–1211. <https://doi.org/10.1007/s12325-020-01594-6>
- De Arauz, L. J., Jozala, A. F., Mazzola, P. G., & Vessoni Penna, T. C. (2009). Nisin biotechnological production and application: a review. *Trends in Food Science & Technology*, 20(3–4), 146–154. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2009.01.056>
- De Vuyust, L., & Vandamme, E. J. (1992). Influence of the carbon source on nisin production in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* batch fermentations. *Journal of General Microbiology*, 138(3), 571–578. <https://doi.org/10.1099/00221287-138-3-571>
- De la Cadena, M. (2011). *Sistemas dispersos*. Material de aula. Quito: UCE.
- Di Giuseppe, E., Corbi, F., Funicello, F., Massmeyer, A., Santimano, T., Rosenau, M., & Davaille, A. (2015). Characterization of Carbopol® hydrogel rheology for experimental tectonics and geodynamics. *Tectonophysics*, 642, 29–45. <https://doi.org/10.1016/j.tecto.2014.12.005>
- Dobaria, N., & Mashru, R. (2009). Design and in vitro evaluation of a novel bioadhesive vaginal drug delivery system for clindamycin phosphate. *Pharmaceutical Development and Technology*, 15(4), 405–414. <https://doi.org/10.3109/10837450903262058>
- Döderlein, A. (1892). The vaginal transsudate and its significance for childbed fever. *Centralblatt für bacteriologie*, 11, 699-700.
- Domínguez-Bauta, S., Trujillo-Pérdomo, T., Aguilar-Fabré, K., & Hernández-Menéndez, M. (2018). Infección por el virus del papiloma humano en adolescentes y adultas jóvenes. *Revista Cubana de Obstetricia y Ginecología*, 44 (1), 1-15

- Donders, G., Bellen, G., Oerlemans, E., Claes, I., Ruban, K., Henkens, T., Kiekens, F., & Lebeer, S. (2020). The use of 3 selected lactobacillary strains in vaginal probiotic gel for the treatment of acute *Candida* vaginitis: a proof-of-concept study. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 39(8), 1551–1558. <https://doi.org/10.1007/s10096-020-03868-x>
- Escobar, L., Rivera, A., & Aristizábal, F. A. (2010). Estudio comparativo de los métodos de resazurina y MTT en estudios de citotoxicidad en líneas celulares tumorales humanas. *Vitae*, 17(1), 67-74.
- Ethier, A., Bansal, P., Baxter, J., Langley, N., Richardson, N., & Patel, A. M. (2019). The Role of Excipients in the Microstructure of Topical Semisolid Drug Products. *The Role of Microstructure in Topical Drug Product Development*, 155–193. https://doi.org/10.1007/978-3-030-17355-5_5
- Egawa, N., & Doorbar, J. (2017). The low-risk papillomaviruses. *Virus Research*, 231, 119–127. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2016.12.017>
- Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos (FEUM) 10 ed. México. (2011). Secretaría de Salud, Comisión permanente de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos.
- Fiorilli, A., Molteni, B., & Milani, M. (2005). Successful treatment of bacterial vaginosis with a polycarbophil-carbopol acidic vaginal gel: results from a randomised double-blind, placebo-controlled trial. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*, 120(2), 202–205. <https://doi.org/10.1016/j.ejogrb.2004.10.011>
- Forbes, C. J., Mccoy, C. F., Murphy, D. J., David Woolfson, A., Moore, J. P., Evans, A., Shattock, R. J., & Karl Malcolm, R. (2014). Modified Silicone Elastomer Vaginal Gels for Sustained Release of Antiretroviral HIV Microbicides. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 103(5), 1422–1432. <https://doi.org/10.1002/jps.23913>
- Garg, S., Vermani, K., Kohli, G., Kandarapu, R., Tambwekar, K., Garg, A., Waller, D., & Zaneveld, L. (2002). Compendium of Pharmaceutical Excipients for Vaginal Formulations. *International Journal of Pharmaceutical Medicine*, 16(3), 141–152. <https://doi.org/10.1097/00124363-200206000-00006>
- Gao, W., Weng, J., Gao, Y., & Chen, X. (2013). Comparison of the vaginal microbiota diversity of women with and without human papillomavirus infection: a cross-sectional study. *BMC Infectious Diseases*, 13(1). <https://doi.org/10.1186/1471-2334-13-271>

- García G., M.d.C. (2012). Goma gellan: formulación de geles fluidos y de emulsiones de a-pineno en presencia de copolímeros. (*Tesis Doctoral Inédita*). Universidad de Sevilla, Sevilla.
