

Universidad Peruana Cayetano Heredia

Facultad de Ciencias “Alberto Cazorla Talleri”



**Determinación de la Actividad Antifúngica de Nanopartículas
Poliméricas de Quitosano Cargadas con Ácido S-
Nitrosomercaptosuccínico sobre *Candida albicans* y *Candida glabrata***

Autora: Gabriela Jesús Morón Atencio

Tesis para optar por el Título Profesional de Químico Farmacéutico

Lima, Perú

2018

Asesora:

M.Sc. Susana Zurita Macalupú

Jurado

Presidente: Dr. José Luis Bauer Cuya

Vocal: Ph.D. Claudia Machicado Rivero

Secretaria: M.Sc. Carolina Ponce de León de Lama

"No deberían existir fronteras para el esfuerzo humano.

Por muy dura que nos parezca la vida,

mientras haya vida hay esperanza".

~Stephen Hawking

“Este logro académico está dedicado a la memoria de mi abuelo Telésforo Atencio, natural del histórico pueblo de Rancas, quien alguna vez abandonó la escuela primaria para sacar adelante a su familia, quien nunca dejó de defender con valentía su tierra”.

Agradecimientos

A mi asesora, la **Dra. Susana Zurita**, quien desde un inicio se mostró presta a escuchar mis ideas y ponerlas en marcha, dedicando su tiempo en el diseño, desarrollo y edición de este trabajo. Porque sin su exigencia, sabiduría y tesón, esta tesis no sería la misma.

A la **Blga. Flor Urcia y Tec. Alida Navarro**, equipo del Laboratorio de Micología del Instituto Nacional de Salud, por dedicarme su tiempo, preocupación y regalarme su valiosa amistad.

A la **Dra. Ana Valderrama**, quien me abrió las puertas de su laboratorio en la Universidad Nacional de Ingeniería, brindándome su apoyo incondicional. Siempre recordaré mi estancia en LIBIPMET como una de las experiencias más gratas en mi vida universitaria.

Al **Dr. Hugo Alarcón**, por su generosidad, dado que sin su colaboración este trabajo hubiera sido imposible de concretar.

Al **Dr. Juan Ramírez**, porque gracias a su estímulo y amor a la docencia, este proyecto dio sus primeros pasos en las aulas de la facultad.

Así mismo, al **Dr. León Villegas y el equipo del Laboratorio de Control de Calidad (UPCH)**, porque siempre nos recibieron con las manos abiertas a mí y a mis compañeros. Al **Blgo. Julio Hidalgo**, cuyo apoyo durante mis años de estudiante ha sido inconmensurable.

A **Héctor Cruz**, por ayudarme a dar mis primeros pasos en la investigación con quitosano, por su entusiasmo y amistad. A **Alejandro Aranda, Samuel Saire, Larry Aguirre, Jimmy Charri, Marco Calderón, Junior León, Jesús Utano, Julio Barrios, Julio Ojeda, Ronny Huamaní, Jose Luis Conislla y Luis Tirado** porque cuando hubo apuros, pude encontrar su valiosa, sincera y fraterna ayuda.

A mi madre, **Violeta Atencio**, a quien le debo todo lo que soy. Quien me enseñó que nunca es tarde para aprender y su ímpetu es el mejor aliciente para seguir mis sueños. A mi padre **Augusto Morón (Q.E.P.D)**, porque con el tiempo voy comprendiendo la magnitud de su amor. A mi **familia**, porque en horas aciagas ha demostrado ser fuente de fortaleza y unión.

A **¡Gabriela Diaz!** cuya entrañable amistad siempre será el mejor antídoto contra los problemas.

A la **poesía**, porque gracias a ella no he sido consumida por el cansancio. Y a **Dante**, porque donde haya poesía estará él.

ÍNDICE

I.	INTRODUCCIÓN	- 17 -
1.1.	Candidiasis: Epidemiología y Tratamiento	- 17 -
1.2.	Óxido Nítrico (NO)	- 19 -
1.2.1.	Presencia a Condiciones Fisiológicas	- 19 -
1.2.2.	Actividad Antifúngica contra <i>Candida sp.</i>	- 20 -
1.2.3.	Drogas Donadoras de NO: S-nitrosotioles	- 21 -
1.2.4.	Toxicidad	- 21 -
1.3.	Biopolímeros	- 22 -
1.3.1.	Quitosano	- 23 -
1.4.	Nanopartículas Poliméricas	- 25 -
1.4.1.	Parámetros Físicos	- 25 -
1.4.2.	Método de Síntesis	- 25 -
1.4.3.	Toxicidad	- 27 -
1.5.	Método de Microdilución en Caldo para la Determinación de Actividad Antifúngica	- 28 -
1.6.	Justificación	- 29 -
II.	HIPÓTESIS / PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN Y OBJETIVOS	- 30 -
2.1.	Hipótesis	- 30 -
2.2.	Pregunta de Investigación	- 30 -
2.3.	Objetivos	- 30 -
2.3.1.	Objetivo General:	- 30 -
2.3.2.	Objetivos Específicos:	- 30 -
III.	MATERIALES Y MÉTODOS	- 31 -
3.1.	Determinación del Grado de Desacetilación, Peso Molecular del Quitosano y Espectroscopía Infrarrojo	- 31 -
3.1.1.	Determinación del Grado de Desacetilación por Titulación Conductimétrica	- 31 -
3.1.2.	Determinación del Peso Molecular por Viscosimetría Capilar	- 33 -
3.1.3.	Espectroscopía Infrarrojo con Transformada de Fourier y ATR	- 35 -
3.2.	Síntesis de Nanopartículas Poliméricas de Quitosano Cargadas con Ácido Mercaptosuccínico (MSA Np) por el Método de Gelación Ionotrópica	- 36 -
3.3.	Determinación de Parámetros Físicos de las MSA Np por la técnica de Dispersión de Luz Dinámica	- 39 -

3.4.	Determinación de la Eficiencia de Encapsulación de las MSA Np por el Método de Ellman	- 41 -
3.5.	Determinación de Actividad Antifúngica de las MSA-NO Np por el Método de Microdilución M27 – A3	- 45 -
3.6.	Estimación del Perfil de Liberación de NO por las MSA-NO Np	- 49 -
IV.	RESULTADOS	- 51 -
4.1.	Determinación del Grado de Desacetilación, Peso Molecular, Espectro Infrarrojo del Quitosano	- 51 -
4.1.1.	Grado de Desacetilación	- 51 -
4.1.2.	Peso Molecular	- 51 -
4.1.3.	Espectro Infrarrojo	- 52 -
4.2.	Determinación de Parámetros Físicos de las MSA Np	- 53 -
4.3.	Determinación de la Eficiencia de Encapsulación de las MSA Np	- 55 -
4.4.	Determinación de la Actividad Antifúngica de las MSA-NO Np	56 -
4.4.1.	Identificación de las cepas <i>Candida sp.</i>	- 56 -
4.4.2.	Microdilución M27-A3	- 57 -
4.5.	Estimación del Perfil de Liberación de NO por las MSA-NO Np	- 61 -
4.5.1.	Perfil de Liberación de NO por las MSA-NO Np a la CMI de <i>C. krusei</i> (0.14 mg/mL)	- 61 -
4.5.2.	Perfil de Liberación de NO por las MSA-NO Np a la CMI de <i>C. glabrata</i> (0.28 mg/mL)	- 62 -
4.5.3.	Perfil de Liberación de NO por las MSA-NO Np a la CMI de <i>C. parapsilosis</i> (0.56 mg/mL)	- 63 -
4.5.4.	Perfil de Liberación de NO por las MSA-NO Np a la CMI de <i>C. albicans</i> (2.25 mg/mL)	- 64 -
V.	DISCUSIÓN	- 65 -
VI.	CONCLUSIONES	- 73 -
VII.	RECOMENDACIONES	- 74 -
VIII.	BIBLIOGRAFÍA	- 75 -
IX.	ANEXOS	- 84 -

RELACIÓN DE TABLAS

Tabla 1. Especificaciones de Calidad del Grado de Desacetilación del Quitosano	- 32 -
Tabla 2. Especificaciones de Calidad del Peso Molecular del Quitosano	- 34-
Tabla 3. Especificaciones de Calidad del Espectro FTIR del Quitosano	- 36 -
Tabla 4. Especificaciones de Calidad de los Parámetros Físicos de MSA Np	- 40 -
Tabla 5. Especificaciones de Calidad de la Eficiencia de Encapsulación de MSA Np	- 42 -
Tabla 6. Preparación de soluciones patrón para la curva de calibración del Ensayo de Ellman	- 43-
Tabla 7. Especificación de calidad de la liberación de NO por MSA-NO Np	- 50 -
Tabla 8. Resultados de la Determinación del GD de Quitosano	- 51 -
Tabla 9. Resultados de la Determinación del PM del Quitosano	- 52 –
Tabla 10. Resultados en términos de pico de absorbancia del espectro IR del quitosano	- 53 -
Tabla 11. Resultados de la Determinación de los Parámetros Físicos DE e IPD de los lotes de MSA Np	- 53 –
Tabla 12. Análisis de varianzas ANOVA Unifactorial del DE de los lotes de MSA Np	- 54 -
Tabla 13. Análisis de Subconjuntos Homogéneos del DE de los lotes de MSA Np	- 54 -
Tabla 14. Análisis de varianzas ANOVA Unifactorial del IPD de los lotes de MSA Np	- 55-
Tabla 15. Análisis de Subconjuntos Homogéneos del Índice de IPD de los lotes de MSA Np	- 55 -
Tabla 16. Resultados de la Determinación de la EE% de los lotes de MSA Np	- 55 –
Tabla 17. Análisis de varianzas Kruskal-Wallis para la EE% de los lotes de MSA Np	- 56 -
Tabla 18. Resultados de las pruebas de Identificación de las Cepas de <i>Candida sp.</i>	- 56 -
Tabla 19. Resultados del ensayo de Microdilución M27-A3 de MSA-NO Np en términos de CMI (en mg/mL)	- 57 -
Tabla 20. Resultados del ensayo de Microdilución M27-A3 en términos de CMI del MSA-NO (en mg/mL)	- 58 -
Tabla 21. Resultados del ensayo de Microdilución M27-A3 en términos de CMI del Quitosano (en mg/mL)	- 58 -

Tabla 22. Incidencia de Crecimiento Paradójico en el ensayo de Microdilución M27-A3 de MSA NO Np a la concentración 4.5 mg/mL - 59 -

Tabla 23. Análisis de varianzas Kruskal-Wallis para las CMI de *Candida sp.* de MSA-NO Np

- 60 -

RELACIÓN DE FIGURAS

Figura 1. A la izquierda: Esquema del Viscosímetro de Ostwald. A la derecha: Foto del sistema de baño María y viscosímetro	- 33 -
Figura 2. Equipo de Espectroscopía Infrarrojo con Transformada de Fourier	- 35 -
Figura 3. Esquema de Síntesis de MSA Np	- 38 -
Figura 4. Imágenes de la Síntesis de MSA Np	- 38 -
Figura 5. Distribución del Lote	- 39 -
Figura 6. Determinación de Parámetros Físicos en el Equipo NanoBrook 90 Plus	- 40 -
Figura 7. Presencia del grupo tiol (-SH) en el MSA	- 41 -
Figura 8. Reacción de Ellman	- 41 -
Figura 9. Lectura de la Reacción de Ellman por Espectrofotometría UV-visible	- 44 -
Figura 10. Ambiente para el manejo de <i>Candida sp.</i>	- 49 -
Figura 11. Cabina de Bioseguridad Clase II Tipo A	- 49 -
Figura 12. Esquema del ensayo de estimación del perfil de liberación del NO por MSA-NO Np	- 51 -
Figura 13. Espectro Infrarrojo del Quitosano	- 52 -
Figura 14. Esquema de la lectura del ensayo de Microdilución M27-A3 de MSA-NO Np	- 57 -
Figura 15. Esquema de la lectura del ensayo de Microdilución M27-A3 del MSA-NO	- 58 -
Figura 16. Esquema de la lectura del ensayo de Microdilución M27-A3 del Quitosano	- 58 -
Figura 17. Esquema de placa donde se observa Crecimiento Paradójico observado en la Microdilución M27 A-3 de MSA-NO Np	- 59 -
Figura 18. Perfil de Liberación del NO por MSA-NO (0.14 mg/mL)	- 61 -
Figura 19. Perfil de Liberación del NO por MSA-NO Np LOTE 01 (0.14 mg/mL)	- 61 -
Figura 20. Perfil de Liberación del NO por MSA-NO Np LOTE 02 (0.14 mg/mL)	- 61 -
Figura 21. Perfil de Liberación del NO por MSA-NO Np LOTE 03 (0.14 mg/mL)	- 61 -
Figura 22. Perfil de Liberación del NO por MSA-NO (0.28 mg/mL)	- 62 -
Figura 23. Perfil de Liberación del NO por MSA-NO Np LOTE 01 (0.28 mg/mL)	- 62 -
Figura 24. Perfil de Liberación del NO por MSA-NO Np LOTE 02 (0.28 mg/mL)	- 62 -
Figura 25. Perfil de Liberación del NO por MSA-NO Np LOTE 03 (0.28 mg/mL)	- 62 -
Figura 26. Perfil de Liberación del NO por MSA-NO (0.56 mg/mL)	- 63 -
Figura 27. Perfil de Liberación del NO por MSA-NO Np LOTE 01 (0.56 mg/mL)	- 63 -
Figura 28. Perfil de Liberación del NO por MSA-NO Np LOTE 02 (0.56 mg/mL)	- 63 -

Figura 29. Perfil de Liberación del NO por MSA-NO Np LOTE 03 (0.56 mg/mL)	- 63-
Figura 30. Perfil de Liberación del NO por MSA-NO (2.25 mg/mL)	- 64 -
Figura 31. Perfil de Liberación del NO por MSA-NO Np LOTE 01 (2.25 mg/mL)	- 64-
Figura 32. Perfil de Liberación del NO por MSA-NO Np LOTE 02 (2.25 mg/mL)	-64 -
Figura 33. Perfil de Liberación del NO por MSA-NO Np LOTE 03 (2.25 mg/mL)	-64-

RELACIÓN DE ANEXOS

Anexo 01. FOR 01 / Q: FORMATO PARA LA DETERMINACIÓN DEL GRADO DE DESACETILACIÓN DEL QUITOSANO POR EL MÉTODO DE TITULACIÓN CONDUCTIMÉTRICA

Anexo 02. FOR 02/ Q: FORMATO PARA LA DETERMINACIÓN DE PESO MOLECULAR DEL QUITOSANO POR VISCOSIMETRÍA CAPILAR.

Anexo 03. FOR 03/ Q: FORMATO PARA LA DETERMINACIÓN DEL ESPECTRO INFRARROJO DEL QUITOSANO

Anexo 04. CERTIFICADO DE ANÁLISIS DE MATERIA PRIMA QUITOSANO OTORGADO POR PROVEEDOR GTC UNION GROUP LTD.

Anexo 05. RESULTADOS DE ANÁLISIS DE PARÁMETROS FÍSICOS. ENSAYOS PILOTO

Anexo 06. FÓRMULA CUALI-CUANTITATIVA DE NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS DE QUITOSANO CARGADAS CON ÁCIDO S-NITROSOMERCAPTOSUCCÍNICO.

Anexo 07. PROCEDIMIENTO PARA EL ROTULADO DE LAS MUESTRAS DEL LOTE DE NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS DE QUITOSANO CARGADAS CON ÁCIDO MERCAPTOSUCCÍNICO

Anexo 08. FOR 01/ NP: FORMATO DE ANÁLISIS DE PARÁMETROS FÍSICOS DE NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS DE QUITOSANO CARGADAS CON ÁCIDO MERCAPTOSUCCÍNICO

Anexo 09. CONSTANCIA DE ANÁLISIS DE DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS FÍSICOS EN EQUIPO DLS OTORGADA POR LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE INGENIERÍA

Anexo 10. FOR 02/NP: FORMATO DE CURVA DE CALIBRACIÓN PARA LA CUANTIFICACIÓN DE ÁCIDO MERCAPTOSUCCÍNICO EN NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS DE QUITOSANO

Anexo 11. FOR 03/NP: FORMATO PARA LA DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE ÁCIDO MERCAPTOSUCCÍNICO ENCAPSULADO EN NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS DE QUITOSANO Y SU EFICIENCIA DE ENCAPSULACIÓN.

Anexo 12. FORMULARIO DE CONTROL DE CALIDAD HONGOS LEVADURIFORMES ESPECIES DE CANDIDA SP.

Anexo 13. FORMULARIO DE CONTROL DE LECTURA MICRODILUCIÓN EN CALDO PARA LA DETERMINACIÓN DE CMI EN LEVADURAS (FLUCONAZOL)

Anexo 14. FORMULARIO DE CONTROL DE LECTURA MICRODILUCIÓN EN CALDO PARA LA DETERMINACIÓN DE CMI EN LEVADURAS (VORICONAZOL)

Anexo 15. FOR 04/ NP CONTROL DE LECTURA MICRODILUCIÓN EN CALDO PARA LA DETERMINACIÓN DE CMI EN LEVADURAS (MSA-NO /MSA-NO Np)

Anexo 16. FOR 05/ NP FORMATO DE ANÁLISIS DEL PERFIL DE LIBERACIÓN DEL ÓXIDO NÍTRICO POR LAS NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS DE QUITOSANO CARGADAS CON MSA-NO

Anexo 17. TRATAMIENTO ESTADÍSTICO DE RESULTADOS

Anexo 18. TABLA DE DISTRIBUCIÓN JI CUADRADA CON NIVEL DE SIGNIFICANCIA 0.05

Anexo 19. TABLA DE DISTRIBUCIÓN DE FISHER CON NIVEL DE SIGNIFICANCIA 0.05

RELACIÓN DE ABREVIATURAS

- SH	Grupo funcional tiol o sulfuro
χ^2	Valor estadístico ji cuadrado
µg	Microgramo
µM	Micromolar
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ATCC	American Type Culture Collection
ATR	Reflexión total atenuada
CaCl₂	Cloruro de calcio
CH₃COOH	Ácido acético
CH₃COONa	Acetato de sodio
CLSI	Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorios
cm⁻¹	Centímetro recíproco
CMI	Concentración mínima inhibitoria
CP	Crecimiento paradójico
GD	Grado de desacetilación
DE	Diámetro efectivo
DETA-NO	(Z)-1-[N-(2-aminoetil)-N-(2-amonioetilamino)-diazén-1-ium-1,2-diolado]
DL 50	Dosis letal media
DLS	Dispersión de luz dinámica
DTNB	Ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoico
EE%	Eficiencia de encapsulación
eNOS	Óxido nítrico sintasa endotelial
ET	Efecto Trailing
F	Valor estadístico de Fisher
FDA	Administración de Alimentos y Medicamentos
FTIR	Espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier
g	Gramo
GRAS	Producto generalmente reconocido como seguro
H	Valor estadístico de Kruskal-Wallis
HCl	Ácido clorhídrico
HP₃O₁₀⁻⁴	Anión trifosfato de hidrógeno
iNOS	Óxido nítrico sintasa inducible
IPD	Índice de polidispersidad
IR	Infrarrojo
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramo
L	Litro
M	Molar
mg	Miligramo
mRNA	Ácido ribonucleico tipo mensajero
MSA	Ácido mercaptosuccínico
MSA-NO	Ácido s-nitrosomercaptosuccínico
MSA-NO Np	Nanopartículas poliméricas de quitosano cargadas con ácido s-nitrosomercaptosuccínico
MSA Np	Nanopartículas poliméricas de quitosano cargadas con ácido mercaptosuccínico
mV	Milivoltios

NaCl	Cloruro de sodio
NaNO₂	Nitrito de sodio
NaOH	Hidróxido de Sodio
-NH₂	Grupo funcional amino
NH₃⁺	Catión amonio
Nm	Nanómetro
nNOS	Óxido nítrico sintasa neuronal
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintasa
NOS1	Óxido nítrico sintasa neuronal
NOS2	Óxido nítrico sintasa inducible
NOS3	Óxido nítrico sintasa endotelial
Np	Nanopartículas poliméricas
OH	Hidroxilo
PM	Peso molecular
P₃O₁₀⁻⁵	Anión trifosfato
PBS	Buffer fosfato salino
PEG	Polietilenglicol
PVDF	Polifluoruro de vinilideno
R²	Coefficiente de correlación
Rpm	Revoluciones por minuto
RPMI	Medio Roswell Park Memorial Institute
RSNO	S-nitrosotioles
SNO-Hb	S-nitrosohemoglobina
TNB	Ácido 2-nitro-5-mercaptobenzoico
TPP	Tripolifosfato de sodio
η	Viscosidad intrínseca
μL	Microlitro
YHB1	Enzima flavohemoglobina óxido nítrico desoxigenasa

RESUMEN

Las especies de *Candida sp.* son los mayores patógenos fúngicos que afectan al ser humano. Últimamente, han descrito cambios en sus patrones de susceptibilidad a los fármacos antifúngicos de primera línea. En vista de esto, se necesitan alternativas de tratamiento que actúen mediante mecanismos de acción distintos. El óxido nítrico (NO) es una molécula importante para la inmunidad innata porque ejerce su efecto antimicrobiano principalmente por el daño oxidativo que produce sobre los microorganismos. Dado que esta es una molécula lábil, su administración es complicada por lo que investigaciones recientes han propuesto el uso de drogas donadoras de NO. Asimismo, con el fin de incrementar su vida media, se han incluido estos compuestos en matrices poliméricas para la liberación controlada del NO. En el presente trabajo se determinó la actividad antifúngica de nanopartículas poliméricas de quitosano cargadas con el donador de NO, el ácido s-nitrosomercaptosuccínico (MSA-NO) sobre las cepas clínicas *Candida albicans* y *Candida glabrata*.

La síntesis de nanopartículas poliméricas de quitosano cargadas con ácido mercaptosuccínico (MSA Np) se llevó a cabo mediante el método de gelación ionotrópica. Se produjeron tres lotes a los que se les analizaron los parámetros físicos (diámetro efectivo promedio de partícula e índice de polidispersidad) y eficiencia de encapsulación del ácido mercaptosuccínico (MSA). Tras agregarse una cantidad equimolar de nitrito de sodio (NaNO₂), se obtuvieron nanopartículas poliméricas de quitosano cargadas con ácido s-nitrosomercaptosuccínico (MSA-NO Np). Luego, se determinó la actividad antifúngica contra *Candida sp.* en valores de concentración mínima inhibitoria (CMI) por el método de Microdilución en Caldo M27-A3 del CLSI (Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio) y se estimó el perfil de liberación de NO a las MSA-NO Np.

Se realizaron ensayos piloto para establecer una formulación de MSA Np y un procedimiento de síntesis óptimos para ser reproducidos a mayor escala. Una vez alcanzado esto, se sintetizaron tres lotes de MSA Np de un diámetro efectivo (DE) promedio de **241.69 ± 18.95 nm**, un índice de polidispersidad (IPD) promedio de **0.274 ± 0.015** y una eficiencia de encapsulación (EE%) del MSA promedio de **97.52 ± 0.07 %**. Estos valores estuvieron de acuerdo a las especificaciones de calidad establecidas. Respecto a la actividad antifúngica, los valores CMI de las cepas clínicas *Candida glabrata* y *Candida albicans* fueron 0.28 mg/mL y 2.25 mg/mL, respectivamente. Se halló una mayor susceptibilidad de la cepa referencial ATCC (Colección Americana de Tipos de Cultivo) *Candida krusei* al MSA-NO mientras la cepa clínica *Candida albicans* fue entre todas la menos susceptible al daño oxidativo causado por esta molécula. Si bien no hay pruebas contundentes que indiquen que el quitosano de las MSA-NO Np ejerció alguna contribución para disminuir el CMI del MSA-NO, este resulta útil como matriz polimérica para promover la liberación controlada del NO.

En función a lo observado se concluye que las MSA-NO Np presentan actividad antifúngica sobre el género *Candida*, causando inhibición en un grado diferente de acuerdo a la especie. Esta formulación representa una alternativa promisoriosa para el tratamiento de candidiasis.

Palabras clave:

Nanopartículas, Candidiasis, Óxido Nítrico.

SUMMARY

The species of *Candida sp.* are the major fungal pathogens that affect humans. Recently, they have undergone changes in their patterns of susceptibility to first-line antifungal drugs. In view of this, treatment alternatives are needed that act by different mechanisms of action. Nitric oxide (NO) is an important molecule for innate immunity because it produces its antimicrobial effect mainly due to the oxidative damage it produces in microorganisms. Since this is a labile molecule, its administration is complicated so researchers have also recently been used nitric oxide donors. In order to improve its half-life, these compounds have been included in polymer matrices for controlled release. In the present work, the antifungal activity of chitosan polymeric nanoparticles loaded with the nitric oxide donor s-nitrosomercaptosuccinic acid against the clinical strains *Candida albicans* and *Candida glabrata* was determined.

The synthesis of polymeric nanoparticles loaded with mercaptosuccinic acid (MSA Np) was carried out by the ionotropic gelation method. They were analyzed in function of their physical parameters (average effective diameter and polydispersity index) and encapsulation efficiency of mercaptosuccinic acid (MSA). Chitosan polymeric nanoparticles loaded with s-nitrosomercaptosuccinic acid (MSA-NO Np) were obtained by adding an equimolar amount of sodium nitrite to MSA Np. Then, antifungal activity against *Candida sp.* in values of minimum concentration inhibition (CMI) by the method of microdilution in broth M27-A3 of the Clinical and Laboratories Standards Institute (CLSI) was determined and the profile of NO release by MSA-NO Np was estimated.

Pilot trials were conducted to establish an optimal MSA Np formulation and synthesis procedure to be reproduced on a larger scale. Once this was achieved, three batches of chitosan polymeric nanoparticles loaded with MSA with an average effective diameter of 241.69 ± 18.95 nm, an average polydispersity index of 0.274 ± 0.015 and an average MSA encapsulation efficiency of $97.52 \pm 0.07\%$ were synthesized. These values were in accordance with the established quality requirements. Regarding the antifungal activity, the CMI values of the clinical strains *Candida glabrata* and *Candida albicans* were 0.28 mg / ml and 2.25 mg / ml, respectively. A greater susceptibility of the strain ATCC *Candida krusei* to the MSA-NO was found whereas the clinical strain *Candida albicans* was among all the less susceptible to oxidative damage caused by NO. While there is no compelling evidence to suggest that chitosan nanoparticles would have made a contribution in lowering the MSA-NO CMI, this biomaterial results useful as a polymeric matrix to promote controlled release of NO.

Based on the observed, it is concluded that the MSA-NO Np present antifungal activity against the genus *Candida*, causing inhibition in a different degree according to the species. This formulation represents a promising alternative for the treatment of candidiasis.

Keywords:

Nanoparticles, Candidiasis, Nitric Oxide.

I. INTRODUCCIÓN

1.1. Candidiasis: Epidemiología y Tratamiento

Debido al incremento en la población de pacientes con inmunosupresión y a las prácticas médicas modernas, como el uso generalizado de catéteres o de agentes antifúngicos de amplio espectro, la frecuencia de las **infecciones fúngicas** ha aumentado a un ritmo alarmante en las últimas décadas [1 -3]. Entre los agentes etiológicos descritos por la literatura, destacan las especies del género *Candida*, por ser los mayores patógenos fúngicos que afectan al ser humano [4].

El **género *Candida*** comprende una variedad de hongos unicelulares levaduriformes. Estos microorganismos se comportan como comensales al formar parte de la microbiota normal de las mucosas de la cavidad oral, tracto gastrointestinal y vaginal en un hospedero sano, pero su patogenicidad aumenta en un hospedero inmunocomprometido. Este género abarca más de doscientas especies existentes, de las cuales más de diecisiete se han reportado como potencialmente patógenas para el ser humano. Para citar algunos ejemplos, están *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *C. tropicalis*, *C. haemulonii*, *C. guilliermondii*, y la especie más recientemente identificada *C. auris* [5,6].

La especie ***Candida albicans*** es la especie más común en su género, siendo la causa principal de candidiasis vulvovaginal y orofaríngea. Asimismo, es el cuarto patógeno más comúnmente aislado en pacientes nosocomiales en los Estados Unidos [7,8], siendo a su vez la causa predominante de infecciones fúngicas invasivas [9], lo que la convierte en un serio problema de salud pública [1,10]. En el Perú, *C. albicans* representa la especie más aislada en muestras de sanguíneas y flujo vaginal [11,12].

Dada la menor frecuencia con la que las demás especies de *Candida sp.* son aisladas clínicamente, usualmente se usa el término “**no albicans**” para referirnos a ellas. Estas especies están cobrando relevancia clínica debido al ascenso en la frecuencia de sus aislamientos, fenómeno que se viene observando de forma similar en Norte América, Europa y Latinoamérica. Se sugiere que este comportamiento en la epidemiología se debe a la confluencia de varios factores como la inmunosupresión severa, enfermedades graves en los pacientes, nacimientos prematuros, pacientes geriátricos, así como la exposición a antibióticos de amplio espectro [9]. Esta situación resulta preocupante debido a la resistencia que puedan desarrollar estas distintas especies a las terapias antifúngicas convencionales.

De las especies no albicans, ***C. glabrata*** ha llamado últimamente la atención de la comunidad médica al mostrar altos niveles de resistencia a las terapias antifúngicas. *C. glabrata* representa

el segundo agente causal más frecuente de candidiasis en el mundo y por las razones ya expuestas, se asocia con una mayor mortalidad [13, 14].

Si bien son pocos los **estudios sobre la distribución de *Candida sp.* en el Perú**, una investigación realizada por *Bustamante et al* en nueve hospitales nacionales durante el periodo 2009- 2011 arrojó un interesante escenario. En dicho estudio se encontraron a los aislados de *Candida* no albicans como agentes comunes de candidemia (92, 60.1%). Entre las especies no albicans reportadas se encontraron *C. parapsilosis* (43, 28.1%), *C. tropicalis* (36, 23.5%), *C. glabrata* (8, 5.2%), *C. guilliermondii* (3, 2%), *C. krusei* (1, 0.7%) y *C. famata* (1, 0.7%). Adicionalmente, se encontró que el 7.8% de las cepas fueron resistentes a los antifúngicos más frecuentemente utilizados en Perú [15].

Otro estudio más reciente realizado por *Rodriguez et al* en el periodo 2013-2015 muestra nuevamente la predominancia de las especies no albicans, representando estas un 71,9 % (*C. parapsilosis* 25,3 %; *C. tropicalis* 24,7 %; *C. glabrata* 9,5 %; *C. guilliermondii* 7,0 %; *C. krusei* 0,6% y otras 5,1 %), mientras *C. albicans* un 27,8 % de los aislados [11].

Los **fármacos antifúngicos** disponibles actualmente y usados frecuentemente contra *Candida sp.* pueden tener un efecto **fungistático** (inhiben el crecimiento de la levadura) o **fungicida** (matan a la levadura) [16]. Asimismo estos se encuentran clasificados en función a su mecanismo de acción sobre el patógeno.

Los **azoles** (como el fluconazol, voriconazol), son fármacos fungistáticos que actúan inhibiendo la enzima lanosterol- 14 α desmetilasa que es crucial para la biosíntesis del ergosterol, componente de la membrana celular de la levadura [17].

Los **polienos** (como la anfotericina B y nistatina) tienen un efecto fungicida sobre *Candida sp.* al interactuar con el ergosterol en la membrana celular. Estos, a su vez, crean canales dentro de la membrana celular causando la fuga de moléculas (como proteínas, glúcidos y cationes monovalentes y divalentes) lo que resulta en la muerte de la levadura [16].

Las **equinocandinas** son los antifúngicos más recientemente introducidos, estas incluyen a la caspofungina, micofungina, representan la terapia de primera línea para la candidiasis invasiva. Funcionan inhibiendo la enzima β - (1,3) -D-glucano sintasa que sintetiza el β - (1,3) -D-glucano, esencial para la pared celular fúngica [18].

Finalmente, la 5-flucitosina es un antifúngico que interfiere con la síntesis de proteínas de la levadura [18].

Las **limitaciones de los fármacos** comentados en el tratamiento contra la candidiasis se debe a la resistencia o disminuida susceptibilidad que algunas especies puedan presentar hacia estos.

La resistencia puede presentarse de dos formas: **resistencia primaria**, donde la especie *Candida sp.* es resistente al antifúngico sin que haya habido exposición previa a la droga y **resistencia secundaria**, donde la especie adquiere resistencia después de la exposición al agente antifúngico [17]. Comentar sobre *C. glabrata* es quizás usar uno de los mejores ejemplos para ilustrar el tema de **resistencia** en sus distintas formas. Esta especie posee la más alta incidencia de resistencia a fármacos **azoles** entre los aislados de *Candida sp.*, exhibiendo una intrínseca susceptibilidad disminuida a este tipo de antifúngicos [19,20] incluyendo al nuevo fármaco isavuconazol, por lo que podría decirse que presenta una **resistencia primaria** [21].

Asimismo, *C. glabrata* ha mostrado su capacidad de desarrollar una alta resistencia a los azoles tras ser expuesta a la droga, es decir, una **resistencia secundaria** [22, 23]. De hecho, se sabe que *C. glabrata* es la especie más frecuentemente aislada en infecciones de pacientes que recibieron anteriormente profilaxis con azoles [24-26]. La proporción de *C. glabrata* resistente a azoles en aislados clínicos en varios países ha mostrado un incremento en el período de 2001 a 2007 [27]. Además, esta especie ha mostrado resistencia a **equinocandinas** en aislados resistentes al fluconazol. La incidencia de estos casos ha aumentado de ningún caso observado entre el periodo 2001-2004 a un 9.3% en el periodo de 2006-2010, apoyando la idea de que la resistencia a los fármacos en *C. glabrata* está en rápido ascenso [28]. Por último, si bien *C. glabrata* ha mostrado susceptibilidad a los **polienos**, su uso generalizado como antifúngico se ve reducido debido a los efectos tóxicos de este fármaco, el más resaltante: su nefrotoxicidad [16].

En función a las **limitaciones en el tratamiento** contra la candidiasis es que cada día se realizan nuevos esfuerzos en la investigación de **alternativas terapéuticas** que puedan contrarrestar los problemas de resistencia de las especies de *Candida sp.* a los antifúngicos convencionales.

1.2. Óxido Nítrico (NO)

En la búsqueda de alternativas terapéuticas que trabajen a través de mecanismos de acción distintos a los antifúngicos convencionales, se ha observado detenidamente la relación que guardan las especies del género *Candida* y la molécula óxido nítrico (NO).

1.2.1. Presencia a Condiciones Fisiológicas

El NO es una molécula gaseosa con una vida media corta en el organismo. Esta molécula participa en diversos procesos fisiológicos, se produce de forma endógena y se deriva en gran parte de las vías enzimáticas. La formación del NO es catalizada por la NO sintasa (NOS) a través de una serie de reacciones redox, con degradación de L-arginina a L-citrulina y NO. Se reconocen tres

isoformas de NOS: NOS endotelial (eNOS o NOS3), NOS neuronal (nNOS o NOS1) y NOS inducible (iNOS o NOS2), esta última se halla primeramente en los macrófagos [29-30].

1.2.2. Actividad Antifúngica sobre *Candida sp.*

Una vez que el NO es sintetizado por la iNOS, este es liberado por los macrófagos para producir su efecto antimicrobiano sobre diversos tipos de microorganismos entre ellos *Candida sp.*

El NO trabaja a través de múltiples mecanismos de toxicidad. A nivel del ADN (ácido desoxirribonucleico) del patógeno, produce daño oxidativo y nitrosativo, así como ejerce la nitrosilación de enzimas que intervienen en su reparación. También promueve la peroxidación de los lípidos de su membrana celular y se une a los grupos heme de ciertas proteínas necesarias para el crecimiento o supervivencia del microorganismo [31]. Además de esto, en *Candida sp.* induce la represión de la enzima flavohemoglobina YHB1, cuya función es desintoxicar a la levadura del NO [32]. También se sabe que el NO induce la fagocitosis de los microorganismos patógenos por las células del sistema inmune del hospedero [33].

Resulta interesante saber que si bien el NO provoca un daño oxidativo al ejercer su acción antimicrobiana sobre los agentes patógenos, a su vez puede proteger de este daño a las células del hospedero. De hecho, se ha hallado que el NO tiene la capacidad de terminar las reacciones de peroxidación lipídica que ocurren en la membrana de las células huésped, protegiéndolas del estrés oxidativo [34]. Asimismo, los hongos y procariontes presentan una mayor susceptibilidad al NO ya que estos microorganismos dependen de proteínas clústeres de azufre y hierro en mayor medida que las células de mamíferos. La degradación de estas proteínas cluster por acción del NO o especies reactivas de nitrógeno provocan que el hierro sea liberado y se una al ADN. Esta fracción de hierro libre cataliza la formación de radicales libres que dañan las membranas y ADN del patógeno [35-38].

Se ha comprobado que uno de los mecanismos patogénicos de *C. albicans* se encuentra la supresión de la generación de NO en los macrófagos [39]. En función a este hallazgo, diversos estudios han experimentado con la **aplicación exógena** de NO en miras de inhibir el crecimiento de la levadura, obteniendo resultados positivos [40-42].

En vista que la resistencia microbiana a los antifúngicos se encuentra en ascenso, es importante preguntarse sobre la existencia de mecanismos de *Candida sp.* que le confieran **resistencia al NO**. Hasta el momento se conoce que *C. albicans* cuenta con una enzima desintoxicante del NO, que es la proteína flavohemoglobina YHB1 [43], asimismo, se han encontrado proteínas homólogas a YHB1 en las cepas *C. glabrata*, *C. parapsilosis* y *C. dubliniensis* [44]. Sin embargo, se ha observado que a elevadas concentraciones de NO, como las que se suministran mediante el

uso de una **droga donadora de NO**, los mecanismos compensatorios de los microorganismos se tornan ineficaces [31].

La utilización de **drogas donadoras de NO** permite **sobrellevar** el problema de la **corta vida media** de la molécula. Es por eso que en la actualidad, diversos trabajos de investigación prefieren suministrar NO de esta forma y aprovechar sus diversas aplicaciones biomédicas.

1.2.3. Drogas Donadoras de NO: S-nitrosotioles

Entre los **tipos de drogas donadoras de NO** se encuentran el nitrito acidificado, los nitratos orgánicos, el nitroprusiato de sodio, los diazeniumdiolados, los s-nitrosotioles y las zeolitas. Sin embargo, ciertos tipos de donadores tienen un uso restringido por problemas de toxicidad, tal es el caso del nitrito acidificado y los diazeniumdiolados. Los nitratos orgánicos y el nitroprusiato de sodio al presentar efectos cardiovasculares potentes (disminuyen la presión arterial), se desaconsejan para su uso como antibiótico. Las zeolitas, por su liberación rápida de NO, tienen una mayor utilidad como desinfectantes [31, 45,46].

Los **s-nitrosotioles** (RSNO) son moléculas que contienen NO unido a un grupo sulfhidrilo [31]. Son compuestos fáciles de sintetizar, dado que su formación radica en la reacción de un compuesto en cuya estructura se hallen grupos sulfhidrilo o tioles (como cisteína, glutatión o ácido mercaptosuccínico) con nitrito de sodio (NaNO_2) en un medio acidificado. La descomposición del RSNO formado y por tanto, la liberación del NO, es promovida por acción de la temperatura, luz, metales divalentes como el cobre y ácido ascórbico [47-49]. Los RSNO son térmicamente inestables en soluciones acuosas, conllevando a la liberación espontánea del NO [31]. Sin embargo, en miras de contrarrestar este inconveniente, cada vez más trabajos optan por incorporar estos compuestos en polímeros biocompatibles los que promueven su liberación controlada [50].

1.2.4. Toxicidad

A pesar que el NO se encuentra presente en el ser humano a condiciones fisiológicas, es importante conocer el **perfil de seguridad** de esta molécula y sus drogas donadoras.

Estudios realizados en fibroblastos y keratinocitos han mostrado una disminución en la viabilidad de estas líneas celulares tras la aplicación de donadores de NO. No obstante, se observó que a mayor concentración del compuesto, la viabilidad celular incrementaba. Se sugiere que la

disminución de la proliferación de estas células no se deba a la muerte de las mismas sino al freno de su crecimiento por un **mecanismo de señalización ejercido por el NO** [51-54].

En la actualidad se encuentran disponibles diversos ensayos pre-clínicos y clínicos que respaldan la seguridad del NO y los s-nitrosotioles. Por ejemplo, tras **administración tópica** del s-nitrosoglutatión (GSNO) en modelos animales se ha llegado a la conclusión que concentraciones de hasta 3.36 mg/ mL no generan irritación ni alteraciones en la histología de la piel ni en la córnea [55,56].

Se asume que la vía de administración tópica debería reducir los **efectos secundarios sistémicos de una droga donadora de NO** como son el estado hemodinámico alterado y metahemoglobinemia [55]. No obstante, existen trabajos donde se reporta la inclusión de s-nitrosotioles en glóbulos rojos, los que luego son devueltos al torrente sanguíneo de un modelo animal por transfusión de sangre. Se reporta que cuando la hemoglobina (Hb) se oxigena, los cambios estructurales que se producen en ella promueven la reacción del NO y el residuo cys β 93 de la Hb (que contiene grupos sulfuro), dando lugar a la s-nitroso-hemoglobina (SNO-Hb). La SNO-Hb ha mostrado tener aplicaciones terapéuticas, su desoxigenación provoca la liberación del NO, que ejerce un control de la respiración celular a nivel mitocondrial, de manera que se promueve una utilización eficiente de O₂. Dicho trabajo hecho por *Stamler et al (1997)* no reporta resultados adversos, sino por lo contrario estimula a la investigación de las propiedades terapéuticas de los s-nitrosotioles [57].

Por otro lado, un **ensayo clínico fase I** describe la aplicación de una dosis terapéutica antibacteriana de NO gaseoso (0.16 mg/ml) en pacientes con fibrosis quística [58-59]. Asimismo, en **pacientes embarazadas** con pre-eclampsia se realizó la **infusión** de GSNO [60]. En ambos estudios se encontraron resultados favorables sobre la patología a tratar sin daños colaterales.

Habiendo contemplado las propiedades antifúngicas del NO, se considera promisorio para el tratamiento de la candidiasis la encapsulación de una droga donadora de NO tipo s-nitrosotiol en un biopolímero que favorezca la liberación controlada del NO. Esto se debe a que la molécula NO actúa bajo un mecanismo de acción distinto a los antifúngicos convencionales.

1.3. Biopolímeros

En la actualidad, matrices como los biopolímeros son propuestas para el diseño de vehículos inteligentes destinados a la liberación de fármacos, esto debido a sus propiedades físicas como biológicas [61]. En la naturaleza pueden hallarse una variedad de biopolímeros tales como el

colágeno, quitina, seda, alginato, celulosa, entre otros. De estos, la quitina es el biopolímero más abundante después de la celulosa, esta se halla en el exoesqueleto de los crustáceos, insectos, moluscos así como en la pared celular de algunos microorganismos [61-62].

La quitina es un co-polímero de unidades N-acetil-D-glucosamina unidas por un enlace β -(1,4) glucosídico. Naturalmente, la quitina se encuentra en tres formas polimórficas cristalinas las que presentan diferentes orientaciones en sus microfibrillas. La α -quitina tiene cadenas antiparalelas, la β -quitina tiene cadenas paralelas, y la γ -quitina tiene una mezcla de cadenas paralelas y antiparalelas [63, 64]. Si bien la α -quitina ha sido utilizada ampliamente en diversos campos biológicos y biomédicos por su abundancia y fácil acceso, la β -quitina podría ser una alternativa prometedora con características especiales debido a la peculiar interacción molecular entre sus cadenas poliméricas [65]

1.3.1. Quitosano

Dada la pobre solubilidad de la quitina, es su forma desacetilada mejor conocida como el **quitosano**, la que encuentra mayor futuro en las aplicaciones biomédicas. Su biocompatibilidad, biodegradabilidad, baja toxicidad (DL50: >10 g/ kg), así como sus propiedades antimicrobianas, cicatrizantes, inmunoadyuvantes, por solo citar algunas, tornan atractivo a este polímero [61]. Las propiedades fisicoquímicas del quitosano se atribuyen en gran medida al grupo amino en su estructura, el cual a un pH menor a 6.5 se encuentra protonado y es muy reactivo [66].

Se encuentra ampliamente descrito en la literatura el **potencial antifúngico del quitosano**. Uno de los **mecanismos** bajo los que actúa es la interacción de su grupo amino con los componentes aniónicos de la pared celular, provocando la lisis del hongo [67]. También puede interactuar con fosfolípidos de membrana, causando la fuga de componentes celulares y con esto, la muerte celular. Asimismo, puede interactuar con el ADN - dado que este se encuentra cargado negativamente -, inhibiendo la síntesis de ácido ribonucleico mensajero (mRNA) y con ello la síntesis de proteínas y enzimas esenciales para el microorganismo. Por último, puede unirse a elementos traza esenciales para la nutrición del hongo [68].

Al trabajar con polímeros como el quitosano, es conveniente reparar en la **forma polimórfica** a utilizar, ya que la disposición espacial de las cadenas en la región cristalina del polímero influirá en sus propiedades fisicoquímicas y biológicas. Se sabe que un **quitosano tipo beta (β)** proveniente de la pluma de calamar presenta una disposición paralela de sus cadenas. Las interacciones tipo puente de hidrógeno intracatenarias e intercatenarias del **β -quitosano** son débiles a comparación al alfa (α) quitosano, de disposición antiparalela, dotando a este primero de una naturaleza **flexible** [69].

La **flexibilidad** experimentada por el **β -quitosano** permite que haya un incremento de regiones de contacto con la superficie del microorganismo patógeno en solución acuosa. Asimismo, otra ventaja de la disposición espacial de esta forma polimórfica, es que sus **grupos aminos libres** serán protonados fácilmente a comparación del α -quitosano. Este último tendrá pocos grupos aminos protonados debido a los fuertes enlaces puente de hidrogeno intermoleculares con los grupos amino intermoleculares [70].

Además de la disposición espacial de las cadenas poliméricas del quitosano, existen otras **dos características** que deben ser contempladas antes de iniciar cualquier investigación: **el peso molecular (PM) y el grado de desacetilación (GD)**.

El **PM** determina la **fuerza de las fibras de quitosano** así como su **viscosidad** en solución. Se sabe que condiciones severas de temperatura y la alta concentración de reactivos utilizados en la desacetilación provocan un acortamiento de la cadena [66, 71]. No obstante, existen aplicaciones donde una cadena corta es favorable y otras en las que se requiere una cadena de mayor tamaño para lograr con mayor eficacia el efecto deseado. El **GD** es la relación entre las unidades glucosamina y la N-acetil glucosamina en el quitosano. Esta relación refleja la **cantidad de grupos amino**, que determinan la solubilidad y actividad del quitosano como material funcional, generalmente en el rango de 60-100% [72, 73]. Este valor representa una especificación de calidad en el momento de analizar el quitosano como materia prima.

Diversos estudios han mostrado que la actividad biológica del quitosano depende significativamente de su PM y GD. Ambos parámetros afectan la actividad antimicrobiana del quitosano independientemente, a pesar que se ha sugerido que la influencia del PM en la actividad antimicrobiana es mayor a la influencia del GD [74,75].

Se ha observado que a **menor PM** del quitosano utilizado, **mayor es la inhibición del crecimiento de microorganismos** [76-81]. Por tanto, esta variable, el peso molecular, aparenta ser fundamental para entender la efectividad de una formulación donde se incluya quitosano. La movilidad, atracción e interacción iónica de las cadenas pequeñas se da con menor dificultad que en las cadenas largas, facilitando la adopción de conformaciones extendidas y una unión efectiva a la superficie de las membranas celulares [74,82].

Un hecho similar pero que ocurre a una menor intensidad es que la actividad antimicrobiana del quitosano se potencia a la par que el GD aumenta [80, 83]. Estudios realizados utilizando quitina y quitosano de diferentes GD contra distintos microorganismos entre ellos *C. albicans*, mostraron en todos los casos que la **actividad antimicrobiana se veía incrementada a la par que el GD aumentaba** [74, 83-85].

Otra propiedad del quitosano es su inherente **mucoadhesividad**, que es resultado de la interacción electrostática de los grupos amino propios del polímero con los grupos siálicos de la mucina en la barrera mucosa. Esto resulta favorable para la liberación de drogas dirigidas a zonas como la cavidad oral, el esófago, los ángulos de la boca y los genitales [86-87].

Por lo expuesto, para incorporar un principio activo en un biopolímero, deben de estudiarse las características de este último para poder optimizar el efecto terapéutico de la formulación. En el caso que se quiera optimizar las propiedades antimicrobianas de una formulación basada en quitosano, resulta una muy buena opción el uso de la forma polimórfica β con un alto GD y un bajo PM.

1.4. Nanopartículas Poliméricas

La aplicación de la **nanotecnología** en el ámbito de la salud se encuentra cada vez en aumento y las nanopartículas poliméricas (Np) actualmente están siendo ampliamente investigadas en el área farmacéutica como sistemas de liberación de principios activos. Esto es debido a que pueden mejorar la estabilidad y biodisponibilidad de los fármacos, así como ofrecen su direccionamiento al sitio diana, de manera que se obtenga el efecto terapéutico deseado [88].

1.4.1. Parámetros Físicos

Para poder analizar una solución de nanopartículas, es necesario conocer ciertos parámetros físicos que nos den información acerca del tamaño de las mismas. Para esto, se suele recurrir a la técnica de Dispersión de Luz Dinámica, que es una técnica no invasiva y bien establecida para medir el tamaño y distribución de tamaño de moléculas y partículas en la región submicrométrica [89]. Con la finalidad de realizar un control de calidad a la formulación de nanopartículas es necesario fijar una especificación para ambos **parámetros físicos** que nos brinda el equipo como son el **diámetro efectivo (DE)** y el **índice de polidispersidad (IPD)**.

Según la literatura, una partícula con dimensiones en el orden inferior a 1000 nm puede considerarse **nanopartícula** [90]; y para que los datos obtenidos en el equipo de dispersión de luz dinámica tengan validez, es necesario que el índice de polidispersidad no exceda el valor 0.3 [91].

1.4.2. Método de Síntesis

Es necesario reflexionar sobre la estructura química de la matriz polimérica para poder determinar el método adecuado de síntesis de nanopartículas. En el caso del quitosano, al solubilizarse en un

medio ácido, sus grupos amino se protonan internamente dando lugar a un polímero catiónico que tiene la capacidad de interactuar con iones cargados negativamente [92]. La reacción de dos agentes iónicos cargados opuestamente representa el fundamento del método de **gelación ionotrópica**, cuyo resultado es la obtención de un **hidrogel**. Se define hidrogel como el conjunto de redes macromoleculares caracterizadas por su capacidad de absorber agua [93].

Los **hidrogeles físicos** producidos en la gelación ionotrópica, a diferencia de los hidrogeles químicos, se encuentran formados por varios enlaces reversibles establecidos entre el polímero y el agente reticulante. Entre estos tipos de enlaces predominan las interacciones electrostáticas sobre los enlaces puente de hidrógeno y de Van der Waals. Por otro lado, la sola solubilización del quitosano en un medio acuoso ácido, da origen a un tipo de hidrogel físico, mejor conocido como hidrogel entrelazado (entangled hydrogel) [94]. La reversibilidad de estas interacciones dota a los hidrogeles físicos con una **ventaja** sobre los hidrogeles químicos: su **biocompatibilidad** [69].

El método de **gelación ionotrópica**, que fue inicialmente desarrollado por *Calvo et al* (1997), involucraba básicamente la disolución de quitosano en ácido acético y la adición de tripolifosfato de sodio (TPP) como agente reticulante, experimentándose la formación espontánea de nanopartículas tras agitación mecánica a temperatura ambiente [95]. Resulta relevante ahondar en los **acontecimientos a nivel molecular** involucrados en la síntesis de nanopartículas poliméricas por dicho método:

1) Protonación

Al solubilizarse el quitosano a un pH bajo, los grupos amino libres del polímero se protonan. Esto provoca una repulsión electrostática entre sus cadenas poliméricas, lo que permite que una mayor área superficial se exponga al medio acuoso, permitiendo la solvatación del polímero [96].

2) Hinchamiento

El solvente entra en contacto con el quitosano, penetrando dentro de la red polimérica debido a la diferencia de potencial químico del solvente dentro y fuera del gel, lo que genera un flujo osmótico que provoca el hinchamiento. A este proceso se le opone una fuerza elástica de parte de las cadenas del polímero, hasta que ambos procesos se igualan y se establece un equilibrio [69]. El hinchamiento está influenciado por el **peso molecular**, carga eléctrica del quitosano, así como sus interacciones físicas [97].

Durante el hinchamiento, es mandatorio evitar que el sistema alcance un “**régimen de entrelazamiento**” (entanglement regime). Dicho régimen se caracteriza por una elevada

viscosidad del sistema, la pérdida de movilidad de los oligómeros de quitosano en solución, los que han empezado a juntarse unos a otros. Debido a esto, **se desaconseja** el uso de altas concentraciones de quitosano, pesos moleculares altos y polimorfos rígidos. Alcanzar un régimen de entrelazamiento **impide la formación de partículas**, lo que resultaría desfavorable para el método de síntesis [71,98].

3) Reticulación

La reticulación implica la formación de una red tridimensional formada por la unión de las diferentes cadenas poliméricas. El **TPP** es el agente reticulante más utilizado en la obtención de hidrogeles físicos. Los hidrogeles obtenidos a partir de TPP presentarán mejores propiedades mecánicas a comparación de los obtenidos con iones citrato o sulfato, debido a la fuerte interacción del quitosano con el TPP [99].

El **mecanismo de reticulación** del quitosano con el TPP puede darse por **deprotonación y/o por interacciones iónicas**, según el pH de la solución. Al solubilizarse, el TPP se disocia en el agua formando iones hidroxilo e iones fosfóricos. A un **pH ácido**, solo se encuentran presentes los iones fosfóricos, por lo que predomina la reticulación iónica; a un **pH básico**, coexisten ambos iones los que compiten por los grupos amino. La unión de un grupo hidroxilo a un grupo amino da lugar a la deprotonación del quitosano [100].

La síntesis de nanopartículas de quitosano mediante el método de gelación ionotrópica resulta ventajosa debido a que es un **proceso simple** y evita el uso de solventes orgánicos así como altas temperaturas, lo que permite la encapsulación exitosa de moléculas frágiles [101].

1.4.3. Toxicidad

Si bien el quitosano es un material reconocido generalmente como **seguro** (GRAS) por la Administración de Medicamentos y Alimentos (FDA), **esta condición no puede extrapolarse** a su forma nanoparticulada. Esta afirmación se basa en que las propiedades farmacocinéticas de un medicamento o excipiente cambian de forma considerable al encontrarse en una escala nanométrica. Factores como el tamaño, la carga y las modificaciones superficiales de las nanopartículas, así como el grado de desacetilación y peso molecular del quitosano pueden influir en el perfil de toxicidad de la formulación ya que afectan la forma en cómo las nanopartículas interactúan con las células [102].

Una prueba de citotoxicidad *in vitro* realizada en células bucales (TR-146) demostró que las nanopartículas de quitosano fueron menos citotóxicas en comparación con el quitosano solo.

Esto podría deberse a la presencia del agente reticulante TPP, pues al aumentar su concentración dicha citotoxicidad se reducía, un hecho similar ocurría al disminuir el grado de desacetilación. También cabe la posibilidad que exista una respuesta intracelular diferencial a la escala nanométrica [103].

Este hallazgo se refuerza con el estudio en peces zebra hecho por *Wang et al (2016)*, donde se observó una mayor incidencia de malformaciones en los embriones de peces zebra ejercida por el quitosano a comparación de las nanopartículas de quitosano (diámetro promedio 84.9 nm) [104]. Otro estudio estableció una comparación de la toxicidad de nanopartículas de quitosano en función a su diámetro de partícula y concentración. Los resultados arrojaron como condiciones óptimas las dimensiones mayores a los 200 nm y el manejo de concentraciones entre los 5-10 mg/mL, que han demostrado no ejercer mortalidad ni malformaciones en embriones de pez zebra [105].

En función a lo expuesto, la aplicación de nanopartículas poliméricas de quitosano de un orden de 200 - 500 nm resulta conveniente para administrar moléculas con actividad antifúngica. Este rango de tamaño nanométrico les permitiría difundir a través de las barreras mucosas [106], sitios donde frecuentemente proliferan las especies de *Candida sp*, así como mejoraría su perfil de seguridad.

1.5.Método de Microdilución en Caldo para la Determinación de Actividad Antifúngica

Los métodos de dilución se usan para establecer las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) de los antimicrobianos. Desde el 2002, el Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorios (CLSI), propuso un método de referencia (M27 – A3) basado en la dilución en caldo para la determinación de susceptibilidad antifúngica de levaduras y organismos levaduriformes, especialmente *Candida sp.* y *Cryptococcus neoformans* [107].

Este método se basa en evaluar la capacidad de los hongos de crecer en los pocillos de placas de microdilución las cuales contienen medio de cultivo líquido y diluciones seriadas de los antifúngicos. La CMI se define como la concentración más baja de un antifúngico que inhibe el crecimiento *in vitro* de la levadura.

Sin embargo, al momento de la lectura de la CMI, pueden surgir situaciones *in vitro* en las que es difícil observar una correlación directa entre la concentración del antifúngico y el crecimiento de

la levadura. A veces, la inhibición total del crecimiento fúngico no se logra con concentraciones mayores de antifúngico y las cepas mantienen un crecimiento residual a altas concentraciones de dicha sustancia; esto se conoce como el **efecto trailing (ET)**. Este efecto ha sido observado durante la exposición de *Candida sp.* a fármacos tipo azoles [107-111].

Otro fenómeno que puede obstaculizar la interpretación del valor CMI es el **crecimiento paradójico (CP)** y se define como el resurgimiento del crecimiento de la cepa a concentraciones mayores a la CMI (mínimo dos diluciones mayores). Este es un fenómeno que comprende **cuatro fases**. La **fase I (subinhibitoria)** se observa en los pocillos con menor concentración de antifúngico, esta concentración que no es suficiente para impedir el crecimiento del hongo, se observa turbidez en los pocillos. La **fase II (de inhibición)** comprende el pocillo en el que se fijó la CMI y concentraciones mayores de antifúngico. Aquí la concentración del fármaco es suficiente para inhibir el crecimiento del hongo, por lo que los pocillos están ópticamente claros. A medida que se incrementa la concentración de antifúngico, se avisa la **fase III (de atenuación de la inhibición)**, donde resurge la turbidez observada en la fase I y con ello, el crecimiento del hongo. Este fenómeno se correlaciona con mecanismos compensatorios del hongo ante la acción del fármaco. Por último, la **fase IV (de inhibición)** comprende los pocillos con concentraciones más altas del agente antifúngico, no se observa crecimiento del hongo, ya que concentraciones muy altas del fármaco tornan ineficientes los mecanismos compensatorios desarrollados por el hongo en la **fase III** [112].

El crecimiento paradójico ha sido descrito para *Candida sp.* cuando es expuesta a antifúngicos del tipo equinocandinas. El crecimiento paradójico ha sido relacionado a cambios en la composición de la pared celular, debido principalmente a un incremento en la síntesis de quitina, como un mecanismo de recompensa a la disminución de los β -glucanos por acción de los agentes antifúngicos [113].

1.6. Justificación

El presente trabajo propone determinar la actividad antifúngica de nanopartículas poliméricas de quitosano cargadas con el donador de NO, el MSA-NO sobre las cepas *C. albicans* y *C. glabrata*, mediante el método de microdilución M27 – A3, propuesto por el CLSI. Los pilares de esta investigación recaen en el carácter promisorio del NO en el tratamiento de las infecciones fúngicas causadas por *Candida sp.* y las bondades del biopolímero quitosano como matriz para la liberación controlada de moléculas.

II. HIPÓTESIS / PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN Y OBJETIVOS

2.1. Hipótesis

Las nanopartículas poliméricas de quitosano cargadas con ácido s-nitrosomercaptosuccínico (MSA-NO Np) ejercen una acción antifúngica sobre *C. albicans* y *C. glabrata*.

2.2. Pregunta de Investigación

¿El crecimiento de *C. albicans* y *C. glabrata* es inhibido por las MSA-NO Np?

2.3. Objetivos

2.3.1. Objetivo General:

Determinar la actividad antifúngica de las MSA-NO Np sobre *C. albicans* y *C. glabrata*.

2.3.2. Objetivos Específicos:

2.3.2.1. **Analizar** la materia prima quitosano en función a su grado de desacetilación y peso molecular.

2.3.2.2. **Sintetizar** nanopartículas de quitosano cargadas con ácido mercaptosuccínico (MSA Np), mediante el método de gelación ionotrópica.

2.3.2.3. **Determinar** las características de las MSA Np sintetizadas, siendo estas: **los parámetros físicos** (diámetro efectivo e índice de polidispersidad) mediante la técnica de dispersión de luz dinámica y **la eficiencia de encapsulación del ácido mercaptosuccínico (MSA)** mediante el método de la reacción de Ellman.

2.3.2.4. **Sintetizar el donador de óxido nítrico, el ácido s-nitrosomercaptosuccínico (MSA-NO)** mediante la reacción de NaNO_2 y las MSA Np.

2.3.2.5. **Determinar las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI)** de las MSA-NO Np sintetizadas de las cepas *C. albicans* y *C. glabrata* mediante el método de microdilución M27 A3 del CLSI.

2.3.2.6. Estimar el **perfil de liberación del óxido nítrico en el tiempo** de las MSA-NO Np en las concentraciones que inhibieron el crecimiento de *C. albicans* y *C. glabrata* en el ensayo de microdilución M27 A3 del CLSI.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Determinación del Grado de Desacetilación, Peso Molecular del Quitosano y Espectroscopía Infrarrojo

3.1.1. Determinación del Grado de Desacetilación por Titulación Conductimétrica

3.1.1.1. Fundamento del método:

El método descrito por *Raymond et al* (1993) , consiste en disolver quitosano en un exceso conocido de ácido clorhídrico (HCl) y valorar con hidróxido de sodio (NaOH). Se obtiene, así, una curva de conductividad versus volumen de NaOH añadido que presenta dos puntos de inflexión. La diferencia de volumen entre estos dos puntos se corresponde con la cantidad de ácido consumido para la protonación de los grupos amino. Este valor permite determinar el porcentaje de grupos amino (-NH₂) en el quitosano, es decir su grado de desacetilación. [73, 114 - 115].

3.1.1.2. Tipo de Muestra:

β-Quitosano (Origen Calamar) GTC Bio Lote GC20161217.

Especificaciones: GD: 96.7 % ; PM 113.2 kDa, según proveedor. **Ver Anexo 04.**

3.1.1.3. Equipos Requeridos:

Conductímetro CON 700 Marca Okion, Balanza Henkel (03 Decimales), Agitador Magnético ThermoScientific.

3.1.1.4. Insumos Requeridos:

- a) *Materiales:* Bureta de 50 mL, Beaker de 50 mL, Beaker de 600 mL, Marcador Permanente.
- b) *Reactivos:* Solución de HCl 1.0 M, Solución de NaOH 0.1 M y solución de NaCl 0.001 M.

3.1.1.5. Condiciones Previas:

- a) Estandarizar la solución de NaOH 0.1 M con biftalato ácido de potasio.
- b) El análisis de la muestra se realizará por triplicado.

3.1.1.6. Documentos Utilizados: FOR 01/ Q (**Anexo 1**).

3.1.1.7. Procedimiento:

- a) Pesar 200 mg de quitosano y adicionar 5mL de HCl 1.0 M, disolver la muestra completamente.
- b) Agregar 450 mL de NaCl 0.001 M, y llevar a agitación a 400 rpm para lograr una solución uniforme.
- c) Realizar la titulación conductimétrica con 60 mL de NaOH 0.1M estandarizado, descargando 0.5 mL de NaOH 0.1M con ayuda de una bureta. Anotar las lecturas del conductímetro.

3.1.1.8. Tratamiento de datos y obtención de resultados:

Los valores de conductividad y volumen de NaOH añadido se anotarán en el FOR 01/ Q. Asimismo, estos valores se ingresarán en el programa Microsoft Excel para poder obtener una gráfica de la titulación con tres ecuaciones de la recta, a partir de las que se obtendrán los datos necesarios para el cálculo del GD. Se efectuarán las ecuaciones indicadas en el FOR 01/Q para calcular el GD de la muestra.

3.1.1.9. Interpretación de Resultados:

Tabla 1. Especificaciones de Calidad del Grado de Desacetilación del Quitosano

Especificación	Interpretación
GD \geq 60%	Alto Grado de Desacetilación ¹

(1) [69]

3.1.2. Determinación del Peso Molecular por Viscosimetría Capilar

3.1.2.1. Fundamento del Método:

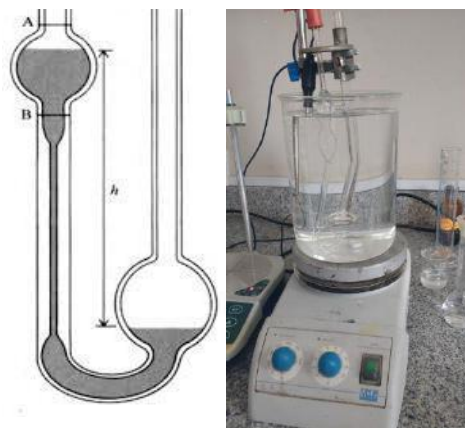
Se basa en la obtención de la viscosidad intrínseca $[\eta]$, que está relacionada con la masa molecular en la ecuación de Mark-Houwink-Sakurada (Rinaudo et al, 1993):

$$[\eta] = KM_v^\alpha$$

Donde, M_v es la masa molar promedio viscosimétrica y K y α son dos constantes que dependen del polímero, del sistema

disolvente utilizado y de la temperatura. Al obtener las medidas de densidad y viscosidad de las soluciones de quitosano, se procederán a determinar el valor de la viscosidad intrínseca y con ello, el peso molecular del quitosano [80-81, 107].

Figura 1. A la izquierda: Esquema del Viscosímetro de Ostwald. A la derecha: Foto del sistema de baño María y viscosímetro.



3.1.2.2. Tipo de Muestra:

β -Quitosano (Origen Calamar) GTC Bio Lote GC20161217.

Especificaciones: GD: 96.7 % ; PM 113.2 kDa, según proveedor. **Ver Anexo 04.**

Equipos Requeridos:

Agitador Magnético TermoScientific

3.1.2.3. Insumos Requeridos:

- Materiales:** Beaker de 1 L, Viscosímetro de Ostwald, Soporte, Cronómetro, Fiolas, Marcador Permanente, Pera de Succión.
- Reactivos:** Solución de acetato de sodio (CH_3COONa) 0.1 M, solución de ácido acético (CH_3COOH) 0.2 M.

3.1.2.4. Condiciones previas:

- Alistar un baño de agua de destilada a temperatura constante a 30 °C.
- Mezclar las soluciones de CH_3COONa 0.1 M y CH_3COOH 0.2 M para la preparación del buffer.
- Las medidas de viscosidad y densidad también se realizaron para el buffer.

d) El análisis de la muestra se realizará por triplicado.

3.1.2.5. Documentos utilizados: FOR 02/Q (Anexo 2).

3.1.2.6. Procedimiento:

- a) Preparar soluciones de quitosano en diferentes concentraciones: 1%, 0.75%, 0.5%, 0.25% y 0.125 % (masa de quitosano / volumen de disolvente buffer).
- b) Preparar un beaker con 800 mL aproximadamente de agua destilada. Colocarlo sobre un agitador magnético, ajustar la temperatura a 30 °C.
- c) Introducir el viscosímetro de Ostwald en el baño de agua y sujetarlo con el soporte. Colocar la Pera de Succión en la rama delgada del viscosímetro.
- d) Verter la solución del quitosano por la rama gruesa del viscosímetro.
- e) Apretar la Pera de Succión de manera que la solución de quitosano ascienda por los capilares. Anotar el tiempo que demora en pasar del punto A al punto B del viscosímetro.

3.1.2.7. Tratamiento de Datos:

En el FOR 02 / Q, ingresar los datos en valores de concentración de quitosano en (g/mL) y tiempos de recorrido entre los puntos A y B. Realizar los cálculos indicados por el formato para hallar el peso molecular.

3.1.2.8. Interpretación de Resultados:

Para la interpretación de los resultados obtenidos, se trabajó con los siguientes rangos:

Tabla 2 Especificaciones de Calidad del Peso Molecular del Quitosano

Especificación	Interpretación
[50 – 190 kDa]	Bajo Peso Molecular ⁽¹⁾

(1) [116-118]

3.1.3. Espectroscopía Infrarrojo con Transformada de Fourier y ATR

3.1.3.1. Fundamento de la Técnica:

La técnica consiste en el paso de un haz de radiación infrarroja (IR) a través de un cristal transparente y de alto índice de refracción, sobre el que está colocada la muestra. En su paso a través del cristal, el haz IR incidente se refleja varias veces y la superficie de la muestra absorbe parte de la radiación a frecuencias características. Cada tipo de enlace

absorbe radiación infrarroja a una frecuencia distinta, lo que permite determinar los grupos funcionales que posee la molécula en estudio. [119-121].

El espectro infrarrojo del polímero quitosano nos provee información sobre la presencia de los grupos amino en su estructura así como permite calcular el grado de desacetilación.

3.1.3.2. Tipo de Muestra:

β -Quitosano (Origen Calamar) GTC Bio Lote GC20161217.

Especificaciones: GD: 96.7 % ; PM 113.2 kDa, según proveedor. **Ver Anexo 04.**

Equipos Requeridos:

Espectrofotómetro con Transformada de Fourier FTIR IR Prestige -21 con frecuencia de 4000 a 400cm⁻¹.

3.1.3.3. Documentos utilizados: FOR 03/ Q (Anexo 3).

3.1.3.4. Procedimiento:

- a) Encender el equipo, seleccionar el modo ATR (Reflectancia Total Atenuada).
- b) Colocar la muestra
- c) Exportar los datos al ordenador.

3.1.3.5. Tratamiento de los Datos:

Ingresar los datos obtenidos en valores de Transmitancia (T%) y Frecuencia (f) en un documento de Microsoft Excel y graficar.

Figura 2. Equipo de Espectroscopía Infrarrojo con Transformada de Fourier



3.1.3.6. Interpretación de Resultados:

Tabla 3. Especificaciones de Calidad del Espectro FTIR del Quitosano

Especificación⁽¹⁾	Interpretación
Se registra un pico de intensidad media a fuerte a la frecuencia 1500 - 1640 cm ⁻¹	Vibraciones de Deformación en enlace N-H.
Se registra pico doble de intensidad media a la frecuencia 3300 – 3500 cm ⁻¹	Vibraciones de Estiramiento en enlace N-H.

(1) [114, 122-123]

3.2. Síntesis de Nanopartículas Poliméricas de Quitosano Cargadas con Ácido Mercaptosuccínico (MSA Np) por el Método de Gelación Ionotrópica

3.2.1. Fundamento del método:

La **gelación ionotrópica** permite la formación de nanopartículas mediante interacciones electrostáticas entre productos de la disociación de un agente reticulante tripolifosfato de sodio en solución acuosa ($P_3O_{10}^{-5}$ y $HP_3O_{10}^{-4}$), con los grupos $-NH_3^+$ del quitosano [124].

El método de gelación ionotrópica a utilizarse para la síntesis de nanopartículas poliméricas de quitosano cargadas con ácido mercaptosuccínico (MSA) ha sido modificado en función a los requerimientos de la formulación. Se incluyó dos etapas de sonicación, que permitirán la dispersión de las partículas que se encuentren aglomeradas, contribuyendo a la reducción del tamaño de partícula [125]. Asimismo, incorporó una etapa de Pegilación, en la que se adicionó el polímero Polietilenglicol (PEG) 4000, que brinda una cubierta hidrofílica a las partículas producidas en la gelación ionotrópica, impidiendo su aglomeración [126].

3.2.2. Equipos Requeridos:

Agitador Magnético Multipunto Witeg®, Baño UltraSonic Cleaner UCS-20 (Lab Companion), Micropipeta Boeco ® 10 – 100 µL, pHmetro HANNAH.

3.2.3. Insumos Requeridos:

a) **Materiales:** Tips amarillos 100 µL, Discos Filtrantes de Polifluoruro de Vinilideno (PVDF) 0.22 µm, 4 Beakers de 250 mL, 1 pastilla magnética grande, 3 pastillas magnéticas medianas, 2 Fiolas 100 mL, Papel Aluminio, Etiquetas, Marcador Permanente.

b) *Materias Primas:* β -Quitosano (Origen Calamar) GTC Bio Lote GC20161217, MSA (Sigma Aldrich ®), PEG 4000 (Químicos Goicochea), TPP (Sigma Aldrich ®), Agua Ultrapura (Braun ®), Ácido Acético Glacial (Merck ®).

3.2.4. *Ensayos Piloto*

Con el fin de definir la formulación y el procedimiento de síntesis de las MSA Np, se realizaron ensayos piloto, los que se encuentran documentados en la sección Anexos. (Ver **Anexo 05**).

3.2.5. *Condiciones previas:*

Se realizará el procedimiento de síntesis de MSA Np por triplicado.

3.2.6. *Procedimiento:*

- a) Preparar 500 ml de solución de ácido acético al 1%, agregando 5 mL de ácido acético glacial a una fiola de 500 mL y enrasar con agua Braun esteril.
- b) En un beaker de 500 mL, agregar 250 ml de la solución de ácido acético al 1% y 250 mg de Quitosano. Realizar este paso con el recipiente sobre un agitador magnético, insertar una pastilla mediana y programar la agitación a 500 rpm.
- c) Dejar agitando a 500 rpm por 24 horas. Concluido este periodo, filtrar la solución por un disco PVDF de 0.22 μ m.
- d) Tomar 180 ml de la solución de quitosano 0.1% en un beaker de 250 ml conteniendo una pastilla magnética mediana. Rotular el beaker con una etiqueta indicando el número de lote.
- e) Añadir 7.200 g de MSA.
- f) Mantener bajo agitación magnética por 12 horas a 400 rpm.
- g) Preparar una solución de TPP 1mg/ml, disolviendo 0.1 gramos de esta sal en 100 ml de agua estéril Braun. Asimismo, preparar una solución de 1 mg/ml de PEG 4000, disolviendo 0.1 g de este polímero en 100 ml de agua estéril. Filtrar ambas soluciones por separado a través de un disco PVDF de 0.22 micras.
- h) Finalizadas las 12 horas de disolución del MSA en la solución de quitosano, añadir 24 ml de solución de TPP 1mg/ml en volúmenes de 10 μ L dispensados gota a gota por una micropipeta de 10 – 100 μ L.
- i) Someter a agitación magnética por dos horas y media a 500 rpm. Este paso se conoce como “reticulación”.
- j) Ajustar a pH 4.0 con NaOH 10 %.
- k) Sonicar por 05 minutos en un baño UltraSonic Cleaner. *Condiciones:* frecuencia baja (LOW), modo pulso (PLS). Temperatura: 20 -25 °C.

l) Añadir 12 ml de PEG 4000 1 mg/ml gota a gota con la ayuda de una jeringa de tuberculina. Agitar a 500 rpm por 30 minutos.

m) Sonicar por 05 minutos. *Condiciones:* frecuencia baja (LOW), modo pulso (PLS).

Temperatura: 20 -25 °C. Filtrar a través de un disco de PVDF de 0.22 micras.

Figura 3. Esquema de Síntesis de las MSA Np

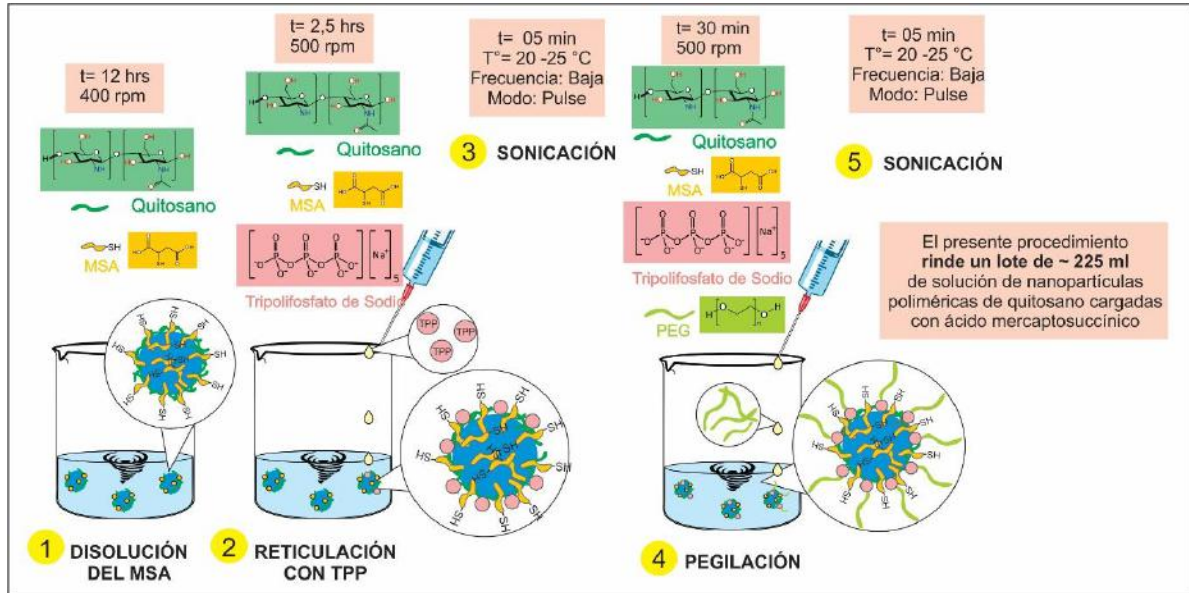


Figura 4. Imágenes de la Síntesis de las MSA Np



3.2.7. Supervisión Organoléptica de Calidad:

Revisar la ausencia de precipitados o partículas extrañas una vez terminada la síntesis de cada lote de MSA Np

3.2.8. Resultados esperados:

Tres lotes (03) de nanopartículas poliméricas de quitosano cargadas con ácido mercaptosuccínico a una concentración de 33.3 mg/mL con un volumen aproximado de 225 mL. Cada lote se repartirá en 15 frascos de vidrio, vertiéndose en cada frasco 15 ml de solución de MSA Np aproximadamente. Se utilizarán 12 frascos por lote para la realización de los análisis posteriores y se reservarán 03 frascos como contramuestras.

Figura 5. Distribución del Lote.



3.3. Determinación de Parámetros Físicos de las MSA Np por la técnica de Dispersión de Luz Dinámica

3.3.1. Fundamento de la técnica:

La dispersión de luz dinámica (DLS) consiste en incidir una fuente de luz (un láser) sobre las partículas que se hallan en movimiento Browniano en suspensión. Al ocurrir esto, las partículas dispersan la luz en diferentes intensidades. Del análisis de estas fluctuaciones de intensidad se obtiene la velocidad del movimiento browniano y por lo tanto el tamaño de partícula utilizando la relación de Stokes-Einstein, (Berne y Pecora, 1976; Chu, 1974) [89, 127-129].

3.3.2. Tipo de Muestra:

09 Frascos de Nanopartículas Poliméricas de Quitosano cargadas con MSA. Consultar **Anexo 07**.

3.3.3. Equipos Requeridos: NanoBrook 90Plus (BrookHaven Instruments, NY).

3.3.4. Insumos Requeridos:

- a) *Materiales:* Celdas de Poliestireno (Sigma Aldrich ®)
- b) *Reactivos:* Agua Bidestilada, Papel Tissue.

3.3.5. Condiciones previas:

- a) Establecer las condiciones de lectura, ángulo de detección (90°), temperatura (25°C), índice de refracción real (1.7).
- b) Asegurarse que los cuatro lados de la celda de poliestireno se encuentren límpidos y sin partículas extrañas.

c) Analizar los parámetros físicos de cada lote por triplicado.

3.3.6. *Documentos Utilizados:* FOR 01/ NP (**Anexo 08**),
Certificado de Análisis (**Anexo 09**).

3.3.7. *Resultados esperados:*

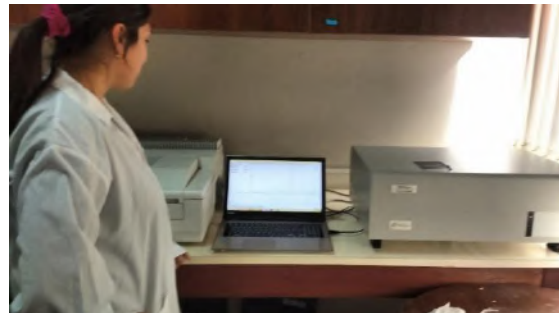
Tabla 4. Especificaciones de Calidad de los Parámetros Físicos de las MSA Np

Parámetro Físico	Especificación
Diámetro Efectivo	<500 nm ⁽¹⁾
Índice de Polidispersidad	<0.3 ⁽²⁾

(1) [90,106]

(2) [130-131]

Figura 6. Determinación de Parámetros Físicos en el Equipo NanoBrook 90 Plus



3.3.8. *Tratamiento Estadístico de Datos*

Antes de realizar un análisis de varianzas, determinar si los datos obtenidos presentan una distribución normal con la **prueba de normalidad de Shapiro-Wilk** (*Shapiro y Wilk, 1965*) para muestras con un tamaño máximo de 50 ($n < 50$) y si presentan varianzas iguales con la prueba de **Homogeneidad de Varianzas de Levene** (*Levene, 1960*).

Una vez comprobada la normalidad de los datos, realizar el **análisis de varianzas** mediante el test **ANOVA** (*Fisher, 1918*), caso contrario, recurrir a su contraparte la prueba no paramétrica **Kruskal – Wallis** (*Kruskal y Wallis, 1952*) que no parte del postulado que la distribución de la muestra sea normal ni que las varianzas sean iguales.

Programa estadístico: IBM Statistics Versión 22. Trabajar con un $p < 0.05$.

3.4. Determinación de la Eficiencia de Encapsulación de las MSA Np por el Método de Ellman

3.4.1. Fundamento del método:

Se determinará el contenido de ácido mercaptosuccínico (MSA) en las nanopartículas poliméricas de quitosano mediante el análisis del grupo tiol (-SH) que su estructura presenta mediante el método de Ellman. Este método se basa en la reacción de los grupos tioles con el DTNB cromogénico (ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoico), el subproducto de esta reacción es el dianión amarillo del ácido 2-nitro-5-mercaptobenzoico (TNB), la absorbancia de este subproducto se cuantifica a la longitud de onda de 412 nm por espectrofotometría UV-visible, (Ellman, 1959) [132].

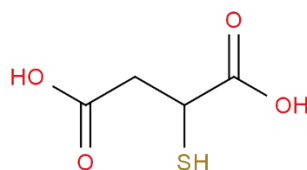


Figura 7. Presencia del grupo tiol (-SH) en el ácido mercaptosuccínico. Fuente: <http://en.chembase.cn>

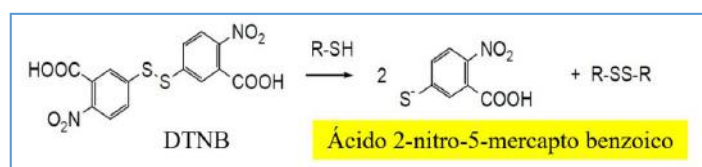


Figura 8. Reacción de Ellman. Fuente: <https://www.doiindo.com>

3.4.2. Tipo de Muestra:

09 Frascos de Nanopartículas Poliméricas de Quitosano cargadas con MSA. Consultar **Anexo 07**.

3.4.3. Equipos Requeridos:

Espectrofotómetro UV-visible Boeco ®, Micropipeta Boeco 10 – 100 µL, Micropipeta Boeco 100 – 1000 µL, Balanza Henkel (3 Decimales), Centrífuga Boeco ®.

3.4.4. Insumos Requeridos:

- Materiales:** 1 Beaker de 600 mL, 9 Fiolas de 10 mL, 2 Fiolas de 100 mL, Tips Amarillos de 100 µL, Tips Azules de 1000 µL, Tubos de Eppendorf (capacidad 2 mL), Marcador Permanente, Celdas de Poliestireno, Tubos Falcon de 15 mL.
- Reactivos:** Pastillas de Buffer Fosfato Salino (PBS) 0.1 M (Sigma Aldrich ®), Agua Estéril Braun ®, Reactivo de Ellman ácido 5,5-ditio-bis2-nitrobenzoico

(DTNB) (Sigma Aldrich®), Dimetilsulfóxido (DMSO) (Merck ®) , Ácido Mercaptosuccínico (MSA) (Sigma Aldrich ®).

3.4.5. Condiciones Previas:

- a) *Curva de Calibración:* Se obtendrá previamente una curva de calibración que nos permita establecer una ecuación de la recta para el cálculo de la concentración del analito, es decir, el MSA. Es una representación gráfica de la relación entre la señal instrumental y la concentración de un analito [133]. Debe caracterizarla su linealidad, es decir, la capacidad de proveer resultados proporcionales a la concentración del analito ya sea directamente o por una transformación matemática [134]. El **cálculo del coeficiente de determinación de la regresión (r^2)** es el método más frecuente para determinar la linealidad y la calidad del ajuste del sistema [135].
- b) *Tratamiento de la Muestra:* Dado que el quitosano es soluble en soluciones ácidas con un pH menor a 6.5 [69], el tratamiento de la muestra coincide en la precipitación de las MSA Np y su centrifugación a 4000 rpm, para obtener un sobrenadante donde yaza la porción libre no encapsulada del ácido mercaptosuccínico. Conociendo la cantidad de ácido mercaptosuccínico libre y el total, se realizan cálculos que dan finalmente como resultado el valor de eficiencia de encapsulación (EE%).
- c) Se determinará la eficiencia de encapsulación de cada lote por **triplicado**.

3.4.6. *Documentos Utilizados:* FOR 02/ NP (Curva de Calibración) (**Anexo 10**),
FOR 03/ NP (Determinación de Eficiencia de Encapsulación) (**Anexo 11**).

3.4.7. Resultados Esperados

Tabla 5 Especificaciones de Calidad de la Eficiencia de Encapsulación de las MSA Np

Análisis	Especificación
Curva de Calibración	$R^2 \sim 1^{(1)}$
Eficiencia de Encapsulación	EE% $\sim 100\%^{(2)}$

(1) [133]

(2) [136]

3.4.8. Procedimiento:

3.4.8.1. Curva de Calibración

- a) Preparar PBS 0.1 M. Disolver 2 pastillas de PBS en 400 ml de agua estéril Braun.
- b) Preparar la solución stock DTNB 10 mM. Disolver 40 mg de DTNB en 10 mL de DMSO. (Tiempo de vida: 3 meses, conservar a 4 °C).
- c) Preparar la solución de trabajo, agregar 1 ml de solución stock de DTNB a 99 ml de buffer PBS 0.1M.
- d) Para preparar las soluciones de MSA A, B y C, se seguirán los siguientes pasos. Pesar 0.15 g de MSA y disolverlos en 100 ml. Esta solución se denominará "M". Seguir las siguientes instrucciones para preparar las soluciones de MSA (A, B y C) necesarias para la preparación de soluciones patrón
 - Tomar 500 µL de "M", agregar 500 µL de agua ultrapura en un eppendorf de capacidad 2 ml. A esta solución la denominamos "A".
 - Tomar 250 µL de "M", agregar 750 µL de agua ultrapura en un eppendorf de capacidad 2 ml. A esta solución la denominamos "B".
 - Tomar 50 µL de "M", agregar 950 µL de agua ultrapura en un eppendorf de capacidad 2 ml. A esta solución la denominamos "C".
- e) Preparar soluciones patrón de diferente concentración de MSA en una fiola de 10 mL. Se añadirá un determinado volumen de la solución patrón de MSA y PBS de acuerdo a la Tabla 6, así como un volumen fijo de 9900 µL de la solución de trabajo.
- f) Agitar tres veces cada fiola de 10 ml. Dejar por 2 minutos a temperatura ambiente para que desarrolle coloración (amarilla).
- g) Medir la absorbancia de las muestras en un espectrofotómetro UV-visible a 412 nm.

Tabla 6 Preparación de soluciones patrón para la curva de calibración del Ensayo de Ellman

Concentración de Soluciones Patrón	Volumen Solución MSA	Volumen PBS 0.1 M	Volumen Solución de Trabajo
6 µg/ml	80 µL A	20 µL	9900 µL
4.5 µg/ml	60 µL A	40 µL	
3 µg/ml	40 µL A	60 µL	
1.5 µg/ml	20 µL A	80 µL	
1.125 µg/ml	30 µL B	70 µL	
0.75 µg/ml	20 µL B	80 µL	
0.375 µg/ml	50 µL C	50 µL	
0.15 µg/ml	20 µL C	80 µL	
Blanco	0 µL	100 µL	

3.4.8.2. Determinación de la Eficiencia de encapsulación (EE%)

3.4.8.2.1. Determinar Contenido de Ácido Mercaptosuccínico libre [MSA libre]:

- Tomar 2 ml de solución de nanopartículas poliméricas de quitosano conteniendo MSA en un tubo Falcon.
- Agregar 200 μL de NaOH 10%.
- Centrifugar a 4000 rpm.
- Recolectar el sobrenadante.
- Tomar 100 μL del sobrenadante y diluirlo con 900 μL de agua destilada, homogeneizar, esta dilución se utilizará como muestra en el ensayo de tioles.
- Tomar 100 μL de la muestra, colocarlos en una fiola de 10 ml y enrasar con solución de trabajo.
- Leer en el espectrofotómetro UV-visible a 412 nm.

3.4.8.2.2. Determinar Contenido de Ácido Mercaptosuccínico Total [MSA Total]:

- Disolver 0.3 g de MSA en 9 ml de agua destilada.
- Tomar 50 μL de esta solución y diluir con 950 μL .
- Tomar 100 μL de esta última dilución, colocarlos en una fiola de 10 ml y enrasar con solución de trabajo.
- Leer en el espectrofotómetro UV-visible a 412 nm.

Figura 9. Lectura de la Reacción de Ellman por Espectrofotometría UV-visible



3.4.9. Cálculo de Resultados

Hallar los valores de [MSA libre] y [MSA Total] en unidades de gramos por mililitro (g/mL) tras utilizar la ecuación de la recta obtenida en el FOR 02/NP.

Calcular la eficiencia de encapsulación usando la siguiente fórmula (Seabra et al, 2015) [136]:

$$EE\% = \frac{[MSA\ Total] - [MSA\ Libre]}{[MSA\ Total]} \times 100$$

3.4.10. Tratamiento Estadístico de Datos

Previo al análisis de varianzas, efectuar la prueba **de normalidad de Shapiro-Wilk** (Shapiro y Wilk, 1965) y la prueba de **Homogeneidad de Varianzas de Levene** (Levene, 1960). De obtenerse datos con distribución normal y varianzas iguales, realizar el **análisis de varianzas** mediante el test **ANOVA** (Fisher, 1918), caso contrario, recurrir a su contraparte la prueba no paramétrica **Kruskal – Wallis** (Kruskal y Wallis, 1952).

Programa estadístico: IBM Statistics Versión 22. Nivel de significancia: $\alpha = 0.05$.

3.5. Determinación de Actividad Antifúngica de las MSA-NO Np por el Método de Microdilución M27 – A3

3.5.1. *Fundamento del Método:* El método de Microdilución M27 A-3 que se rige bajo los lineamientos del Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (CLSI) se utiliza para determinar la actividad antifúngica de ciertas sustancias en términos de Concentración Mínima Inhibitoria (CMI). Para esto, se preparan diferentes diluciones de la sustancia antifúngica, se añaden alícuotas de estas diluciones en una placa de 96 pocillos, y en cada pocillo se añade a su vez el inóculo del microorganismo en cuestión. Se asignan celdas para control positivo (solo inóculo de la cepa) y control negativo (solo el medio de cultivo). Tras la incubación de la placa a 37 °C por 24 horas, se realiza la lectura de resultados que consiste en observar la turbidez de los pocillos. Se asigna como CMI a la menor dilución en cuyo pocillo no se observa turbidez y por tanto, hubo inhibición del crecimiento del microorganismo.

3.5.2. *Tipo de Muestra:* 09 Frascos de Nanopartículas Poliméricas de Quitosano cargadas con MSA (consultar **Anexo 7**), Solución de MSA-NO 36 mg/mL, Solución de Quitosano (0.75 mg/mL).

3.5.3. *Cepas:* *Candida albicans* 024 (Origen: Tracto Vaginal), *Candida glabrata* INS121768314 (Origen: Tracto Vaginal), Referenciales: *Candida parapsilosis* ATCC 22019 y *Candida krusei* ATCC 6258.

3.5.4. *Condiciones previas:*

3.5.4.1. *Ensayo de Microdilución de fármacos azoles.* Se realizó un ensayo previo de microdilución utilizando los fármacos Fluconazol y Voriconazol contra las cepas

ATCC *Candida krusei* y *Candida parapsilosis* en orden de probar la destreza del analista antes de realizar los ensayos de microdilución propios de la investigación. Los resultados se adjuntan en los **Anexos 13 y 14**.

3.5.4.2. *Formación del ácido s-nitrosomercaptosuccínico*. A partir de esta parte de la investigación, se comienza a trabajar con el donador de NO, es decir, el s-nitrosotiol o siendo más específicos, **el ácido s-nitrosomercaptosuccínico (MSA-NO)**, que se forma tras la nitrosación de los grupos tioles libres del ácido mercaptosuccínico (MSA).

3.5.4.3. *Identificación de las Cepas*: Antes de utilizar alguna cepa de *Candida sp.* en el ensayo de microdilución, es necesario identificar dicha cepa, por lo que se recurre a las pruebas de Presencia de Tubo Germinativo, Crecimiento en CHROM[®] agar, Formación de Clamidospora en agar arroz, Asimilación de Urea, Crecimiento en Agar Mycosel[®], la Formación de Velo en caldo Saboraud y la asimilación de los carbohidratos Glucosa, Maltosa, Sacarosa, Galactosa, Lactosa y Rafinosa.

3.5.4.4. Se realizará el ensayo de microdilución M27-A3 de cada lote por **triplicado** para determinar las CMI de *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei* y *C.parapsilosis*.

3.5.5. *Equipos Requeridos*: Cabina de Bioseguridad Clase II Tipo A Marca LABCONCO Modelo 36204, Incubadora Marca SOLFARMA Modelo INC-105, Micropipeta de 100 – 1000 µL Boeco[®], Micropipeta Multicanal 10 – 100 µL Axygen[®], Mechero Bunsen.

3.5.6. *Insumos Requeridos*:

Materiales: Tips amarillos de 100 µL, Tips azules de 1000 µL, Placas de Poliestireno de 96 pocillos fondo plano, Reservorios, Marcador Permanente, Asa de Siembra.

Reactivos: Medio Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640, Nitrito de Sodio, Agua Estéril Braun[®], Tubos Estériles con Solución Salina NaCl 0.85%, Alcohol al 70%, Tubo de CaCl₂ (Escala de McFarland 0.5).

3.5.7. *Documentos Utilizados*: Formulario de Control de Calidad de Hongos Levaduriformes Especies *Candida sp.* (**Anexo 12**) y FOR 04/ NP (**Anexo 15**).

3.5.8. Procedimiento

3.5.8.1. Identificación de las cepas

- a) Repicar la cepa de *Candida sp.* en agar Saboraud y dejar incubar 24 horas aproximadamente.
- b) Después de las 24 horas, sembrar la cepa de *Candida sp.* en CHROM® agar, agar Urea (prueba Ureasa), agar Mycosel, agar Arroz, caldo Saboraud (prueba de formación de Velo) y los agares con los carbohidratos Glucosa, Maltosa, Sacarosa, Galactosa, Lactosa y Rafinosa. Realizar lectura a las 24 horas, incubar a 37 °C.
- c) Tomar una colonia de la cepa *Candida sp.* en agar Saboraud y cultivarla en suero para ver la formación de tubo germinativo, realizar la lectura en el microscopio óptico a las 2 horas.
- d) Sembrar en agar arroz para ver la presencia de clamidospora. Dejar a temperatura ambiente, leer a las 24 horas en un microscopio óptico.

3.5.8.2. Preparación del inóculo

- a) Preparar en un tubo con 5 mL solución salina de cloruro de sodio (NaCl) 0.85% una suspensión de la cepa a la escala 0.5 McFarland. (La cepa ha de ser cultivada por 24 Horas en agar Saboraud, 48 Horas para *C. parapsilosis*). Identificar con rótulo “A1”.
- b) Tomar 100 µL de “A1” para traspasarlos a otro tubo con 5 ml de solución salina, al que se le asignó el nombre de “A2”.
- c) Tomar 0.5 ml de A2 para traspasarlos a un tubo con 9.5 ml de RPMI 1640. Este es el inóculo final.
- d) Conservar en la refrigeradora a una temperatura de 4 °C.

3.5.8.3. Formación del ácido s-nitrosomercaptosuccínico

- a) Añadir 1.38 g de NaNO₂ en 10 mL de agua destilada y filtrar por un disco de 0.22 µm. A esta solución la llamamos “solución nitrosante”.
- b) Alicuotar 9 ml de la solución de nanopartículas poliméricas de quitosano cargadas con ácido s-nitrosomercaptosuccínico en un frasco de vidrio estéril de 20 mL.
- c) Tomar una alícuota de 1 mL de la solución de NaNO₂ (1.38 mg/mL) y añadir al frasco con nanopartículas mencionado en el inciso b).

- d) Observar la formación de una coloración rojo cereza, indica la formación de MSA-NO Np (36 mg/mL).

3.5.8.4. Preparación de las diluciones seriadas y adición del inóculo

- a) Realizar diluciones seriadas de nanopartículas poliméricas conteniendo ácido *s*-nitrosomercaptosuccínico con RPMI 1640 disminuyendo en razón de un medio. Siendo las diluciones: 18 mg/mL, 9 mg/mL, 4.5 mg/mL, 2.25 mg/mL, 1.13 mg/mL, 0.56 mg/mL, 0.28 mg/mL, 0.14 mg/mL 0.07 y 0.004 mg/mL.
- b) Verter cada dilución en un reservorio y luego dispensar por octuplicado en volúmenes de 100 μ L en las columnas 1-10 de una placa de 96 pocillos.
- c) Añadir 100 μ L del inóculo de las cepas en cuestión. Reservar la columna 11 para añadir únicamente 200 μ L del inóculo (control positivo de crecimiento). En la columna 12, añadir únicamente 200 μ L del medio RPMI 1640 (control de esterilidad).
- d) Incubar las placas a 37 °C \pm 0.5 por 48 horas. Evaluar la turbidez en cada pocillo a las 24 horas para todas las cepas exceptuando *C. parapsilosis* (48 Horas) para la determinación de las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI).

3.5.9. Tratamiento Estadístico de Datos

Previo al análisis de varianzas, efectuar la prueba de **normalidad de Shapiro-Wilk** (*Shapiro y Wilk*, 1965) y la prueba de **Homogeneidad de Varianzas de Levene** (*Levene*, 1960). De obtenerse datos con distribución normal y varianzas iguales, realizar el **análisis de varianzas** mediante el test **ANOVA** (*Fisher*, 1918), caso contrario, recurrir a su contraparte la prueba no paramétrica **Kruskal – Wallis** (*Kruskal y Wallis*, 1952). Programa estadístico: IBM Statistics Versión 22. Nivel de significancia: $\alpha = 0.05$.

3.5.10. Instalaciones

Los ensayos que involucraron el manejo de las cepas *Candida sp.*, fueron llevados a cabo en las instalaciones del Laboratorio de Micología del INS. Dicho ambiente cuenta con las adecuadas condiciones de bioseguridad para la manipulación de microorganismos.