- Gennaro, A. (2003). *Farmacia de Remington*. Buenos Aires, Argentina: Médica Panamericana.
- Gillet, E., Meys, J. F., Verstraelen, H., Bosire, C., de Sutter, P., Temmerman, M., & Broeck, D. V. (2011). Bacterial vaginosis is associated with uterine cervical human papillomavirus infection: a meta-analysis. *BMC Infectious Diseases*, 11(1). <https://doi.org/10.1186/1471-2334-11-10>
- Guo, Y. L., You, K., Qiao, J., Zhao, Y. M., & Geng, L. (2012). Bacterial vaginosis is conducive to the persistence of HPV infection. *International Journal of STD & AIDS*, 23(8), 581–584. <https://doi.org/10.1258/ijsa.2012.011342>
- Hakimi, S., Farhan, F., Farshbaf-Khalili, A., Dehghan, P., Javadzadeh, Y., Abbasalizadeh, S., & Khalvati, B. (2017). The effect of prebiotic vaginal gel with adjuvant oral metronidazole tablets on treatment and recurrence of bacterial vaginosis: a triple-blind randomized controlled study. *Archives of Gynecology*
- Hancock, R. E. (2005). Mechanisms of action of newer antibiotics for Gram-positive pathogens. *The Lancet Infectious Diseases*, 5(4), 209–218. [https://doi.org/10.1016/s1473-3099\(05\)70051-7](https://doi.org/10.1016/s1473-3099(05)70051-7)
- Hennink, W., & Van Nostrum, C. (2002). Novel crosslinking methods to design hydrogels. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 54(1), 13–36. [https://doi.org/10.1016/s0169-409x\(01\)00240-x](https://doi.org/10.1016/s0169-409x(01)00240-x)
- Hsu, S. T. D., Breukink, E., Tischenko, E., Lutters, M. A. G., de Kruijff, B., Kaptein, R., Bonvin, A. M. J. J., & van Nuland, N. A. J. (2004). The nisin–lipid II complex reveals a pyrophosphate cage that provides a blueprint for novel antibiotics. *Nature Structural & Molecular Biology*, 11(10), 963–967. <https://doi.org/10.1038/nsmb830>
- Hussain, A., & Ahsan, F. (2005). The vagina as a route for systemic drug delivery. *Journal of Controlled Release*, 103(2), 301–313. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2004.11.034>
- Iannitti, T., & Palmieri, B. (2010). Therapeutical use of probiotic formulations in clinical practice. *Clinical Nutrition*, 29(6), 701–725. <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2010.05.004>
- IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. (1996). *Analytica Chimica Acta*, 336(1–3), 229–230. [https://doi.org/10.1016/s0003-2670\(97\)89591-8](https://doi.org/10.1016/s0003-2670(97)89591-8)
- Islam, M. T., Rodríguez-Hornedo, N., Ciotti, S., & Ackermann, C. (2004). Fourier transform infrared spectroscopy for the analysis of neutralizer-carbomer and surfactant-carbomer interactions in aqueous, hydroalcoholic, and anhydrous gel formulations. *The AAPS Journal*, 6(4), 61–67. <https://doi.org/10.1208/aapsj060435>

- Jadhav, S. S., Bhitre, M. J., & Inamdar, K. (2018). Identification of Polymer Synergy with Help of DOE. *International Journal of Emerging Technologies in Engineering Research (IJETER)* January, 6(1).