La **Figura 10** muestra el ambiente de siembra donde se realizaron las pruebas de identificación de cepas y preparación del inóculo, mientras la **Figura 11** muestra la cabina de bioseguridad donde se realizó el ensayo de microdilución M27 –A3.

Figura 10. Ambiente para el manejo de *Candida sp.*



Figura 11. Cabina de Bioseguridad Clase II Tipo A



3.6. Estimación del Perfil de Liberación de NO por las MSA-NO Np

3.6.1. *Fundamento del Método:* La presencia de compuestos s-nitrosotioles como el ácido s-nitrosomercaptosuccínico (MSA-NO) puede detectarse debido a que el enlace S-NO presente en su estructura tiene un pico de absorbancia a la longitud de onda 545 nm. Este enlace es susceptible a la temperatura y al descomponerse, libera NO. Tras una incubación del compuesto a 37 °C, el decaimiento en la absorbancia a dicha longitud de onda se atribuye a la descomposición del s-nitrosotiol y la liberación del NO [83].

3.6.2. *Tipo de Muestra:* 09 Frascos de Nanopartículas Poliméricas de Quitosano cargadas con MSA (Consultar **Anexo 07**), Solución de MSA-NO 36 mg/mL.

3.6.3. *Equipos Requeridos:* Espectrofotómetro UV-visible Boeco ®, Baño María, Micropipeta de 100 – 1000 µL, Probeta de 50 mL.

3.6.4. *Insumos Requeridos:*

Materiales: Matraces de 100 mL, Marcador Permanente, Celdas de Poliestireno.

Reactivos: Agua Bidestilada.

3.6.5. *Condiciones Previas:*

Se analizarán las concentraciones a las que se determinó como CMI en el análisis de Determinación de Actividad Antifúngica por el Método de Microdilución M27 – A3.

Se estimará el perfil de liberación de NO de los lotes de MSA-NO Np por triplicado.

3.6.6. *Documentos Utilizados:* FOR 05/ NP (**Anexo 16**).

3.6.7. *Resultados Esperados*

Tabla 7 Especificación de calidad de la liberación de NO por las MSA-NO Np

Especificación	Interpretación
Disminución en la absorbancia a 545 nm	Descomposición del MSA-NO Liberación del NO ⁽¹⁾

(1) [136]

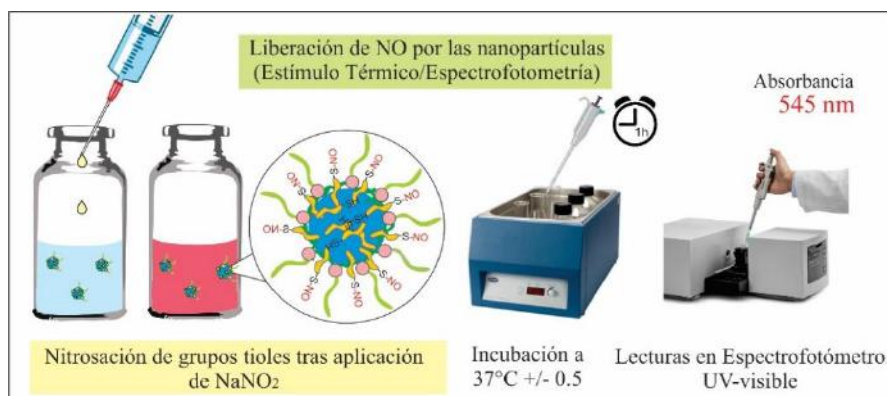
3.6.8. *Procedimiento:*

- a) Añadir 1 ml de solución de NaNO₂ por 9 ml de solución de MSA Np. Observar coloración rojo intenso.
- b) Hacer diluciones seriadas a partir del lote preparado (MSA-NO Np 36 mg/mL) con el fin de obtener las concentraciones 2.25, 0.56, 0.28 y 0.14 mg/mL de MSA-NO Np utilizando buffer fosfato salino (pH 7.2). Preparar volúmenes por triplicado de 60 mL aproximadamente por cada dilución en un matraz de 100 mL.
- c) Introducir los matraces en un baño María a 37° C ± 0.5.
- d) Colectar volúmenes de 1.5 ml aproximadamente cada hora durante 24 horas y cada seis horas a partir de las 24 horas hasta las 48 horas.
- e) Realizar las lecturas de las absorbancias de las muestras a 545 nm por espectrofotometría UV-visible.

3.6.9. *Tratamiento de datos y obtención de resultados:*

Los datos fueron colectados en el FOR-05/ Np y luego digitalizados en una tabla para generar un gráfico de dispersión (x vs. y) con ayuda del programa Microsoft Excel 2013, siendo la variable independiente “Tiempo en Horas” y la variable dependiente “Absorbancia a 545 nm”.

Figura 12. Esquema del ensayo de estimación del perfil de liberación del NO por las MSA-NO Np



IV. RESULTADOS

4.1. Determinación del Grado de Desacetilación, Peso Molecular, Espectro Infrarrojo del Quitosano

4.1.1. Grado de Desacetilación

En la **Tabla 8** se aprecian los resultados de GD expresados en porcentajes tras el análisis por triplicado de la muestra Quitosano. En la misma tabla se encuentra el valor promedio de GD (85.15 ± 1.19 %) obtenido. Dado que este valor supera el 60%, la materia prima Quitosano cumple con la especificación establecida.

Tabla 8. Resultados de la Determinación del GD de Quitosano.

	Q1	Q2	Q3
GD%	83.8	86.06	85.60
Promedio	85.15 ± 1.19 %		

Q: Quitosano; GD: Grado de Desacetilación

4.1.2. Peso Molecular

En la **Tabla 9** se aprecian los resultados de PM expresados en kiloDaltons (kDa) tras el análisis por triplicado de la muestra Quitosano. En la misma tabla se encuentra el valor promedio de PM (138.63 ± 2.58 kDa) obtenido. Dado que este valor se encuentra dentro del rango [50 – 190 kDa], se clasificó a la materia prima como quitosano de bajo peso molecular de acuerdo a la especificación establecida.

Tabla 9. Resultados de la Determinación del PM del Quitosano

	Q1	Q2	Q3
PM (en kDa)	135.65	140.13	140.11
Promedio	138.63 ± 2.58 kDa		

Q: Quitosano; PM: Peso Molecular

4.1.3. Espectro Infrarrojo

En la **Figura 13** se encuentra la gráfica del espectro infrarrojo del quitosano, la que tiene como ordenadas (eje x) a los valores de Transmitancia (en %) y como abcisas (eje y) a los valores de Frecuencia (en cm^{-1}). La gráfica de la muestra de quitosano presenta un total de tres (03) picos de absorbancia. De acuerdo a la especificación, el pico registrado a la frecuencia 1597 cm^{-1} corresponde a la vibración del flexión en el enlace N-H; respecto a los picos registrados a las frecuencias 3298 y 3356 cm^{-1} , estos corresponden a la vibración de estiramiento del enlace N-H. La **Tabla 10** resume las tres longitudes de onda a las que se observó el pico de absorbancia y relaciona estos datos con las especificaciones de calidad.

En función a este resultado, el quitosano GTC Bio Lote GC20161217 fue **aprobado** para su utilización como **materia prima** en la síntesis de nanopartículas poliméricas de quitosano cargadas con ácido mercaptosuccínico.

Figura 13. Espectro Infrarrojo del Quitosano

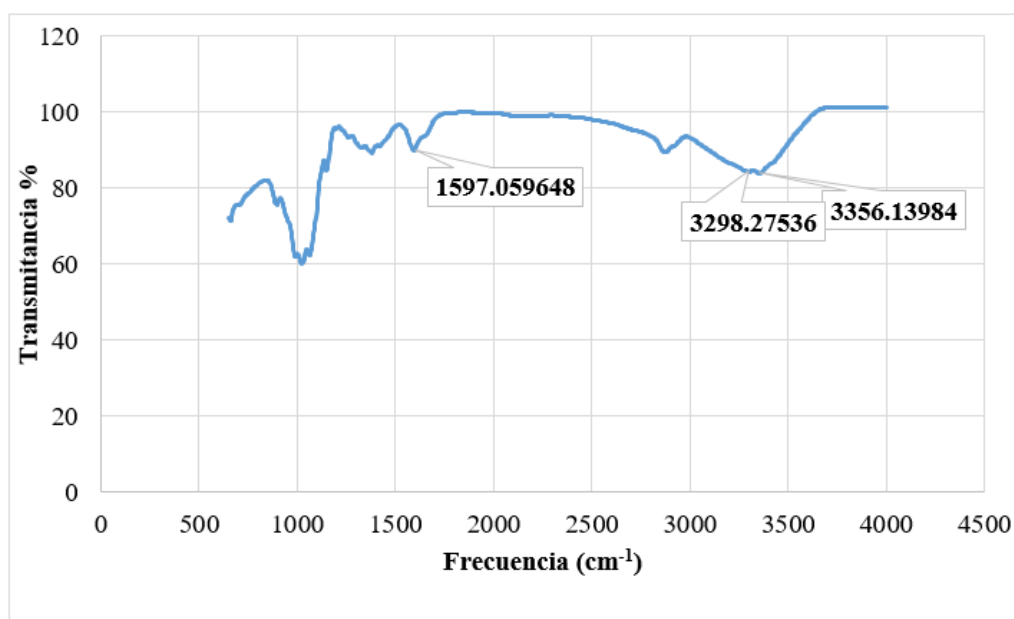


Tabla 10. Resultados en términos de pico de absorbancias del Espectro Infrarrojo del Quitosano

Pico de Absorbancia	Transmitancia	Especificación ⁽¹⁾	Interpretación
1597.05965	89.962359	Se registra un pico de intensidad media a fuerte a la frecuencia 1500 - 1640 cm ⁻¹	Vibraciones de Deformación en enlace N-H.
3298.27536	84.265874	Se registra pico doble de intensidad media a la frecuencia 3300 – 3500 cm ⁻¹	Vibraciones de Estiramiento en enlace N-H.
3356.13984	83.851812		

4.2. Determinación de Parámetros Físicos de las MSA Np

En la **Tabla 11** se encuentran los valores correspondientes al Diámetro Efectivo Promedio y el Índice de Polidispersidad Promedio obtenido tras el análisis de los tres lotes de MSA Np. Los promedios interlote obtenidos para sendos parámetros físicos permitieron calificar a las muestras de nanopartículas sintetizadas como aptas, de acuerdo a las especificaciones establecidas.

Tabla 11. Resultados de la Determinación de los Parámetros Físicos DE e IPD de los lotes de MSA Np

	DE Promedio (en nm)	IPD Promedio
LOTE 01	230.47 ± 18.64	0.278 ± 0.018
LOTE 02	232.07 ± 9.74	0.269 ± 0.017
LOTE 03	262.53 ± 3.88	0.274 ± 0.015
Promedio Interlote	241.69 ± 18.95	0.274 ± 0.015

DE: Diámetro Efectivo; IPD: Índice de Polidispersidad

Respecto al **tratamiento estadístico de los resultados**, se procedió a una prueba **ANOVA (Unifactorial)** para el análisis de las varianzas del **diámetro efectivo**, habiéndose comprobado que los datos siguen una distribución normal y presentan varianzas iguales. Siendo la hipótesis nula (H₀):

H₀= Las medias de los valores de Diámetro Efectivo de los lotes de MSA Np son iguales.

La **Tabla 12** muestra el resultado de la comparación de los tres lotes de MSA Np.

Tabla 12. Análisis de varianzas ANOVA Unifactorial del DE de los lotes de MSA Np

Muestra	Interpretación del Valor Estadístico de Fisher	Interpretación del Valor p
Diámetro Efectivo	6.426 > 5.14 Se rechaza hipótesis nula	0.032 < 0.05 Se rechaza hipótesis nula
*Según Tabla de Distribución Fisher, F crítico = 5.14 Grados de Libertad del Numerador:2; Grados de Libertad del Denominador : 6 ; Nivel de significancia $\alpha = 0.05$ (Ver Anexo 19).		

La **Tabla 13** muestra los resultados del análisis de subconjuntos homogéneos que establece una comparación de las medias del diámetro efectivo promedio de partículas entre cada uno de los lotes de MSA Np.

Tabla 13. Análisis de Subconjuntos Homogéneos del DE de los lotes de MSA Np

Análisis de Subconjuntos Homogéneos		
Subconjunto	Valor p Observado	Interpretación
Lote 01*Lote 02	0.986	p>0.05 : Las medias de los valores DE de los lotes 01 y 02 de MSA Np son iguales.
Lote 02*Lote 03	0.053	p>0.05 : Las medias de los valores DE de los lotes 02 y 03 de MSA Np son iguales.
Lote 03*Lote 01	0.044	p<0.05 : Las medias de los valores DE de los lotes 03 y 01 de MSA Np no son iguales.

Al rechazarse la hipótesis nula, basándonos en el valor p y el valor de Fisher (F) de la **Tabla 12**, se asume que existe una diferencia significativa entre los tres lotes de MSA Np respecto a la media de sus diámetros efectivos de partícula. No obstante, al ejercer la comparación de medias lote a lote en la **Tabla 13** se observó que entre los lotes 01 - 02 y los lotes 02 - 03 no existe una diferencia significativa respecto a las medias de sus diámetros efectivos de partícula. Por otro lado, los lotes 01 - 03 difieren significativamente en este aspecto ($p < 0.05$).

Para el análisis del **índice de polidispersidad**, se recurrió de la misma manera a la prueba **ANOVA (Unifactorial)** para el análisis de varianzas, siendo la H_0 :

H_0 = Las medias de valores de Índice de Polidispersidad de los lotes de MSA Np son iguales

La **Tabla 14** establece una comparación entre las medias de índice de polidispersidad de los tres lotes de MSA Np.

Tabla 14. Análisis de varianzas ANOVA Unifactorial del IPD de los lotes de MSA Np

Muestra	Interpretación del Valor Estadístico de Fisher	Interpretación del Valor p
Diámetro Efectivo	0.192 < 5.14 Se retiene hipótesis nula	0.830 > 0.05 Se retiene hipótesis nula
*Según Tabla de Distribución Fisher, F crítico = 5.14 Grados de Libertad del Numerador:2; Grados de Libertad del Denominador : 6 ; Nivel de significancia $\alpha = 0.05$ (Ver Anexo 19).		

La **Tabla 15** respalda el resultado mostrado por la **Tabla 14**, al encontrarse un único subconjunto homogéneo.

Tabla 15. Análisis de Subconjuntos Homogéneos del IPD de los lotes de MSA Np

Análisis de Subconjuntos Homogéneos		
Subconjunto	Valor p Observado	Interpretación
Lote 01*Lote 02*Lote 03	0.816	p > 0.05 : Las medias de los valores IPD de los lotes 01, 02 y 03 de MSA-Np son iguales.

Por tanto, basándonos en los valores p y F mostrados por la Tabla, no se rechaza la hipótesis nula, es decir, se asume que las medias de los valores de índice de polidispersidad de los lotes 01, 02 y 03 de MSA Np son iguales

4.3. Determinación de la Eficiencia de Encapsulación de las MSA Np

En la **Tabla 16** se encuentran los valores correspondientes a la Eficiencia de Encapsulación (EE%) promedio. El valor promedio interlote obtenido fue 97.52 ± 0.07 %.

Tabla 16. Resultados de la Determinación de la EE% de los lotes de MSA Np

	EE % Promedio
LOTE 01	97.53 ± 0.00
LOTE 02	97.51 ± 0.10
LOTE 03	97.53 ± 0.11
Promedio Interlote	97.52 ± 0.07

EE%: Eficiencia de Encapsulación

Respecto al **tratamiento estadístico de los resultados**, se recurrió a la **prueba Kruskal-Wallis** para el análisis de varianzas de la **eficiencia de encapsulación**, en vista que los datos no cumplían con tener una distribución normal. Siendo la H_0 :

H_0 = Los valores de eficiencia de encapsulación de los lotes MSA-Np provienen de una población idéntica con una misma mediana.

Tabla 17. Análisis de varianzas Kruskal-Wallis para la EE% de los lotes de MSA Np.

Muestra	Interpretación del Valor Estadístico de Kruskal Wallis	Interpretación del Valor p
Eficiencia de Encapsulación	1.175 < 5.14 Se retiene hipótesis nula	0.556 > 0.05 Se retiene hipótesis nula
*Según Tabla de Distribución Ji Cuadrada, χ^2 crítico = 5.992 Grados de Libertad :2; Nivel de significancia $\alpha = 0.05$ (Ver Anexo 18).		

En función a la **Tabla 17**, no se rechaza la hipótesis nula, por lo que se asume que los valores de eficiencia de encapsulación para los lotes 01, 02 y 03 de MSA Np **pertenecen a una población idéntica y con una misma mediana.**

4.4. Determinación de la Actividad Antifúngica

4.4.1. Identificación de la Cepa

En la **Tabla 18** se observan los resultados correspondientes a las pruebas de identificación de las cepas de *Candida sp.* que serán utilizadas en el ensayo de Microdilución M27 – A3. Tal como lo señala dicha tabla, se logró la identificación de las cepas *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei* y *C. parapsilosis*.

Tabla 18. Resultados de las pruebas de identificación de las cepas de *Candida sp.*

Código	TG	CL	CHROM	UREA	MYC	VELO	GLU	LAC	SAC	MAL	GAL	RAF	Resultado
<i>Candida albicans</i> 024	(+)	(+)	Verde	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)	(-)	<i>Candida albicans</i>
<i>Candida glabrata</i> INS121 768314	(-)	(-)	Borde blanco y centro rosado/ fucsia	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	<i>Candida glabrata</i>
<i>Candida krusei</i> ATCC 6258	(-)	(-)	Rosadas/ lilas	(-)	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	<i>Candida krusei</i>
<i>Candida parapsilosis</i> ATCC 22019	(-)	(-)	Creimas	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)	(-)	<i>Candida parapsilosis</i>

TG: Formación de Tubo Germinativo, CL: Formación de Clamidospora; CHROM: Crecimiento en CHROM Agar; MYC: Crecimiento en Agar Mycosel®, VELO: Formación de Velo; GLU: Glucosa; LAC: Lactosa; SAC: Sacarosa; MAL: Maltosa; GAL: Galactosa; RAF: Raffinosa.

4.4.2. Microdilución M27-A3

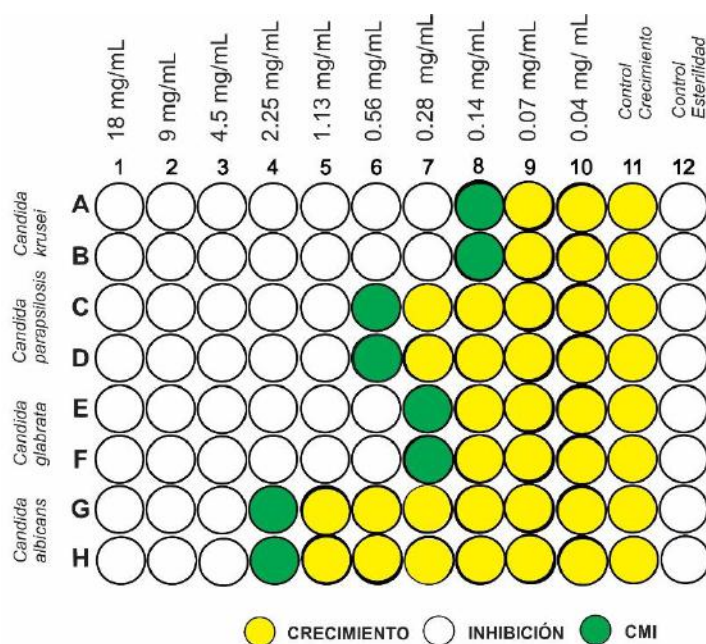
Los resultados que se aprecian en la **Tabla 19**, indican que las nanopartículas poliméricas de quitosano cargadas con ácido s-nitrosomercaptosuccínico (MSA-NO) tienen mayor actividad antifúngica contra la cepa *C. krusei* (CMI: 0.14 mg/mL), seguida de *C. glabrata* (CMI: 0.14 – 0.28 mg/mL) y *C. parapsilosis* (CMI: 0.56 mg/mL). Por otro lado, en la cepa *C. albicans*, se registró la menor actividad antifúngica (CMI 2.25 mg/mL). La **Figura 14** representa un esquema de la placa en la que se realizó la lectura.

Tabla 19. Resultados del ensayo de Microdilución M27-A3 de las MSA- NO Np en términos de CMI (en mg/mL)

	<i>Candida parapsilosis</i> ATCC 22019	<i>Candida krusei</i> ATCC 6258	<i>Candida glabrata</i> INS12176831	<i>Candida albicans</i> 024
LOTE 01	0.56	0.14	0.14	1.13
LOTE 02	0.56	0.14	0.28	2.25
LOTE 03	0.56	0.14	0.14	2.25
CMI Interlote	0.56	0.14	0.28	2.25

CMI: Concentración Mínima Inhibitoria

Figura 14. Esquema de la lectura del ensayo de Microdilución M27-A3 de las MSA- NO Np



La **Tabla 20**, indica que el principio activo solo, es decir, el MSA-NO, tiene mayor actividad antifúngica contra la cepa *C.krusei* (CMI: 0.14 mg/mL), seguida de *C. glabrata* y *C.parapsilosis* (CMI: 0.56 mg/mL). Por otro lado, en la cepa *C. albicans*, se registró la menor actividad antifúngica (CMI 2.25 mg/mL).

La **Tabla 21**, indica que el excipiente quitosano tiene actividad antifúngica contra las cepas *C. krusei*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. albicans*, las que comparten la misma CMI (0.38 mg/mL).

Tabla 20. Resultados del ensayo de Microdilución M27-A3 en términos de CMI del MSA-NO (en mg/mL)

	CMI (MSA-NO)
<i>Candida parapsilosis</i> ATCC 22019	0.56 mg/mL
<i>Candida krusei</i> ATCC 6258	0.14 mg/mL
<i>Candida albicans</i> 024	2.25 mg/mL
<i>Candida glabrata</i> INS12176831	0.56 mg/mL

Tabla 21. Resultados del ensayo de Microdilución M27-A3 en términos de CMI del Quitosano (en mg/mL)

	CMI (Quitosano)
<i>Candida parapsilosis</i> ATCC 22019	0.38 mg/mL
<i>Candida krusei</i> ATCC 6258	0.38 mg/mL
<i>Candida albicans</i> 024	0.38 mg/mL
<i>Candida glabrata</i> INS12176831	0.38 mg/mL

Figura 15. Esquema de la lectura del ensayo de Microdilución M27-A3 del MSA-NO

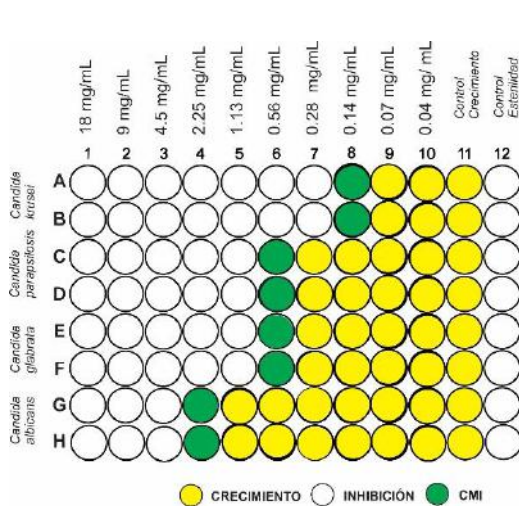


Figura 16. Esquema de la lectura del ensayo de Microdilución M27-A3 del Quitosano

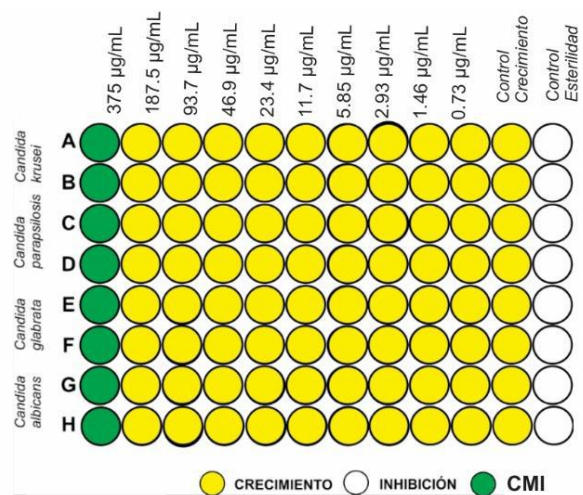


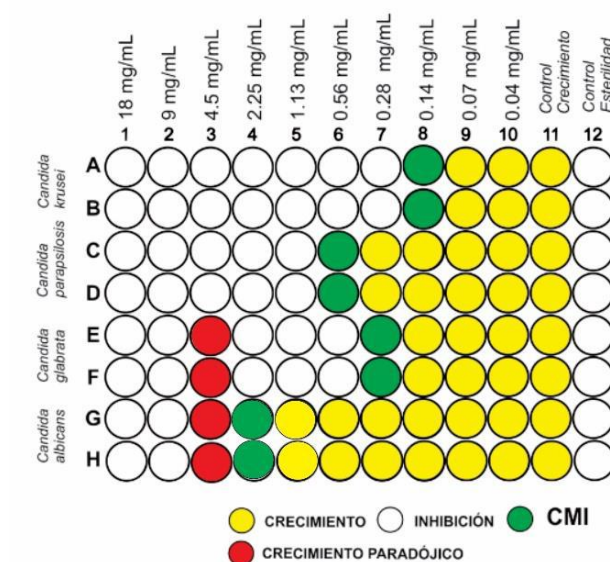
Tabla 22. Incidencia de Crecimiento Paradójico en el ensayo de Microdilución M27-A3 de MSA-NO Np a la concentración 4.5 mg/mL.

	<i>Candida parapsilosis</i> ATCC 22019	<i>Candida krusei</i> ATCC 6258	<i>Candida albicans</i> 024	<i>Candida glabrata</i> INS12176831
LOT 01	0	0	1	3
LOT 02	0	0	1	2
LOT 03	0	0	1	3
Total	0	0	3	8

Las **Figuras 14 – 16** representan un esquema de la placa de 96 pocillos utilizada en la técnica de microdilución M27 A3, de manera que pueda observarse la distribución espacial de las diluciones de MSA-NO Np, MSA-NO, y quitosano, así como los controles de esterilidad y de crecimiento. De acuerdo a la leyenda, uno puede guiarse en función al color del pocillo dónde hay crecimiento (amarillo), inhibición (blanco) o se halla la **concentración mínima inhibitoria** (verde).

En la **Tabla 22** se encuentra registrado el número de incidencias de **crecimiento paradójico** en las cepas de *Candida sp.* tras ser enfrentadas nanopartículas poliméricas cargadas con MSA-NO a una concentración de 4.5 mg/mL. La **Figura 17** representa un esquema de lo observado. No se observó el crecimiento paradójico en las cepas referenciales *C. krusei* ATCC ® 6258 y *C. parapsilosis* ® ATCC 22019. Tampoco se encontró crecimiento paradójico en los ensayos de microdilución del MSA-NO ni en el del Quitosano. La cepa *C. glabrata* presenta un mayor número de incidencias de crecimiento paradójico (08) comparado a *C. albicans* (03).

Figura 17. Esquema de placa donde se observa Crecimiento Paradójico observado en Microdilución M27 A-3 de MSA-NO Np



Respecto al tratamiento estadístico de los datos, se recurrió a la prueba de Kruskal Wallis para el análisis de varianzas, ya que los datos no seguían una distribución normal. Siendo la H_0 :

H_0 = Los valores CMI de *Candida sp.* de los lotes 01, 02 y 03” de MSA Np provienen de una población idéntica con una misma mediana.

Tabla 23. Análisis de varianzas Kruskal-Wallis para las CMI de *Candida sp.* de MSA – NO Np.

Muestra	Interpretación del Valor Estadístico de Kruskal Wallis	Interpretación del Valor p
CMI <i>C. albicans</i>	5.600 < 5.992 Se retiene hipótesis nula	0.061 > 0.05 Se retiene hipótesis nula
CMI <i>C. glabrata</i>	0.800 < 5.992 Se retiene hipótesis nula	0.670 > 0.05 Se retiene hipótesis nula
CMI <i>C. parapsilosis</i>	0.000 < 5.992 Se retiene hipótesis nula	1.000 > 0.05 Se retiene hipótesis nula
CMI <i>C. krusei</i>	0.000 < 5.992 Se retiene hipótesis nula	1.000 > 0.05 Se retiene hipótesis nula
*Según Tabla de Distribución Ji Cuadrada, χ^2 crítico = 5.992 Grados de Libertad :2; Nivel de significancia α = 0.05 (Ver Anexo 18).		

En función a los resultados presentados por la **Tabla 23**, se asume que las CMI de *C. krusei* de los lotes 01, 02 y 03 de MSA Np provienen de una población idéntica y con medianas iguales.

4.5. Estimación del Perfil de Liberación del Óxido Nítrico por las MSA-NO Np

4.5.1. Perfil de Liberación de NO por las MSA-NO Np a la CMI de *Candida krusei* (0.14 mg/mL)

La gráfica del perfil de liberación de NO correspondiente a la concentración 0.14 mg/mL de MSA-NO (Ver Figura 18) y MSA-NO Np (Ver Figuras 19-21) muestra la disminución en la absorbancia a 545 nm del MSA-NO (eje y) en función al tiempo (eje x). De acuerdo a la especificación planteada, la disminución en la absorbancia registrada indica la liberación de NO. En el caso del MSA-NO, se observa una caída abrupta en la absorbancia durante las primeras 03 horas. A comparación, las MSA-NO Np, experimentan una caída abrupta en la absorbancia solo durante la primera hora y durante las siguientes 19 horas mantienen una disminución paulatina en la absorbancia, lo que indica a su vez una liberación controlada del NO. Puede observarse además que el valor de absorbancia en el tiempo 0 del MSA-NO (0.022) es mayor al MSA-NO Np (0.012).

Figura 18. Perfil de Liberación del NO por MSA-NO (0.14 mg/mL)

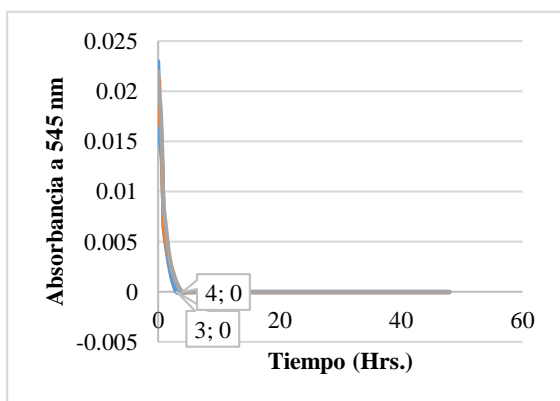


Figura 19. Perfil de Liberación del NO por MSA-NO Np LOTE 01 (0.14 mg/mL)

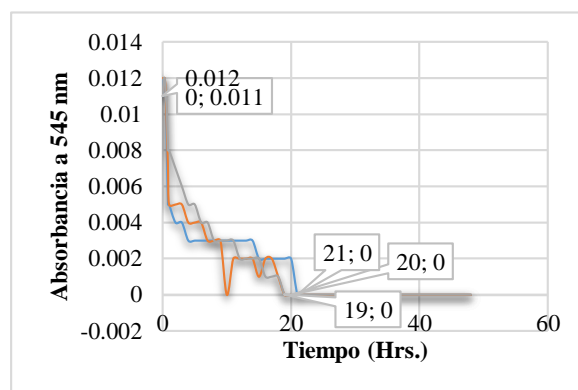


Figura 20. Perfil de Liberación del NO por MSA-NO Np LOTE 02 (0.14 mg/mL)

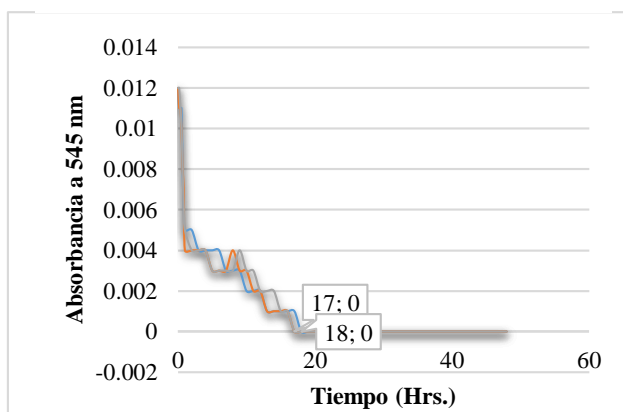
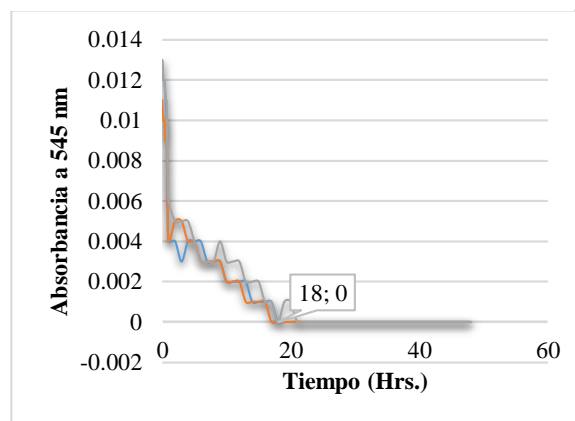


Figura 21. Perfil de Liberación del NO por MSA-NO Np LOTE 03 (0.14 mg/mL)



4.5.2. Perfil de Liberación de NO por las MSA-NO Np a la CMI de *Candida glabrata* (0.28 mg/mL)

La gráfica del perfil de liberación de NO correspondiente a la concentración 0.28 mg/mL de MSA-NO (Ver Figura 22) y MSA-NO Np (Ver Figuras 23-25) muestra la disminución en la absorbancia a 545 nm del MSA-NO (eje y) en función al tiempo (eje x).

Las MSA-NO Np presentan un perfil de liberación de NO donde se observan **fluctuaciones** en la disminución e incremento de la absorbancia a 545 nm durante 24 horas, que es el tiempo a la que la absorbancia llega a su valor mínimo. Respecto al MSA-NO se observa una caída abrupta de la absorbancia en las primeras 04 horas. A partir de este tiempo, también se observan fluctuaciones donde hay liberación de NO hasta las 30 horas. Es necesario recordar que la inhibición del MSA-NO sobre *C. glabrata* se dio recién a la concentración de 0.56 mg/mL, dicho perfil será analizado más adelante. Nuevamente, se observó que el valor de absorbancia en el tiempo 0 del MSA-NO (0.03) fue mayor al MSA-NO Np (0.02).

Figura 22. Perfil de Liberación del NO por MSA-NO (0.28 mg/mL)

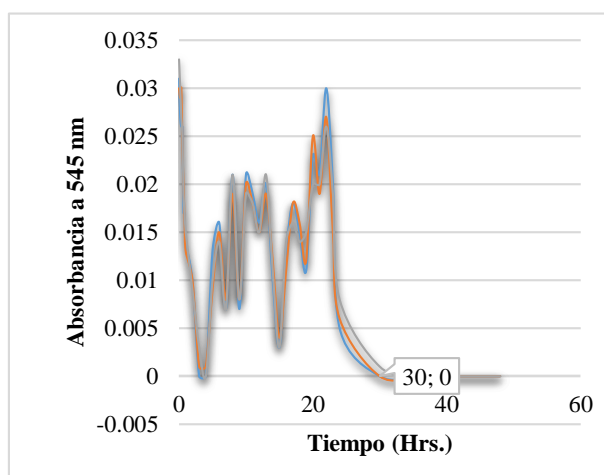


Figura 23. Perfil de Liberación del NO por MSA-NO Np LOTE 01 (0.28mg/mL)

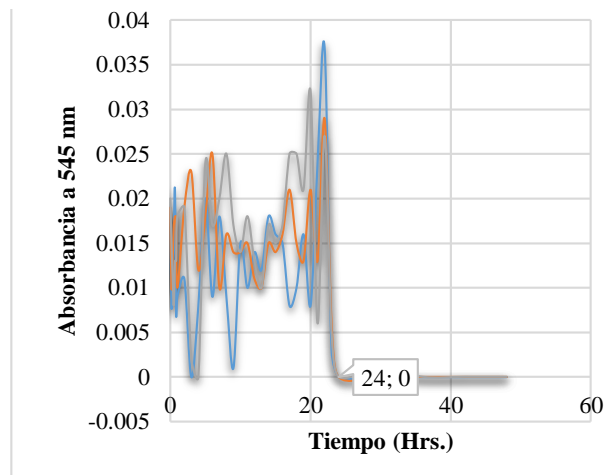


Figura 24. Perfil de Liberación del NO por MSA-NO Np LOTE 02 (0.28mg/mL)

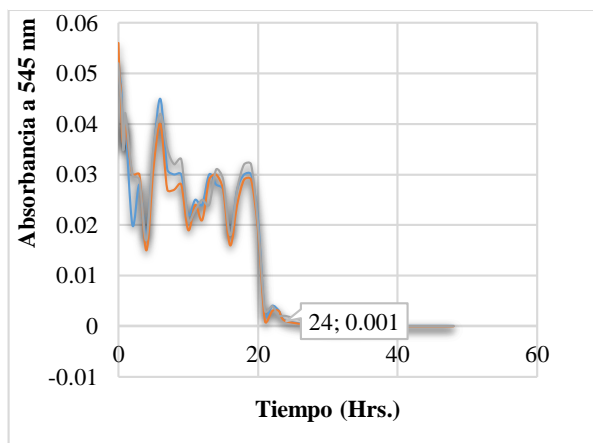
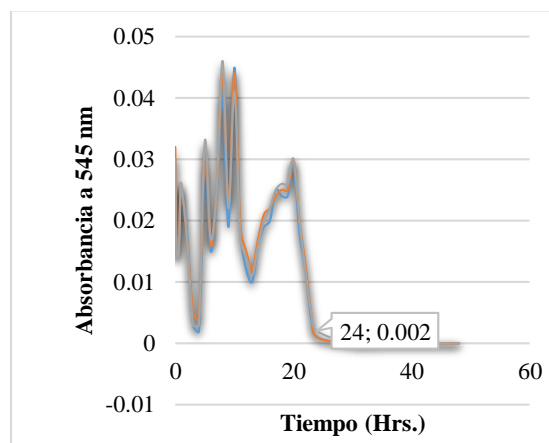


Figura 25. Perfil de Liberación del NO por MSA-NO Np LOTE 03 (0.28 mg/mL)



4.5.3. Perfil de Liberación de NO por las MSA-NO Np a la CMI de *Candida parapsilosis* (0.56 mg/mL)

La gráfica del perfil de liberación de NO correspondiente a la concentración 0.56 mg/mL de MSA-NO (Ver Figura 26) y MSA-NO Np (Ver Figuras 27-29) muestra disminución en la absorbancia a 545 nm (eje y) en función al tiempo (eje x).

Tanto las MSA-NO Np como el MSA-NO obtuvieron un CMI de 0.56 mg/ mL contra *C. parapsilosis*. Las cinéticas de liberación para ambas son similares ya que tanto el MSA-NO como el MSA-NO Np experimentaron fluctuaciones en la disminución e incremento de la absorbancia a lo largo de todas las 24 horas. Se observó que el valor de absorbancia en el tiempo 0 del MSA-NO (~0.06) fue mayor al MSA-NO Np (~0.03).

Figura 26. Perfil de Liberación del NO por MSA-NO (0.56 mg/mL)

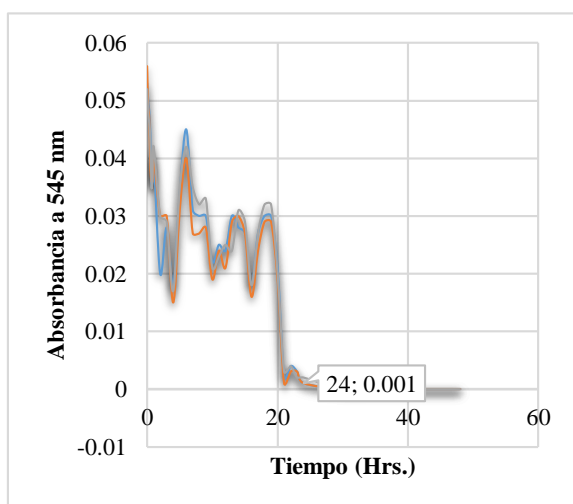


Figura 27. Perfil de Liberación del NO por MSA-NO Np LOTE 01 (0.56 mg/mL)

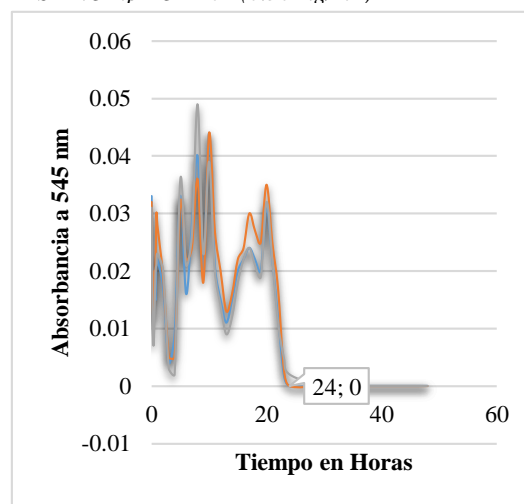


Figura 28. Perfil de Liberación del NO por MSA-NO Np LOTE 02 (0.56 mg/mL)

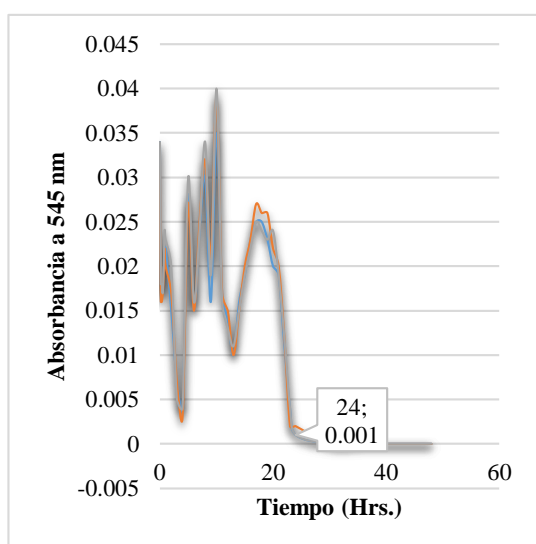
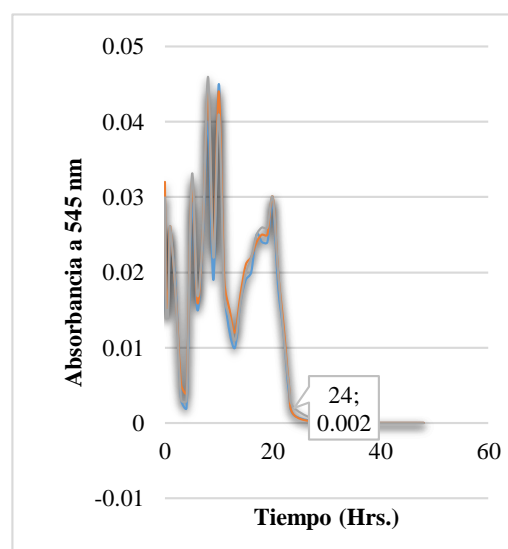


Figura 29. Perfil de Liberación del NO por MSA-NO Np LOTE 03 (0.56 mg/mL)



4.5.4. Perfil de Liberación de NO por las MSA-NO Np a la CMI de *Candida albicans* (2.25 mg/mL)

La gráfica del perfil de liberación de NO correspondiente a la concentración 2.25 de MSA-NO (Ver Figura 30) y MSA-NO Np (Ver Figuras 31-33) muestra disminución en la absorbancia a 545 nm (eje y) en función al tiempo (eje x).

Se observó que en el perfil de liberación de NO del MSA-NO hay una disminución paulatina de la absorbancia a 545 nm durante 20 horas. Por su parte, el MSA-NO Np presenta un perfil de liberación de NO donde se observó una fase de disminución de la absorbancia a dicha longitud de onda que duró hasta las 14 horas. Luego de este tiempo, se observó en todas las gráficas de los lotes una tendencia al incremento de la absorbancia, donde no hay liberación de NO. Por último, y como se vino observando en los anteriores perfiles de liberación, se observó que el valor de absorbancia en el tiempo 0 del MSA-NO (~0.06) fue mayor al MSA-NO Np (~0.015).

Figura 30. Perfil de Liberación del NO por MSA-NO (2.25 mg/mL)

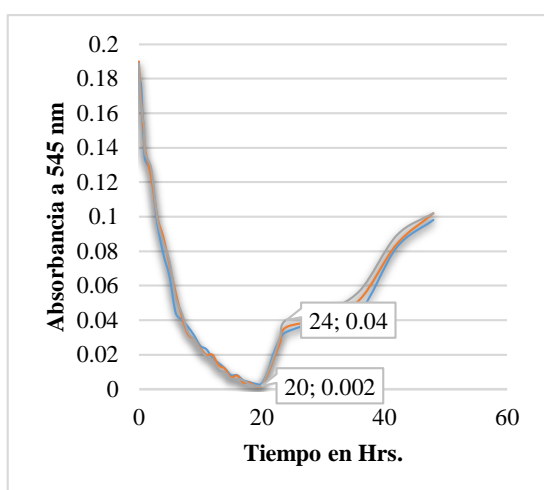


Figura 31. Perfil de Liberación del NO por MSA-NO Np LOTE 01 (2.25 mg/mL)

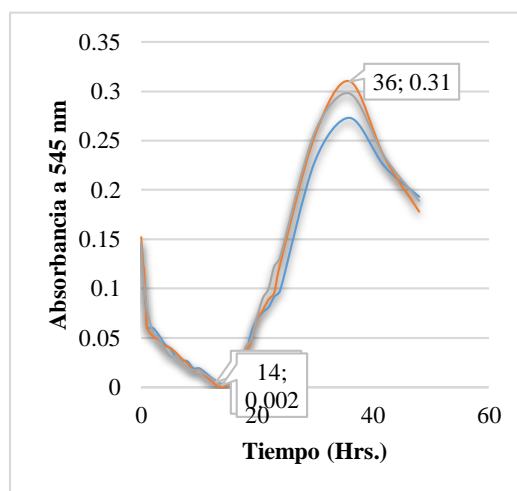


Figura 32. Perfil de Liberación del NO por MSA-NO Np LOTE 02 (2.25 mg/mL)

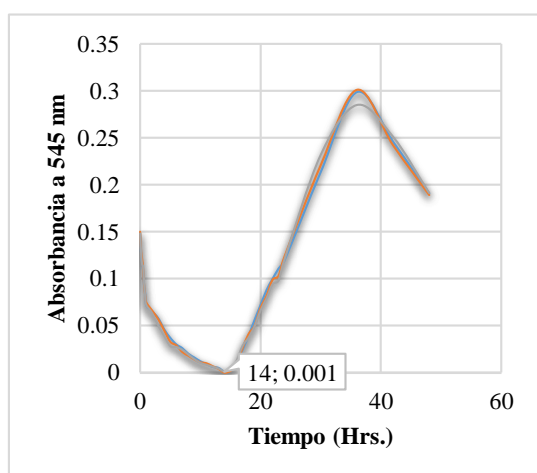
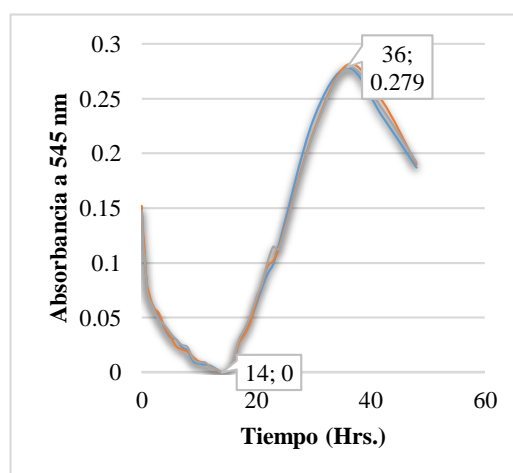


Figura 33. Perfil de Liberación del NO por MSA-NO Np LOTE 03 (2.25 mg/mL)



V. DISCUSIÓN

A través de los análisis de calidad del Quitosano de Calamar Lote GC20161217 (GTC BioTech), se comprobó la **aptitud** de esta materia prima para su utilización en la síntesis de nanopartículas poliméricas cargadas con ácido mercaptosuccínico. La **presencia del grupo funcional amino (-NH₂)** en la estructura molecular del quitosano pudo corroborarse a través de los picos de absorción característicos en el espectro infrarrojo de la molécula (1597, 3298 y 3356 cm⁻¹). Estos picos de absorción están estrechamente relacionados a las vibraciones del enlace N-H en el grupo funcional amino. La **relevancia** del grupo amino en la estructura molecular del quitosano para la síntesis de nanopartículas por el método de gelación ionotrópica, radica en que este grupo amino se cargará positivamente al encontrarse el quitosano en un medio ácido (< 6.5). Esta ionización producida en el quitosano le permitirá establecer interacciones electrostáticas con los grupos funcionales cargados negativamente presentes en el agente reticulante.

También se determinó la proporción de grupos amino, es decir, el **GD del quitosano**, que resultó en un valor mayor al 60% (**85.15 ± 1.19 %**), que se ajusta a la especificación de calidad y permite calificar al polímero como apto para los fines deseados. La presencia de una mayor cantidad de grupos funcionales amino disponibles representa una mayor probabilidad de establecer las interacciones electrostáticas necesarias para la gelación ionotrópica propuesta en el procedimiento. Se sustenta el cálculo del GD por el método de titulación conductimétrica debido a que, a diferencia de la espectroscopía infrarroja (FTIR), este método permite el análisis de quitosanos de alto grado de desacetilación. La técnica FTIR presenta una buena resolución para quitosanos con un GD de hasta 45% (*Baxter et al, 1992*) [137]. Bien es cierto se obtuvo un resultado que difiere con las especificaciones del proveedor (96.7% GD), el certificado de análisis no provee información sobre la técnica utilizada para la determinación del GD. De hecho, existen métodos más sofisticados como la espectroscopía de resonancia magnética nuclear protónica (¹HNMR), que representa el método estándar establecido por su precisión y reproducibilidad; sin embargo, implica altos costos [138].

Respecto a la determinación del **PM**, el valor obtenido (**138.63 ± 2.58 kDa**) difiere con la especificación provista por el proveedor (113.2 kDa) dado que el valor GD se utiliza en el cálculo del PM. No obstante, nos permitió corroborar la especificación de bajo peso molecular (50-190 kDa) provista por el proveedor. Esta materia prima nos ofrecerá una mayor ventaja frente a la utilización de otra con un alto PM. Para afirmar esto, nos basamos en hallazgos anteriores que reportan que los valores de DE de las nanopartículas incrementan de forma

directamente proporcional al PM del quitosano utilizado en la síntesis de las mismas (*Pena et al, 2005*) [139].

Para **definir el procedimiento de síntesis** de MSA Np propuesto en el presente trabajo, se realizaron ensayos piloto donde se evaluó la formulación en función a sus parámetros físicos, tales como el diámetro efectivo y el **índice de polidispersidad**, siendo este último el más importante al **tomar una decisión** sobre la composición de la formulación o los pasos llevados a cabo en el procedimiento de síntesis de nanopartículas.

La obtención de un **IPD a 0.3** indica una distribución estrecha en el tamaño de partícula de la solución [130,131], un resultado que supere este valor resultaría adverso ya que nos hallaríamos frente a una solución con nanopartículas de distintos tamaños, siendo poco posible la obtención de un promedio verídico. Cabe mencionar que la **homogeneidad** en el tamaño de nanopartículas es lo ideal para poder estudiar de forma más objetiva el comportamiento de las mismas en los análisis posteriores.

En la etapa de **formulación** se comprendieron ciertos aspectos como la concentración del quitosano, la concentración de TPP, el s-nitrosotiol a encapsular y su concentración, así como el pH de la solución de MSA Np. Se estableció la **concentración de 0.1 % de quitosano** en vista que concentraciones mayores como de 0.2% dan lugar a partículas que no pueden atravesar un filtro PVDF de 220 nm. Se descartaron concentraciones menores a 0.1% ya que cuando las nanopartículas se encuentran muy diluidas en el medio surgen problemas en la dispersión de la luz (efecto Tyndall). Esta propiedad es requisito para el análisis de parámetros físicos mediante la técnica de DLS. Se probaron **concentraciones de TPP** al 0.1% y al 0.2%, encontrándose que a concentraciones mayores a 0.1%, se forman partículas que no pueden atravesar el filtro PVDF de 220 nm. Las proporciones de quitosano y TPP se determinaron utilizando como guía el trabajo realizado por *Seabra et al* (2015) [136].

La decisión sobre **la elección del s-nitrosotiol** a encapsular fue influenciada por la rentabilidad de la propuesta. En vista que el glutatión reducido, el s-nitrosotiol más estudiado, es costoso, se optó por una alternativa a este, el ácido mercaptosuccínico. Según la literatura consultada, el ácido mercaptosuccínico presenta valores tan altos de pKa (> 9) para su grupo tiol tanto como el glutatión reducido (9.65). El pKa influye mucho en la tasa de formación de los s-nitrosotioles, tal es el caso que a mayor pKa incrementa la nucleofilidad, por lo que hay una alta densidad electrónica en el centro azufre. Esto favorece a la velocidad y eficiencia en la formación de s-nitrosotioles (*Wang et al, 1999*) [140-141].

La **concentración de MSA** se ajustó a 33.3 mg/mL, concentraciones menores de MSA dieron lugar al aumento del tamaño de partícula. El **pH de las MSA Np** se ajustó a 4.0 de acuerdo a la formulación planteada por *Seabra et al* (2015). No obstante, se experimentó con pH 6.0 y

pH 2.0. Se observó que la disminución en el pH incrementa la rapidez con la que la solución de nanopartículas cambia de ser transparente a un color rojo grosella, es decir, pH bajos incrementan la rapidez de la formación del ácido s-nitrosomercaptosuccínico. Se descartó el uso de pH muy bajos que den a la formulación un efecto irritante.

Los resultados de los **ensayos piloto** reportados en el **Anexo 14** nos brindan un mejor panorama acerca de los **cambios** que ha sufrido la formulación y el procedimiento de síntesis de las nanopartículas poliméricas. En un inicio la formulación se compuso únicamente de las cuatro materias primas básicas como es el ácido mercaptosuccínico, el polímero quitosano, el agente reticulante (tripolifosfato de sodio) y el vehículo (agua). Sin embargo, el **alto IPD (0.287 ± 0.025)** y la presencia de turbidez que nos llevó a sospechar **la aglomeración** de las nanopartículas en la solución, hicieron que implementemos cambios en la formulación. En consecuencia, se decidió **incluir al polímero Polietilenglicol (PEG) 4000**, basándonos en trabajos anteriores que lo utilizan para dotar a las nanopartículas de revestimientos hidrofílicos que proporcionan un impedimento estérico que evita que las nanopartículas se aglomeren [142].

Una vez implementado este cambio en la formulación dejó de observarse turbidez en la solución de nanopartículas sintetizadas, no obstante, esta mejora **no resultó significativa sobre el IPD (0.309 ± 0.008)**, por lo que se recurrió a **la modificación del procedimiento** de síntesis incorporándosele dos etapas de **sonicación**, bajo la premisa de que la aplicación de energía del sonido tiene la capacidad de dispersar las partículas en solución [143].

El presente trabajo recomienda la utilización de **frecuencias bajas** al momento de sonicar ya que la utilización de frecuencias altas daría como resultado nanopartículas con un diámetro efectivo elevado que no se encuentra contemplado por la especificación. Una posible explicación a este hallazgo es que la utilización de energía de alta frecuencia provocaría no solo la dispersión de partículas sino la ruptura entre las interacciones electrostáticas, desestabilizando la formulación y llevando a la formación de aglomerados. La experiencia obtenida tras la realización de estos ensayos pilotos, permitió **definir el tiempo y frecuencia de sonicación necesarios**. Después de realizado el Piloto 04 se fijó el tiempo de sonicación 05 minutos, baja frecuencia, obteniéndose MSA Np que cumplían con ambas especificaciones de los parámetros físicos (**DE: 283.67 ± 57.29 nm; IPD: 0.205 ± 0.007**)

Una vez **definido el procedimiento de síntesis**, este se reprodujo por **triplicado** a una escala mayor (volumen de lote ~ 225 mL). Se obtuvieron tres lotes de nanopartículas los cuales se distribuyeron para poder ser objeto de análisis en los ensayos de determinación de parámetros físicos, eficiencia de encapsulación, actividad antifúngica contra *Candida sp.* y estimación de perfil de liberación de NO. Si bien los resultados correspondientes a los parámetros físicos

mostraron un ligero incremento en el DE e IPD respecto al Piloto 04, hecho que podría relacionarse con la **transición en la síntesis de un lote de volumen menor (~ 30 mL) a uno de volumen mayor (~225 mL)**. Cabe resaltar que tanto los valores de DE promedio interlote 241.69 ± 18.95 nm así como el IPD promedio interlote de 0.274 ± 0.015 se encuentran **contemplados dentro de la especificación** de calidad definida. El resultado del DE promedio obtenido nos permite inferir que las nanopartículas sintetizadas tendrían la habilidad de **difundir a través de barreras mucosas** en condiciones *in vivo* dado su diámetro inferior a 500 nm, según investigaciones anteriores (*Lai et al, 2009*) [106]. El tratamiento estadístico indica **repetibilidad** en los parámetros físicos de los tres lotes de MSA Np. Si bien la estadística señala una **diferencia significativa** entre los DE del lote 01 y 03 de MSA Np, es conocido que las nanopartículas poliméricas de quitosano ofrecen generalmente pobre reproducibilidad lote a lote respecto al DE de partícula (*Jawahar et al, 2012*) [144]. Este detalle, sumado a la baja desviación estándar que acompaña los promedios es un indicador de que el procedimiento de síntesis es **repetible** respecto a los parámetros físicos.

Cabe mencionar que si bien la determinación del DE promedio y el IPD de las nanopartículas que nos brinda **el equipo de Dispersión de Luz Dinámica** representa un alcance significativo de la naturaleza física de las mismas, existen ciertas **limitantes** que deberían superarse en posteriores investigaciones. Dado que la técnica DLS emite como resultado un **promedio estadístico** en función al análisis de un grupo de familias de nanopartículas en solución agrupadas por tamaño, las amplias diferencias entre los tamaños de las familias, dará lugar a un DE promedio poco verídico. En orden de sobrellevar este inconveniente, sería recomendable recurrir a técnicas más sofisticadas de caracterización de parámetros físicos como es la **microscopía electrónica de barrido**, ya que nos permitirá conocer el **tamaño exacto de las nanopartículas y la forma de las mismas** [145]. Esta última información será de mucha ayuda en caso de que se añadan polímeros en la superficie de las nanopartículas, como en nuestro caso ocurrió con el PEG 4000, ya que podremos identificarlos y observar de qué manera se encuentran dispuestos en la estructura de la nanopartícula.

En miras de estimar la estabilidad del lote de nanopartículas, resultaría útil determinar su **potencial zeta**. Las nanopartículas con valores de potencial zeta mayores que +25 mV o menos de -25 mV típicamente tienen una muy buena estabilidad, de lo contrario, tenderán a agregarse debido a las atracciones de Van der Waal entre partículas [146].

Respecto a la determinación de la **eficiencia de encapsulación** del MSA en las MSA Np, podemos decir que la curva de calibración inicialmente realizada muestra un alto coeficiente de determinación (R^2) **0.9946** cercano a la unidad (1). Este resultado es importante ya que nos indica que existe una **alta correlación** entre las concentraciones del analito y la absorbancia

a 412 nm del producto de la reacción cromogénica entre los grupos sulfhidrilo del analito con el reactivo de Ellman. En función a esto, se procedió a la determinación del MSA, en la que se obtuvo un promedio interlote de **97.52 ± 0.07 %**. Este valor muestra una **gran afinidad del polímero por el MSA**, resultado que concuerda con el hallazgo hecho por *Seabra et al.*, que encapsuló MSA en nanopartículas de quitosano obteniendo una eficiencia de encapsulación de **99 ± 1 %** [136]. El tratamiento estadístico de los resultados refleja que existe **repetibilidad** en las eficiencias de encapsulación del MSA entre los tres lotes de MSA Np.

Los resultados de la **determinación de la actividad antifúngica** sobre *Candida sp.* fueron presentados en calidad de valores CMI (concentración mínima inhibitoria). Estos revelaron que la cepa *C. krusei* **posee la mayor susceptibilidad** a la acción del MSA-NO administrado solo o en MSA-NO Np (CMI 0.14 mg/mL). Este hallazgo resulta importante dado que *C. krusei* representa un problema de salud pública por su capacidad de desarrollar resistencia primaria al fluconazol y amfotericina B [147]. Hoy en día el descubrimiento de una alternativa de tratamiento antifúngico que tenga actividad frente a esta cepa resultaría de mucha utilidad.

En el caso de *C. glabrata*, se observó que la **incorporación del MSA-NO en las nanopartículas poliméricas** daba como resultado la **disminución de su CMI** (0.56 mg/mL) a los valores 0.14 - 0.28 mg/ml. Este hecho difícilmente podría ser atribuido a un efecto sumatorio producto de la actividad antifúngica del quitosano. Se señala esto, dado que el quitosano posee un CMI de 0.38 mg/ml frente a la cepa y a la concentración que se halla en las MSA-NO Np 0.28 mg/mL, es de 0.006 mg/ml, concentración muy baja como para ejercer algún grado de inhibición sobre la levadura. Por tanto, resultaría conveniente considerar otros factores que hayan contribuido a la disminución de la CMI. Por ejemplo, el tamaño nanométrico de las partículas de quitosano, la acción de los demás excipientes de la formulación, entre otros.

Siguiendo en orden decreciente en susceptibilidad se encuentra la cepa *C. parapsilosis*, en la que se observa que la incorporación del MSA-NO en nanopartículas de quitosano no ha variado la CMI del compuesto para esta cepa (0.056 mg/mL).

Por último, la **cepa con menor susceptibilidad** al MSA-NO solo y cargado en nanopartículas poliméricas fue *C. albicans*.

Los hallazgos obtenidos en la presente investigación han podido ser contrastados con investigaciones anteriores donde si bien no se utilizó el mismo compuesto, se utilizó un donador de NO (Z)-1-[N-(2-aminoetil)-N-(2-amonioetilamino)-diazeno-1-ium-1,2-diolado] (DETA-NO). Dicho estudio llegó a la conclusión de que las cepas *C. krusei* (1.20 mg/ml) y *C. parapsilosis* (0.8- 1.0 mg/ml) mostraron la mayor susceptibilidad al DETA-NO mientras

que *C. glabrata* (1.6 – 1.8 mg/ml) y *C. albicans* (1.6 – 2.0 mg/ml) fueron las que mostraron menor susceptibilidad a la droga (McElhane-Feser, 1998)[148]. Los resultados de este estudio anterior junto a los hallazgos obtenidos en la presente investigación, refuerzan la idea de que **la cepa *C. krusei* tiene una mayor susceptibilidad respecto a las demás cepas de interés frente a la acción del NO**. Por tanto, resultaría conveniente seguir investigando el efecto de esta molécula sobre dicha cepa en específico para el desarrollo de nuevos antifúngicos.

Por otro lado, otro trabajo que permite esclarecer más la situación de la **pobre susceptibilidad de *C. albicans* al NO**, es aquel desarrollado por *Espinosa et a (2015)*, donde se expone a *C. glabrata* y *C. albicans* a distintas concentraciones de hidroperóxido de cumeno, un agente oxidante. Sus hallazgos indican que *C. albicans* es capaz de soportar mayores concentraciones de hidroperóxido de cumeno que *C. glabrata* [149]. Por tanto, esta **protección frente al estrés oxidativo** probablemente es lo que esté relacionada a la baja susceptibilidad que presenta la cepa frente al MSA-NO testeado en nuestros ensayos, ya que al ser un donador de NO, uno de sus efectos antimicrobianos será ejercer un daño oxidativo sobre la levadura.

El **tratamiento estadístico** de los valores CMI para *Candida sp.* presentados por los lotes de MSA-NO Np muestra que **no existen diferencias significativas** entre estos, lo que indica repetibilidad del método de síntesis de MSA-NO Np respecto a su actividad antifúngica.

Un **resultado controversial** que no puede pasar por desapercibido es la presencia de ciertos pocillos inoculados con las cepas clínicas *C. glabrata* INS12176831 y *C. albicans* 024 que muestran crecimiento fúngico a una concentración superior a la CMI (4.5 mg/mL). A esta concentración de MSA-NO Np, la concentración de quitosano es de 0.094 mg/mL. Este fenómeno es conocido como **crecimiento paradójico**.

Sería precipitado asociar el crecimiento paradójico a la presencia del quitosano en la formulación, a pesar que uno de los mecanismos antifúngicos de este sea inducir desarreglos en la pared celular de la levadura, que es compatible con los hechos que desencadenan el crecimiento paradójico [150]. En los pocillos que contenían solo MSA-NO 4.5 mg/mL no se observó este fenómeno, por lo que lo más probable es que el crecimiento paradójico esté siendo desencadenado por algún excipiente de la formulación, ya sea el tamaño nanométrico de las partículas de quitosano o el perfil de liberación de NO.

Una última observación respecto al ensayo de determinación de actividad antifúngica de las MSA-NO Np sobre *Candida sp.* es que mientras el CMI de las cepas ATCC (*C. krusei* y *C. parapsilosis*) es un valor fijo, **las cepas clínicas (*C. albicans* y *C. glabrata*) presenta un rango de CMI**. Lo observado en las cepas ATCC guarda relación con la estabilidad que guardan, es decir sus características genóticas y fenotípicas originales se mantienen. Respecto a la

diferencia que presentan las cepas clínicas, esta podría estar relacionada a la **variabilidad genética** que presenta *Candida sp.*, la cual ha sido reportada para la especie *C. albicans* en Lima, Perú (Arce Gil, 2018) [151].

Por último, tras estimarse el perfil de liberación de NO para las CMI de cada cepa, se encontró que en el caso de la concentración 0.14 mg/mL (CMI de *C. krusei*), las MSA-NO Np experimentan una **liberación controlada del NO**, lo que resulta ventajoso ya que de liberarse lentamente pocas cantidades de esta molécula, **se favorece su vida media in vivo**, dado que está en una relación inversamente proporcional a su concentración [152].

Para la concentración 0.28 mg/mL (CMI de *C. glabrata*), también se observa una liberación controlada del NO, lo que se refleja en los cortos periodos de disminución (liberación de NO) e incremento en la absorbancia. Si bien la CMI para *C. glabrata* del MSA-NO Np (0.14 - 0.28 mg/mL) es menor a la del MSA-NO (0.56 mg/mL), esto podría deberse al incremento de la vida media del NO al ser liberado en bajas concentraciones y de forma paulatina.

Para la concentración 0.56 mg/mL de MSA-NO Np (CMI contra *C. parapsilosis*) no se observan mayores diferencias entre los perfiles de liberación del NO por el MSA-NO y las MSA-NO Np. En ninguno de estos perfiles de liberación se observan liberaciones abruptas del NO. Este resultado nos lleva a suponer que la encapsulación del MSA-NO en nanopartículas poliméricas no ofrece una ventaja relevante en la inhibición de esta cepa.

Por último, en el perfil de liberación de MSA-NO Np 2.25 mg/mL (CMI contra *C. albicans*), se observa la liberación paulatina del NO y se mantiene la actividad antifúngica del MSA-NO a esta concentración tras ser incorporado en nanopartículas de quitosano. Se observó que el MSA-NO ofrece una liberación de NO en un periodo más largo de tiempo a comparación de las MSA-NO Np. Sin embargo, esto podría deberse a la amplia diferencia de absorbancias que se registraron a las 0 horas transcurridas tras la formación del MSA-NO

Por último, es necesario ahondar más respecto a este fenómeno, es decir, la **diferencia entre las absorbancias** tomadas en **el tiempo 0** (0 horas transcurridas después de la reacción de nitrosación) para las concentraciones de MSA-NO y MSA-NO Np. En vista de lo sucedido, **es posible** de que al encontrarse encapsulado el MSA en las nanopartículas de quitosano **algunos grupos sulfhidrilos no se encuentren accesibles a la nitrosación** en las primeras horas en que la reacción se produce. Esto lleva a que se forme menor cantidad de MSA-NO y la señal de absorbancia a 545 nm sea menor comparada a la solución que contenía únicamente MSA disuelto en agua.

La **posterior nitrosación** de los grupos sulfhidrido del MSA cargado en las nanopartículas, antes inaccesibles, puede dar lugar al incremento de la absorbancia horas posteriores a la

reacción inicial. Este fenómeno es más notorio en el perfil de liberación de las MSA-NO Np a 2.25 mg/mL, donde hay una fase de incremento de la absorbancia muy pronunciada.

En función a lo observado, podemos mencionar que si bien no se ha logrado aprovechar la propiedad antimicrobiana del quitosano en el diseño de una formulación de nanopartículas poliméricas cargadas con MSA-NO con actividad antifúngica sobre *Candida sp.*, la presencia de esta **matriz polimérica** resultó **beneficiosa** para poder proteger de una rápida descomposición a una molécula tan lábil como es el NO, y en su lugar fomentó su liberación controlada que resultará en un **incremento de su vida media**.

En vista que el control en la síntesis de nanopartículas poliméricas representa un desafío, los resultados de los análisis realizados en este trabajo nos permiten afirmar que hay repetibilidad en el método de síntesis de MSA-NO Np. La **validación del método de síntesis de MSA-NO Np con actividad antifúngica sobre las cepas *Candida sp.* representa un logro de este trabajo**.

VI. CONCLUSIONES

1. Se comprobó la calidad óptima de la materia prima quitosano y se determinó un procedimiento para la síntesis de nanopartículas poliméricas de quitosano cargadas con MSA basado en el método de **gelación ionotrópica**, al cual se le incorporó las fases de **Pegilación y Sonicación**. Estas dos **modificaciones al método original** se realizaron en miras de obtener un **índice de polidispersidad** menor a <0.3.
2. Se obtuvieron **tres lotes** de MSA Np con un DE promedio de **241.69 ± 18.95 nm**, un IPD promedio de **0.274 ± 0.015** y una EE% del MSA promedio de **97.52 ± 0.07 %**. Estos valores se encuentran dentro de las especificaciones de calidad establecidas.
3. Se determinaron las **concentraciones mínimas inhibitorias** de las MSA-NO Np para *C. krusei* ATCC® (0.14 mg/mL), *C. glabrata* (clínica) (0.14- 0.28 mg/mL), *C. parapsilosis* ATCC ® (0.56 mg/mL) así como *C. albicans* (clínica) (1.13 – 2.25 mg/mL). Se observó un **mayor susceptibilidad** al NO por parte de la cepa *C. krusei*, en contraste *C. albicans* resultó la menos susceptible al agente oxidante.
4. La inclusión de MSA-NO en nanopartículas poliméricas de quitosano provocó la **disminución del CMI de *C. glabrata***.
5. Las MSA-NO Np representan una **alternativa promisorio** para el tratamiento de infecciones por *C. krusei*.
6. Se obtuvo un resultado controversial como fue el fenómeno de **crecimiento paradójico** a la concentración 4.5 mg/mL de MSA-NO Np en *C. glabrata* y *C. albicans*, atribuido a factores diversos (excipientes, tamaño nanométrico, entre otros).
7. Se **estimó el perfil de liberación de NO por parte de las MSA-NO Np**, donde se observó la **liberación controlada** de NO promovida por la inclusión del MSA-NO en una matriz polimérica.
8. Se **validó** el método de síntesis de MSA-NO Np con actividad antifúngica sobre cepas *Candida sp.*

VII. RECOMENDACIONES

- Complementar la información obtenida acerca de los parámetros físicos de las nanopartículas con una **microscopía electrónica de barrido** que nos permita la forma y el tamaño exacto de las mismas.
- Determinar el **potencial zeta** de las nanopartículas sintetizadas con el objetivo de predecir la **estabilidad de la formulación**.
- Si se comprobara que el surgimiento del crecimiento paradójico en las cepas de interés *C.albicans* y *C. glabrata* esté siendo promovido por la presencia del quitosano, se recomienda hacer una mejora en la formulación. Podría cambiarse el quitosano por **una matriz polimérica mucoadhesiva que no tenga efecto sobre la pared celular de la levadura**. Entre los polímeros que se usan para administrar drogas al tracto vaginal se encuentran los poliacrilatos, derivados de celulosa, derivados del ácido hialurónico, pectina, almidón, goma tragacanto, polietilenglicol, polisacáridos sulfatados, carragenato, alginato de sodio y gelatina.
- Sería recomendable continuar con la investigación preclínica, siendo prioridad los **ensayos de toxicología *in vitro* o *in vivo***, teniendo en cuenta el tipo de candidiasis a la que la formulación se encuentra dirigida. Por ejemplo, si está dirigida al tratamiento de candidiasis vaginales, se recomendaría hacer un ensayo de irritación vaginal en conejos (test RVI). No obstante, en la actualidad están surgiendo alternativas al uso de modelos animales como es test EpiVaginal® que incluye ensayos de viabilidad celular, disrupción de barrera y liberación de citoquinas inflamatorias [153].

VIII. BIBLIOGRAFÍA

1. Almirante B, Rodriguez D, Park B, Cuenca-Estrella M, Planes A, Almela M et al. Epidemiology and Predictors of Mortality in Cases of Candida Bloodstream Infection: Results from Population-Based Surveillance, Barcelona, Spain, from 2002 to 2003. *Journal of Clinical Microbiology*. 2005;43(4):1829-1835.
2. Lin M, Carmeli Y, Zumsteg J, Flores E, Tolentino J, Sreeramoju P et al. Prior Antimicrobial Therapy and Risk for Hospital-Acquired Candida glabrata and Candida krusei Fungemia: a Case-Case-Control Study. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2005;49(11):4555-4560.
3. Sandven P, Bevanger L, Digranes A, Haukland H, Mannsaker T, Gaustad P. Candidemia in Norway (1991 to 2003): Results from a Nationwide Study. *Journal of Clinical Microbiology*. 2006;44(6):1977-1981.
4. Turner S, Butler G. The Candida Pathogenic Species Complex. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*. 2014;4(9):a019778-a019778.
5. Barbedo L.S., Sgarbi D.B.G. Candidiasis DST - Jornal brasileiro de doenças sexualmente transmissíveis. 2010;22:22-38.
6. Ruiz Gaitán A, Moret A, López Hontangas J, Molina J, Aleixandre López A, Cabezas A et al. Nosocomial fungemia by Candida auris: First four reported cases in continental Europe. *Revista Iberoamericana de Micología*. 2017;34(1):23-27.
7. Tobar A E, Silva O F, Olivares C R, Gaete G P, Luppi N M. Candidiasis invasoras en el paciente crítico adulto. *Revista chilena de infectología*. 2011;28(1):41-49.
8. Castañón Olivares L. Candidiasis - Recursos en Micología - UNAM [Internet]. *Facmed.unam.mx*. 2016 [citado 4 de Enero 2016]. Disponible en: <http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/micologia/candidosis.html>
9. Horn D, Neofytos D, Anaissie E, Fishman J, Steinbach W, Olyaei A et al. Epidemiology and Outcomes of Candidemia in 2019 Patients: Data from the Prospective Antifungal Therapy Alliance Registry. *Clinical Infectious Diseases*. 2009;48(12):1695-1703.
10. Lai C, Wang C, Liu W, Huang Y, Hsueh P. Time to positivity of blood cultures of different Candida species causing fungaemia. *Journal of Medical Microbiology*. 2012;61(Pt_5):701-704.
11. Rodriguez L, Bustamante B, Huaroto L, Agurto C, Illescas R, Ramirez R, et al. A multi-centric Study of Candida bloodstream infection in Lima-Callao, Peru: Species distribution, antifungal resistance and clinical outcomes. *PLoS One*. 2017;12(4):e0175172.
12. Muñoz E, Angulo I, Chávez M, Luján M, Wilson J, Espinoza G. Aislamiento de Candida albicans de mujeres con candidiasis vaginal atendidas en el Hospital Regional Docente de Trujillo-Perú, 2012. *Revista Científica de la Facultad de Ciencias Biológicas*. 2012; 32 (1) :42-47.
13. Krcmery V, Barnes A. Non-albicans Candida spp. causing fungaemia: pathogenicity and antifungal resistance. *Journal of Hospital Infection*. 2002;50(4):243-260.
14. Vale-Silva L, Sanglard D. Tipping the balance both ways: drug resistance and virulence in Candida glabrata. *FEMS Yeast Research*. 2015;15(4).
15. Bustamante B, Martins M, Bonfietti L, Szeszs M, Jacobs J, Garcia C et al. Species distribution and antifungal susceptibility profile of Candida isolates from bloodstream infections in Lima, Peru. *Journal of Medical Microbiology*. 2014;63(Pt_6):855-860.

16. Rodrigues C, Silva S, Henriques M. *Candida glabrata*: a review of its features and resistance. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*. 2013;33(5):673-688.
17. Dixon, D.M.; Walsh, T.J. Chapter 76: Antifungal Agents. In *Medical Microbiology*, 4th ed; Baron, S., Ed.; University of Texas Medical Branch at Galveston: Galveston, TX, USA, 1996.
18. Silva S, Negri M, Henriques M, Oliveira R, Williams D, Azeredo J. *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis*: biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance. *FEMS Microbiology Reviews*. 2012;36(2):288-305.
19. Oxman D, Chow J, Frenzl G, Hadley S, Hershkovitz S, Ireland P et al. *Candidaemia* associated with decreased in vitro fluconazole susceptibility: is *Candida* speciation predictive of the susceptibility pattern?. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2010;65(7):1460-1465.
20. Pfaller M, Jones R, Castanheira M. Regional data analysis of *Candida non-albicans* strains collected in United States medical sites over a 6-year period, 2006-2011. *Mycoses*. 2014;57(10):602-611.
21. Castanheira M, Messer S, Rhomberg P, Dietrich R, Jones R, Pfaller M. Isavuconazole and Nine Comparator Antifungal Susceptibility Profiles for Common and Uncommon *Candida* Species Collected in 2012: Application of New CLSI Clinical Breakpoints and Epidemiological Cutoff Values. *Mycopathologia*. 2014;178(1-2):1-9.
22. Fidel PL, Vazquez JA, Sobel JD. *Candida glabrata*: Review of Epidemiology, Pathogenesis, and Clinical Disease with Comparison to *C. albicans*. *Clinical Microbiology Reviews*. 1999;12(1):80-96.
23. Lee I, Fishman N, Zaoutis T, Morales K, Weiner M, Synnestvedt M et al. Risk Factors for Fluconazole-Resistant *Candida glabrata* Bloodstream Infections. *Archives of Internal Medicine*. 2009;169(4):379.
24. Bennett J, Izumikawa K, Marr K. Mechanism of Increased Fluconazole Resistance in *Candida glabrata* during Prophylaxis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2004;48(5):1773-1777.
25. Imhof A, Balajee S, Fredricks D, Englund J, Marr K. Breakthrough Fungal Infections in Stem Cell Transplant Recipients Receiving Voriconazole. *Clinical Infectious Diseases*. 2004;39(5):743-746.
26. Hachem R, Hanna H, Kontoyiannis D, Jiang Y, Raad I. The changing epidemiology of invasive candidiasis. *Cancer*. 2008;112(11):2493-2499.
27. Ferrari S, Sanguinetti M, Torelli R, Posteraro B, Sanglard D. Contribution of CgPDR1-Regulated Genes in Enhanced Virulence of Azole-Resistant *Candida glabrata*. *PLoS ONE*. 2011;6(3):e17589.
28. Pfaller M, Castanheira M, Lockhart S, Ahlquist A, Messer S, Jones R. Frequency of Decreased Susceptibility and Resistance to Echinocandins among Fluconazole-Resistant Bloodstream Isolates of *Candida glabrata*. *Journal of Clinical Microbiology*. 2012;50(4):1199-1203.
29. Wu G, Morris S. Arginine metabolism: nitric oxide and beyond. *Biochemical Journal*. 1998;336(1):1-17.
30. Epstein F, Moncada S, Higgs A. The L-Arginine-Nitric Oxide Pathway. *New England Journal of Medicine*. 1993;329(27):2002-2012.
31. Schairer D, Chouake J, Nosanchuk J, Friedman A. The potential of nitric oxide releasing therapies as antimicrobial agents. *Virulence*. 2012;3(3):271-279.

32. Liao Z, Yan Y, Dong H, Zhu Z, Jiang Y, Cao Y. Endogenous nitric oxide accumulation is involved in the antifungal activity of Shikonin against *Candida albicans*. *Emerging Microbes & Infections*. 2016;5(8):e88-e88.
33. Fierro I, Barja-Fidalgo C, Cunha F, Ferreira S. The involvement of nitric oxide in the anti-*Candida albicans* activity of rat neutrophils. *Immunology*. 1996;89(2):295-300.
34. Rubbo H, Radi R, Trujillo M, Telleri R, Kalyanaraman B, Barnes S, et al. Nitric oxide regulation of superoxide and peroxynitrite-dependent lipid peroxidation. Formation of novel nitrogen containing oxidized lipid derivatives. *The Journal of Biological Chemistry*. 1994; 269:26066-75.
35. Pacelli R, Wink DA, Cook JA, Krishna MC, DeGraff W, Friedman N, et al. Nitric oxide potentiates hydrogen peroxide-induced killing of *Escherichia coli*. *The Journal of Experimental Medicine*. 1995; 182:1469-79.
36. Fang F. Antimicrobial Actions of Reactive Oxygen Species. *mBio*. 2011;2(5).
37. Gerwien F, Safyan A, Wisgott S, Brunke S, Kasper L, Hube B. The Fungal Pathogen *Candida glabrata* Does Not Depend on Surface Ferric Reductases for Iron Acquisition. *Frontiers in Microbiology*. 2017;8.
38. Wink D, Mitchell J. Chemical biology of nitric oxide: insights into regulatory, cytotoxic, and cytoprotective mechanisms of nitric oxide. *Free Radical Biology and Medicine*. 1998;25(4-5):434-456.
39. Collette J, Zhou H, Lorenz M. *Candida albicans* Suppresses Nitric Oxide Generation from Macrophages via a Secreted Molecule. *PLoS ONE*. 2014;9(4):e96203.
40. Macherla C, Sanchez D, Ahmadi M, Vellozzi E, Friedman A, Nosanchuk J et al. Nitric Oxide Releasing Nanoparticles for Treatment of *Candida Albicans* Burn Infections. *Frontiers in Microbiology*. 2012;3.
41. Hromatka B, Noble S, Johnson A. Transcriptional Response of *Candida albicans* to Nitric Oxide and the Role of the YHB1 Gene in Nitrosative Stress and Virulence. *Molecular Biology of the Cell*. 2005;16(10):4814-4826.
42. Heilman B, Tadle A, Pimentel L, Mascharak P. Selective damage to hyphal form through light-induced delivery of nitric oxide to *Candida albicans* colonies. *Journal of Inorganic Biochemistry*. 2013;123:18-22.
43. Ullmann B, Myers H, Chiranand W, Lazzell A, Zhao Q, Vega L et al. Inducible Defense Mechanism against Nitric Oxide in *Candida albicans*. *Eukaryotic Cell*. 2004;3(3):715-723.
44. *C. albicans* YHB1/CR_07790C Summary [Internet]. *Candidagenome.org*. [citado 11 de Setiembre 2018]. Disponible en: http://www.candidagenome.org/cgi-bin/locus.pl?locus=CR_07790C_A
45. Universidad de Duke, NC. Red Blood Cells Loaded with S-nitrosothiols and Uses Therefor. Estados Unidos; 6203789 B1, 1997.
46. Ormerod A, Copeland P, Hay I, Husain A, Ewen S. The Inflammatory and Cytotoxic Effects of a Nitric Oxide Releasing Cream on Normal Skin. *Journal of Investigative Dermatology*. 1999;113(3):392-397.
47. Dicks AP, Swift HR, Williams DLH, Butler AR, Al-Sa'doni HH, Cox BG. Identification of Cu⁺ as the effective reagent in nitric oxide formation from S-nitrosothiols (RSNO). *Journal of the Chemical Society*, 1996; 4.
48. Holmes AJ, Williams DLH. Reaction of ascorbic acid with S-nitrosothiols: clear evidence for two distinct reaction pathways. *Journal of the Chemical Society*. 2000; 8.
49. Singh RJ, Hogg N, Joseph J, Kalyanaraman B. Mechanism of nitric oxide release from S-nitrosothiols. *Journal of Biological Chemistry* 1996; 271:18596-603.

50. Seabra AB, de Lima R, Calderón M. Nitric oxide releasing nanomaterials for cancer treatment: current status and perspectives. *Current Topics in Medical Chemistry*. 2015; 15:298-308.
51. Liu X, Zhu Y, Wang H, Kohyama T, Wen F, Rennard S. Effect of Nitric Oxide Donors on Human Lung Fibroblast Proliferation In Vitro. *Chest*. 2001;120(1):S13-S14.
52. Witte M, Thornton F, Efron D, Barbul A. Enhancement of Fibroblast Collagen Synthesis by Nitric Oxide. *Nitric Oxide*. 2000;4(6):572-582.
53. Schwentker A, Billiar TR. Nitric oxide and wound repair. *Surgical Clinics of North America*. 2003;83:521-30.
54. Hetrick E, Shin J, Paul H, Schoenfisch M. Anti-biofilm efficacy of nitric oxide-releasing silica nanoparticles. *Biomaterials*. 2009;30(14):2782-2789.
55. Seabra A, Fitzpatrick A, Paul J, De Oliveira M, Weller R. Topically applied S-nitrosothiol-containing hydrogels as experimental and pharmacological nitric oxide donors in human skin. *British Journal of Dermatology*. 2004;151(5):977-983.
56. Cariello A, Souza G, Lowen M, Oliveira M, Höfling-Lima A. Assessment of ocular surface toxicity after topical instillation of nitric oxide donors. *Arquivos Brasileiros de Oftalmologia*. 2013;76(1):38-41.
57. Universidad de Duke, NC. Red Blood Cells Loaded with S-nitrosothiols and Uses Therefor. Estados Unidos; 6203789 B1, 1997.
58. Miller CC, Miller M, McMullin B, Regev G, Serghides L, Kain K, Road J, Av-Gay Y. A phase I clinical study of inhaled nitric oxide in healthy adults. *Journal of Cystic Fibrosis*. 2012; 11:324-31.
59. Deppisch C, Herrmann G, Graepler-Mainka U, Wirtz H, Heyder S, Engel C et al. Gaseous nitric oxide to treat antibiotic resistant bacterial and fungal lung infections in patients with cystic fibrosis: a phase I clinical study. *Infection*. 2016;44(4):513-520.
60. Everett T, Wilkinson I, Mahendru A, McEniery C, Garner S, Goodall A et al. S-Nitrosoglutathione improves haemodynamics in early-onset pre-eclampsia. *British Journal of Clinical Pharmacology*. 2014;78(3):660-669.
61. Pokhrel S, Yadav P, Adhikari R. Applications of Chitin and Chitosan in Industry and Medical Science: A Review. *Nepal Journal of Science and Technology*. 2016;16(1):99.
62. Muzzarelli RAA. Chitin. Pergamon Press Ltd. Headington Hill Hall, Oxford, England 1977:5-37
63. Rudall K, Kenchington W. The Chitin System. *Biological Reviews*. 1973;48(4):597-633.
64. Cabib E., Bowers B, Sburlati A, Silverman SJ. Fungal cell wall synthesis: the construction of a biological structure. *Microbiological Sciences*. 1988.5 (12): 370-375
65. Khan F, Ahmad S. Polysaccharides and Their Derivatives for Versatile Tissue Engineering Application. *Macromolecular Bioscience*. 2013;13(4):395-421.
66. Tsaih ML, Chen RH. The effect of reaction time and temperature during heterogenous alkali deacetylation on degree of deacetylation and molecular weight of resulting chitosan. *Journal of Applied Polymer Science*. 2003. 88(13): 2917-2923.
67. Tayel A, Moussa S, El-Tras W, Knittel D, Opwis K, Schollmeyer E. Anticandidal action of fungal chitosan against *Candida albicans*. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2010. 47(4):454-457.
68. Ing, L, Zin N, Sarwar A, Katas H. (2012). Antifungal Activity of Chitosan Nanoparticles and Correlation with Their Physical Properties. *International Journal of Biomaterials*, 2012; 2012:1-9.
69. Abram A. Quitina y quitosano. 1st ed. Lima: Pontificia Universidad Católica del Perú; 2004

70. Park S, Nam J, Kim J, Kim Y, Nah J, Jang M. Antimicrobial Action of Water-Soluble β -Chitosan against Clinical Multi-Drug Resistant Bacteria. *International Journal of Molecular Sciences*. 2015. 16(4): 7995-8007
71. Chattopadhyay D, Inamdar M. Aqueous Behaviour of Chitosan. *International Journal of Polymer Science*. 2010; 2010:1-7.
72. Ramirez C, Delgado E, Andrade A. Determinación del grado de desacetilación de quitosana mediante titulación potenciométrica, FTIR y Raman. *Journal CIM*. 4 (1): 769-776
73. Raymond L, Morin FG y Marchessault RH. Degree of deacetylation of chitosan using conductimetric titration and solid-state NMR, *Carbohydrate Research*. 1993; 243:331-336.
74. Goy R, Britto D, Assis O. A review of the antimicrobial activity of chitosan. *Polímeros*. 2009;19(3):241-247.
75. Sekiguchi S, Miura Y, Kaneko H, Nishimura SI, Nishi NI, Iwase M, Tokura S. Molecular weight dependency of antimicrobial activity by chitosan oligomers, in: Nishinari K, Doi E. (Eds), "Food Hydrocolloids: Structures, Properties and Functions", Plenum Press, New York (1994).
76. Jing Y, Hao Y, Qu H, Shan Y, Li D, Du R. Studies on the antibacterial activities and mechanisms of chitosan obtained from cuticles of housefly larvae. *Acta Biologica Hungarica*. 2007;58(1):75-86.
77. Jung BO, Chung SJ, Lee GW. Effect of molecular weight of chitosan on its antimicrobial activity. *Journal Chitin Chitosan* 2002; 7:231-236.
78. Omura Y, Shigemoto M, Akiyama T, Saimoto H, Shigemasa Y, Nakamura I et al. Antimicrobial activity of chitosan with different degrees of acetylation and molecular weights. *Biocontrol. Sciences*. 2003; 8: 25-30.
79. Tikhonov V, Stepnova E, Babak V, Yamskov I, Palma-Guerrero J, Jansson H et al. Bactericidal and antifungal activities of a low molecular weight chitosan and its N-(2-(3-dodec-2-enyl)succinoyl)-derivatives. *Carbohydrate Polymers*. 2006;64(1):66-72.
80. Tsai GJ, Zhang SL, Shieh PL. Antimicrobial Activity of a Low-Molecular-Weight Chitosan Obtained from Cellulase Digestion of Chitosan. *Journal of Food Protection*. 2004; 67:396-398.
81. Zivanovic S, Basurto CC, Chi S, Davidson PM, Weiss J. Molecular Weight of Chitosan Influences Antimicrobial Activity in Oil-in-Water Emulsions. *Journal of Food Protection*. 2004; 67:952-959.
82. Vishu Kumar A, Varadaraj M, Gowda L, Tharanathan R. Characterization of chito-oligosaccharides prepared by chitosanolytic with the aid of papain and Pronase, and their bactericidal action against *Bacillus cereus* and *Escherichia coli*. *Biochemical Journal*. 2005;391(2):167-175.
83. Andres Y, Giraud L, Gerente C, Le Cloirec P. Antibacterial Effects of Chitosan Powder: Mechanisms of Action. *Environmental Technology*. 2007;28(12):1357-1363.
84. Hongpattarakere, T. & Riyaphan, O. – Songklanakarin. Effect of deacetylation conditions on antimicrobial activity of chitosans prepared from carapace of black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). *Journal of Science and Technology* 2008;30: 1-9.
85. Tsai GJ, Su WH, Chen HC, Pan CL. Antimicrobial activity of shrimp chitin and chitosan from different treatments and applications of fish preservation. *Fisheries Science*. 2002; 68:170-177.

86. Surbhi G, Wilson B. Mucosal Candidiasis: Background, Pathophysiology, Epidemiology [Internet]. Emedicine.medscape.com. 2017 [citado 7 Enero 2018]. Disponible en:<https://emedicine.medscape.com/article/1075227-overview>
87. Woodley, J. Bioadhesion, new possibilities for drug administration. *Clinical Pharmacokinetics*.2001;40 (2):77-84.
88. Tiwari G, Tiwari R, Bannerjee S, Bhati L, Pandey S, Pandey P et al. Drug delivery systems: An updated review. *International Journal of Pharmaceutical Investigation*. 2012;2(1):2.
89. Dispersión de luz dinámica para la caracterización de tamaño [Internet]. Malvernpanalytical.com. [citado 02 de Julio del 2018]. Disponible en: <https://www.malvernpanalytical.com/es/products/technology/light-scattering/dynamic-light-scattering>
90. Gennaro A, Remington J. Remington. 20th ed. Easton, Pa.: Panamericana. 2003.
91. NanoComposix's Guide To Dynamic Light Scattering Measurement and Analysis [Internet]. Cdn.shopify.com. 2015 [citado 16 de Abril 2018]. Disponible en: https://cdn.shopify.com/s/files/1/0257/8237/files/nanoComposix_Guidelines_for_DLS_Measurements_and_Analysis.pdf
92. Aguilar M, San Román J. Smart polimers and their application. Cambridge: Woodhead publishing; 2014.
93. Peppas NA, Korsmeyer RW. Dynamically Swelling Hydrogels in Controlled Release Applications, *Hydrogels in Medicine and Pharmacy*. 3° edición. Peppas editor (CRC, Boca Raton) 1987.
94. Berger J, Reist M, Mayer J, Felt O, Peppas N, Gurny R. Structure and interactions in covalently and ionically crosslinked chitosan hydrogels for biomedical applications. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2004;57(1):19-34.
95. Calvo P, Remunan-Lopez C, Vila-Jata JL, Alonso MJ. Chitosan and chitosan: ethylene oxidepropylene oxide block copolymer nanoparticles as novel carriers for protein and vaccines. *Pharmaceutic Research*. 1997; 14: 1431– 143
96. Szymańska E, Winnicka K. Stability of Chitosan—A Challenge for Pharmaceutical and Biomedical Applications. *Marine Drugs*. 2015;13(4):1819-1846.
97. Anseth KS, Bowman CN, Brannon-Peppas L. Mechanical properties of hydrogels and their experimental determination. *Biomaterials*. 1996; 17: 1647–1657.
98. Sreekumar S, Goycoolea F, Moerschbacher B, Rivera-Rodriguez G. Parameters influencing the size of chitosan-TPP nano- and microparticles. *Scientific Reports*. 2018;8(1).
99. Shu X, Zhu K. Controlled drug release properties of ionically cross-linked chitosan beads: the influence of anion structure. *International Journal of Pharmaceutics*. 2002;233(1-2):217-225.
100. Bhumkar D, Pokharkar V. Studies on effect of pH on cross-linking of chitosan with sodium tripolyphosphate: A technical note. *AAPS Pharmaceutical Science and Technology*. 2006;7(2):E138-E143.
101. Ahirrao S, Gide P, Shrivastav B, Sharma P. Ionotropic Gelation: A Promising Cross Linking Technique for Hydrogels. *Journal Of Pharmaceutics And Nanotechnology*. 2017; 2(1).
102. Kean T, Thanou M. Biodegradation, biodistribution and toxicity of chitosan. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2010;62(1):3-11.

103. Pistone S, Goycoolea F, Young A, Smistad G, Hiorth M. Formulation of polysaccharide-based nanoparticles for local administration into the oral cavity. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2017; 96:381-389.
104. Wang Y, Zhou J, Liu L, Huang C, Zhou D, Fu L. Characterization and toxicology evaluation of chitosan nanoparticles on the embryonic development of zebrafish, *Danio rerio*. *Carbohydrate Polymers*. 2016; 141:204-210.
105. Gao J, Hu, Wang, Han. Toxicity evaluation of biodegradable chitosan nanoparticles using a zebrafish embryo model. *International Journal of Nanomedicine*. 2011;3351.
106. Lai S, Wang Y, Hanes J. Mucus-penetrating nanoparticles for drug and gene delivery to mucosal tissues. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2009;61(2):158-171.
107. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; approved standard. Second edition. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pa, 2008.
108. Alp S, Sancak B, Hascelik G, Arikan S. Influence of different susceptibility testing methods and media on determination of the relevant fluconazole minimum inhibitory concentrations for heavy trailing *Candida* isolates with low-high phenotype. *Mycoses*.2010; 53:475-80.
109. Marcos-Zambrano LJ, Escribano P, Sanchez-Carrillo C, Bouza E, Guinea J. Scope and frequency of fluconazole trailing assessed using EUCAST in invasive *Candida* spp. isolates. *Medical Mycology*. 2016; 54: 733-9.
110. Ostrosky-Zeichner L, Rex JH, Pappas PG, et al. Antifungal susceptibility survey of 2,000 bloodstream *Candida* isolates in the United States. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2003; 47:3149-54.
111. Rueda C, Puig-Asensio M, Guinea J, Almirante B, Cuenca-Estrella M, Zaragoza O et al. Evaluation of the possible influence of trailing and paradoxical effects on the clinical outcome of patients with candidemia. *Clinical Microbiology and Infection*. 2017;23(1):49.e1-49.e8.
112. Varga I. The paradoxical growth of *Candida albicans*, *C. dubliniensis*, *C. krusei* and *C. tropicalis* strains in the presence of high concentration caspofungin [PhD.]. University of Debrecen. Doctoral School of Pharmaceutical Sciences; 2011.
113. Rueda C, Cuenca-Estrella M, Zaragoza O. Paradoxical growth of *Candida albicans* in the presence of caspofungin is associated with multiple cell wall rearrangements and decreased virulence. *Antimicrobial Agents of Chemotherapy*. 2014;58:1071-83.
114. García T, Roca J. Industrialización de los crustáceos para la obtención de Quitosano en ungüento con efecto cicatrizante. *Industrial Data*. 2008; 11(2): 26.
115. Coria Oriundo L. Electrodo modificado con quitosano y partículas de platino para la determinación rápida de *Escherichia coli*. Licenciatura. Universidad Nacional de Ingeniería, 2014.
116. Chitosan 448869 (Low Molecular Weight) [Internet]. Sigma-Aldrich. [citado 2 de Julio 2018]. Disponible en: <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/448869?lang=en®ion=PE>
117. Chitosan 448877 (Medium Molecular Weight) [Internet]. Sigma-Aldrich. [citado 2 de Julio 2018]. Disponible en: <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/448877?lang=en®ion=PE>
118. Chitosan 419419 (High Molecular Weight) [Internet]. Sigma-Aldrich. [citado 2 de Julio 2018]. Disponible en: <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/419419?lang=en®ion=PE>

119. Pemble ME, Gardner P. Vibrational Spectroscopy from Surfaces. Surface Analysis – The Principal Techniques. Vickerman J.C., Gilmore I.S. (Eds.), 2nd Edition. John Wiley & Sons Ltd., U.K. 2009; 2009: 333-390.
120. Fernández, G. Fundamentos de la Espectroscopía Infrarroja. [Internet] Quimicaorganica.org. Available at: <https://www.quimicaorganica.org/espectroscopia-infrarroja/769-fundamentos-espectroscopia-infrarroja.html> [Accessed 2 Jul. 2018].
121. J. Brugnerotto, An infrared investigation in relation with chitin and chitosan characterization. 2001; 42: 3569-3580.
122. Vílchez S. Nuevos tratamientos de lana con enzimas. Barcelona España. Universidad de Barcelona; 2005: 100-108.
123. Colthup N, Wiberley S, Daly L. Introduction to Infrared and Raman Spectroscopy. 2nd ed. London: Academic Press. 1975:326.
124. Goycoolea Valencia F.M., Remuñán López C., Alonso M.J. Nanopartículas a base de polisacáridos: quitosano. En: Nanotecnología Farmacéutica: Realidades y posibilidades farmacoterapéuticas. Vila Jato JL (ed.) Real Academia Nacional de Farmacia. Madrid, España. 2009: 103-113.
125. Nanoparticle Dispersion [Internet]. Qsonica. [citado 2 Julio de 2018]. Disponible en: <https://www.sonicator.com/pages/nanoparticle-dispersion>
126. Suk J, Xu Q, Kim N, Hanes J, Ensign L. PEGylation as a strategy for improving nanoparticle-based drug and gene delivery. Advanced Drug Delivery Reviews. 2016; 99:28-51.
127. R Pecora ed. Dynamic light scattering: Applications of photon correlation spectroscopy. Plenum, New York, 1985
128. B Chu. Laser light scattering: Basic principles and practice. Academic Press, Boston, Second Edition.1991:343.
129. Berne BJ, Pecora R. Dynamic light scattering. Wiley. New York. 1976.
130. Moorthi C, Kathiresan K. Application of Plackett-Burman Factorial Design in The Development of Curcumin Loaded Eudragit E 100 Nano particles. Nano Biomed Eng. 2013; 5(1): 28-33.
131. Viveksarathi K, Kannan K. Effect of the moist-heat sterilization on fabricated nanoscale solid lipid particles containing Rasagiline mesylate. Int J Pharma Investig 2015; 5(2):1-5.
132. Eyer P, Worek F, Kiderlen D, Sinko G, Stuglin A, Simeon-Rudolf V et al. Molar absorption coefficients for the reduced Ellman reagent: reassessment. Analytical Biochemistry. 2003;312(2):224-227.
133. Dosal M, Villanueva M. CURVAS DE CALIBRACIÓN EN LOS MÉTODOS ANALÍTICOS. Antología de Química Analítica Experimental. 2008;.
134. The United States Pharmacopeia : USP 31. Rockville, Maryland.: United States Pharmacopeial Convention; 2007.
135. Gonzáles- Pérez I, Quintana Cantillo A. Linealidad, algo más que r^2 : un ejemplo práctico. Revista CENIC Ciencias Biológicas. 2005;37(2):88.
136. Seabra A, Kitice N, Pelegrino M, Lancheros C, Yamauchi L, Pinge-Filho P et al. Nitric oxide-releasing polymeric nanoparticles against Trypanosoma cruzi. Journal of Physics: Conference Series. 2015;617:012020.
137. Baxter A, Dillon M, Anthony KD, Roberts GAF. Improved method for i.r. determination of the degree of N-acetylation of chitosan. International Journal of Biological Macromolecules. 1992; 14(3):166–169.