- Jarry, C., Leroux, J. C., Haeck, J., & Chaput, C. (2002). Irradiating or Autoclaving Chitosan/Polyol Solutions: Effect on Thermogelling Chitosan-.BETA.-glycerophosphate Systems. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 50(10), 1335–1340. <https://doi.org/10.1248/cpb.50.1335>
- Jiménez-castellanos, M. R., Zia, H., & Rhodes, C. T. (1993). Mucoadhesive Drug Delivery Systems. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 19(1–2), 143–194. <https://doi.org/10.3109/03639049309038765>
- Juturu, V., & Wu, J. C. (2018). Microbial production of bacteriocins: Latest research development and applications. *Biotechnology Advances*, 36(8), 2187–2200. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2018.10.007>
- Khan, H., Khan, A. R., Maheen, S., Hanif, M., Raza, S. A., Sarfraz, R. M., ... & Andleeb, M. (2015). Preparation and in vitro evaluation of sustained release microparticles of an antidiabetic drug. *Latin American Journal of Pharmacy*, 34, 1931-1939.
- Kurian, MJ, Rao, B., Rao, A. y Shameem, VPA (2016). Efecto del pH vaginal sobre la eficacia del gel de dinoprostona para la inducción del parto. *Revista internacional de reproducción, anticoncepción, obstetricia y ginecología*, 5 (4), 1196+. <https://link.gale.com/apps/doc/A456990144/HRCA?u=anon~5f7c05bb&sid=googleScholar&xid=b75d3756>
- Kristmundsdóttir, T., Sigurdsson, P., & Thormar, H. (2003). Effect of Buffers on the Properties of Microbicidal Hydrogels Containing Monoglyceride as the Active Ingredient. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 29(2), 121–129. <https://doi.org/10.1081/ddc-120016719>
- Kwiecień, I., & Kwiecień, M. (2018). Application of Polysaccharide-Based Hydrogels as Probiotic Delivery Systems. *Gels*, 4(2), 47. <https://doi.org/10.3390/gels4020047>
- Laftah, W. A., Hashim, S., & Ibrahim, A. N. (2011). Polymer Hydrogels: A Review. *Polymer-Plastics Technology and Engineering*, 50(14), 1475–1486. <https://doi.org/10.1080/03602559.2011.593082>
- Lee, C. H., & Chien, Y. W. (2013). Drug delivery: Vaginal route. In *Encyclopedia of Pharmaceutical Science and Technology, Fourth Edition* (pp. 1236-1259). CRC Press.
- Lopes, BDM, Lessa, VL, Silva, BM y La Cerda, LG (2015). Goma xantana: propiedades, condiciones de producción, calidad y perspectiva económica. *J. Alimentos Nutrición. Res.*, 54 (3), 185-194.

- Lee, C. H., & Chien, Y. W. (1996). Development and evaluation of a mucoadhesive drug delivery system for dual-controlled delivery of nonoxynol-9. *Journal of Controlled Release*, 39(1), 93–103. [https://doi.org/10.1016/0168-3659\(95\)00142-5](https://doi.org/10.1016/0168-3659(95)00142-5)
- Lewis, M. J. (2011). *Análisis de la situación del cáncer cervicouterino en América Latina y el Caribe*. IRIS PAHO. <https://iris.paho.org/handle/10665.2/762>
- Leyva-Gómez, G., del Prado-Audelo, M. L., Ortega-Peña, S., Mendoza-Muñoz, N., Urbán-Morlán, Z., González-Torres, M., González-Del Carmen, M., Figueroa-González, G., Reyes-Hernández, O. D., & Cortés, H. (2019). Modifications in Vaginal Microbiota and Their Influence on Drug Release: Challenges and Opportunities. *Pharmaceutics*, 11(5), 217. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics11050217>
- Lv, W., Cong, W., & Cai, Z. (2004). Nisin Production by *Lactococcus Lactis* Subsp. *lactis* under Nutritional Limitation in Fed-Batch Culture. *Biotechnology Letters*, 26(3), 235–238. <https://doi.org/10.1023/b:bile.0000013721.78288.1d>
- Macosko, C. W. (1994). *Rheology: Principles, Measurements, and Applications*. Wiley-Vch.