138. de Alvarenga E. Characterization and Properties of Chitosan. *Biotechnology of Biopolymers*. 2011;.
139. Pena A, Suarez S, Fernandez M. Chitosan and heparin nanoparticles. WO2007042572A1, 2007.
140. Tirfu Zekarias M, Nageswara Rao G. Evaluation Of Protonation Constants Of Mercaptosuccinic Acid In Aqueous Solutions Of Propylene Glycol And Dioxan. *Journal of the Chilean Chemical Society*. 2012;57(1):1054-1057.
141. Wang K, Hou YC, Zhang W, Ksebati MB, Xian M, Cheng JP, Wang PG. N-15 NMR and electronic properties of S-nitrosothiols. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*. 1999; 9: 2897-2902.
142. Fang C, Bhattarai N, Sun C, Zhang M. Functionalized Nanoparticles with Long-Term Stability in Biological Media. *Small*. 2009;5(14):1637-1641.
143. Bensadoun F, Kchit N, Billotte C, Trochu F, Ruiz E. A Comparative Study of Dispersion Techniques for Nanocomposite Made with Nanoclays and an Unsaturated Polyester Resin. *Journal of Nanomaterials*. 2011; 2011: 1-12.
144. Jawahar N, Meyyanathan S N. Polymeric nanoparticles for drug delivery and targeting: A comprehensive review. *Int J Health Allied Sci* 2012;1:217-23.
145. Williams D. Measuring & Characterizing Nanoparticle Size – TEM vs SEM [Internet]. AZoNano.com [citado 06 de Junio 2018]. Disponible en: <https://www.azonano.com/article.aspx?ArticleID=4118>
146. Zeta Potential Analysis of Nanoparticles [Internet]. Cdn.shopify.com. [citado 6 de Junio 2018]. Disponible en: https://cdn.shopify.com/s/files/1/0257/8237/files/nanoComposix_Guidelines_for_Zeta_Potential_Analysis_of_Nanoparticles.pdf
147. Pfaller MA, Diekema DJ, Gibbs DL, et al. *Candida krusei*, a Multidrug-Resistant Opportunistic Fungal Pathogen: Geographic and Temporal Trends from the ARTEMIS DISK Antifungal Surveillance Program, 2001 to 2005. *Journal of Clinical Microbiology*. 2008;46(2):515-521.
148. McElhaney-Feser GE, Rauli RE, Cihlar RL. Synergy of Nitric Oxide and Azoles against *Candida* Species In Vitro. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1998;42(9):2342-2346.
149. Espinosa O, Cuéllar M. Efecto del estrés oxidativo de dos cepas de *Candida*. *Verano de Investigación*. 2015; 1(2): 659 -62.
150. Bizerra F, Melo A, Katchburian E, Freymüller E, Straus A, Takahashi H et al. Changes in Cell Wall Synthesis and Ultrastructure during Paradoxical Growth Effect of Caspofungin on Four Different *Candida* Species. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2010; 55(1):302-310.
151. Arce Gil Z. Variabilidad genética, en cepas de *Candida albicans*, aisladas de muestras clínicas de pacientes oncológicos del INEN, Lima, utilizando la técnica de RAPD [Maestría]. Universidad Peruana Cayetano Heredia; 2018.
152. Kelm, M. Nitric oxide metabolism and breakdown. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Bioenergetics*. 1999 ;1411(2-3):273-289.
153. Ayeahunie S, Cannon C, LaRosa K, Pudney J, Anderson D, Klausner M. Development of an in vitro alternative assay method for vaginal irritation. *Toxicology*. 2011;279(1-3):130-138.

IX. ANEXOS

ANEXO 01

**FORMATO PARA LA DETERMINACIÓN DEL GRADO DE DESACETILACIÓN DEL QUITOSANO
POR EL MÉTODO DE TITULACIÓN CONDUCTIMÉTRICA**

Análisis: Determinación del grado de desacetilación del quitosano.			
Método: Titulación conductimétrica			
Fecha : 26/09/17		Muestra: QUITOSANO GTC Bio (01) GC20161217	
1) Colección de datos		Gráfica	
Conductividad			
vNaOH	k (mS/cm)	vNaOH	k (mS/cm)
0	4.270	46	1.433
4	3.990	47	1.438
8	3.740	48	1.445
12	3.440	49	1.452
16	3.130	50	1.457
20	2.860	51	1.464
24	2.580	52	1.478
28	2.310	53	1.51
32	1.997	54	1.544
36	1.747	55	1.584
40	1.499	56	1.619
41	1.442	57	1.660
42	1.404	58	1.702
43	1.405	62	1.860
44	1.417	66	2.010
45	1.425		

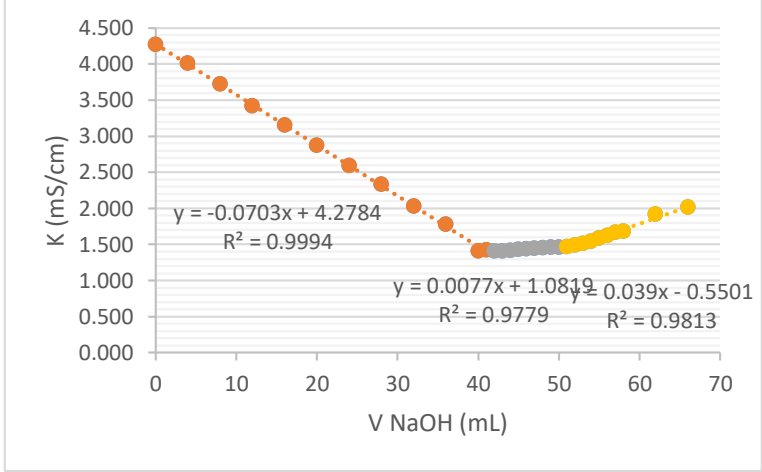
1) Obtención de Ecuaciones de Recta (y=mx + b)			
(y= mx +b)	R2	m	b
1ec: y=-0.0693x +4.2611	0.9993	0.0693	4.2611
2ec: y=-0.0069x + 1.1116	0.991	0.0069	1.1116
3 ec: y=- 0.0388x - 0.5511	0.9997	0.0388	0.5511

Datos:
Molaridad real del NaOH 0.1 M = 0.0965
Masa real del Quitosano = 0.2000

2) Determinación del DD		**Ecuación utilizada:**																	
$$y = \frac{	b_{3ec}	+	b_{2ec}	}{	m_{3ec}	-	m_{2ec}	} = \frac{0.5511 + 1.1116}{0.0388 - 0.0069} = \frac{1.6627}{0.0319} = 52.12$$ $$x = \frac{	b_{1ec}	-	b_{2ec}	}{	m_{1ec}	+	m_{2ec}	} = \frac{4.2611 - 1.1116}{0.0693 + 0.0069} = \frac{3.1495}{0.0762} = 41.33$$ $$\% GD = 16.1 \times \frac{(52.12 - 41.33)}{0.2000} \times 0.0965 = 83.8 \%$$		$$GD = \% NH_2 = 16.1 \times \frac{(Y - X)}{W} \times f$$ Donde: y: volumen equivalente mayor (mL) x: volumen equivalente menor (mL) f: concentración del NaOH (mol/L) w: masa de la muestra de quitosano en g. 16.1 es un valor relacionado con el peso equivalente del quitosano	
3) Especificación		**4) Leyenda**																	
GD > 60%		k= conductividad mS/cm = miliSiemens por centímetro M= molar GD= Grado de Desacetilación NH2% = Porcentaje de grupos amino VNaOH= volumen en mililitros de NaOH 0.0965 M gastado																	

**FORMATO PARA LA DETERMINACIÓN DEL GRADO DE DESACETILACIÓN DEL QUITOSANO
POR EL MÉTODO DE TITULACIÓN CONDUCTIMÉTRICA**

Análisis: Determinación del grado de desacetilación del quitosano.			
Método: Titulación conductimétrica			
Fecha : 26/09/17		Muestra: QUITOSANO GTC Bio (02) GC20161217	
1) Colección de datos		Gráfica	
Conductividad			
vNaOH	k (mS/cm)	vNaOH	k (mS/cm)
0	4.270	46	1.435
4	4.010	47	1.444
8	3.720	48	1.452
12	3.420	49	1.459
16	3.150	50	1.461
20	2.870	51	1.469
24	2.590	52	1.492
28	2.330	53	1.513
32	2.031	54	1.544
36	1.777	55	1.583
40	1.407	56	1.621
41	1.421	57	1.663
42	1.406	58	1.679
43	1.408	62	1.921
44	1.415	66	2.016
45	1.431		

| **Datos:** Molaridad real del NaOH 0.1 M = 0.0965 M Masa real del Quitosano = 0.2013 g | | | |
1) Obtención de Ecuaciones de Recta (y=mx + b)																			
(y= mx +b)	R2		m			b													
1 ec: y=-0.0703x +4.2784	**0.9994**	**0.0703**	**4.2784**																
2 ec: y=0.0077x +1.0819	**0.9779**	**0.0077**	**1.0819**																
3 ec: y=0.039x - 0.5501	**0.9813**	**0.039**	**0.5501**																
2) Determinación del DD		**Ecuación utilizada:**																	
$$y = \frac{	b_{3ec}	+	b_{2ec}	}{	m_{3ec}	-	m_{2ec}	} = \frac{0.5501 + 1.0819}{0.039 - 0.0077} = \frac{1.632}{0.0313} = 52.14$$ $$x = \frac{	b_{1ec}	-	b_{2ec}	}{	m_{1ec}	+	m_{2ec}	} = \frac{4.2784 - 1.0819}{0.0703 + 0.077} = \frac{3.1965}{0.078} = 40.99$$ $$\% GD = 16.1 \times \frac{(52.14 - 40.99)}{0.2013} \times 0.0965 = 86.06\%$$		$$GD = \% NH_2 = 16.1 \times \frac{(y - x)}{w} \times f$$ Donde: y: volumen equivalente mayor (mL) x: volumen equivalente menor (mL) f: concentración del NaOH (mol/L) w: masa de la muestra de quitosano en g. 16.1 es un valor relacionado con el peso equivalente del quitosano	
3) Especificación		**4) Leyenda**																	
GD > 60%		k= conductividad mS/cm = miliSiemens por centímetro M= molar GD= Grado de Desacetilación NH2% = Porcentaje de grupos amino VNaOH= volumen en mililitros de NaOH 0.0965 M gastado																	

**FORMATO PARA LA DETERMINACIÓN DEL GRADO DE DESACETILACIÓN DEL QUITOSANO
POR EL MÉTODO DE TITULACIÓN CONDUCTIMÉTRICA**

Análisis: Determinación del grado de desacetilación del quitosano.			
Método: Titulación conductimétrica			
Fecha : 26/09/17		Muestra: QUITOSANO GTC Bio (03) GC 20161217	
1) Colección de datos		Gráfica	
Conductividad			
vNaOH	k (mS/cm)	vNaOH	k (mS/cm)
0	4.280	46	1.437
4	4.012	47	1.447
8	3.734	48	1.455
12	3.449	49	1.462
16	3.161	50	1.467
20	2.873	51	1.470
24	2.600	52	1.485
28	2.350	53	1.515
32	2.040	54	1.545
36	1.780	55	1.580
40	1.390	56	1.620
41	1.416	57	1.665
42	1.410	58	1.680
43	1.405	62	1.920
44	1.410	66	2.015
45	1.425		

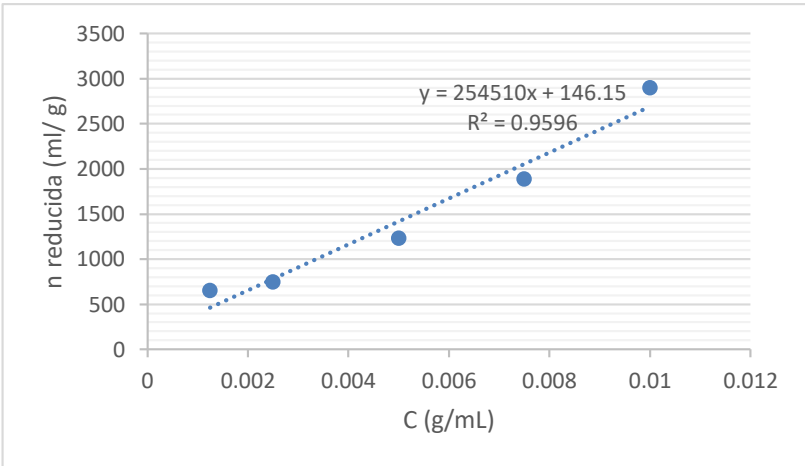
Datos:
Molaridad real del NaOH 0.1 M = 0.0965 M
Masa real del Quitosano = 0.2019 g

1) Obtención de Ecuaciones de Recta (y=mx + b)			
(y= mx + b)	R2	m	b
1ec: y=-0.0707x +4.2951	0.9992	0.0707	4.2951
2ec: y=0.0085x +1.0436	0.9565	0.0085	1.0436
3 ec: y=0.0391x - 0.5531	0.9820	0.0391	0.5531

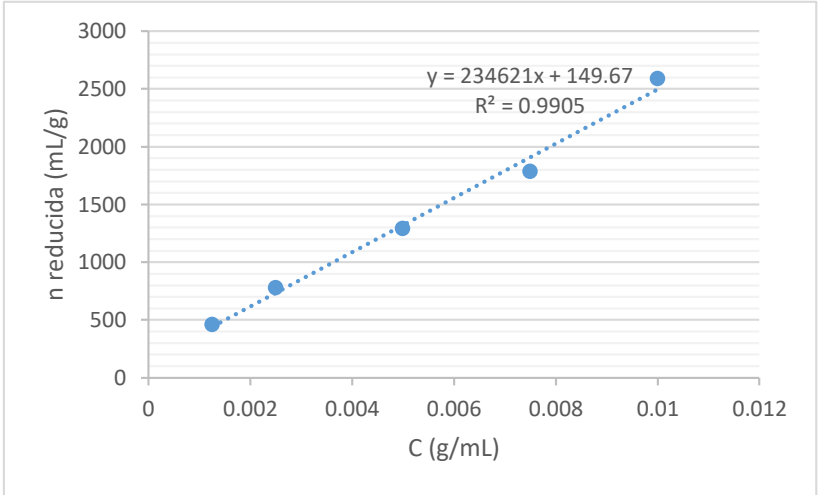
2) Determinación del DD		**Ecuación utilizada:**																	
$$y = \frac{	b_{3ec}	+	b_{2ec}	}{	m_{3ec}	-	m_{2ec}	} = \frac{0.5531 + 1.0436}{0.0391 - 0.0085} = \frac{1.597}{0.0306} = 52.18$$ $$x = \frac{	b_{1ec}	-	b_{2ec}	}{	m_{1ec}	+	m_{2ec}	} = \frac{4.2951 - 1.0436}{0.0707 + 0.0085} = \frac{3.2515}{0.0792} = 41.05$$ $$\% GD = 16.1 \times \frac{(52.18 - 41.05)}{0.2019} \times 0.0965 = 85.6\%$$		$$GD = \% NH_2 = 16.1 \times \frac{(y - x)}{w} \times f$$ Donde: y: volumen equivalente mayor (mL) x: volumen equivalente menor (mL) f: concentración del NaOH (mol/L) w: masa de la muestra de quitosano en g. 16.1 es un valor relacionado con el peso equivalente del quitosano	
3) Especificación		**4) Leyenda**																	
GD > 60%		k= conductividad mS/cm = miliSiemens por centímetro M= molar GD= Grado de Desacetilación NH2%= Porcentaje de grupos amino VNaOH= volumen en mililitros de NaOH 0.0965 M gastado																	

ANEXO 02

**FORMATO PARA LA DETERMINACIÓN DE PESO MOLECULAR DEL QUITOSANO POR
VISCOSIMETRÍA CAPILAR**

Análisis: Determinación del peso molecular del quitosano.					
Método: Viscosimetría capilar					
Fecha: 25/09/2017					
1) Colección de datos					
MUESTRA QUITOSANO (01) GTC Bio GC20161217	C (g/ml)	t (s)	t-t*	n esp = (t-t*) /t*	n red = n esp/ C
	Buffer*	16.09			
	0.01	482.00	465.91	28.956	2895.649
	0.0075	243.85	227.76	14.155	1887.383
	0.005	115.30	99.21	6.166	1233.188
	0.0025	46.10	30.01	1.865	746.053
0.00125	29.15	13.06	0.812	649.347	
2) Obtención de la Ecuación de la Recta					
Gráfica 				Ecuación de la recta: (y= mx + b) Y= 25410x + 146.15 R2= 0.9596	
3) Cálculo del Peso Molecular					
Dato (FOR 01/ Q) DD% = 85.15 (PROMEDIO)					
$\alpha = -0.0102 x (85.15) + 1.8159 = 0.94737$ $K (10^6 L/g) = 1.641 x 10^{-27} x 85.15^{14.032} = 1.99278$ $K (10^6 mL/g) = 0.001992781$ $Mw = \left(\frac{146.15}{0.001992781222}\right)^{1/0.94737} = 136655.56 \text{ Da}$ $Mw = 136.65 \text{ kDa}$ $PM = 136.65 \text{ kDa}$				Ecuaciones: $\alpha = -0.0102DD + 1.8159$ $k(10^6 L/g) = 1.641x10^{-27}xDD^{14.032}$ $[\eta] = KMw^\alpha$ <i>Donde es η es b en la ecuación de la recta (y = mx + b)</i>	
4) Especificaciones					
50 -190 kDa = Bajo Peso Molecular		190 – 310 kDa= Mediano Peso Molecular			
310 -375 kDa= Alto Peso Molecular					
5) Leyenda					
kDa= kilodaltons DD= Grado de Desacetilación [n] = viscosidad n esp= viscosidad específica n red= viscosidad reducida Mw=PM= Peso Molecular C= Concentración t= tiempo t*= tiempo en que el buffer demora en pasar por el capilar					

**FORMATO PARA LA DETERMINACIÓN DE PESO MOLECULAR DEL QUITOSANO POR
VISCOSIMETRÍA CAPILAR**

Análisis: Determinación del peso molecular del quitosano.					
Método: Viscosimetría capilar					
Fecha: 25/09/2017					
1) Colección de datos					
MUESTRA QUITOSANO (02) GTC Bio GC20161217	C (g/ml)	t (s)	t-t*	n esp = (t-t*) /t*	n red = n esp/ C
	Buffer*	16.70			
	0.01	449.39	432.68	25.909	2590.898
	0.0075	240.51	223.81	13.402	1786.906
	0.005	124.50	107.80	6.455	1291.018
	0.0025	49.20	32.50	1.946	778.443
0.00125	26.30	9.60	0.575	459.880	
2) Obtención de la Ecuación de la Recta					
Gráfica 				Ecuación de la recta: (y= mx + b) Y= 234621x +149.67 R2= 0.9905	
3) Cálculo del Peso Molecular					
Dato (FOR 01/ Q) DD% = 85.15 (PROMEDIO)					
$\alpha = -0.0102 x (80.2) + 1.8159 =$ $K (10^6 L/g) = 1.641 x 10^{-27} x 80.2^{14.032} =$ $K (10^6 mL/g) = 0.001992781$ $Mw = \left(\frac{149.67}{0.001992781222}\right)^{1/0.94737} = 140132.0257 \text{ Da}$ $Mw = 140.13 \text{ kDa}$ $PM = 140.13 \text{ kDa}$			Ecuaciones: $\alpha = -0.0102DD + 1.8159$ $k(10^6 L/g) = 1.641x10^{-27}xDD^{14.032}$ $[\eta] = KMw^\alpha$ <i>Donde es η es b en la ecuación de la recta (y = mx + b)</i>		
4) Especificaciones					
50 -190 kDa = Bajo Peso Molecular		190 – 310 kDa= Mediano Peso Molecular			
310-375 kDa= Alto Peso Molecular					
5) Leyenda					
kDa= kilodaltons DD= Grado de Desacetilación [n] = viscosidad n esp= viscosidad específica n red= viscosidad reducida Mw=PM= Peso Molecular C= Concentración t= tiempo t*= tiempo en que el buffer demora en pasar por el capilar					

**FORMATO PARA LA DETERMINACIÓN DE PESO MOLECULAR DEL QUITOSANO POR
VISCOSIMETRÍA CAPILAR**

Análisis: Determinación del peso molecular del quitosano.					
Método: Viscosimetría capilar					
Fecha: 25/09/2017					
1) Colección de datos					
MUESTRA QUITOSANO (03) GTC Bio GC20161217	C (g/ml)	t (s)	t-t*	n esp = (t-t*) / t*	n red = n esp/ C
	Buffer*	15.90			
	0.01	437.72	421.82	26.529	2652.956
	0.0075	238.47	222.57	13.998	1866.415
	0.005	121.70	105.80	6.654	1330.820
	0.0025	47.11	31.21	1.963	785.157
	0.00125	25.30	9.40	0.591	472.956
2) Obtención de la Ecuación de la Recta					
Gráfica				Ecuación de la recta: (y= mx + b)	
				Y= 242288x +149.65 R2= 0.9938	
3) Cálculo del Peso Molecular					
Dato (FOR 01/ Q) DD% = 85.15 (PROMEDIO)					
$\alpha = -0.0102 x (85.15) + 1.8159 = 0.94737$ $K (10^6 L/g) = 1.641 x 10^{-27} x 85.15^{14.032} = 1.99278$ $K (10^6 mL/g) = 0.001992781$ $Mw = \left(\frac{149.65}{0.001992781222} \right)^{1/0.94737} = 140112.26 \text{ Da}$ $Mw = 140.11 \text{ kDa}$ $PM = 140.11 \text{ kDa}$				Ecuaciones: $\alpha = -0.0102DD + 1.8159$ $k(10^6 L/g) = 1.641x10^{-27} x DD^{14.032}$ $[\eta] = KMw^\alpha$ <i>Donde es η es b en la ecuación de la recta (y = mx + b)</i>	
4) Especificaciones					
50 -190 kDa = Bajo Peso Molecular 190 – 310 kDa= Mediano Peso Molecular					
310-375 kDa= Alto Peso Molecular					
5) Leyenda					
kDa= kilodaltons DD= Grado de Desacetilación [n] = viscosidad n esp= viscosidad específica					
n red= viscosidad reducida Mw= PM=Peso Molecular C= Concentración					
t= tiempo t*= tiempo en que el buffer demora en pasar por el capilar					

ANEXO 03

FORMATO - ESPECTRO INFRARROJO DEL QUITOSANO

Análisis: Determinación del espectro infrarrojo del Quitosano de Calamar Lote GC20161217 (GTC Biotech)							
Método: Espectroscopía Infrarroja con Transformada de Fourier y Sistema ATR							
Fecha: 26/09/17							
1) Colección de Datos							
Longitud de Onda	T%	v (cm-1)	T%	v (cm-1)	T%	v (cm-1)	T%
4000.36438	101.211076	3861.48963	101.094003	3722.61488	101.255769	3583.74013	97.049788
3996.50675	101.186867	3857.632	101.079837	3718.75725	101.254982	3579.8825	96.85235
3992.64912	101.143595	3853.77437	101.10833	3714.89962	101.276535	3576.02486	96.615903
3988.79149	101.119306	3849.91674	101.136363	3711.04198	101.256556	3572.16723	96.362669
3984.93386	101.143739	3846.0591	101.059734	3707.18435	101.234122	3568.3096	96.139657
3981.07622	101.176657	3842.20147	101.118856	3703.32672	101.238063	3564.45197	95.908449
3977.21859	101.182968	3838.34384	101.108844	3699.46909	101.175192	3560.59434	95.664958
3973.36096	101.162061	3834.48621	101.165446	3695.61146	101.156587	3556.7367	95.417129
3969.50333	101.124143	3830.62858	101.174351	3691.75382	101.071257	3552.87907	95.133338
3965.6457	101.118519	3826.77094	101.129154	3687.89619	101.051272	3549.02144	94.906644
3961.78806	101.1463	3822.91331	101.10986	3684.03856	100.982975	3545.16381	94.701766
3957.93043	101.141182	3819.05568	101.1475	3680.18093	100.903154	3541.30618	94.397653
3954.0728	101.129109	3815.19805	101.170035	3676.3233	100.805233	3537.44854	94.254808
3950.21517	101.119956	3811.34042	101.14722	3672.46566	100.770481	3533.59091	94.074964
3946.35754	101.118778	3807.48278	101.106305	3668.60803	100.746799	3529.73328	93.900151
3942.4999	101.115797	3803.62515	101.104266	3664.7504	100.671363	3525.87565	93.575265
3938.64227	101.10184	3799.76752	101.141741	3660.89277	100.67661	3522.01802	93.197933
3934.78464	101.093908	3795.90989	101.163811	3657.03514	100.463069	3518.16038	92.977046
3930.92701	101.09643	3792.05226	101.148993	3653.1775	100.353273	3514.30275	92.791544
3927.06938	101.097449	3788.19462	101.236018	3649.31987	100.255522	3510.44512	92.574735
3923.21174	101.09895	3784.33699	101.166238	3645.46224	100.127289	3506.58749	92.308533
3919.35411	101.103919	3780.47936	101.209521	3641.60461	99.976727	3502.72986	92.005253
3915.49648	101.117616	3776.62173	101.215443	3637.74698	99.874504	3498.87222	91.659217
3911.63885	101.066683	3772.7641	101.209264	3633.88934	99.624271	3495.01459	91.388781
3907.78122	101.076633	3768.90646	101.197862	3630.03171	99.50026	3491.15696	91.163598
3903.92358	101.073034	3765.04883	101.209686	3626.17408	99.339802	3487.29933	90.909428
3900.06595	101.082868	3761.1912	101.217539	3622.31645	99.138363	3483.4417	90.622396
3896.20832	101.084824	3757.33357	101.174523	3618.45882	98.914006	3479.58406	90.274542
3892.35069	101.06131	3753.47594	101.116313	3614.60118	98.691702	3475.72643	89.949591
3888.49306	101.035674	3749.6183	101.113652	3610.74355	98.509283	3471.8688	89.687636
3884.63542	101.065909	3745.76067	101.11475	3606.88592	98.307802	3468.01117	89.409694
3880.77779	101.093285	3741.90304	101.101546	3603.02829	98.096253	3464.15354	89.129798
3876.92016	101.078898	3738.04541	101.110748	3599.17066	97.900561	3460.2959	88.843228
3873.06253	101.061125	3734.18778	101.12818	3595.31302	97.686732	3456.43827	88.577013
3869.2049	101.073564	3730.33014	101.163666	3591.45539	97.479009	3452.58064	88.367147
3865.34726	101.112264	3726.47251	101.222647	3587.59776	97.266535	3448.72301	88.168155

v (cm-1)	T%	v (cm-1)	T%	v (cm-1)	T%	v (cm-1)	T%
3444.86538	87.862429	3317.56352	84.536396	3190.26166	86.723501	3062.95981	91.063591
3441.00774	87.610144	3313.70589	84.521451	3186.40403	86.810924	3059.10218	91.196595
3437.15011	87.400395	3309.84826	84.449023	3182.5464	86.897982	3055.24454	91.327226
3433.29248	87.19314	3305.99062	84.335508	3178.68877	87.00996	3051.38691	91.459807
3429.43485	86.989135	3302.13299	84.285362	3174.83114	87.109947	3047.52928	91.611628
3425.57722	86.840737	3298.27536	84.265874	3170.9735	87.258964	3043.67165	91.746117
3421.71958	86.702903	3294.41773	84.211431	3167.11587	87.417355	3039.81402	91.898536
3417.86195	86.524787	3290.5601	84.22559	3163.25824	87.544499	3035.95638	92.047242
3414.00432	86.372006	3286.70246	84.308447	3159.40061	87.696989	3032.09875	92.176282
3410.14669	86.248315	3282.84483	84.374409	3155.54298	87.864679	3028.24112	92.301615
3406.28906	86.126534	3278.9872	84.460101	3151.68534	87.985371	3024.38349	92.457177
3402.43142	85.973209	3275.12957	84.555933	3147.82771	88.113263	3020.52586	92.597653
3398.57379	85.811899	3271.27194	84.661471	3143.97008	88.265057	3016.66822	92.729711
3394.71616	85.673215	3267.4143	84.830409	3140.11245	88.417508	3012.81059	92.846417
3390.85853	85.481151	3263.55667	84.992861	3136.25482	88.571672	3008.95296	92.968139
3387.0009	85.300444	3259.69904	85.122999	3132.39718	88.717833	3005.09533	93.103046
3383.14326	85.128968	3255.84141	85.235417	3128.53955	88.845816	3001.2377	93.216536
3379.28563	84.904259	3251.98378	85.333313	3124.68192	88.970769	2997.38006	93.295725
3375.428	84.654106	3248.12614	85.445267	3120.82429	89.088465	2993.52243	93.366821
3371.57037	84.409262	3244.26851	85.543603	3116.96666	89.206224	2989.6648	93.427304
3367.71274	84.183911	3240.41088	85.63701	3113.10902	89.317737	2985.80717	93.471712
3363.8551	84.020078	3236.55325	85.744017	3109.25139	89.448696	2981.94954	93.461252
3359.99747	83.911332	3232.69562	85.848223	3105.39376	89.595148	2978.0919	93.445859
3356.13984	83.851812	3228.83798	85.954171	3101.53613	89.729931	2974.23427	93.427995
3352.28221	83.861439	3224.98035	86.042322	3097.6785	89.839004	2970.37664	93.373724
3348.42458	83.921236	3221.12272	86.115553	3093.82086	89.970136	2966.51901	93.308064
3344.56694	84.02367	3217.26509	86.190135	3089.96323	90.101607	2962.66138	93.226019
3340.70931	84.138081	3213.40746	86.292723	3086.1056	90.22594	2958.80374	93.096917
3336.85168	84.252409	3209.54982	86.382622	3082.24797	90.373005	2954.94611	92.940444
3332.99405	84.37297	3205.69219	86.443726	3078.39034	90.514734	2951.08848	92.743143
3329.13642	84.489199	3201.83456	86.51974	3074.5327	90.631473	2947.23085	92.510169
3325.27878	84.559992	3197.97693	86.587757	3070.67507	90.777841	2943.37322	92.263044
3321.42115	84.556736	3194.1193	86.642981	3066.81744	90.944278	2939.51558	92.01135

v (cm-1)	T%	v (cm-1)	T%	v (cm-1)	T%	v (cm-1)	T%
2935.65795	91.753948	2792.92557	93.879434	2650.19318	96.20996	2507.4608	97.87565
2931.80032	91.499504	2789.06794	93.975506	2646.33555	96.291698	2503.60317	97.909928
2927.94269	91.265059	2785.2103	94.064475	2642.47792	96.369322	2499.74554	97.958458
2924.08506	91.072176	2781.35267	94.135361	2638.62029	96.441953	2495.8879	97.998518
2920.22742	90.927309	2777.49504	94.217412	2634.76266	96.516726	2492.03027	98.018382
2916.36979	90.844136	2773.63741	94.312223	2630.90502	96.58021	2488.17264	98.031771
2912.51216	90.804091	2769.77978	94.380021	2627.04739	96.632295	2484.31501	98.071443
2908.65453	90.771473	2765.92214	94.428592	2623.18976	96.706517	2480.45738	98.128258
2904.7969	90.691081	2762.06451	94.487396	2619.33213	96.774064	2476.59974	98.153289
2900.93926	90.563905	2758.20688	94.548368	2615.4745	96.80841	2472.74211	98.169048
2897.08163	90.397322	2754.34925	94.630434	2611.61686	96.86397	2468.88448	98.204325
2893.224	90.183558	2750.49162	94.699209	2607.75923	96.908053	2465.02685	98.258141
2889.36637	89.972021	2746.63398	94.742323	2603.9016	96.944965	2461.16922	98.321458
2885.50874	89.785654	2742.77635	94.787857	2600.04397	96.994173	2457.31158	98.372157
2881.6511	89.58954	2738.91872	94.848474	2596.18634	97.046082	2453.45395	98.400178
2877.79347	89.44356	2735.06109	94.900095	2592.3287	97.088052	2449.59632	98.399652
2873.93584	89.375917	2731.20346	94.94082	2588.47107	97.124922	2445.73869	98.413733
2870.07821	89.395424	2727.34582	94.975882	2584.61344	97.163167	2441.88106	98.459971
2866.22058	89.502361	2723.48819	95.016661	2580.75581	97.202011	2438.02342	98.499686
2862.36294	89.703479	2719.63056	95.060441	2576.89818	97.242691	2434.16579	98.511701
2858.50531	89.982889	2715.77293	95.111583	2573.04054	97.290073	2430.30816	98.530724
2854.64768	90.2987	2711.9153	95.165069	2569.18291	97.335389	2426.45053	98.562421
2850.79005	90.651088	2708.05766	95.21988	2565.32528	97.360201	2422.5929	98.59387
2846.93242	91.04048	2704.20003	95.275849	2561.46765	97.398546	2418.73526	98.612523
2843.07478	91.437742	2700.3424	95.32802	2557.61002	97.444252	2414.87763	98.610618
2839.21715	91.792223	2696.48477	95.379819	2553.75238	97.460313	2411.02	98.628082
2835.35952	92.075728	2692.62714	95.435449	2549.89475	97.481861	2407.16237	98.655427
2831.50189	92.329724	2688.7695	95.494682	2546.03712	97.518748	2403.30474	98.651617
2827.64426	92.570423	2684.91187	95.549917	2542.17949	97.56309	2399.4471	98.653774
2823.78662	92.790299	2681.05424	95.616938	2538.32186	97.603843	2395.58947	98.652022
2819.92899	92.971084	2677.19661	95.700377	2534.46422	97.629098	2391.73184	98.671027
2816.07136	93.114342	2673.33898	95.770991	2530.60659	97.662695	2387.87421	98.760293
2812.21373	93.259136	2669.48134	95.831456	2526.74896	97.696789	2384.01658	98.75746
2808.3561	93.406914	2665.62371	95.893724	2522.89133	97.703295	2380.15894	98.779753
2804.49846	93.542804	2661.76608	95.957814	2519.0337	97.761688	2376.30131	98.801689
2800.64083	93.665492	2657.90845	96.049728	2515.17606	97.817972	2372.44368	98.813071
2796.7832	93.774602	2654.05082	96.133582	2511.31843	97.848896	2368.58605	98.814301

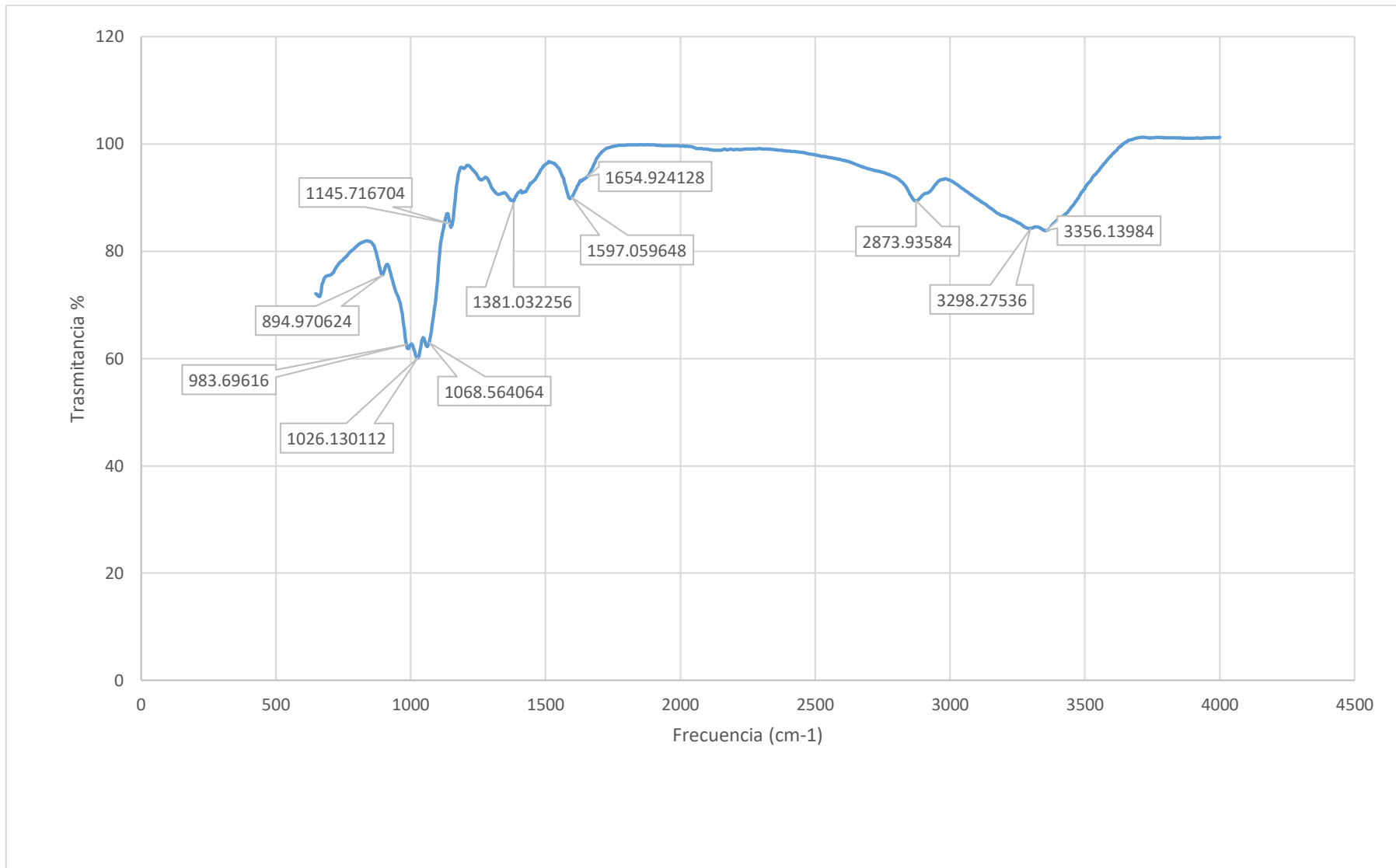
v (cm-1)	T%	v (cm-1)	T%	v (cm-1)	T%	v (cm-1)	T%
2364.72842	98.818498	2221.99603	98.931005	2079.26365	99.112842	1936.53126	99.695947
2360.87078	98.838272	2218.1384	98.912993	2075.40602	99.118207	1932.67363	99.69877
2357.01315	98.869775	2214.28077	98.948792	2071.54838	99.100084	1928.816	99.71088
2353.15552	98.899854	2210.42314	98.984268	2067.69075	99.099103	1924.95837	99.741857
2349.29789	98.924293	2206.5655	98.992823	2063.83312	99.127747	1921.10074	99.756177
2345.44026	98.948759	2202.70787	98.954415	2059.97549	99.170253	1917.2431	99.764287
2341.58262	98.981171	2198.85024	98.929396	2056.11786	99.214775	1913.38547	99.778953
2337.72499	99.010816	2194.99261	98.936409	2052.26022	99.272691	1909.52784	99.787326
2333.86736	99.021071	2191.13498	98.975859	2048.40259	99.375503	1905.67021	99.792277
2330.00973	99.016151	2187.27734	99.02613	2044.54496	99.451329	1901.81258	99.813549
2326.1521	99.016648	2183.41971	99.014413	2040.68733	99.522961	1897.95494	99.824329
2322.29446	99.023753	2179.56208	98.97448	2036.8297	99.497236	1894.09731	99.809643
2318.43683	99.030523	2175.70445	98.9092	2032.97206	99.495302	1890.23968	99.826799
2314.5792	99.038979	2171.84682	98.930814	2029.11443	99.536676	1886.38205	99.830933
2310.72157	99.047088	2167.98918	98.993603	2025.2568	99.601696	1882.52442	99.836674
2306.86394	99.059136	2164.13155	99.025455	2021.39917	99.590188	1878.66678	99.875827
2303.0063	99.075349	2160.27392	98.978855	2017.54154	99.550651	1874.80915	99.842463
2299.14867	99.088718	2156.41629	98.913772	2013.6839	99.568474	1870.95152	99.844542
2295.29104	99.094853	2152.55866	98.861178	2009.82627	99.651338	1867.09389	99.842412
2291.43341	99.097269	2148.70102	98.853971	2005.96864	99.623723	1863.23626	99.843489
2287.57578	99.115989	2144.84339	98.851755	2002.11101	99.562325	1859.37862	99.851641
2283.71814	99.088128	2140.98576	98.861891	1998.25338	99.55948	1855.52099	99.83619
2279.86051	99.062603	2137.12813	98.858123	1994.39574	99.663502	1851.66336	99.883441
2276.00288	99.050577	2133.2705	98.837673	1990.53811	99.635921	1847.80573	99.848608
2272.14525	99.037835	2129.41286	98.808743	1986.68048	99.65825	1843.9481	99.856799
2268.28762	99.028546	2125.55523	98.824279	1982.82285	99.660008	1840.09046	99.858481
2264.42998	99.02236	2121.6976	98.841633	1978.96522	99.68671	1836.23283	99.838532
2260.57235	99.022444	2117.83997	98.871597	1975.10758	99.688395	1832.3752	99.831937
2256.71472	99.027981	2113.98234	98.888255	1971.24995	99.688552	1828.51757	99.832038
2252.85709	99.035023	2110.1247	98.915807	1967.39232	99.690288	1824.65994	99.838998
2248.99946	99.041073	2106.26707	98.94262	1963.53469	99.685805	1820.8023	99.835395
2245.14182	99.048931	2102.40944	98.989495	1959.67706	99.68175	1816.94467	99.845067
2241.28419	99.046481	2098.55181	99.019659	1955.81942	99.674906	1813.08704	99.818714
2237.42656	99.021438	2094.69418	99.033586	1951.96179	99.682539	1809.22941	99.817842
2233.56893	99.009741	2090.83654	99.037855	1948.10416	99.693607	1805.37178	99.803688
2229.7113	98.996151	2086.97891	99.041701	1944.24653	99.678632	1801.51414	99.797321
2225.85366	98.979375	2083.12128	99.059807	1940.3889	99.684119	1797.65651	99.780203

v (cm-1)	T%	v (cm-1)	T%	v (cm-1)	T%	v (cm-1)	T%
1793.79888	99.772048	1651.0665	93.725025	1508.33411	96.446258	1365.60173	89.889171
1789.94125	99.765562	1647.20886	93.577378	1504.47648	96.3504	1361.7441	90.128623
1786.08362	99.732736	1643.35123	93.41637	1500.61885	96.214037	1357.88646	90.369473
1782.22598	99.749747	1639.4936	93.382141	1496.76122	96.005686	1354.02883	90.726279
1778.36835	99.730834	1635.63597	93.183604	1492.90358	95.939352	1350.1712	90.879216
1774.51072	99.728848	1631.77834	93.060117	1489.04595	95.592803	1346.31357	90.962873
1770.65309	99.716859	1627.9207	93.20744	1485.18832	95.335704	1342.45594	90.822718
1766.79546	99.697541	1624.06307	92.641192	1481.33069	95.111308	1338.5983	90.796463
1762.93782	99.704859	1620.20544	92.333208	1477.47306	94.688011	1334.74067	90.739056
1759.08019	99.630923	1616.34781	91.99834	1473.61542	94.368883	1330.88304	90.669127
1755.22256	99.587162	1612.49018	91.586876	1469.75779	94.078386	1327.02541	90.557437
1751.36493	99.551253	1608.63254	91.174415	1465.90016	93.74222	1323.16778	90.661597
1747.5073	99.505736	1604.77491	90.775214	1462.04253	93.436483	1319.31014	90.750989
1743.64966	99.44639	1600.91728	90.33339	1458.1849	93.19197	1315.45251	90.879185
1739.79203	99.37519	1597.05965	89.962359	1454.32726	93.018111	1311.59488	91.068855
1735.9344	99.312074	1593.20202	89.958062	1450.46963	92.841534	1307.73725	91.32749
1732.07677	99.259877	1589.34438	89.770845	1446.612	92.637039	1303.87962	91.599569
1728.21914	99.188957	1585.48675	90.075881	1442.75437	92.610938	1300.02198	91.88168
1724.3615	99.155763	1581.62912	90.612631	1438.89674	92.159148	1296.16435	92.305529
1720.50387	98.953856	1577.77149	91.438214	1435.0391	91.884576	1292.30672	92.777536
1716.64624	98.833409	1573.91386	92.07357	1431.18147	91.587642	1288.44909	93.205901
1712.78861	98.701167	1570.05622	92.734545	1427.32384	91.123108	1284.59146	93.537383
1708.93098	98.501354	1566.19859	93.605286	1423.46621	91.0689	1280.73382	93.725687
1705.07334	98.264306	1562.34096	93.93828	1419.60858	90.989679	1276.87619	93.773143
1701.21571	98.040341	1558.48333	94.46141	1415.75094	90.956965	1273.01856	93.682518
1697.35808	97.820544	1554.6257	94.92033	1411.89331	90.840722	1269.16093	93.508988
1693.50045	97.504409	1550.76806	95.390143	1408.03568	91.362495	1265.3033	93.356519
1689.64282	97.345079	1546.91043	95.552939	1404.17805	91.116558	1261.44566	93.28169
1685.78518	96.795246	1543.0528	95.795078	1400.32042	90.986329	1257.58803	93.320212
1681.92755	96.424187	1539.19517	96.031432	1396.46278	90.779472	1253.7304	93.511291
1678.06992	96.025171	1535.33754	96.212321	1392.60515	90.45813	1249.87277	93.811378
1674.21229	95.595765	1531.4799	96.410802	1388.74752	90.1338	1246.01514	94.153905
1670.35466	95.172541	1527.62227	96.431776	1384.88989	89.796514	1242.1575	94.47904
1666.49702	94.856548	1523.76464	96.534669	1381.03226	89.220541	1238.29987	94.751527
1662.63939	94.32257	1519.90701	96.600918	1377.17462	89.490568	1234.44224	94.951884
1658.78176	94.100456	1516.04938	96.579809	1373.31699	89.526293	1230.58461	95.145192
1654.92413	93.913439	1512.19174	96.729286	1369.45936	89.501278	1226.72698	95.342844

v (cm-1)	T%	v (cm-1)	T%	v (cm-1)	T%	v (cm-1)	T%
1219.01171	95.778022	1076.27933	65.030464	933.546944	74.387077	790.81456	80.550848
1215.15408	95.972718	1072.4217	63.867662	929.689312	75.093101	786.956928	80.396173
1211.29645	96.071602	1068.56406	63.039752	925.83168	75.817422	783.099296	80.235638
1207.43882	95.98614	1064.70643	62.468458	921.974048	76.549389	779.241664	80.0838
1203.58118	95.713953	1060.8488	62.232597	918.116416	77.175048	775.384032	79.894782
1199.72355	95.4669	1056.99117	62.435611	914.258784	77.545434	771.5264	79.677186
1195.86592	95.432112	1053.13354	63.078662	910.401152	77.519745	767.668768	79.464163
1192.00829	95.576235	1049.2759	63.75224	906.54352	77.126992	763.811136	79.237739
1188.15066	95.680819	1045.41827	63.931927	902.685888	76.483483	759.953504	79.000085
1184.29302	95.546327	1041.56064	63.380582	898.828256	75.863036	756.095872	78.81542
1180.43539	95.11552	1037.70301	62.384103	894.970624	75.579082	752.23824	78.63509
1176.57776	94.37087	1033.84538	61.302727	891.112992	75.807053	748.380608	78.45064
1172.72013	93.298394	1029.98774	60.464866	887.25536	76.441846	744.522976	78.204154
1168.8625	91.838288	1026.13011	60.056215	883.397728	77.33769	740.665344	78.033801
1165.00486	90.023716	1022.27248	60.140008	879.540096	78.223649	736.807712	77.89341
1161.14723	88.013528	1018.41485	60.562969	875.682464	78.969974	732.95008	77.669113
1157.2896	86.124813	1014.55722	61.191046	871.824832	79.709983	729.092448	77.378196
1153.43197	84.816561	1010.69958	61.874905	867.9672	80.456736	725.234816	77.085296
1149.57434	84.461499	1006.84195	62.464505	864.109568	80.972001	721.377184	76.770044
1145.7167	85.088935	1002.98432	62.745457	860.251936	81.289202	717.519552	76.400515
1141.85907	86.191664	999.126688	62.627419	856.394304	81.547167	713.66192	76.065755
1138.00144	87.012236	995.269056	62.228027	852.536672	81.722573	709.804288	75.84385
1134.14381	87.039972	991.411424	61.860531	848.67904	81.816346	705.946656	75.655557
1130.28618	86.386782	987.553792	61.875494	844.821408	81.858852	702.089024	75.562091
1126.42854	85.421769	983.69616	62.532859	840.963776	81.889418	698.231392	75.515004
1122.57091	84.434587	979.838528	63.781364	837.106144	81.930246	694.37376	75.487365
1118.71328	83.515559	975.980896	65.337252	833.248512	81.917819	690.516128	75.442693
1114.85565	82.607065	972.123264	66.880673	829.39088	81.845975	686.658496	75.3457
1110.99802	81.420593	968.265632	68.275558	825.533248	81.762663	682.800864	75.177081
1107.14038	79.587816	964.408	69.43047	821.675616	81.684891	678.943232	74.884729
1103.28275	77.117233	960.550368	70.320932	817.817984	81.591128	675.0856	74.359087
1099.42512	74.50616	956.692736	70.965798	813.960352	81.491565	671.227968	73.818947
1095.56749	72.237791	952.835104	71.486328	810.10272	81.385447	667.370336	72.394118
1091.70986	70.519275	948.977472	71.960669	806.245088	81.255159	663.512704	71.532545
1087.85222	69.167873	945.11984	72.455244	802.387456	81.094929	659.655072	71.54145
1083.99459	67.850159	941.262208	73.021069	798.529824	80.907746	655.79744	71.695127
						651.939808	71.97336
						648.082176	72.126176

Leyenda: T% = Transmitancia v = Frecuencia

Firma Analista: Gabriela M.



2) Gráfica 1 Espectro Infrarrojo de Quitosano

ANEXO 04



G.T.C. UNION GROUP LTD.

NO.52 HONGKONG MIDDLE STREET, SHINAN DISTRICT, QINGDAO, CHINA

TEL: 86-532-80632517

FAX: 86-532-80622407

CERTIFICATE OF ANALYSIS

BATCH NO. : GC20161217

DATE: Dec.17, 2016

NAME	Squid Chitosan		
QUANTITY	1000KGS		
ITEM	STANDARD	RESULT	
D.A.C. %	95	96.7	
Viscosity cps	50-300	185	
Molecular Weight kDa	50 – 190	113.2	
Insolubles %	1% max	0.45	
Ash %	1% max	0.87	
Moisture %	10% max	9	
Particle Size mesh	80 (95% Pass)	Qualified	
Heavy Metals ppm	1ppm max	Qualified	
Arsenic ppm	0.5ppm max	Qualified	
Density g/ml	0.35	0.38	
Appearance	White Powder	Qualified	
COMMENT: QUALIFIED. THE ITEM TESTED IS IN ACCORDANCE WITH THE			
INSPECTOR: Liu NA NATIONAL STANDARD OF P.R.OF CHINA COMPLETELY RESPONSIBLE INSPECTOR: Song Xiaohui			

ANEXO 05

ANEXO 05. RESULTADOS DE ANÁLISIS DE PARÁMETROS FÍSICOS. ENSAYOS PILOTO

1° Ensayo. Fecha: 06/05/2017

Figura 1 Resultados de Parámetros Físicos de la Formulación 01 / Muestra 01

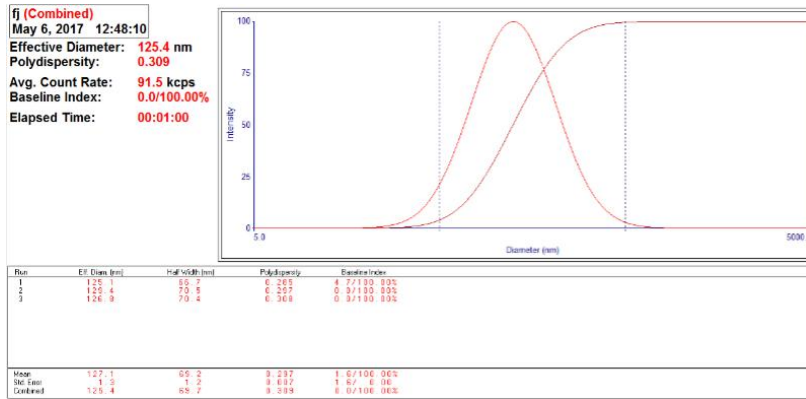


Figura 2 Resultados de Parámetros Físicos de la Formulación 01/ Muestra 02

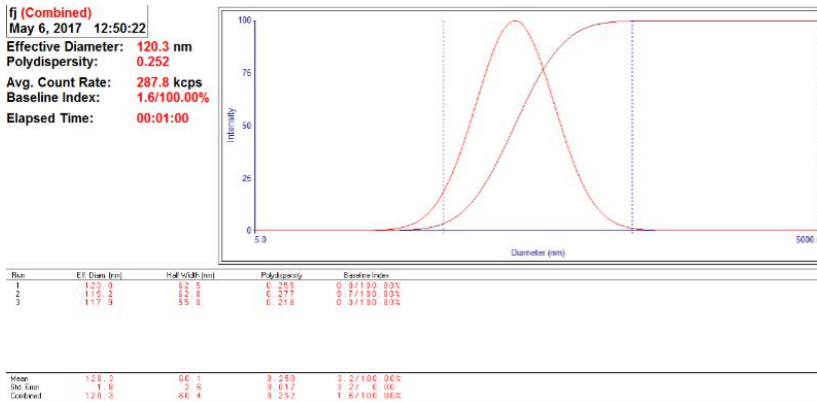


Figura 3 Resultados de Parámetros Físicos de la Formulación 01/ Muestra 03

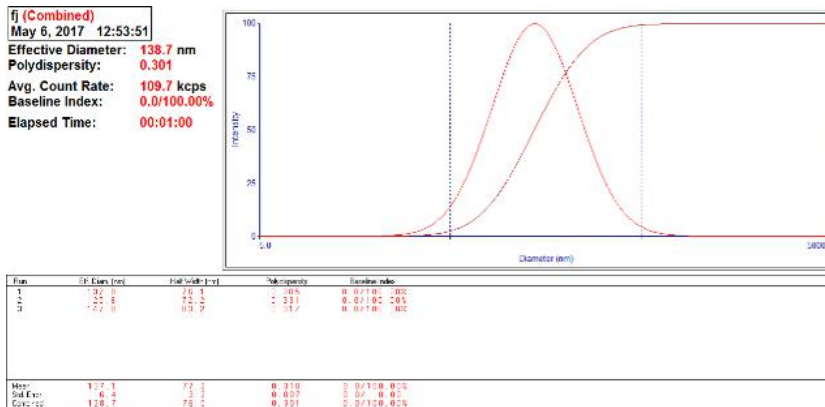


Tabla 1 Resultados de Parámetros Físicos Piloto 01

	DE	IPD
Muestra 01	125.4 nm	0.309
Muestra 01	120.3 nm	0.252
Muestra 01	138.7 nm	0.301
Promedio	128.13 ± 7.76	0.287 ± 0.025

DE: Diámetro Efectivo; IPD: Índice de Polidispersidad

2° Ensayo Piloto: 12 / 05 / 2017

Figura 4 Resultados de Parámetros Físicos Piloto 02 Muestra 01

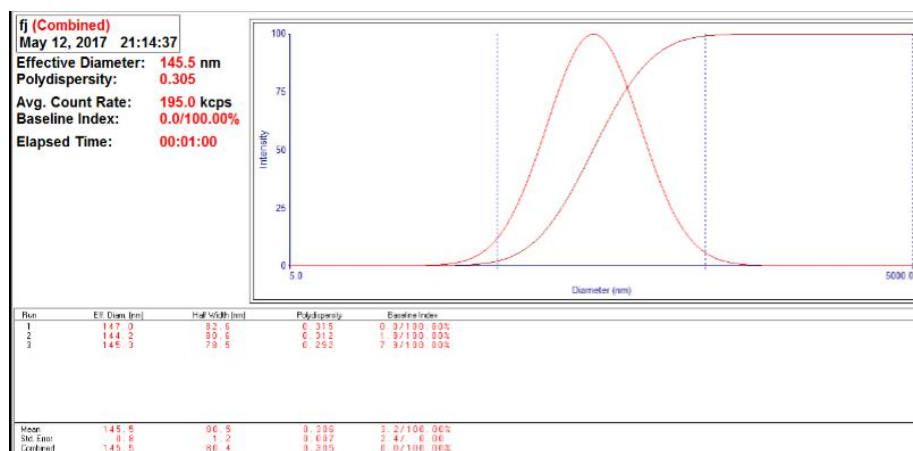


Figura 5 Resultados de Parámetros Físicos Piloto 02 Muestra 02

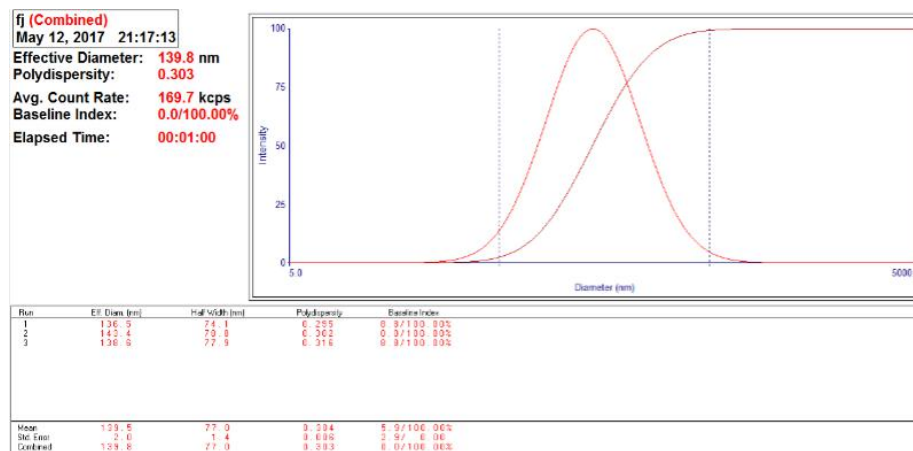


Figura 6 Resultados de Parámetros Físicos Piloto 02 Muestra 03

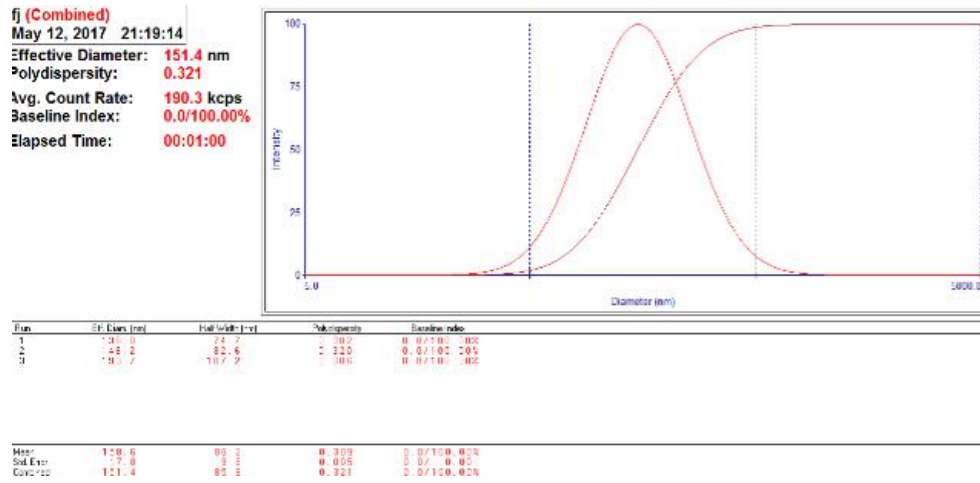


Tabla 2 Resultados de Parámetros Físicos Piloto 02

	DE	IPD
Muestra 01	145.5 nm	0.305
Muestra 02	139.8 nm	0.303
Muestra 03	151.4 nm	0.321
Promedio	145.57 ± 4.73 nm	0.309 ± 0.008

DE: Diámetro Efectivo; IPD: Índice de Polidispersidad

3° Ensayo Piloto: 17 / 08 / 2017

Figura 7 Resultados de Parámetros Físicos Piloto 03. Aplicación de 10 minutos Sonicación Mediana Frecuencia

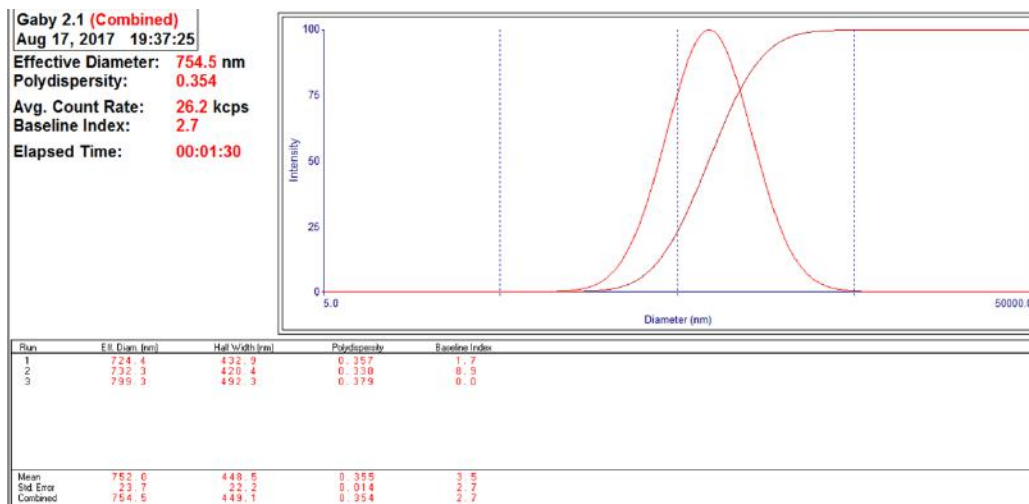


Figura 8 Resultados de Parámetros Físicos Piloto 03. Aplicación de 10 minutos Sonicación Alta Frecuencia

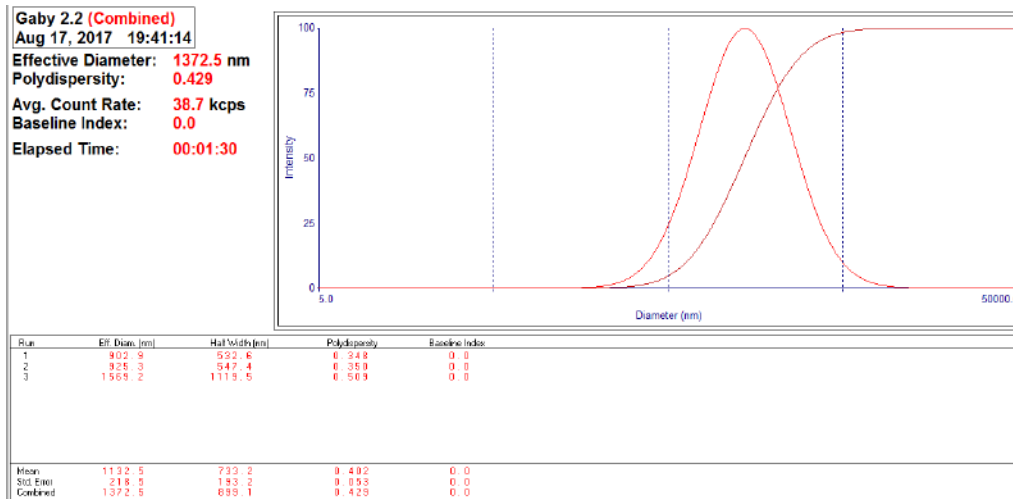


Tabla 3 Resultados de Parámetros Físicos Piloto 03

	DE	IPD
Muestra 10 minutos Mediana Frecuencia	754.5 nm	0.354
Muestra 10 minutos Alta Frecuencia	1372.5 nm	0.429

DE: Diámetro Efectivo; IPD: Índice de Polidispersidad

4° Ensayo Piloto: 31 / 08 / 2017

Figura 9 Resultados de Parámetros Físicos Piloto 04. Aplicación de 5 minutos Sonicación Baja Frecuencia. Muestra 01

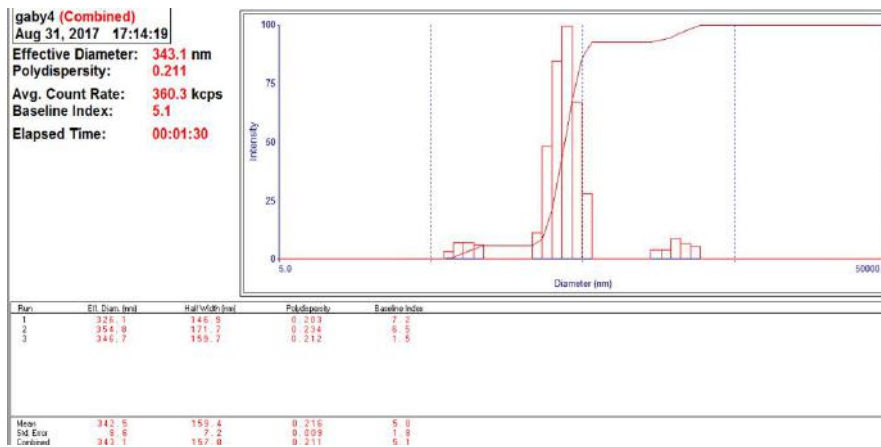


Figura 10 Resultados de Parámetros Físicos Piloto 04. Aplicación de 5 minutos Sonicación Baja Frecuencia. Muestra 02

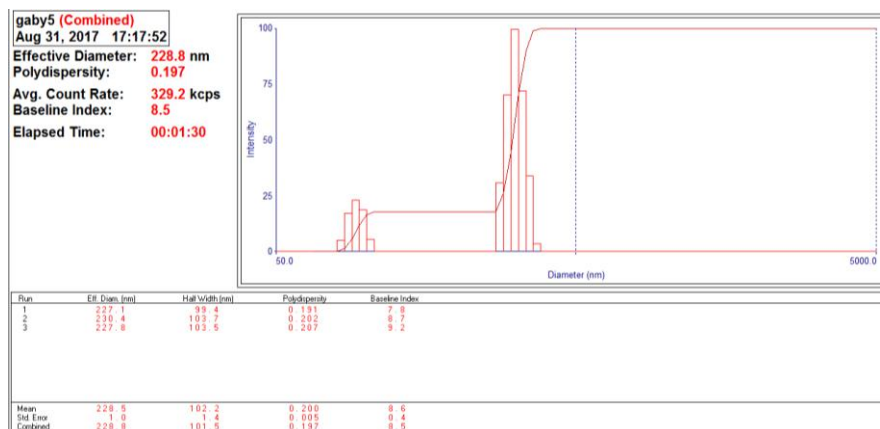


Figura 11 Resultados de Parámetros Físicos Piloto 04. Aplicación de 5 minutos Sonicación Baja Frecuencia. Muestra 03

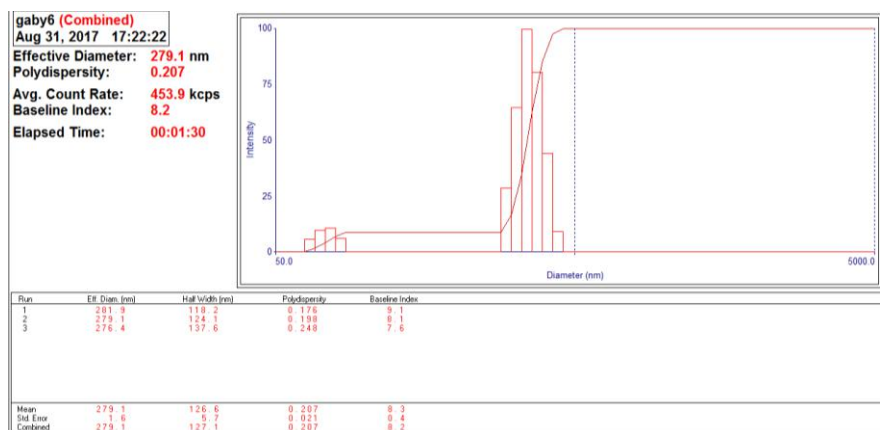


Tabla 4 Resultados de Parámetros Físicos Piloto 04

	DE	IPD
Muestra 01	343.1 nm	0.211
Muestra 02	228.8 nm	0.197
Muestra 03	279.1 nm	0.207
Promedio	283.67 ± 57.29 nm	0.205 ± 0.007

Tabla 5 Cambios en la Formulación y Etapas de Procedimiento de Síntesis de Nanopartículas Poliméricas de Quitosano Cargadas con MSA

	Piloto 01	Piloto 02	Piloto 03	Piloto 04
Componentes	<ol style="list-style-type: none"> 1. 0.9 g de MSA 2. 22.5 mL de Quitosano 1 mg/mL 3. 3 mL de TPP 1 mg/mL 	<ol style="list-style-type: none"> 1. 0.9 g de MSA 2. 22.5 mL de Quitosano 1 mg/mL 3. 3 mL de TPP 1 mg/mL 4. 1.5 mL de PEG 4000 1 mg/mL 	<ol style="list-style-type: none"> 1. 0.9 g de MSA 2. 22.5 mL de Quitosano 1 mg/mL 3. 3 mL de TPP 1 mg/mL 4. 1.5 mL de PEG 4000 1 mg/mL 	<ol style="list-style-type: none"> 1. 0.9 g de MSA 2. 22.5 mL de Quitosano 1 mg/mL 3. 3 mL de TPP 1 mg/mL 4. 1.5 mL de PEG 4000 1 mg/mL
Etapas de Síntesis	<ol style="list-style-type: none"> 1. Disolución del MSA 2. Reticulación Ionotrópica 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Disolución del MSA 2. Reticulación Ionotrópica 3. Pegilación 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Disolución del MSA 2. Reticulación Ionotrópica 3. Sonicación (<i>10 min Mediana / Alta Frecuencia</i>) 4. Pegilación 5. Sonicación (<i>10 min Mediana / Alta Frecuencia</i>) 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Disolución del MSA 2. Reticulación Ionotrópica 3. Sonicación (<i>5 min Baja Frecuencia</i>) 4. Pegilación 5. Sonicación (<i>5 min Baja Frecuencia</i>)

ANEXO 06

ANEXO 06. FÓRMULA CUALI-CUANTITATIVA DE LAS NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS DE QUITOSANO CARGADAS CON ÁCIDO S-NITROSO MERCAPTOSUCCÍNICO

En la siguiente tabla, se describe la formulación de las nanopartículas poliméricas de quitosano cargadas con ácido s-nitrosomercaptosuccínico en función de sus ingredientes y el porcentaje en el que se encuentran los mismos dentro de la formulación.

ITEM	INGREDIENTE	PORCENTAJE (%)
1	AGUA	95.03
2	ÁCIDO MERCAPTOSUCCÍNICO	2.75
3	NITRITO DE SODIO	1.26
4	ÁCIDO ACÉTICO	0.72
5	HIDRÓXIDO DE SODIO	0.15
6	QUITOSANO	0.07
7	TRIPOLIFOSFATO DE SODIO	0.01
	TOTAL	99.99

ANEXO 07

ANEXO 07: PROCEDIMIENTO PARA EL ROTULADO DE LAS MUESTRAS DEL LOTE DE NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS DE QUITOSANO CARGADAS CON ÁCIDO MERCAPTOSUCCÍNICO

1. *Condición previa.* Se han distribuido los lotes sintetizados de nanopartículas poliméricas de quitosano cargadas con MSA en frascos de vidrio (15 frascos por lote). Un frasco representa una muestra.
2. *Rotulado.*

El rotulado constará de dos partes:

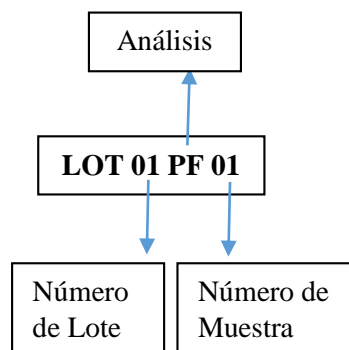
- La primera que corresponde al **número de lote**, representada por las siglas LOT y el número de lote que corresponda.
- La segunda que corresponde al **tipo de análisis** al que será destinada la muestra, representado por las siglas del análisis y el número de muestra que corresponda.

Teniendo en cuenta los ensayos que se realizarán se asignaron las siguientes siglas para el rotulado de las muestras. Consultar Tabla 3.

Tabla 1

Análisis	Siglas
Determinación de Parámetros Físicos	PF
Determinación de la Eficiencia de Encapsulación	EE
Determinación de la Actividad Antifúngica	AAF
Estimación del Perfil de Liberación de NO	LIB

A continuación un esquema ejemplificando el rotulado de la muestra N°01 del Lote N° 01 para el análisis de Determinación de Parámetros Físicos.



En la siguiente tabla se encuentra la distribución de todas las muestras de los tres lotes sintetizados en este trabajo y que serán utilizadas en los análisis comentados.

Análisis	N° de Frascos	LOTE 01			LOTE 02			LOTE 03		
Determinación de Parámetros Físicos	09	LOT01PF01	LOT01PF02	LOT01PF03.	LOT02PF01	LOT02PF02	LOT02PF03	LOT03PF01	LOT03PF02	LOT03PF03
Determinación de Eficiencia de Encapsulación	09	LOT01EE01	LOT01EE02	LOT01EE03	LOT02EE01	LOT02EE02	LOT02EE03	LOT03EE01	LOT03EE02	LOT03EE03
Determinación de Actividad Antifúngica	09	LOT01AAF01	LOT01AAF02	LOT01AAF03	LOT02AAF01	LOT02AAF02	LOT02AAF03	LOT03AAF01	LOT03AAF02	LOT03AAF03
Estimación del Perfil de Liberación de NO	09	LOT01LIB01	LOT01LIB02	LOT01LIB03	LOT02LIB01	LOT02LIB02	LOT02LIB03	LOT03LIB01	LOT03LIB02	LOT03LIB03

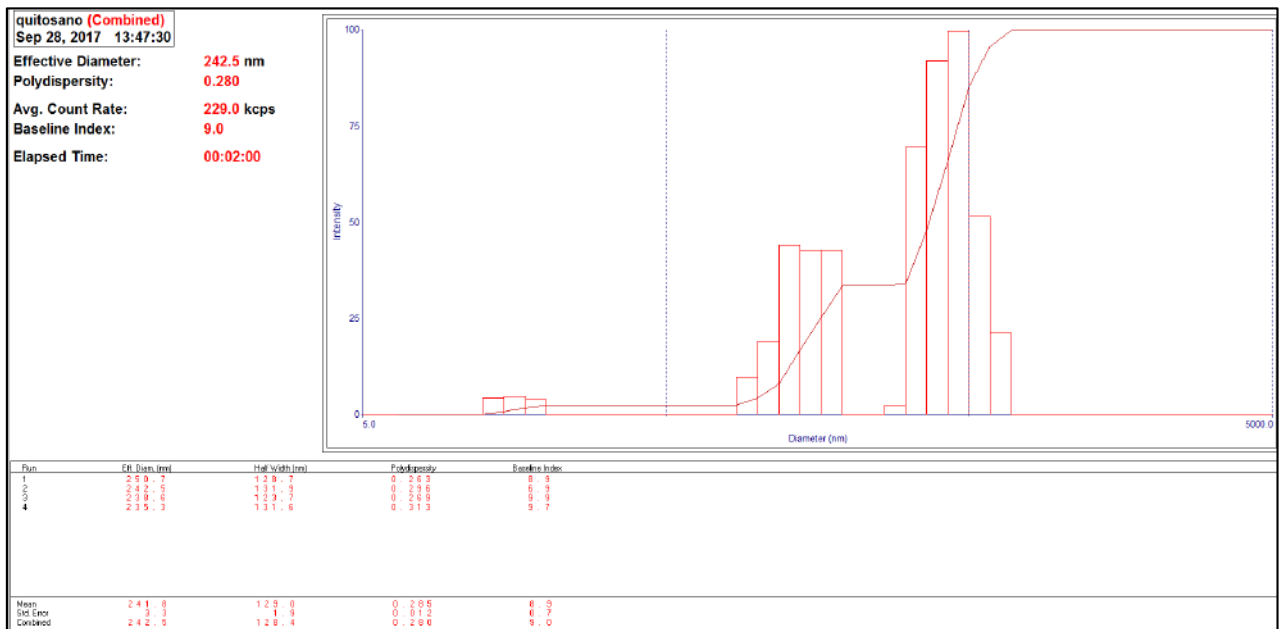
ANEXO 08

**FORMATO DE ANÁLISIS DE PARÁMETROS FÍSICOS DE NANOPARTÍCULAS
POLIMÉRICAS DE QUITOSANO CARGADAS CON ÁCIDO MERCAPTOSUCCÍNICO**

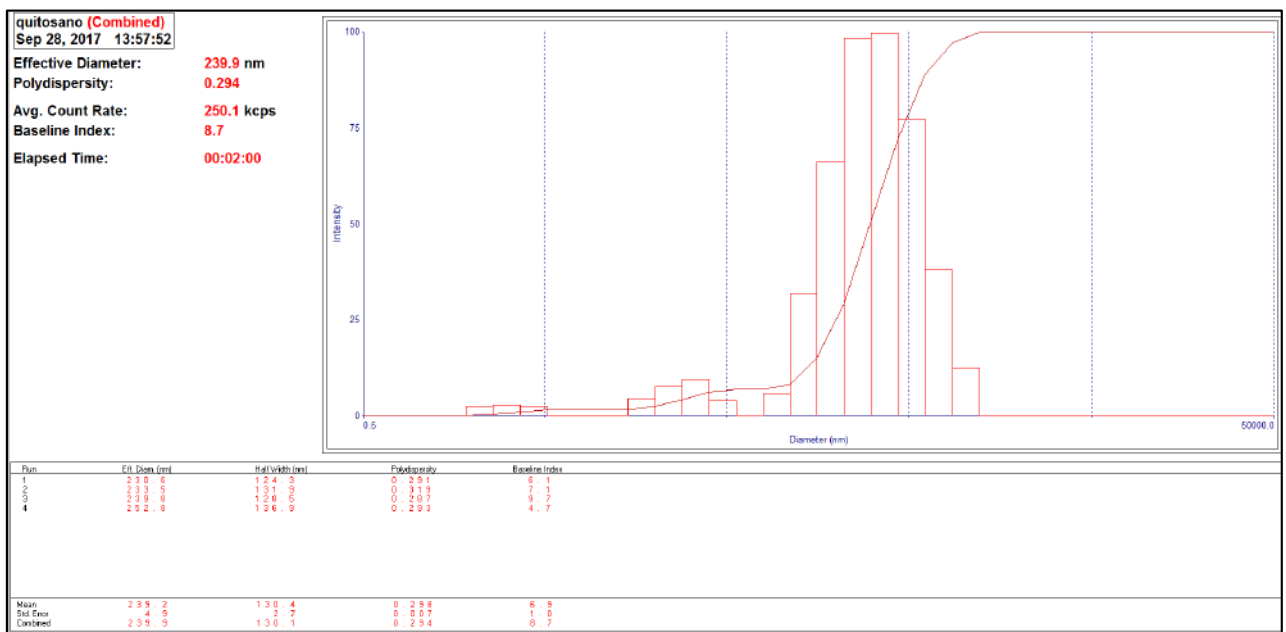
Análisis: Determinación del diámetro efectivo en nanómetros e índice de polidispersidad de nanopartículas poliméricas cargadas con ácido mercaptosuccínico				
Método: Dispersión de luz dinámica (Nanobrook Zetasizer)				
ANÁLISIS DE MUESTRAS PROBLEMA				
Índice de Refracción: 1.7				
Fecha	Código de Muestra	DE (nm)	IPD	Interpretación
28/09/17	LOT01PF01	242.5	0.280	Cumple especificación
28/09/17	LOT01PF02	239.9	0.294	Cumple especificación
28/09/17	LOT01PF03	209.0	0.259	Cumple especificación
28/09/17	LOT02PF01	234.0	0.273	Cumple especificación
28/09/17	LOT02PF02	240.7	0.284	Cumple especificación
28/09/17	LOT02PF03	221.5	0.251	Cumple especificación
28/09/17	LOT03PF01	265.3	0.291	Cumple especificación
28/09/17	LOT03PF02	258.1	0.263	Cumple especificación
28/09/17	LOT03PF03	264.2	0.268	Cumple especificación
Fecha de Cierre del Registro: 28/09/17			Firma Analista: Gabriela M.	

Especificación
DE < 500 nm
IPD < 0.3

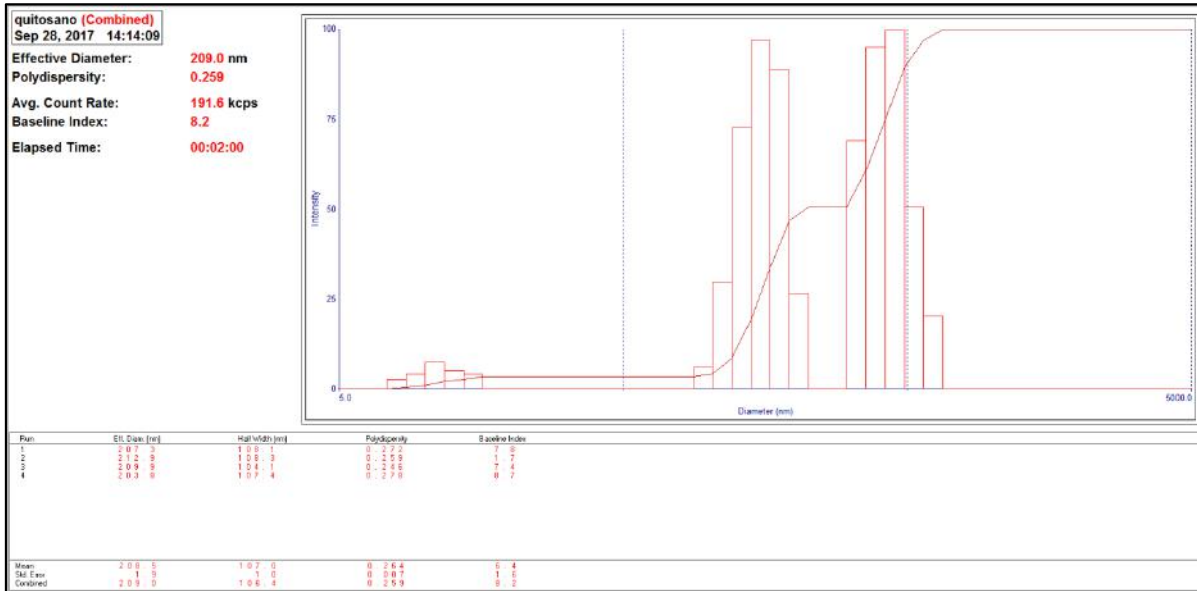
LEYENDA
DE = Diámetro efectivo
IPD = Índice de Polidispersidad



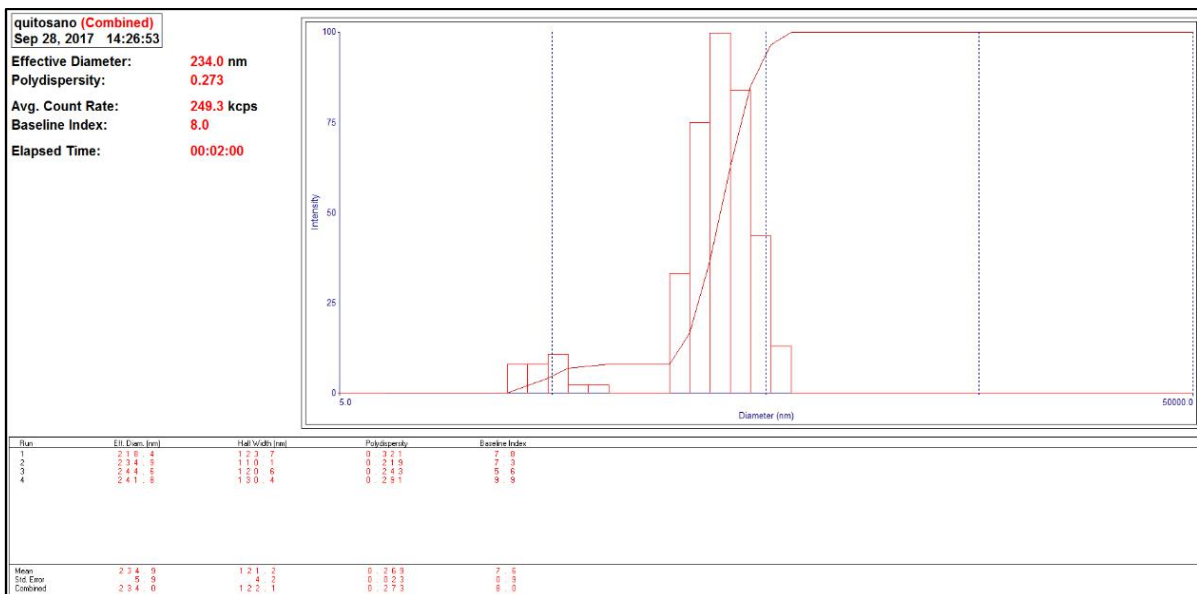
Lectura DLS 1. Muestra LOT01PF01



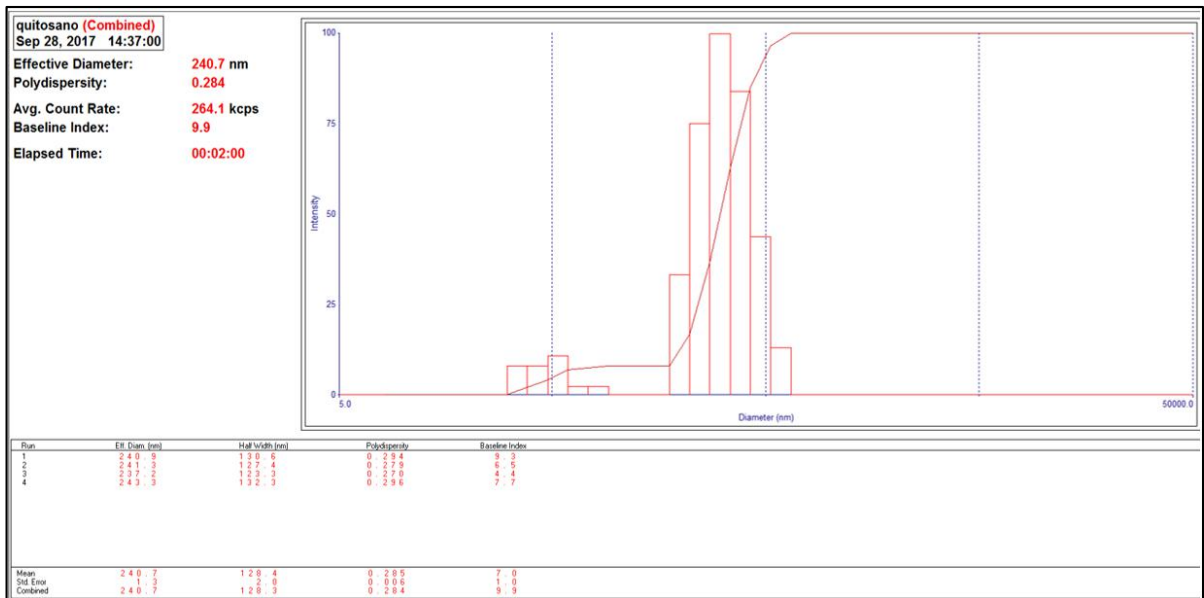
Lectura DLS 2. Muestra LOT01PF02



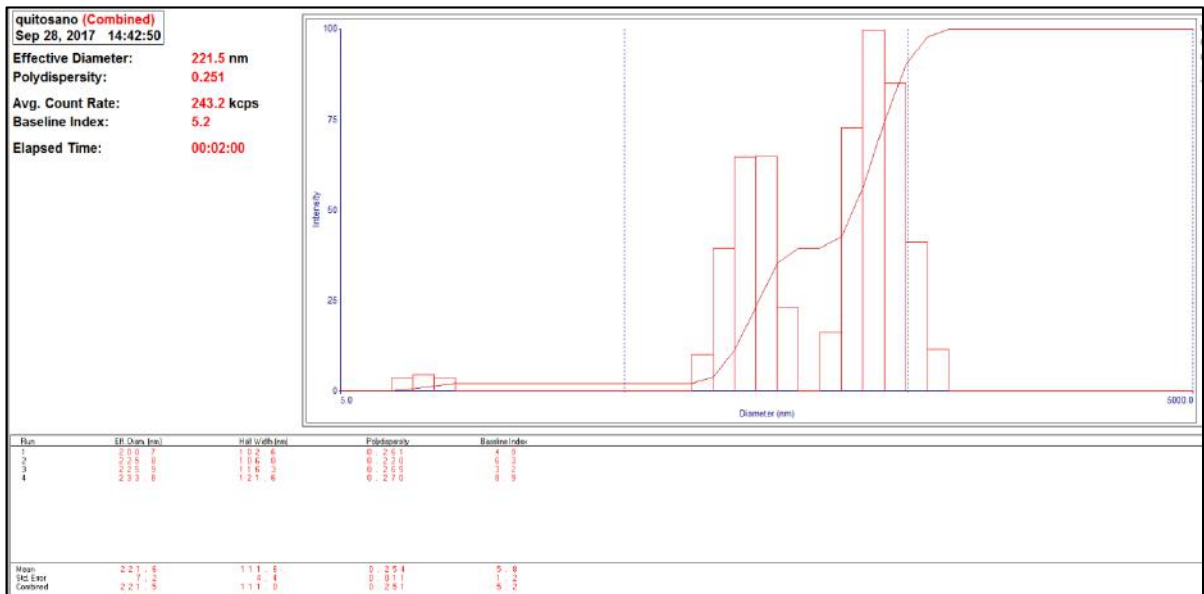
Lectura DLS 3. Muestra LOT01PF03



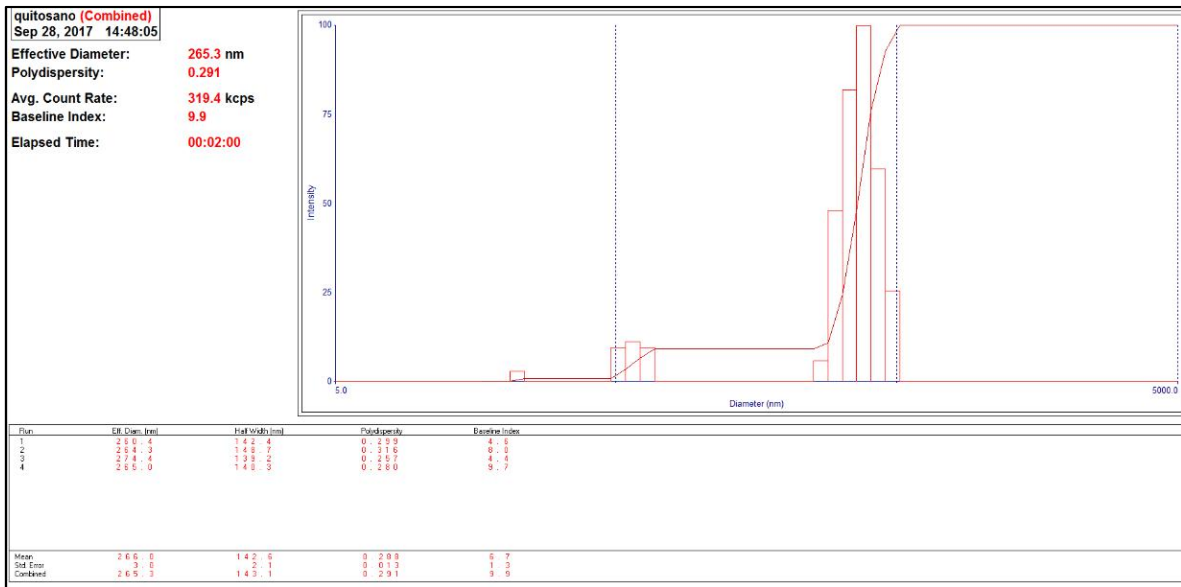
Lectura DLS 4. Muestra LOT02PF01



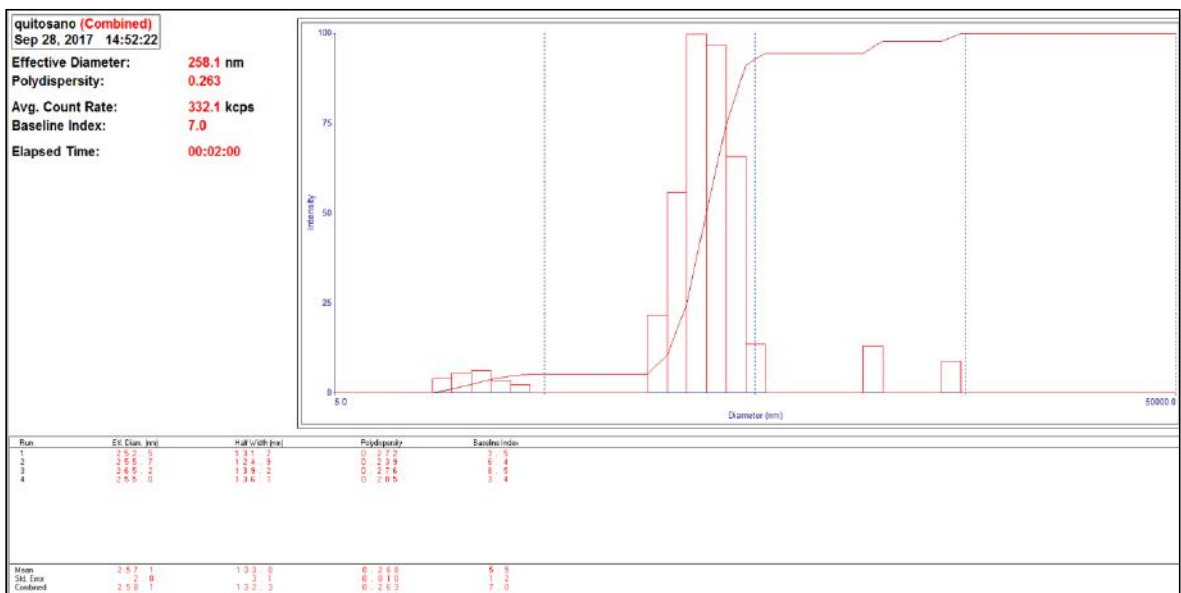
Lectura DLS 5. Muestra LOT02PF02



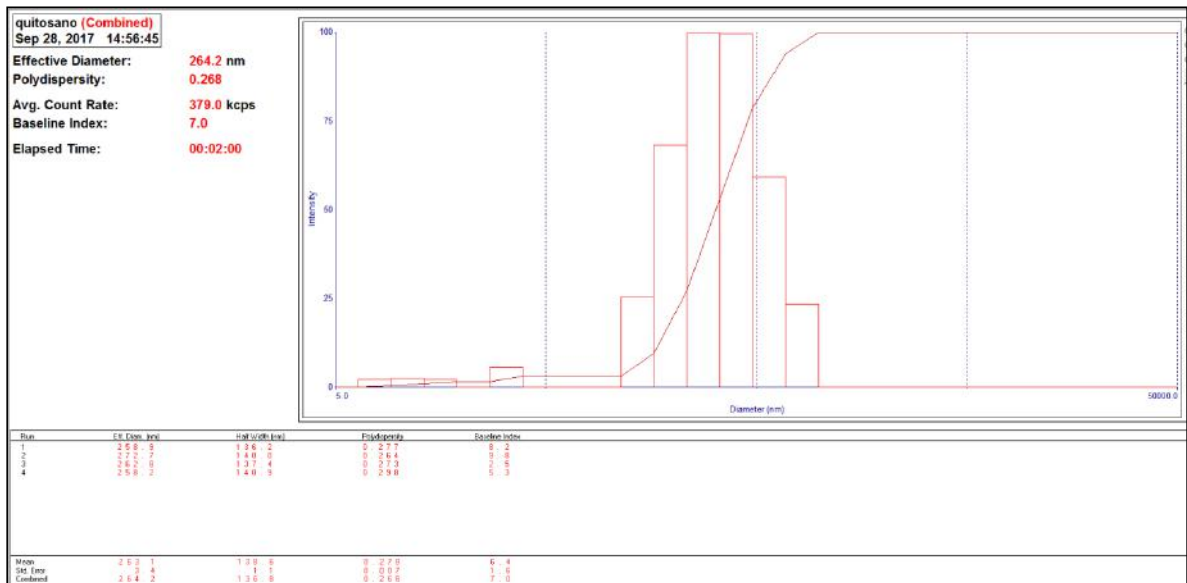
Lectura DLS 6. Muestra LOT02PF03



Lectura DLS 7. Muestra LOT03PF01



Lectura DLS 8. Muestra LOT03PF02



Lectura DLS 9. Muestra LOTE 03 PF 03

ANEXO 09



UNIVERSIDAD NACIONAL DE INGENIERÍA

Facultad de Ciencias

Lima, 15 de Diciembre del 2017

CONSTANCIA DE ANÁLISIS

Mediante el presente documento se hace constancia de la determinación del **Diámetro Efectivo** de partícula e **Índice de Polidispersión** de un total de nueve (09) muestras, análisis solicitado por la Bach. Gabriela Jesús Morón Atencio con motivos del desarrollo de su tesis de Licenciatura "Determinación de la Actividad Antifúngica de Nanopartículas Poliméricas de Quitosano cargadas con Ácido S-Nitrosomercaptosuccinico sobre *Candida albicans* y *Candida glabrata*" (Código SIDISI 100650).