- Martín, R., Soberón, N., Vázquez, F., & Suárez, J. E. (2008). La microbiota vaginal: composición, papel protector, patología asociada y perspectivas terapéuticas. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 26(3), 160–167. <https://doi.org/10.1157/13116753>
- Martínez, M. (2016). *Desarrollo y aplicaciones de hidrogeles para la administración y liberación modificada de fármacos* [Tesis de doctorado, Universidad de Valencia]. Repositorio Institucional – Universidad de la Rioja.
- Martínez, B. (1996) Bacteriocinas de *Lactococcus lactis* aislados de quesos asturionos: Nisina z y Lactococina 972. Instituto de Productos Lácteos de Asturias.
- Massad, L. S. (2008). Outcomes After Diagnosis of Vaginal Intraepithelial Neoplasia. *Journal of Lower Genital Tract Disease*, 12(1), 16–19. <https://doi.org/10.1097/lgt.0b013e318074f968>
- Mauricio, E., Rosado, C., Duarte, M., Verissimo, J., Bom, S., & Vasconcelos, L. (2017). Efficiency of Nisin as Preservative in Cosmetics and Topical Products. *Cosmetics*, 4(4), 41. <https://doi.org/10.3390/cosmetics4040041>
- Medina-Villaseñor, E., Oliver-Parra, P., Neyra-Ortiz, E., Pérez-Castro, J., Sánchez-Orozco, J., & Contreras-González, N. (2014). Neoplasia intraepitelial cervical, análisis de las características clínico-patológicas. *Gaceta Mexicana de Oncología*, 13(1), 12-25.
- Mezger, T. G. (2013). *The Rheology Handbook* (3.^a ed.). Vincentz.

- Mirza, M. A., Panda, A. K., Asif, S., Verma, D., Talegaonkar, S., Manzoor, N., Khan, A., Ahmed, F. J., Dudeja, M., & Iqbal, Z. (2016). A vaginal drug delivery model. *Drug Delivery*, 23(8), 3123–3134. <https://doi.org/10.3109/10717544.2016.1153749>
- Mohamed, A. E., Elgammal, W. E., Eid, A. M., Dawaba, A. M., Ibrahim, A. G., Fouda, A., & Hassan, S. M. (2022). Synthesis and characterization of new functionalized chitosan and its antimicrobial and in-vitro release behavior from topical gel. *International Journal of Biological Macromolecules*, 207, 242–253. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.02.173>
- Montero, P. H. (2018). Cáncer de Cabeza y Cuello asociado a Virus Papiloma Humano: Prevención, diagnóstico y tratamiento. *Rev Med Clin Condes*, 29 (4), 419-426.
- Mossop, H., Linhares, I. M., Bongiovanni, A. M., Ledger, W. J., & Witkin, S. S. (2011). Influence of Lactic Acid on Endogenous and Viral RNA-Induced Immune Mediator Production by Vaginal Epithelial Cells. *Obstetrics & Gynecology*, 118(4), 840–846. <https://doi.org/10.1097/aog.0b013e31822da9e9>
- MY, H., A, H., & Nizam WA, W. A. (2020). Cytotoxicity Effect of Quercus infectoria Based Vaginal Cream on Hela Cells and its Preliminary in Vivo Toxicity Evaluation Towards Female Rats. *IJUM Medical Journal Malaysia*, 17(2). <https://doi.org/10.31436/imjm.v17i2.276>
- Nagy, E., FROMan, G., & MARDH, P. A. (1992). Fibronectin binding of Lactobacillus species isolated from women with and without bacterial vaginosis. *Journal of Medical Microbiology*, 37(1), 38–42. <https://doi.org/10.1099/00222615-37-1-38>
- Nami, Y., Haghshenas, B., Haghshenas, M., & Yari Khosroushahi, A. (2015). Antimicrobial activity and the presence of virulence factors and bacteriocin structural genes in Enterococcus faecium CM33 isolated from ewe colostrum. *Frontiers in Microbiology*, 6. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00782>
- Neves, J., da Silva, M., Goncalves, M., Amaral, M., & Bahia, M. (2009). Rheological Properties of Vaginal Hydrophilic Polymer Gels. *Current Drug Delivery*, 6(1), 83–92. <https://doi.org/10.2174/156720109787048294>
- N'Guessan G., K., Bouttier, S., Yeo, A., Aka Any-Grah, A., Geiger, S., Huang, N., Nicolas, V., Villebrun, S., Faye-Kette, H., Ponchel, G., Koffi, A., & Agnely, F. (2020). Characterization and in vitro evaluation of a vaginal gel containing Lactobacillus crispatus for the prevention of gonorrhoea. *International Journal of Pharmaceutics*, 588, 119733. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2020.119733>

- NOM-241-SSA1-2021. (2021) Norma Oficial Mexicana NOM-241-SSA1-2021, Buenas prácticas de fabricación de dispositivos médicos. Diario Oficial, Comité Consultivo Nacional de Normalización de Regulación y Fomento Sanitario.
- Oerlemans, E. F. M., Bellen, G., Claes, I., Henkens, T., Allonsius, C. N., Wittouck, S., van den Broek, M. F. L., Wuyts, S., Kiekens, F., Donders, G. G. G., & Lebeer, S. (2020). Impact of a lactobacilli-containing gel on vulvovaginal candidosis and the vaginal microbiome. *Scientific Reports*, *10*(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-020-64705-x>
- Oh, H., Kim, B. S., Seo, S. S., Kong, J. S., Lee, J. K., Park, S. Y., Hong, K. M., Kim, H. K., & Kim, M. (2015). The association of uterine cervical microbiota with an increased risk for cervical intraepithelial neoplasia in Korea. *Clinical Microbiology and Infection*, *21*(7), 674.e1-674.e9. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2015.02.026>
- O'Hanlon, D. E., Moench, T. R., & Cone, R. A. (2013). Vaginal pH and Microbicidal Lactic Acid When Lactobacilli Dominate the Microbiota. *PLoS ONE*, *8*(11), e80074. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0080074>
- Oppong, F. K., & de Bruyn, J. R. (2011). Microrheology and jamming in a yield-stress fluid. *Rheologica Acta*, *50*(4), 317–326. <https://doi.org/10.1007/s00397-010-0519-9>
- Owen, D. H., & Katz, D. F. (1999). A vaginal fluid simulant. *Contraception*, *59*(2), 91–95. [https://doi.org/10.1016/s0010-7824\(99\)00010-4](https://doi.org/10.1016/s0010-7824(99)00010-4)
- PA, R., Sailer, M., & Müller, A. (2020). Randomized, prospective trial to evaluate the effects of the intravaginal gel DeflaGyn® on the regression rate of HPV high-risk positive strains and the cytological p16/Ki67 marker in women with cytological findings according to Bethesda (ASC-US, LSIL, ASC-H, and HSIL). *Geburtshilfe und Frauenheilkunde*. <https://doi.org/10.1055/s-0040-1718175>
- Patel, P., & Patel, P. (2015). Formulation and evaluation of clindamycin HCL in situ gel for vaginal application. *International Journal of Pharmaceutical Investigation*, *5*(1), 50. <https://doi.org/10.4103/2230-973x.147233>
- Park, H., & Robinson, J. R. (1985). Physico-chemical properties of water insoluble polymers important to mucin/epithelial adhesion. *Journal of Controlled Release*, *2*, 47–57. [https://doi.org/10.1016/0168-3659\(85\)90032-x](https://doi.org/10.1016/0168-3659(85)90032-x)
- Park, A., & Shlepr, J. (2006). Carbopol® Aqua CC Polymer: The Premier Cationic Compatible Rheology Modifier for Low pH Formulations. *Cosmetic Science Technology*, 241-248.