Para este fin, se recurrió a la técnica de Dispersión de Luz Dinámica utilizando el analizador de partículas NanoBrook 90Plus (BrookHaven Instruments, NY) en las instalaciones de la Universidad Nacional de Ingeniería. Se adjunta la Tabla 1, donde se muestran los resultados obtenidos.


Tabla 1 Datos colectados

Determinación de Parámetros Físicos									
Muestra	LOT01 PF01	LOT01 PF02	LOT01 PF03	LOT02 PF01	LOT02 PF02	LOT02 PF03	LOT03 PF01	LOT03 PF02	LOT03 PF03
Diámetro Efectivo (DE) en nm	242.50	239.90	209.00	234.00	240.70	221.50	265.30	258.10	264.20
Índice de Polidispersión (IPD)	0.280	0.294	0.259	0.273	0.284	0.251	0.291	0.263	0.268

*Índice de Refracción = 1.7

Se emite el presente documento para los fines que se crean convenientes,

Atentamente,


Dr. Hugo Alarcón Cavero
Jefe de Laboratorio de Química Analítica e Instrumental
Facultad de Ciencias
UNI



ANEXO 10

FORMATO DE CURVA DE CALIBRACIÓN PARA LA CUANTIFICACIÓN DE ÁCIDO MERCAPTOSUCCÍNICO EN NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS DE QUITOSANO

Análisis: Determinación del contenido de ácido mercaptosuccínico en soluciones patrón y la generación de una curva de calibración.

Método: Cuantificación del producto colorimétrico del reactivo de Ellman con soluciones patrón por espectrofotometría a 412 nm.

CURVA DE CALIBRACIÓN ESTÁNDAR

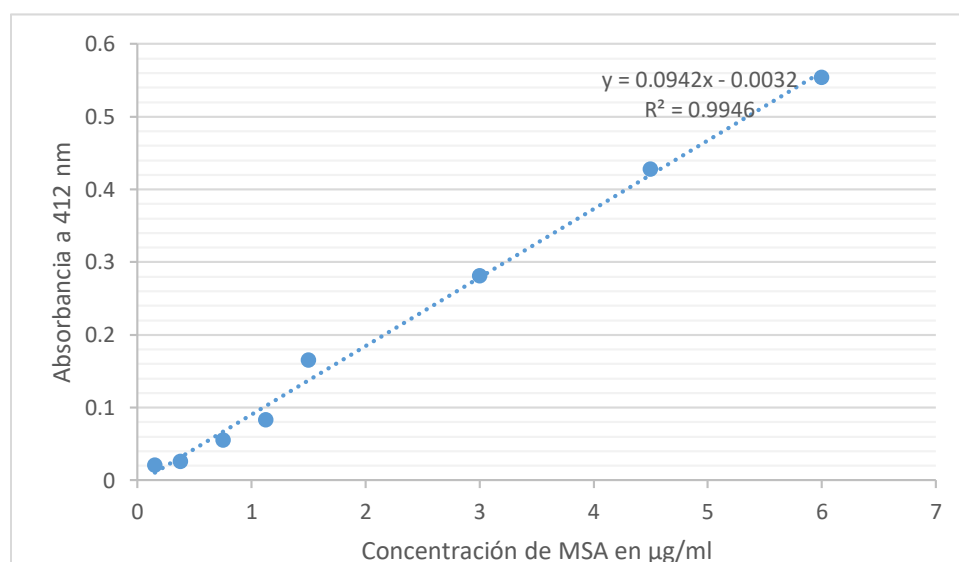
Fecha: 01/10/17

Solución Patrón	Concentración	Dilución	Absorbancia a 412 nm
	µg/ml		
A	6 µg/ml	1	0.554
B	4.5 µg/ml	1	0.428
C	3 µg/ml	1	0.281
D	1.5 µg/ml	1	0.165
E	1.125 µg/ml	1	0.083
F	0.75 µg/ml	1	0.055
G	0.375 µg/ml	1	0.026
H	0.15 µg/ml	1	0.021

Tratamiento de Datos: Uso del programa Excel 2013 para la generación de la ecuación de la recta ($y = mx + b$) y el coeficiente de correlación (r^2).

Ecuación de la recta: $y = 0.0942x - 0.0032$ $r^2 = 0.9946$

Anexo de Gráfica



Leyenda:

M= Concentración Molar µg/ml = microgramos ml= mililitros µM= micromolar
MSA= Ácido Mercaptosuccínico

Fecha de Cierre de Registro: 01/10/17

Firma Analista: Gabriela M.

ANEXO 11

**FORMATO PARA LA DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE ÁCIDO MERCAPTOSUCCÍNICO
ENCAPSULADO EN NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS DE QUITOSANO Y SU EFICIENCIA DE
ENCAPSULACIÓN.**

Análisis: Determinación del contenido de ácido mercaptosuccínico encapsulado por mililitro de solución de nanopartículas poliméricas de quitosano y la eficiencia de la encapsulación.

Método: Cuantificación del producto colorimétrico del reactivo de Ellman con las muestras problema por espectrofotometría UV a 412 nm.

ANÁLISIS DE MUESTRAS PROBLEMA

Longitud de onda: 412 nm

MSA Total	Abs	Dilución	C (en mg/mL)	
	1.486	1/2000	31.618	
	1.488	1/2000	31.660	
	1.484	1/2000	31.575	
			Promedio	31.618
Código de Muestra	Abs MSA-Libre	Dilución	Concentración en mg/mL	EE%
LOT01EE01	1.612	22/1000	0.779	97.53
LOT01EE02	1.612	22/1000	0.779	97.53
LOT01EE03	1.612	22/1000	0.779	97.53
LOT02EE01	1.664	22/1000	0.804	97.46
LOT02EE02	1.555	22/1000	0.752	97.62
LOT02EE03	1.675	22/1000	0.810	97.44
LOT03EE01	1.535	22/1000	0.742	97.65
LOT03EE02	1.658	22/1000	0.802	97.46
LOT03EE03	1.652	22/1000	0.799	97.47

Ecuación:

$$EE\% = \frac{[MSA\ Total] - [MSA\ Libre]}{[MSA\ Total]}$$

Se efectúa la conversión a mg/mL, teniendo en cuenta que el peso molecular del ácido mercaptosuccínico es **150.15 g/mol**.

Fecha de Cierre del Registro: 01/10/17

Firma Analista: Gabriela M.

Leyenda: MSA = Ácido mercaptosuccínico nm= Nanómetro EE% = Eficiencia de Encapsulación
C = Concentración mg/mL= miligramo por mililitro Abs = Absorbancia

ANEXO 12

1. FORMACIÓN DE TUBO GERMINATIVO

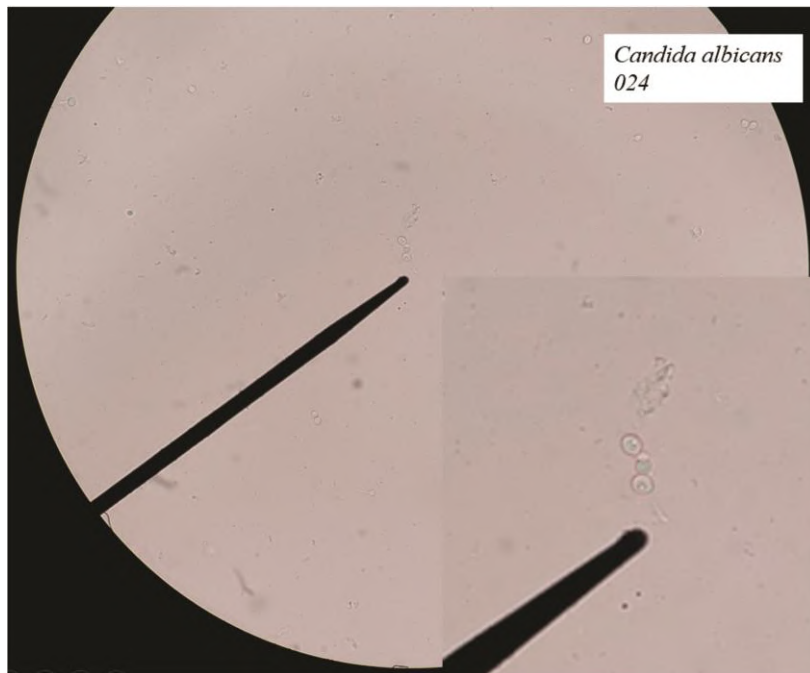


Foto 1 *Candida albicans* 024 . Tubo Germinativo. Aumento 100x

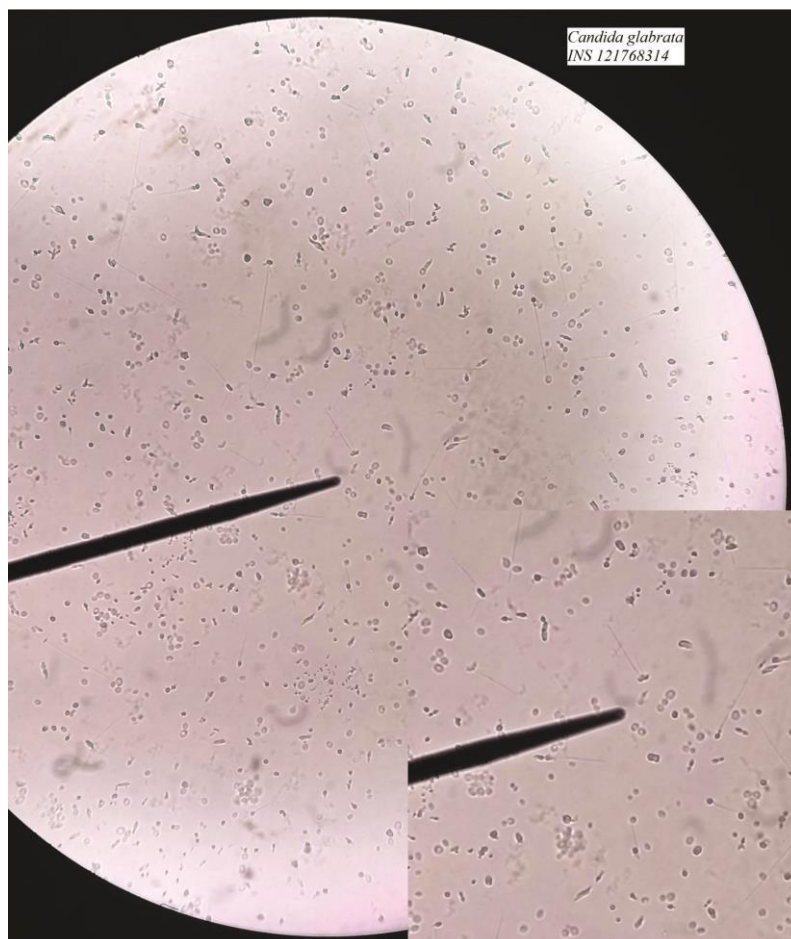


Foto 2 *Candida glabrata* INS121768314. Tubo Germinativo Aumento 100x

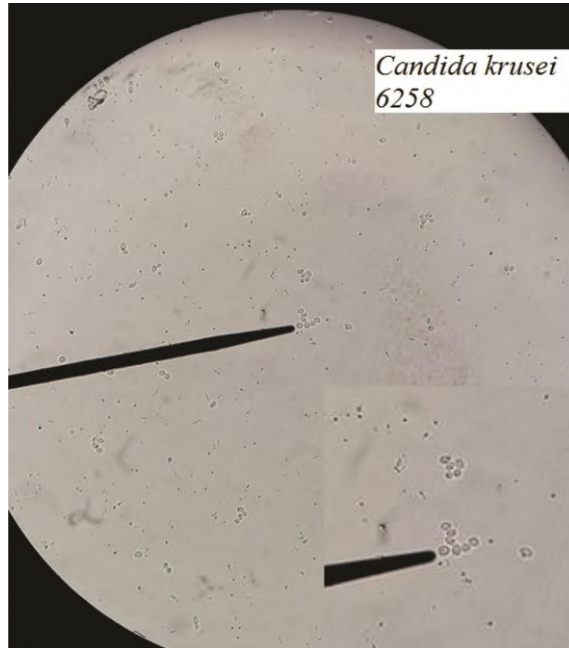


Foto 3 *Candida krusei* 6258. Tubo Germinativo. Aumento 100x

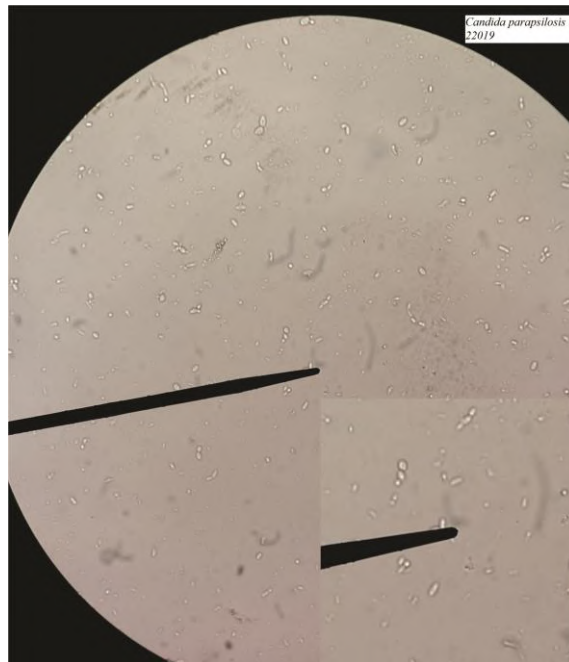


Foto 4 *Candida parapsilosis* 22019. Tubo Germinativo. Aumento 100x

2. FORMACIÓN DE CLAMIDOSPORA

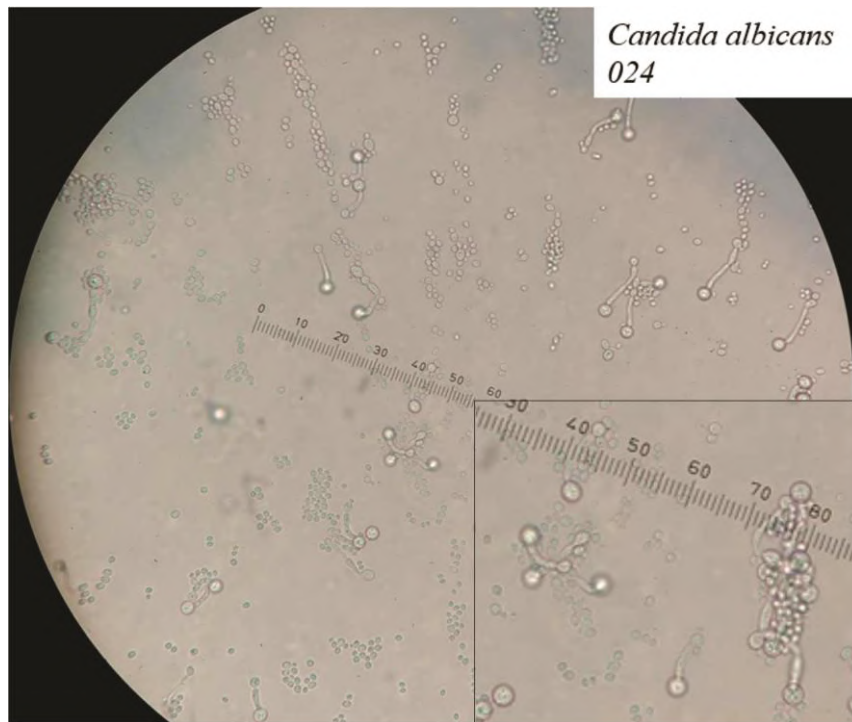


Foto 5 *Candida albicans*. Clamidospora. Aumento 100 x

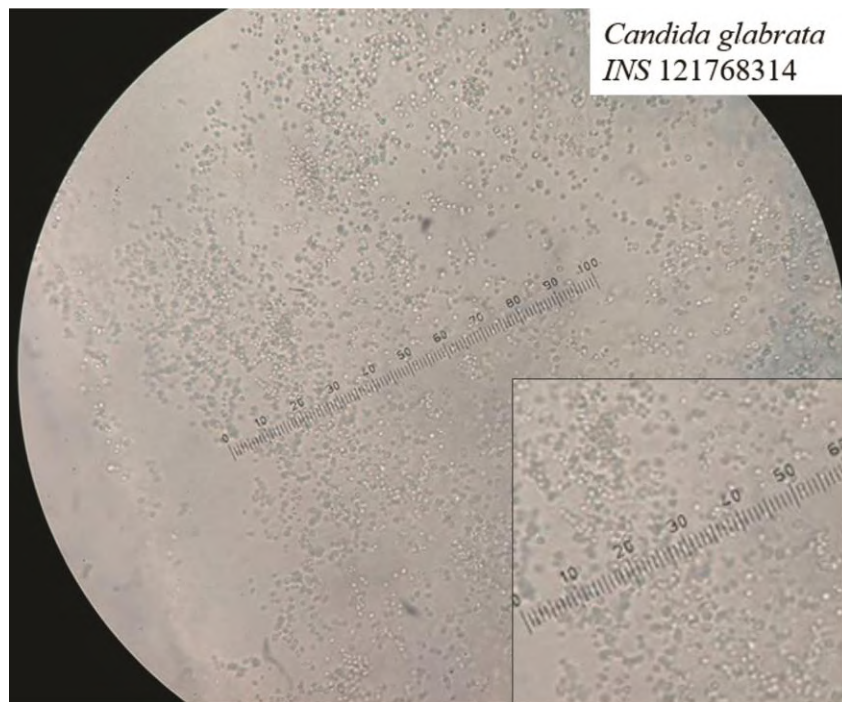


Foto 6 *Candida glabrata*. Clamidospora. Aumento 100x



Foto 7 *Candida krusei*. Clamidospora. Aumento 100 x

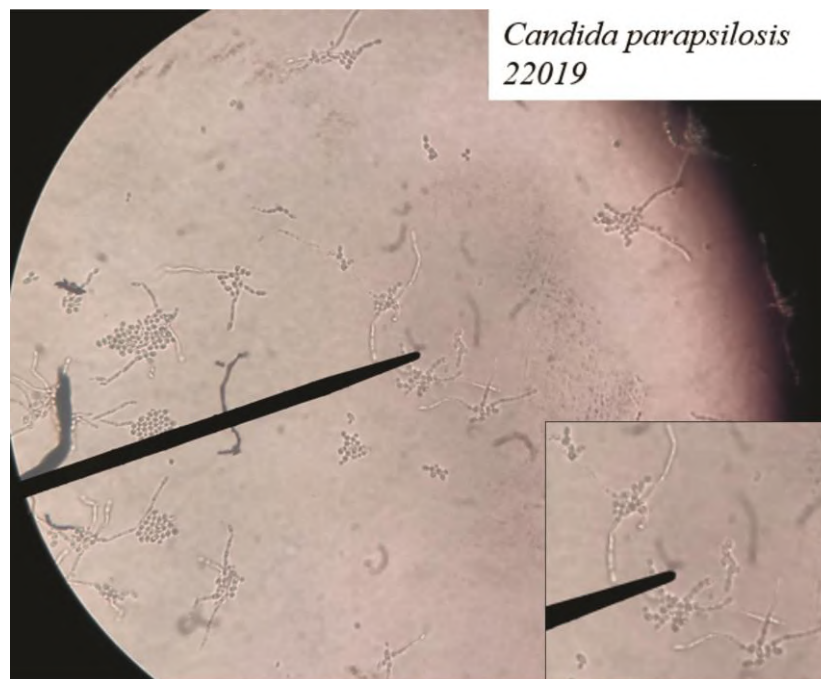


Foto 8 *Candida parapsilosis*. Clamidospora. Aumento 100x

3. CRECIMIENTO EN CHROM AGAR ®

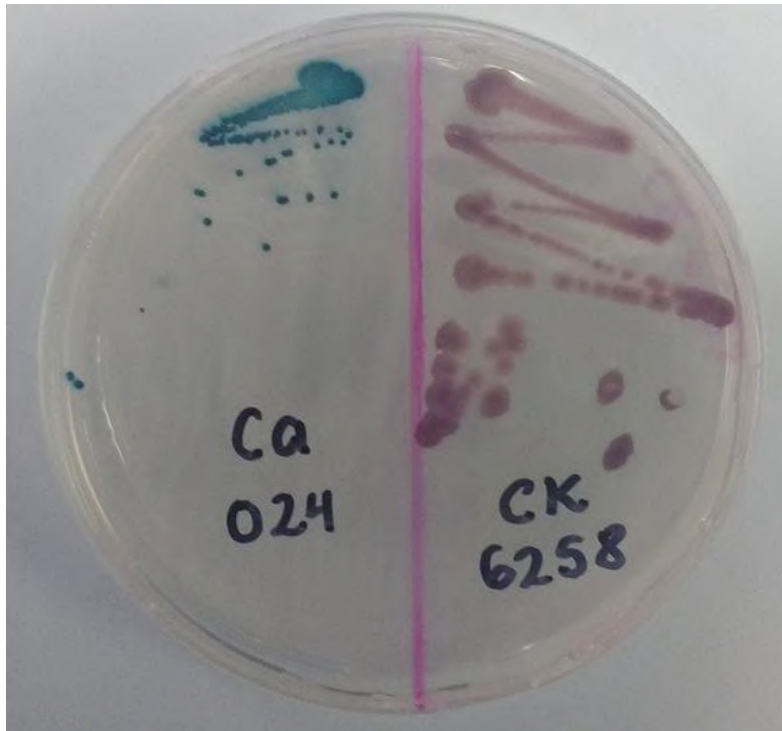


Foto 9 *Candida albicans* 024 y *Candida krusei* 6258. Placa CHROM® agar

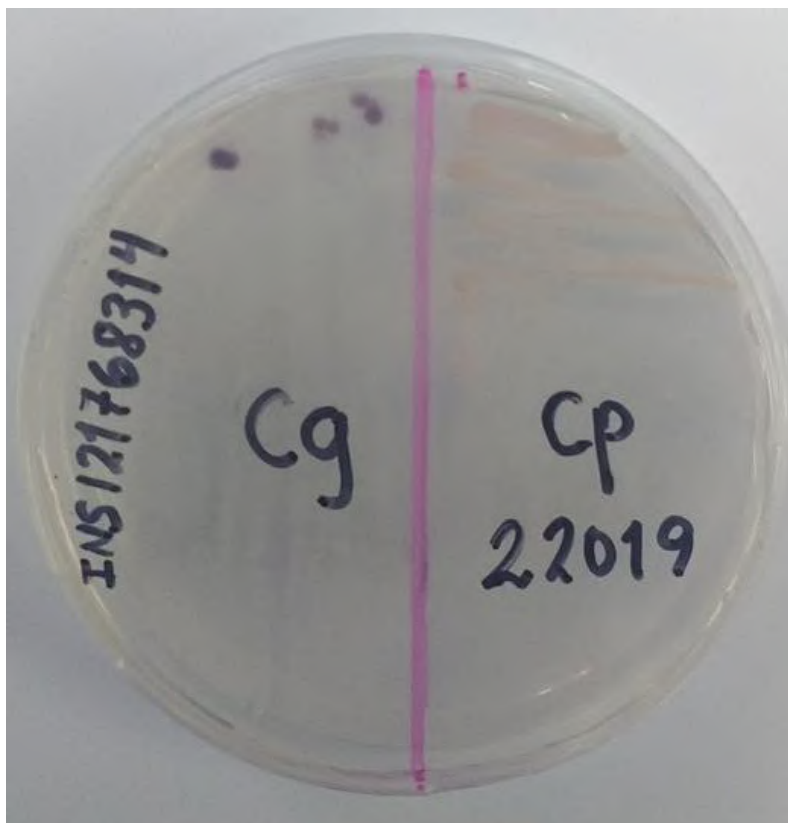


Foto 9 *Candida glabrata* INS121768314 y *Candida krusei* 6258. Placa CHROM® agar

4. DEGRADACIÓN DE UREA

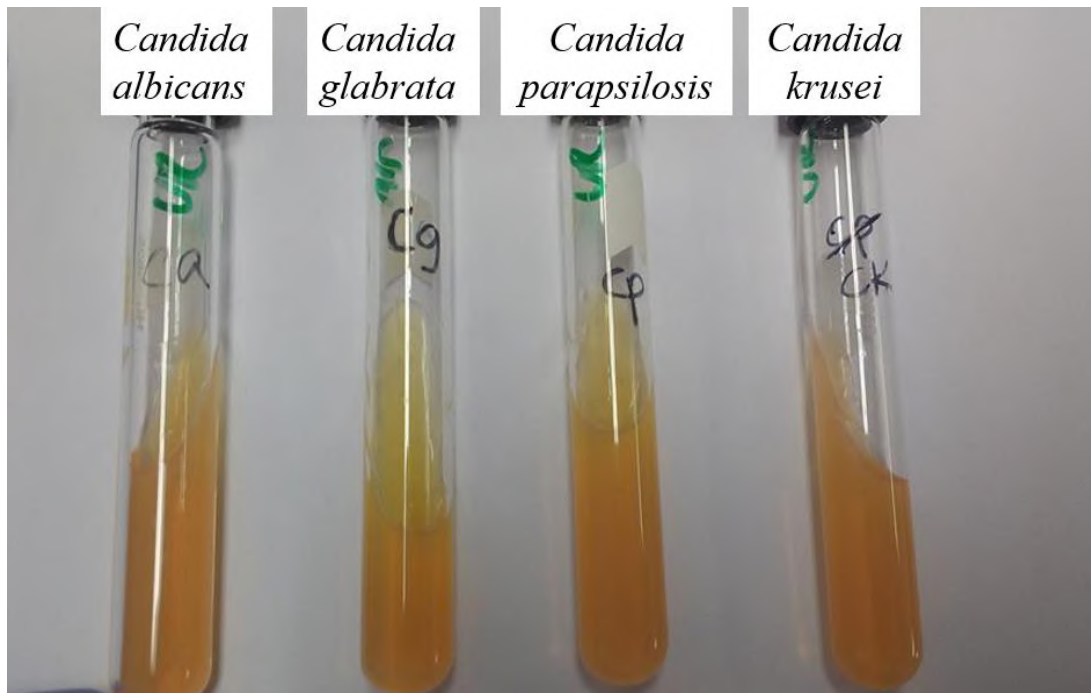


Foto 10 Tubos con Agar Urea

5. CRECIMIENTO EN AGAR MYCOSEL ®

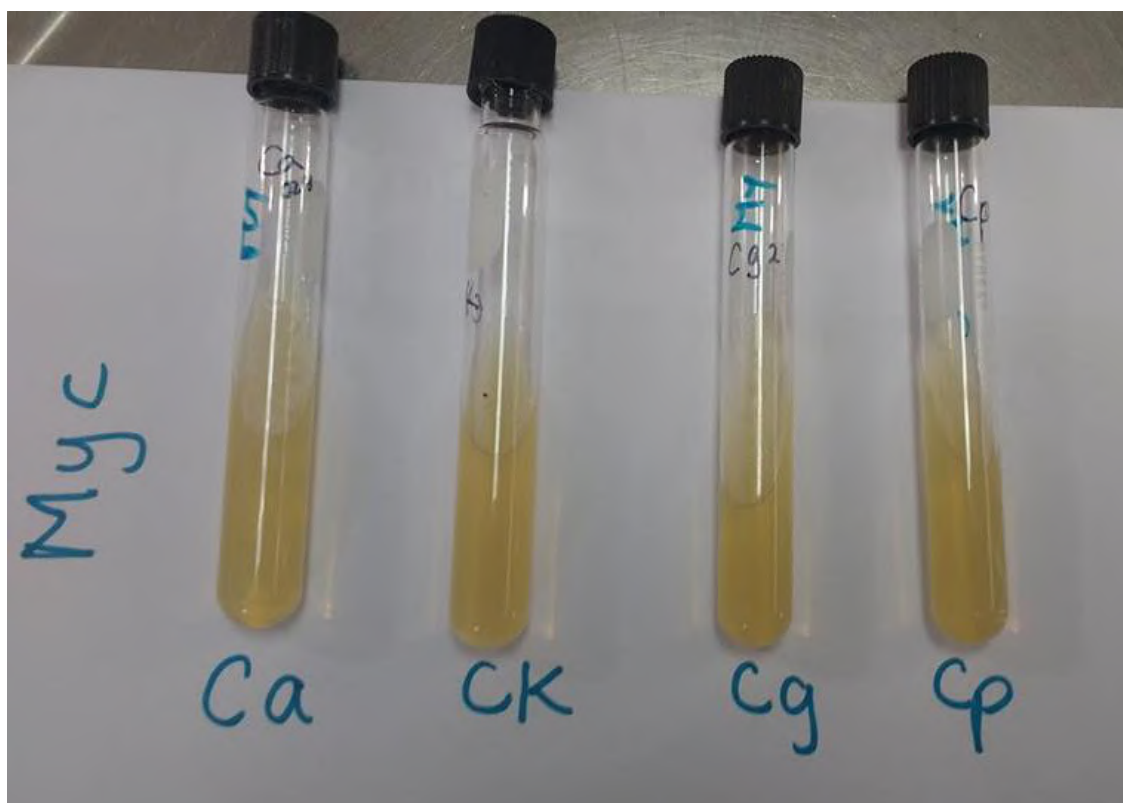


Foto 11 Tubos con Agar Mycosel ®

6. FORMACIÓN DE VELO EN CALDO SABORAUD

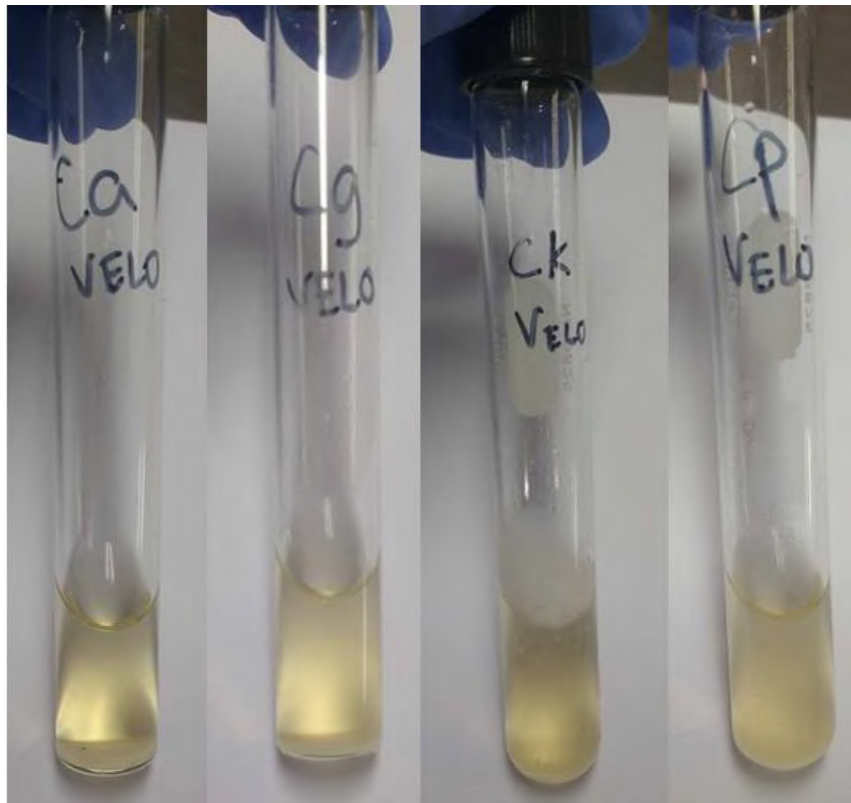


Foto 12 Tubos con Caldo Saboraud. Formación de Velo por parte de la cepa *C. krusei*

7. BIOQUÍMICA: CARBOHIDRATOS

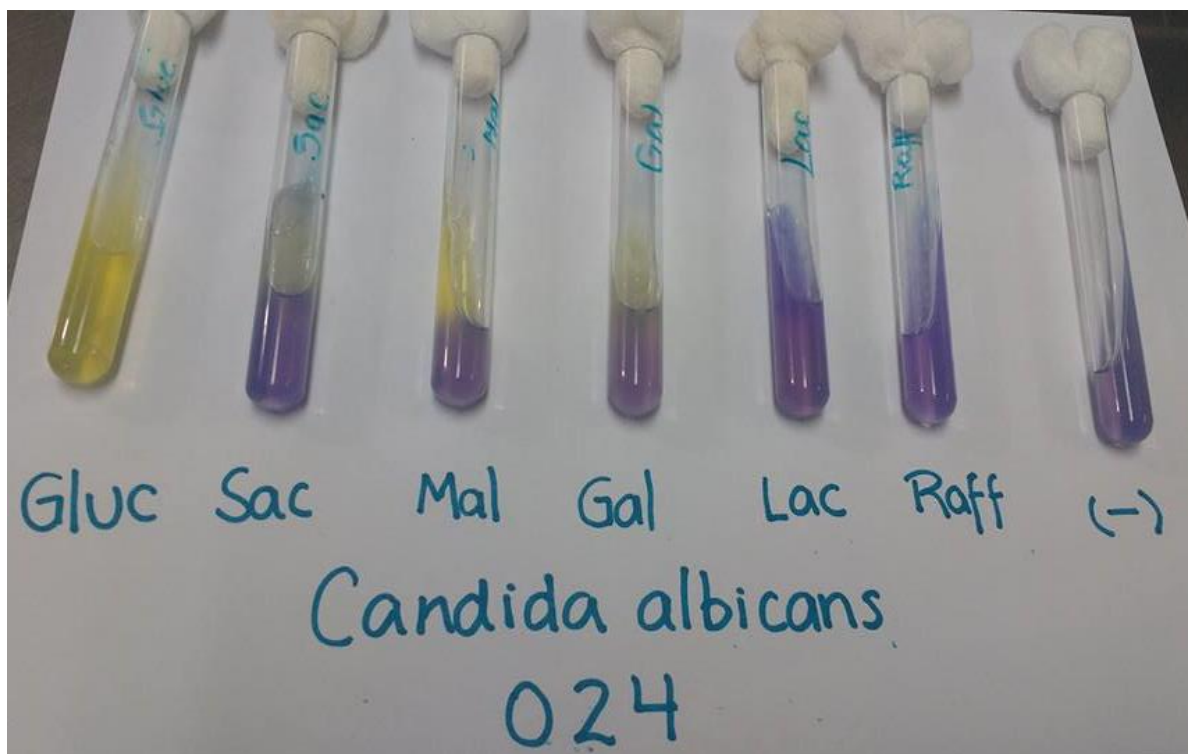


Foto 13 Tubos con carbohidratos Glucosa, Sacarosa, Maltosa, Galactosa, Lactosa y Rafinosa.
Candida albicans 024

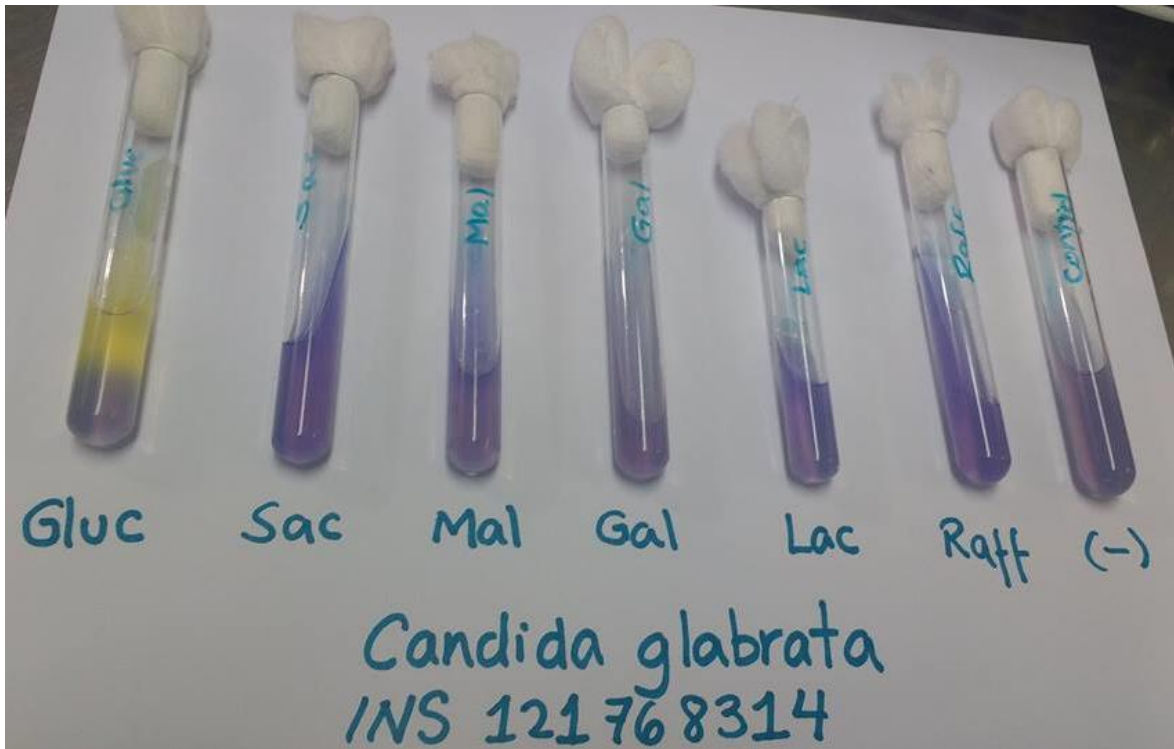


Foto 14 Tubos con carbohidratos Glucosa, Sacarosa, Maltosa, Galactosa, Lactosa y Rafinosa.
Candida glabrata INS121768314

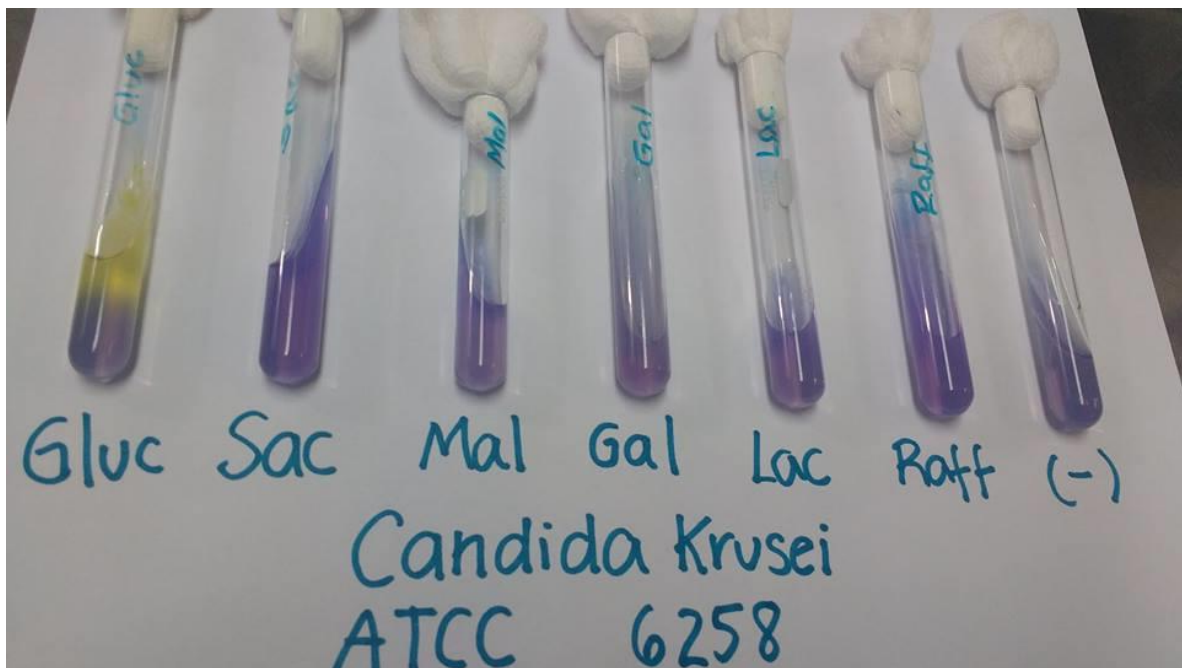


Foto 15 Tubos con carbohidratos Glucosa, Sacarosa, Maltosa, Galactosa, Lactosa y Rafinosa.
Candida krusei 6258

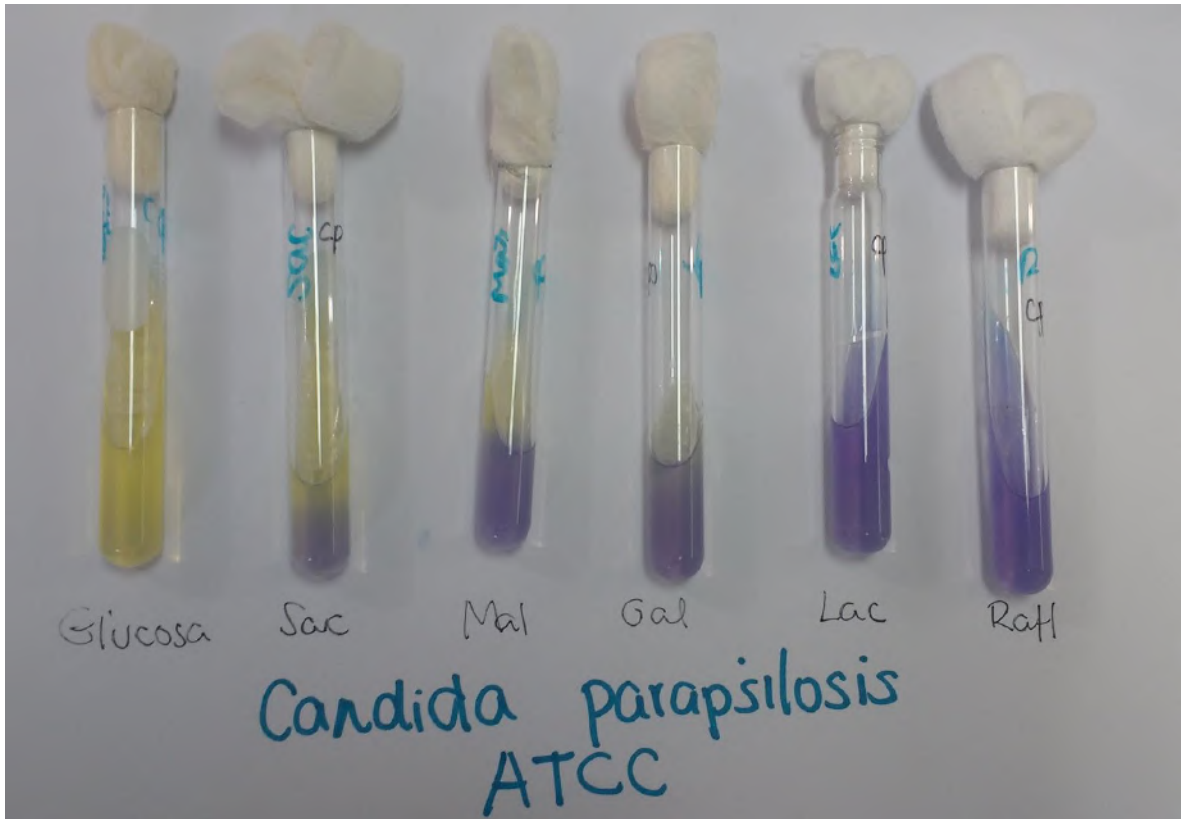


Foto 16 Tubos con carbohidratos Glucosa, Sacarosa, Maltosa, Galactosa, Lactosa y Rafinosa.
Candida parapsilosis 22019

ANEXOS 13-14

**FORMULARIO CONTROL DE LECTURA
MICRODILUCIÓN EN CALDO PARA LA DETERMINACIÓN DE CMI EN LEVADURAS**

LECTURA VISUAL M27-A3 (CLSI):													
ANTIFÚNGICO (FLUCONAZOL) / TIEMPO DE INCUBACIÓN (48 HORAS)													
CMI (µg/mL)													
N° POCILLO	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
CONCENTRACIÓN	128	64	32	16	8	4	2	1	0,5	0,25	BLANCO	CONTROL DE CRECIMIENTO	
LECTURA VISUAL (48 HORAS) (VALOR ASIGNADO)													
A	<i>C. krusei</i> ATCC 6258	0	0	1	2	3	3	4	4	4			4
B	<i>C. krusei</i> ATCC 6258	0	0	1	2	3	3	4	4	4			4
C	<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019	0	0	0	0	0	0	2	2	3			3
D	<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019	0	0	0	0	0	0	2	2	3			4
E													
F													
G													
H													

LECTURA VISUAL (VALOR ASIGNADO)

0= Ópticamente claro; **1=** Ligeramente turbio; **2=** Considerable reducción de la turbidez
3= Pequeña reducción en la turbidez; **4=** Sin reducción de la turbidez
 La CMI para AB, está definida como la menor concentración con valor 0 en la escala.
 La CMI para azólicas y CASP se define como la concentración más baja con valor 2 en la escala
ANTIFÚNGICOS: FLZ= Fluconazol, **5FC =** Fluorocitosina

Fecha de cierre del registro: 11/07/2017

**FORMULARIO CONTROL DE LECTURA
MICRODILUCIÓN EN CALDO PARA LA DETERMINACIÓN DE CMI EN LEVADURAS**

Lectura a las 24 Horas



Lectura a las 48 Horas



**FORMULARIO CONTROL DE LECTURA
MICRODILUCIÓN EN CALDO PARA LA DETERMINACIÓN DE CMI EN LEVADURAS**

LECTURA VISUAL M27-A3 (CLSI):													
ANTIFÚNGICO (VORICONAZOL) /TIEMPO DE INCUBACIÓN (48 HORAS)													
CMI (µg/mL)													
Nº POCILLO	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
CONCENTRACIÓN	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,13	0,06	0,03			
LECTURA VISUAL (48 Horas) (VALOR ASIGNADO)													
A	<i>C. krusei</i> ATCC 6258	0	0	0	0	0	0	0	2	3	4	BLANCO	CONTROL DE CRECIMIENTO
B	<i>C. krusei</i> ATCC 6258	0	0	0	0	0	0	0	2	3	4		
C	<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019	0	0	0	0	0	0	0	1	2	3		
D	<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019	0	0	0	0	0	0	0	1	2	3		
E													
F													
G													
H													
LECTURA VISUAL (VALOR ASIGNADO)													
<p>0= Ópticamente claro; 1= Ligeramente turbio; 2= Considerable reducción de la turbidez 3= Pequeña reducción en la turbidez; 4= Sin reducción de la turbidez La CIM para AB, está definida como la menor concentración con valor 0 en la escala. La CIM para azólicas y CASP se define como la concentración más baja con valor 2 en la escala ANTIFÚNGICOS: AB= Anfotericina B; CASP= Caspofungina; ITZ= Itraconazol; VZ= Voriconazol</p>													

Fecha de Cierre de Registro : 11/07/2017

**FORMULARIO CONTROL DE LECTURA
MICRODILUCIÓN EN CALDO PARA LA DETERMINACIÓN DE CMI EN LEVADURAS**

Lectura a las 24 Horas:



Lectura a las 48 Horas:



**FORMULARIO CONTROL DE LECTURA
MICRODILUCIÓN EN CALDO PARA LA DETERMINACIÓN DE CMI EN LEVADURAS**

Tabla. Intervalos de la CMI de los antifúngicos para las cepas control de calidad, obtenidas por el método de microdilución M27 – A3 según el CLSI.

	Intervalos de la CMI ($\mu\text{g/mL}$)			
	C. parapsilosis ATCC 22019		C. krusei ATCC 6258	
Antifúngico	24 h	48 h	24 h	48 h
Fluconazol	0.5 - 4	1 - 4	8-64	16 - 128
Voriconazol	0.016 – 0.12	0.03 – 0.25	0.06 – 0.5	0.12 - 1

Resultado:

Respecto al Fluconazol, se halló un CMI de 64 $\mu\text{g/mL}$ para la cepa ATCC *C. krusei* 6258, lo cual es compatible con los parámetros de calidad. Respecto a *C. parapsilosis*, los pocillos con fluconazol (4 $\mu\text{g/mL}$) se encuentran ópticamente claros, se observa la presencia de una colonia únicamente. Esto puede asociarse con un crecimiento residual característico de los fármacos tipo azoles, por lo que se señala que esta concentración es la CMI, que se encuentra dentro del rango para el control de calidad.

Por último, dado que el CMI del Voriconazol para las cepas ATCC *C. parapsilosis* 22019 y *C. krusei* 6258 es 0.25 $\mu\text{g/mL}$ y este resultado es compatible con los rangos dispuestos por el CLSI. En función a la expuesto, puede decirse que el analista ha ejecutado el método de manera favorable.