- Petitjean, M., Aussant, F., Vergara, A., & Isasi, J. R. (2020). Solventless Crosslinking of Chitosan, Xanthan, and Locust Bean Gum Networks Functionalized with β -Cyclodextrin. *Gels*, 6(4), 51. <https://doi.org/10.3390/gels6040051>
- Putnam, K., Bombick, D., & Doolittle, D. (2002). Evaluation of eight in vitro assays for assessing the cytotoxicity of cigarette smoke condensate. *Toxicology in Vitro*, 16(5), 599–607. [https://doi.org/10.1016/s0887-2333\(02\)00050-4](https://doi.org/10.1016/s0887-2333(02)00050-4)
- Reid, G., & Bocking, A. (2003). The potential for probiotics to prevent bacterial vaginosis and preterm labor. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 189(4), 1202–1208. [https://doi.org/10.1067/s0002-9378\(03\)00495-2](https://doi.org/10.1067/s0002-9378(03)00495-2)
- Rossi, F., Perale, G., Storti, G., & Masi, M. (2011). A library of tunable agarose carbomer-based hydrogels for tissue engineering applications: The role of cross-linkers. *Journal of Applied Polymer Science*, 123(4), 2211–2221. <https://doi.org/10.1002/app.34731>
- Rupp, R., Rosenthal, S. L., & Stanberry, L. R. (2007). VivaGel (SPL7013 Gel): a candidate dendrimer-microbicide for the prevention of HIV and HSV infection. *International journal of nanomedicine*, 2(4), 561–566.
- Sahoo, S., Chakraborti, C. K., Mishra, S. C., Naik, S., & Nanda, U. N. (2011). FTIR and raman spectroscopy as a tool for analyzing sustained release hydrogel of ciprofloxacin/carbopol polymer.
- Sánchez, J. D. (s. f.). *Virus del Papiloma Humano (VPH)*. Pan American Health Organization / World Health Organization. Recuperado 2021, de https://www3.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=14873:sti-human-papilloma-virus-hpv&Itemid=3670&lang=es#:~:text=Las%20verrugas%20genitales%20causadas%20por,%3A%20bivalente%2C%20tetraivalente%20y%20nonavalente.
- Sanjeevani Shekhar, D., Kiran Suresh, A., & Jayashri Gajanan, M. (2022). In vitro and in vivo evaluation of prebiotic potential of pectin on vaginal lactobacilli. *Journal of Applied Biology & Biotechnology*. <https://doi.org/10.7324/jabb.2021.100113>
- Scherer, K., Spille, J. H., Sahl, H. G., Grein, F., & Kubitscheck, U. (2015). The Lantibiotic Nisin Induces Lipid II Aggregation, Causing Membrane Instability and Vesicle Budding. *Biophysical Journal*, 108(5), 1114–1124. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2015.01.020>

- Seo, S. S., Oh, H. Y., Lee, J. K., Kong, J. S., Lee, D. O., & Kim, M. K. (2016). Combined effect of diet and cervical microbiome on the risk of cervical intraepithelial neoplasia. *Clinical Nutrition*, 35(6), 1434–1441. <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2016.03.019>
- Serrano, L., López, A. C., González, S. P., Palacios, S., Dexeus, D., Centeno-Mediavilla, C., Coronado, P., de la Fuente, J., López, J. A., Vanrell, C., & Cortés, J. (2021). Efficacy of a *Coriolus versicolor*-Based Vaginal Gel in Women With Human Papillomavirus-Dependent Cervical Lesions. *Journal of Lower Genital Tract Disease*, Publish Ahead of Print. <https://doi.org/10.1097/lgt.0000000000000596>
- Silva, J., Cerqueira, F., & Medeiros, R. (2014). Chlamydia trachomatis infection: implications for HPV status and cervical cancer. *Archives of gynecology and obstetrics*, 289(4), 715–723. <https://doi.org/10.1007/s00404-013-3122-3>
- Simoës, J. A., Bahamondes, L. G., Camargo, R. P. S., Alves, V. M. N., Zaneveld, L. J. D., Waller, D. P., Schwartz, J., Callahan, M. M., & Mauck, C. K. (2006). A pilot clinical trial comparing an acid-buffering formulation (ACIDFORM gel) with metronidazole gel for the treatment of symptomatic bacterial vaginosis. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 61(2), 211–217. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2125.2005.02550.x>
- Sinha, A., & Ewies, A. A. A. (2013). Non-hormonal topical treatment of vulvovaginal atrophy: an up-to-date overview. *Climacteric*, 16(3), 305–312. <https://doi.org/10.3109/13697137.2012.756466>
- Sivaram, A. J., Rajitha, P., Maya, S., Jayakumar, R., & Sabitha, M. (2015). Nanogels for delivery, imaging and therapy. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology*, 7(4), 509–533. <https://doi.org/10.1002/wnan.1328>
- Smart, J. D., Kellaway, I. W., & Worthington, H. E. C. (1984). An in-vitro investigation of mucosa-adhesive materials for use in controlled drug delivery. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 36(5), 295–299. <https://doi.org/10.1111/j.2042-7158.1984.tb04377.x>
- Smith, S. B., & Ravel, J. (2016). The vaginal microbiota, host defence and reproductive physiology. *The Journal of Physiology*, 595(2), 451–463. <https://doi.org/10.1113/jp271694>
- Strus, M., Brzywczy-Włoch, M., Gosiewski, T., Kochan, P., & Heczko, P. B. (2006). The in vitro effect of hydrogen peroxide on vaginal microbial communities. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 48(1), 56–63. <https://doi.org/10.1111/j.1574-695x.2006.00120.x>
- Stanković, M., Savić, V., & Marinković, V. (2012). Development of Formulations for Vaginal Gel Carrier in the Pharmacy - a Regulatory and Quality Aspect. *Acta Facultatis Medicae Naissensis*, 29(1). <https://doi.org/10.2478/v10283-012-0004-8>

- Tachedjian, G., Aldunate, M., Bradshaw, C. S., & Cone, R. A. (2017). The role of lactic acid production by probiotic *Lactobacillus* species in vaginal health. *Research in Microbiology*, 168(9–10), 782–792. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2017.04.001>
- Tamburic, S. & Craig, D. (2011). *Rheological Evaluation of Polyacrylic Acid Hydrogels*. *Pharmacy and Pharmacology Communications*. 1. 107 - 109. 10.1111/j.2042-7158.1995.tb00403.x.
- The Lubrizol Corporation. (2011). *Productos químicos para aplicaciones especializadas - The Lubrizol Corporation*. The lubrizol corporation. Recuperado 30 de julio de 2022, de <https://espanol.lubrizol.com/>
- Thoma, M. E., Klebanoff, M. A., Rovner, A. J., Nansel, T. R., Neggers, Y., Andrews, W. W., & Schwebke, J. R. (2011). Bacterial Vaginosis Is Associated with Variation in Dietary Indices. *The Journal of Nutrition*, 141(9), 1698–1704. <https://doi.org/10.3945/jn.111.140541>
- Tomás, M., Palmeira-de-Oliveira, A., Simões, S., Martinez-de-Oliveira, J., & Palmeira-de-Oliveira, R. (2020). Bacterial vaginosis: Standard treatments and alternative strategies. *International Journal of Pharmaceutics*, 587, 119659. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2020.119659>
- Touitou, E., & Barry, B. W. (Eds.). (2006). Enhancement in Drug Delivery. *Enhancement in Drug Delivery*. <https://doi.org/10.1201/9781420004816>
- United States Pharmacopeia XXVIII. (2004). *The United States Pharmacopeia: USP 28: the National Formulary*. United States Pharmacopeia. Recuperado 2021, de <https://www.usp.org/>
- Uzcátegui, Y. B., Tovar, M. C., Lorenzo, C. J., & González, M. (2012). Patología vaginal: utilidad de la citología y la colposcopia como métodos diagnósticos. *Revista de Obstetricia y Ginecología de Venezuela*, 72(3), 161-170.
- Valenta, C., Kast, C. E., Harich, I., & Bernkop-Schnürch, A. (2001). Development and in vitro evaluation of a mucoadhesive vaginal delivery system for progesterone. *Journal of Controlled Release*, 77(3), 323–332. [https://doi.org/10.1016/s0168-3659\(01\)00520-x](https://doi.org/10.1016/s0168-3659(01)00520-x)
- Vega-García, A. E., Álvarez-Solorza, I., Toxqui-Tlachino, M. G., Ensastegui-Juárez, L., & Robles-Esquivel, M. D. (2018). Conductas de riesgo para contraer el virus de papiloma humano en estudiantes. *Convención Internacional de Salud, Cuba Salud*, 1-6.
- Velázquez, N. S., Turino, L. N., Luna, J. A., & Mengatto, L. N. (2019). Progesterone loaded thermosensitive hydrogel for vaginal application: Formulation and in vitro comparison with

commercial product. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 27(8), 1096–1106.
<https://doi.org/10.1016/j.jsps.2019.09.006>

- Vidal Torres, D. (2022). *Asociación del desarrollo de lesiones intraepiteliales cervicales con la presencia de coinfecciones del VPH y otros patógenos asociados a infecciones vaginales* (Doctoral dissertation, Universidad Autónoma de Nuevo León).
- Vriend, H. J., Stolte, I. G., Heijne, J. C. M., Heijman, T., de Vries, H. J. C., Geskus, R. B., van der Sande, M. A. B., & Prins, M. (2014). Repeated STI and HIV testing among HIV-negative men who have sex with men attending a large STI clinic in Amsterdam: a longitudinal study. *Sexually Transmitted Infections*, 91(4), 294–299. <https://doi.org/10.1136/sextrans-2014-051786>
- Wade, L. G. (2004). *QUIMICA ORGANICA 1* (7.ª ed.). PEARSON EDUCACION DE MEXICO.
- Wu, J. P., Fielding, S. L., & Fiscella, K. (2007). The effect of polycarbophil gel (Replens™) on bacterial vaginosis: A pilot study. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*, 130(1), 132–136. <https://doi.org/10.1016/j.ejogrb.2006.01.007>
- Xu, S., Cavera, V. L., Rogers, M. A., Huang, Q., Zubovskiy, K., & Chikindas, M. L. (2013). Benzoyl Peroxide Formulated Polycarbophil/Carbopol 934P Hydrogel with Selective Antimicrobial Activity, Potentially Beneficial for Treatment and Prevention of Bacterial Vaginosis. *Infectious Diseases in Obstetrics and Gynecology*, 2013, 1–10. <https://doi.org/10.1155/2013/909354>
- Yu, T., Malcolm, K., Woolfson, D., Jones, D. S., & Andrews, G. P. (2011). Vaginal gel drug delivery systems: understanding rheological characteristics and performance. *Expert Opinion on Drug Delivery*, 8(10), 1309–1322. <https://doi.org/10.1517/17425247.2011.600119>