ANEXO 15

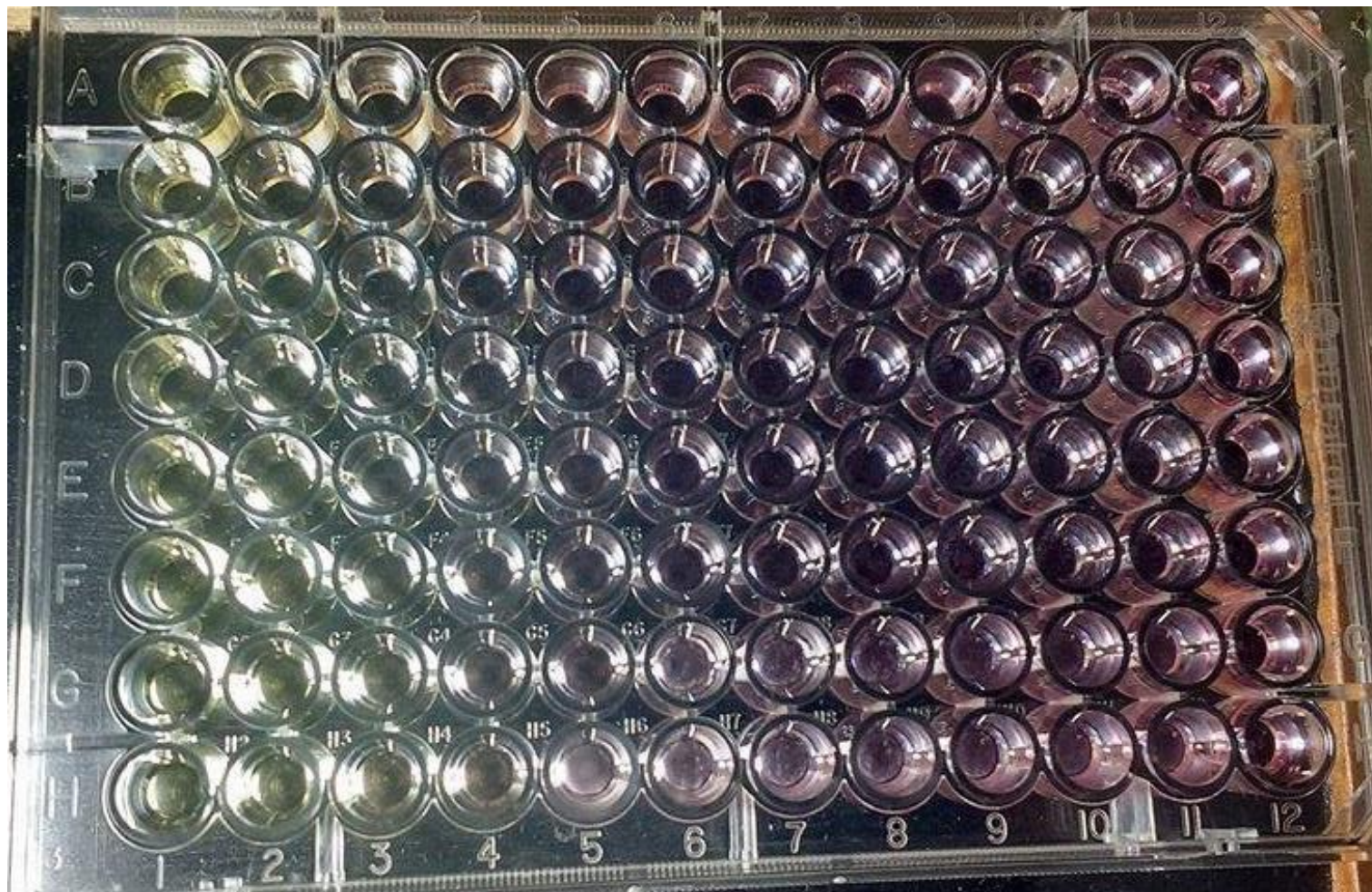
LECTURA VISUAL M27- A3 (CLSI):													
ANTIFÚNGICO/TIEMPO DE INCUBACIÓN													
CMI													
N° POCILLO	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
	MUESTRA = Acido S-nitrosomercaptosuccínico (1) / 24 HORAS												
CONCENTRACION en mg/mL	18	9	4.5	2.25	1.13	0.56	0.28	0.14	0.07	0.04			
LECTURA VISUAL (VALOR ASIGNADO)													
A	<i>C. krusei</i> ATCC 6258	0	0	0	0	0	0	0	0	3	3	CONTROL DE CRECIMIENTO	CONTROL DE ESTERILIDAD
B	<i>C. krusei</i> ATCC 6258	0	0	0	0	0	0	0	0	3	3		
C	<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019	0	0	0	0	0	0	0	0	3	3		
D	<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019	0	0	0	0	0	0	0	0	3	3		
E	<i>Candida glabrata</i> INS121768314	0	0	0	0	0	0	1	3	4	4		
F	<i>Candida glabrata</i> INS121768314	0	0	0	0	0	0	1	3	4	4		
G	<i>Candida albicans</i> 024	0	0	0	0	1	4	4	4	4	4		
H	<i>Candida albicans</i> 024	0	0	0	0	3	4	4	4	4	4		
LECTURA VISUAL (VALOR ASIGNADO)													
<p>0= Ópticamente claro; 1= Ligeramente turbio; 2= Considerable reducción de la turbidez</p> <p>3= Pequeña reducción en la turbidez; 4= Sin reducción de la turbidez</p> <p>ANTIFÚNGICOS: MSA-NO = Ácido S-nitrosomercaptosuccínico</p> <p>CMI: Concentración Mínima Inhibitoria (Verde)</p>													

LECTURA VISUAL M27-A3 (CLSI):												
ANTIFÚNGICO/TIEMPO DE INCUBACIÓN												
CMI (mg/mL)												
N° POCILLO	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	MUESTRA = Acido S-nitrosomercaptosuccínico (1) / 48 HORAS											
CONCENTRACION en mg/mL	18	9	4.5	2.25	1.13	0.56	0.28	0.14	0.07	0.04		
LECTURA VISUAL (VALOR ASIGNADO)												
A	<i>C. krusei</i> ATCC 6258											
B	<i>C. krusei</i> ATCC 6258											
C	<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019	0	0	0	0	0	0	1	2	3	3	
D	<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019	0	0	0	0	0	0	1	2	3	3	
E	<i>Candida glabrata</i> INS121768314											
F	<i>Candida glabrata</i> INS121768314											
G	<i>Candida albicans</i> 024											
H	<i>Candida albicans</i> 024											
LECTURA VISUAL (VALOR ASIGNADO)												
<p>0= Ópticamente claro; 1= Ligeramente turbio; 2= Considerable reducción de la turbidez 3= Pequeña reducción en la turbidez; 4= Sin reducción de la turbidez</p> <p>ANTIFÚNGICOS: MSA-NO = Ácido S-nitrosomercaptosuccínico</p> <p>CMI: Concentración Mínima Inhibitoria (Verde)</p>												

CONTROL DE CRECIMIENTO

CONTROL DE ESTERILIDAD

MUESTRA MSA-NO (1). LECTURA A LAS 24 HORAS



MUESTRA MSA-NO (1). LECTURA A LAS 48 HORAS



LECTURA VISUAL M27-A3 (CLSI):												
ANTIFÚNGICO/TIEMPO DE INCUBACIÓN												
CMI												
N° POCILLO	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
MUESTRA = Ácido S-nitrosomercaptosuccínico (2) / 24 HORAS												
CONCENTRACIÓN	18	9	4.5	2.25	1.13	0.56	0.28	0.14	0.07	0.04	CONTROL DE CRECIMIENTO CONTROL DE ESTERILIDAD	
LECTURA VISUAL (VALOR ASIGNADO)												
A	<i>C. krusei</i> ATCC 6258	0	0	0	0	0	0	0	0	3	3	CONTROL DE CRECIMIENTO CONTROL DE ESTERILIDAD
B	<i>C. krusei</i> ATCC 6258	0	0	0	0	0	0	0	0	3	3	
C	<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019	0	0	0	0	0	0	0	0	3	3	
D	<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019	0	0	0	0	0	0	0	0	3	3	
E	<i>Candida glabrata</i> INS121768314	0	0	0	0	0	0	2	3	4	4	
F	<i>Candida glabrata</i> INS121768314	0	0	0	0	0	0	2	3	4	4	
G	<i>Candida albicans</i> 024	0	0	0	0	2	4	4	4	4	4	
H	<i>Candida albicans</i> 024	0	0	0	0	3	4	4	4	4	4	
LECTURA VISUAL (VALOR ASIGNADO)												
<p>0= Ópticamente claro; 1= Ligeramente turbio; 2= Considerable reducción de la turbidez</p> <p>3= Pequeña reducción en la turbidez; 4= Sin reducción de la turbidez</p> <p>ANTIFÚNGICOS: MSA-NO = Ácido S-nitrosomercaptosuccínico</p> <p>CMI: Concentración Mínima Inhibitoria (Verde)</p>												

LECTURA VISUAL M27-A3 (CLSI):												
ANTIFÚNGICO/TIEMPO DE INCUBACIÓN												
CMI												
N° POCILLO	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	MUESTRA = Ácido S-nitrosomercaptosuccínico (2) / 48 HORAS											
CONCENTRACIÓN	18	9	4.5	2.25	1.13	0.56	0.28	0.14	0.07	0.04		
LECTURA VISUAL (VALOR ASIGNADO)												
A	<i>C. krusei</i> ATCC 6258											
B	<i>C. krusei</i> ATCC 6258											
C	<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019	0	0	0	0	0	0	1	2	3	3	
D	<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019	0	0	0	0	0	0	1	2	3	3	
E	<i>Candida glabrata</i> INS121768314											
F	<i>Candida glabrata</i> INS121768314											
G	<i>Candida albicans</i> 024											
H	<i>Candida albicans</i> 024											
LECTURA VISUAL (VALOR ASIGNADO)												
<p>0= Ópticamente claro; 1= Ligeramente turbio; 2= Considerable reducción de la turbidez</p> <p>3= Pequeña reducción en la turbidez; 4= Sin reducción de la turbidez</p> <p>ANTIFÚNGICOS: MSA-NO = Ácido S-nitrosomercaptosuccínico</p> <p>CMI: Concentración Mínima Inhibitoria (Verde)</p>												

CONTROL DE CRECIMIENTO

CONTROL DE ESTERILIDAD

MUESTRA MSA-NO (2). LECTURA A LAS 24 HORAS



MUESTRA MSA-NO (2). LECTURA A LAS 48 HORAS



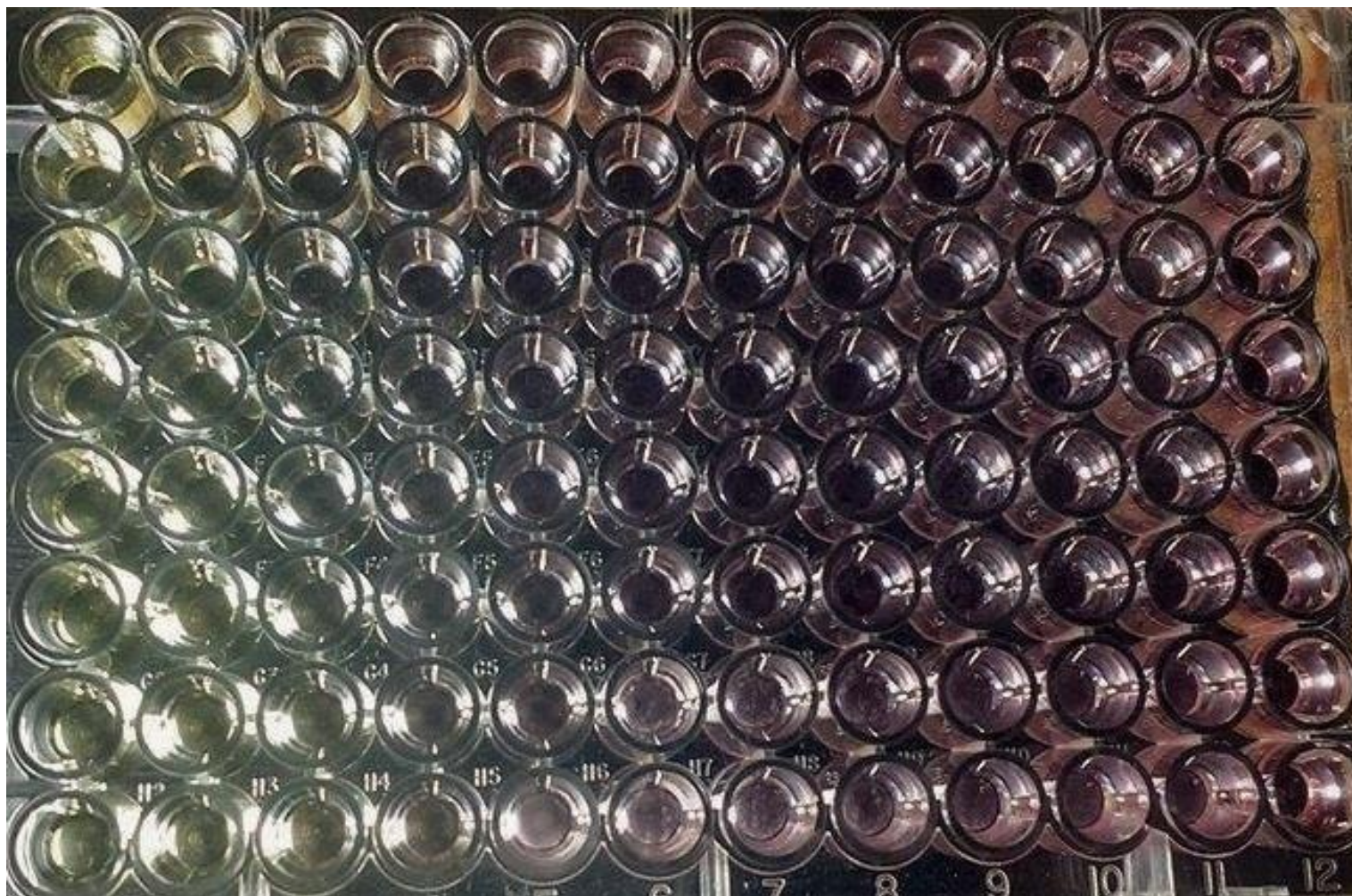
LECTURA VISUAL M27-A3 (CLSI):													
ANTIFÚNGICO/TIEMPO DE INCUBACIÓN													
CMI													
N° POCILLO	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
	MUESTRA = Ácido S-nitrosomercaptosuccínico (3) / 24 HORAS												
CONCENTRACION en mg/mL	18	9	4.5	2.25	1.13	0.56	0.28	0.14	0.07	0.04			
LECTURA VISUAL (VALOR ASIGNADO)													
A	<i>C. krusei</i> ATCC 6258	0	0	0	0	0	0	0	0	3	3	CONTROL DE CRECIMIENTO	CONTROL DE ESTERILIDAD
B	<i>C. krusei</i> ATCC 6258	0	0	0	0	0	0	0	0	3	3		
C	<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019	0	0	0	0	0	0	0	0	3	3		
D	<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019	0	0	0	0	0	0	0	0	3	3		
E	<i>Candida glabrata</i> INS121768314	0	0	0	0	0	0	1	3	4	4		
F	<i>Candida glabrata</i> INS121768314	0	0	0	0	0	0	1	3	4	4		
G	<i>Candida albicans</i> 024	0	0	0	0	3	4	4	4	4	4		
H	<i>Candida albicans</i> 024	0	0	0	0	3	4	4	4	4	4		
LECTURA VISUAL (VALOR ASIGNADO)													
<p>0= Ópticamente claro; 1= Ligeramente turbio; 2= Considerable reducción de la turbidez</p> <p>3= Pequeña reducción en la turbidez; 4= Sin reducción de la turbidez</p> <p>ANTIFÚNGICOS: MSA-NO = Ácido S-nitrosomercaptosuccínico</p> <p>CMI: Concentración Mínima Inhibitoria (Verde)</p>													

LECTURA VISUAL M27 - A3 (CLSI):												
ANTIFÚNGICO/TIEMPO DE INCUBACIÓN												
CMI												
N° POCILLO	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	MUESTRA = Ácido S-nitrosomercaptosuccínico (3) / 48 HORAS											
CONCENTRACION en mg/mL	18	9	4.5	2.25	1.13	0.56	0.28	0.14	0.07	0.04		
LECTURA VISUAL (VALOR ASIGNADO)												
A	<i>C. krusei</i> ATCC 6258											
B	<i>C. krusei</i> ATCC 6258											
C	<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019	0	0	0	0	0	0	1	1	3	3	
D	<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019	0	0	0	0	0	0	1	1	3	3	
E	<i>Candida glabrata</i> INS121768314											
F	<i>Candida glabrata</i> INS121768314											
G	<i>Candida albicans</i> 024											
H	<i>Candida albicans</i> 024											
LECTURA VISUAL (VALOR ASIGNADO)												
<p>0= Ópticamente claro; 1= Ligeramente turbio; 2= Considerable reducción de la turbidez</p> <p>3= Pequeña reducción en la turbidez; 4= Sin reducción de la turbidez</p> <p>ANTIFÚNGICOS: MSA-NO = Ácido S-nitrosomercaptosuccínico</p> <p>CMI: Concentración Mínima Inhibitoria (Verde)</p>												

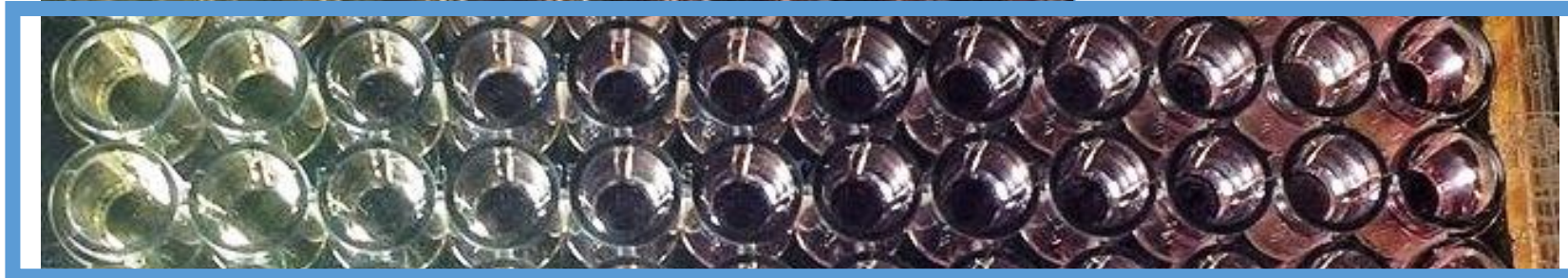
CONTROL DE CRECIMIENTO

CONTROL DE ESTERILIDAD

MUESTRA MSA-NO (3). LECTURA A LAS 24 HORAS



MUESTRA MSA-NO (3). LECTURA A LAS 48 HORAS



LECTURA VISUAL M27-A3 (CLSI):													
ANTIFÚNGICO/TIEMPO DE INCUBACIÓN													
CMI (µg/mL)													
Nº POCILLO	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
	QUITOSANO (1)/ 24 HORAS (05/10/17)												
CONCENTRACIÓN	375	187.5	93.75	46.9	23.4	11.7	5.85	2.93	1.46	0.73			
LECTURA VISUAL (VALOR ASIGNADO)													
A	<i>C. krusei</i> ATCC 6258	0	3	3	3	3	3	4	4	4	4	CONTROL DE CRECIMIENTO	CONTROL DE ESTERILIDAD
B	<i>C. krusei</i> ATCC 6258	0	3	3	3	3	3	4	4	4	4		
C	<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019	0	0	2	2	2	2	3	3	3	4		
D	<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019	0	0	2	2	2	2	3	3	3	4		
E	<i>Candida albicans</i> 024	0	2	3	3	3	3	3	3	3	3		
F	<i>Candida albicans</i> 024	0	2	3	3	3	3	3	3	3	3		
G	<i>Candida glabrata</i>	0	2	3	3	3	3	3	3	4	4		
H	<i>Candida glabrata</i>	0	2	3	3	3	3	3	3	4	4		
LECTURA VISUAL (VALOR ASIGNADO)													
<p>0= Ópticamente claro; 1= Ligeramente turbio; 2= Considerable reducción de la turbidez</p> <p>3= Pequeña reducción en la turbidez; 4= Sin reducción de la turbidez</p> <p>ANTIFÚNGICOS: Quitosano</p> <p>CMI: Concentración Mínima Inhibitoria (Verde)</p>													

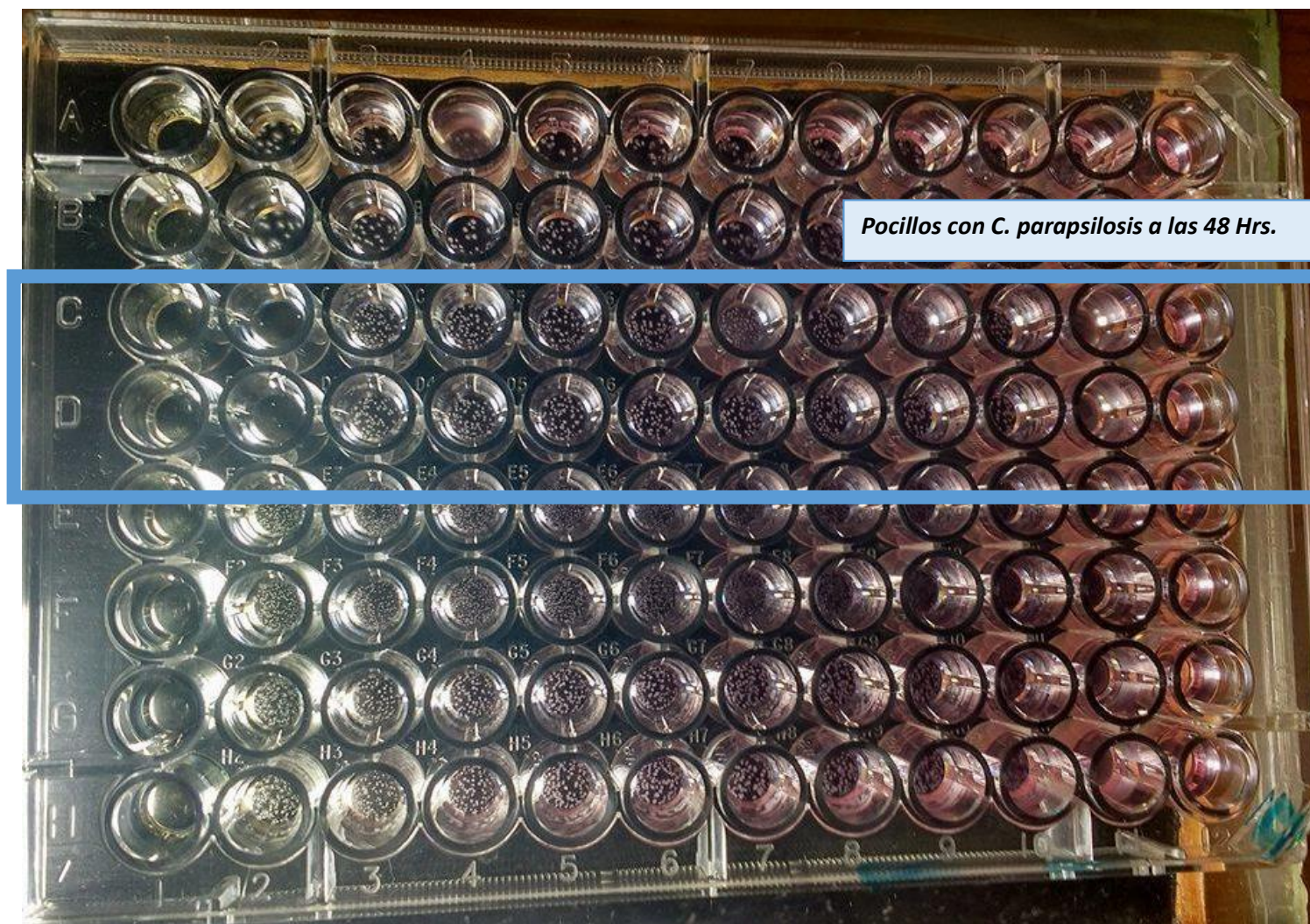
LECTURA VISUAL M27-A3 (CLSI):												
ANTIFÚNGICO/TIEMPO DE INCUBACIÓN												
CMI												
N° POCILLO	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	QUITOSANO (1)/ 48 HORAS (06/10/17)											
CONCENTRACIÓN En (µg/mL)	375	187.5	93.75	46.9	23.4	11.7	5.85	2.93	1.46	0.73		
LECTURA VISUAL (VALOR ASIGNADO)												
A	<i>C. krusei</i> ATCC 6258											
B	<i>C. krusei</i> ATCC 6258											
C	<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019	0	1	2	2	2	3	3	3	3	4	
D	<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019	0	1	2	2	2	3	3	3	3	4	
E	<i>Candida albicans</i> 024											
F	<i>Candida albicans</i> 024											
G	<i>Candida glabrata</i>											
H	<i>Candida glabrata</i>											
LECTURA VISUAL (VALOR ASIGNADO)												
0= Ópticamente claro; 1= Ligeramente turbio; 2= Considerable reducción de la turbidez												
3= Pequeña reducción en la turbidez; 4= Sin reducción de la turbidez												
ANTIFÚNGICOS: Quitosano												
CMI: Concentración Mínima Inhibitoria (Verde)												

CONTROL DE ESTERILIDAD
CONTROL DE CRECIMIENTO

MUESTRA QUITOSANO (1). LECTURA A LAS 24 HORAS



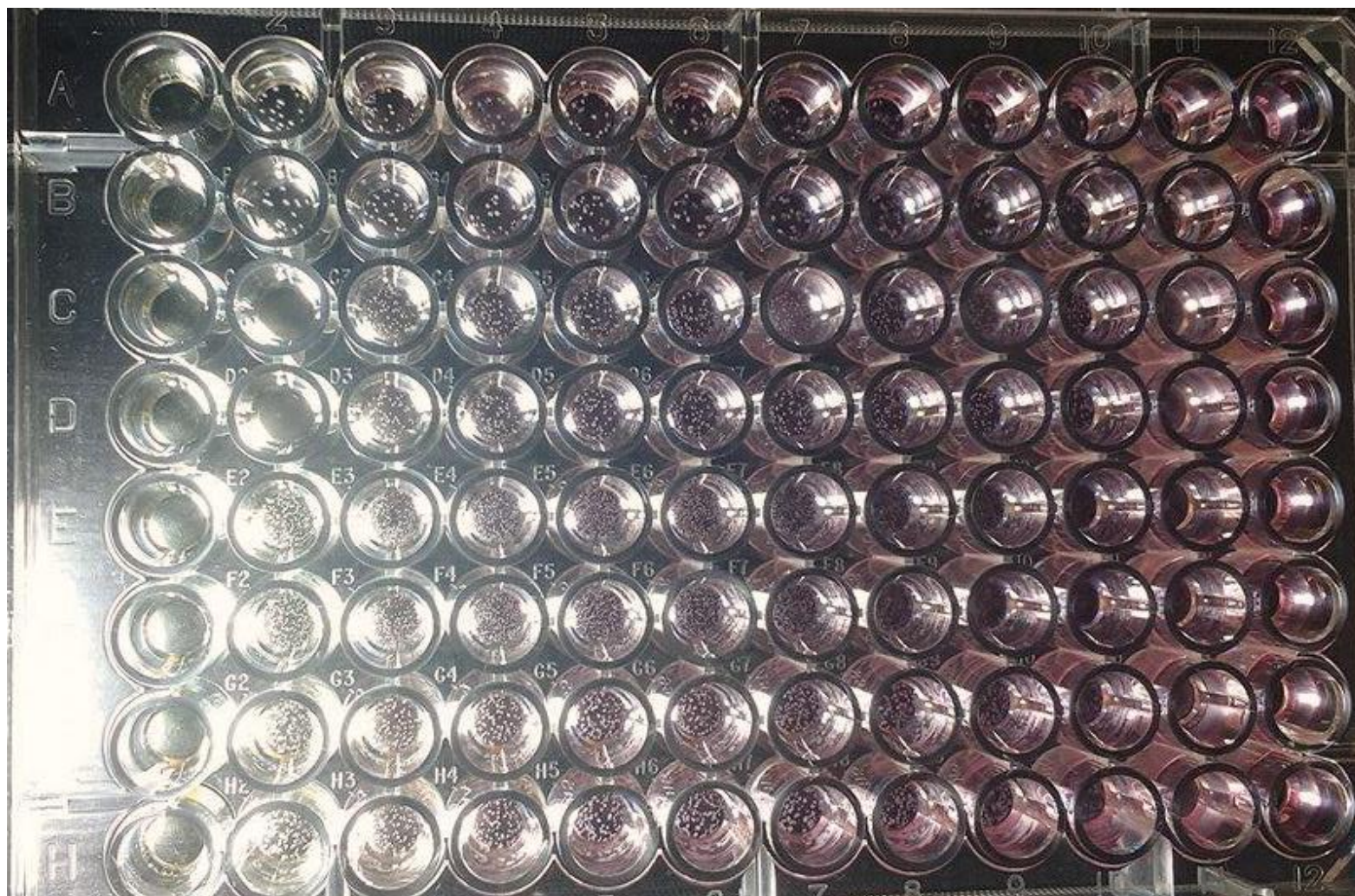
MUESTRA QUITOSANO (1) . LECTURA A LAS 48 HORAS



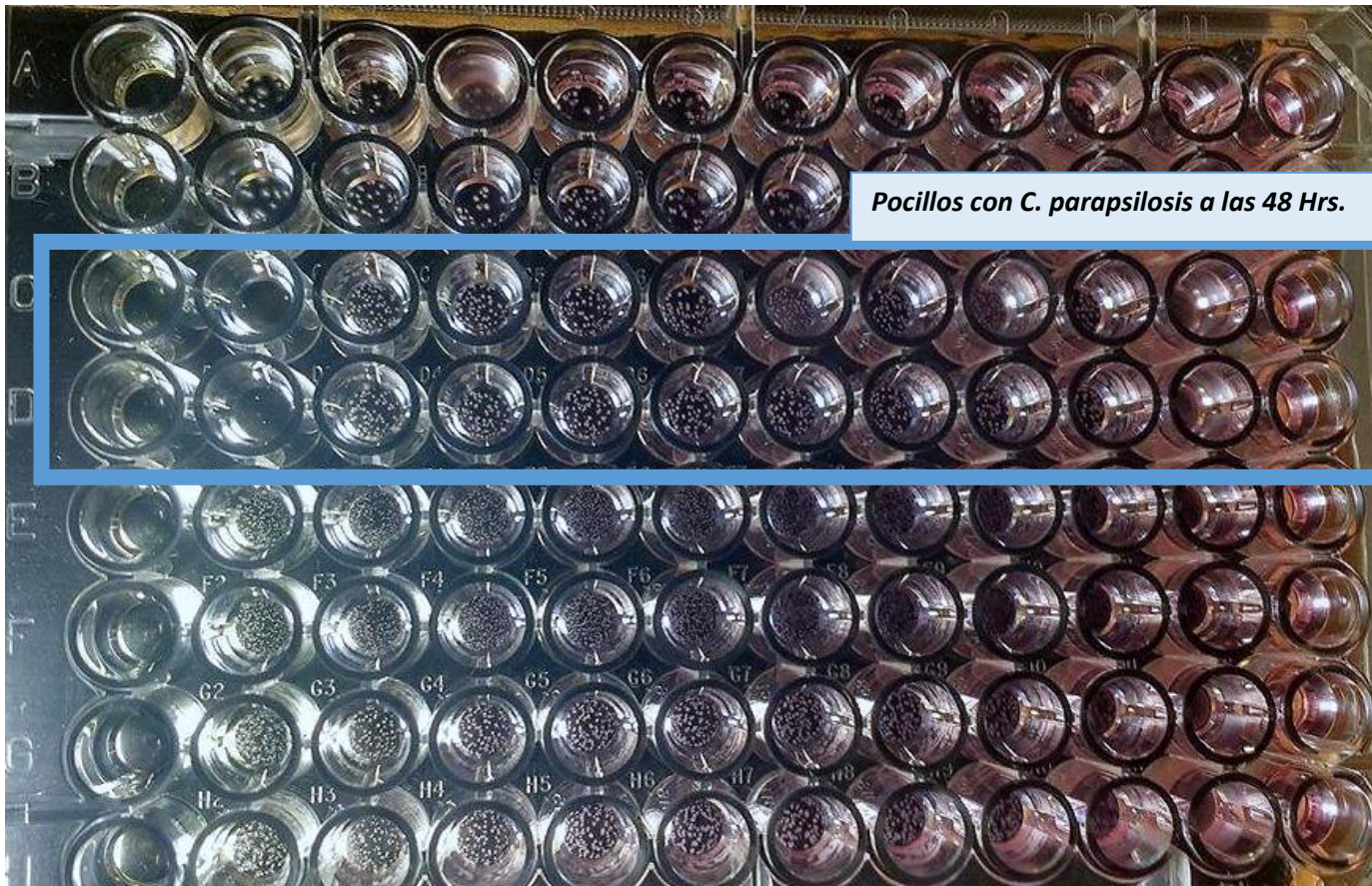
LECTURA VISUAL M27-A3 (CLSI):													
ANTIFÚNGICO/TIEMPO DE INCUBACIÓN													
	CMI												
	N° POCILLO	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	QUITOSANO (2) / 24 HORAS (05/10/17)												
	CONCENTRACION En (µg/mL)	375	187.5	93.75	46.9	23.4	11.7	5.85	2.93	1.46	0.73		
	LECTURA VISUAL (VALOR ASIGNADO)												
A	<i>C. krusei</i> ATCC 6258	0	3	3	3	3	3	4	4	4	4	CONTROL DE CRECIMIENTO	CONTROL DE ESTERILIDAD
B	<i>C. krusei</i> ATCC 6258	0	3	3	3	3	3	4	4	4	4		
C	<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019	0	0	2	2	2	2	3	3	3	4		
D	<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019	0	0	2	2	2	2	3	3	3	4		
E	<i>Candida albicans</i> 024	0	2	3	3	3	3	3	3	3	3		
F	<i>Candida albicans</i> 024	0	2	3	3	3	3	3	3	3	3		
G	<i>Candida glabrata</i>	0	2	3	3	3	3	3	3	4	4		
H	<i>Candida glabrata</i>	0	2	3	3	3	3	3	3	4	4		
LECTURA VISUAL (VALOR ASIGNADO)													
<p>0= Ópticamente claro; 1= Ligeramente turbio; 2= Considerable reducción de la turbidez</p> <p>3= Pequeña reducción en la turbidez; 4= Sin reducción de la turbidez</p> <p>ANTIFÚNGICOS: Quitosano</p> <p>CMI: Concentración Mínima Inhibitoria (Verde)</p>													

LECTURA VISUAL M27 (CLSI):														
ANTIFÚNGICO/TIEMPO DE INCUBACIÓN														
CMI														
N° POCILLO	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12		
	QUITOSANO (2) / 48 HORAS 06/10/17)													
CONCENTRACIÓN En (µg/mL)	375	187.5	93.75	46.9	23.4	11.7	5.85	2.93	1.46	0.73				
LECTURA VISUAL (VALOR ASIGNADO)														
A	<i>C. krusei</i> ATCC 6258												CONTROL DE CRECIMIENTO	CONTROL DE ESTERILIDAD
B	<i>C. krusei</i> ATCC 6258													
C	<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019	0	1	2	2	2	3	3	3	3	4			
D	<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019	0	1	2	2	2	3	3	3	3	4			
E	<i>Candida albicans</i> 024													
F	<i>Candida albicans</i> 024													
G	<i>Candida glabrata</i>													
H	<i>Candida glabrata</i>													
LECTURA VISUAL (VALOR ASIGNADO)														
0= Ópticamente claro; 1= Ligeramente turbio; 2= Considerable reducción de la turbidez														
3= Pequeña reducción en la turbidez; 4= Sin reducción de la turbidez														
ANTIFÚNGICOS: Quitosano														
CMI: Concentración Mínima Inhibitoria (Verde)														

MUESTRA QUITOSANO (2) . LECTURA A LAS 24 HORAS



MUESTRA QUITOSANO (2) . LECTURA A LAS 48 HORAS



LECTURA VISUAL M27-A3 (CLSI):													
ANTIFÚNGICO/TIEMPO DE INCUBACIÓN													
	CMI												
	N° POCILLO	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	QUITOSANO (3) / 24 HORAS (05/10/17)												
	CONCENTRACION En (µg/mL)	375	187.5	93.75	46.9	23.4	11.7	5.85	2.93	1.46	0.73		
	LECTURA VISUAL (VALOR ASIGNADO)												
A	<i>C. krusei</i> ATCC 6258	0	3	3	3	3	3	4	4	4	4	CONTROL DE CRECIMIENTO	CONTROL DE ESTERILIDAD
B	<i>C. krusei</i> ATCC 6258	0	3	3	3	3	3	4	4	4	4		
C	<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019	0	0	2	2	2	2	3	3	3	4		
D	<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019	0	0	2	2	2	2	3	3	3	4		
E	<i>Candida albicans</i> 024	0	2	3	3	3	3	3	3	3	3		
F	<i>Candida albicans</i> 024	0	2	3	3	3	3	3	3	3	3		
G	<i>Candida glabrata</i>	0	2	3	3	3	3	3	3	4	4		
H	<i>Candida glabrata</i>	0	2	3	3	3	3	3	3	4	4		
LECTURA VISUAL (VALOR ASIGNADO)													
<p>0= Ópticamente claro; 1= Ligeramente turbio; 2= Considerable reducción de la turbidez</p> <p>3= Pequeña reducción en la turbidez; 4= Sin reducción de la turbidez</p> <p>ANTIFÚNGICOS: Quitosano</p> <p>CMI: Concentración Mínima Inhibitoria (Verde)</p>													

LECTURA VISUAL M27-A3 (CLSI):												
ANTIFÚNGICO/TIEMPO DE INCUBACIÓN												
CMI												
N° POCILLO	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	QUITOSANO (3) / 48 HORAS(06/10/17)											
CONCENTRACIÓN En (µg/mL)	375	187.5	93.75	46.9	23.4	11.7	5.85	2.93	1.46	0.73		
LECTURA VISUAL (VALOR ASIGNADO)												
A	<i>C. krusei</i> ATCC 6258											
B	<i>C. krusei</i> ATCC 6258											
C	<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019	0	1	2	2	2	3	3	3	3	4	
D	<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019	0	1	2	2	2	3	3	3	3	4	
E	<i>Candida albicans</i> 024											
F	<i>Candida albicans</i> 024											
G	<i>Candida glabrata</i>											
H	<i>Candida glabrata</i>											
LECTURA VISUAL (VALOR ASIGNADO)												
<p>0= Ópticamente claro; 1= Ligeramente turbio; 2= Considerable reducción de la turbidez</p> <p>3= Pequeña reducción en la turbidez; 4= Sin reducción de la turbidez</p> <p>ANTIFÚNGICOS: Quitosano</p> <p>CMI: Concentración Mínima Inhibitoria (Verde)</p>												

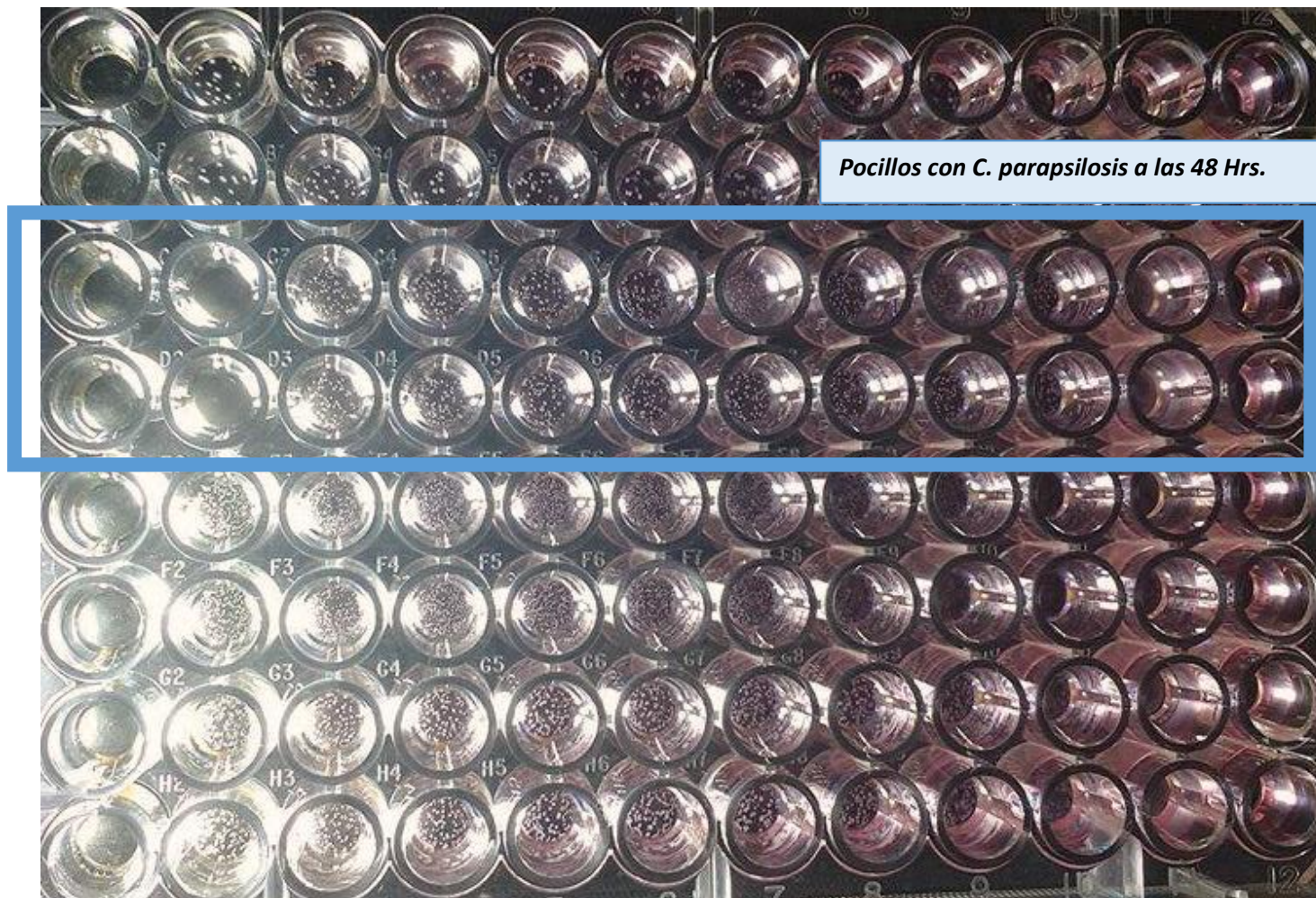
CONTROL DE CRECIMIENTO

CONTROL DE ESTERILIDAD

MUESTRA QUITOSANO (3) . LECTURA A LAS 24 HORAS



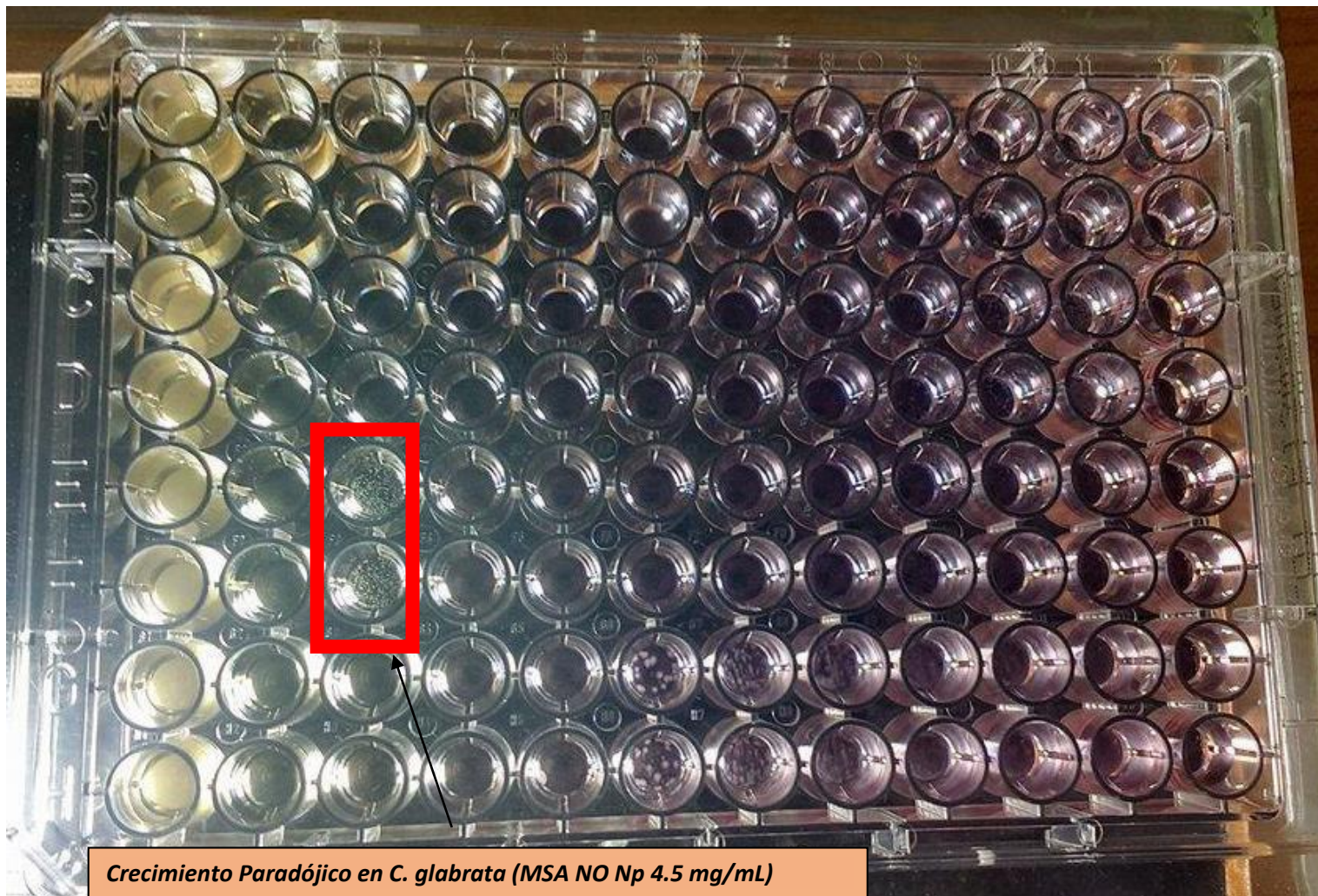
MUESTRA QUITOSANO (3) . LECTURA A LAS 48 HORAS



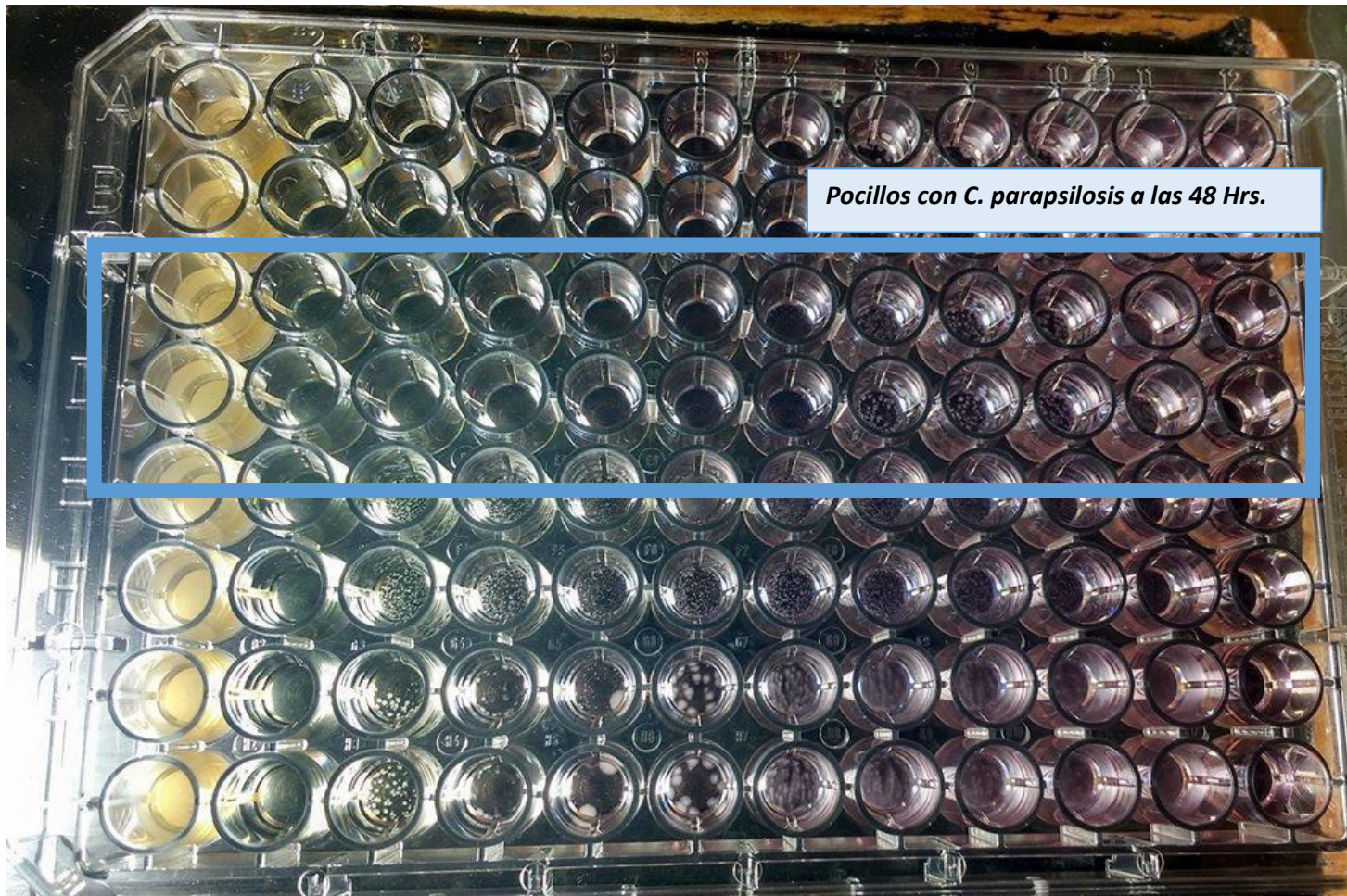
LECTURA VISUAL M27-A3 (CLSI):													
ANTIFÚNGICO/TIEMPO DE INCUBACIÓN													
CMI													
N° POCILLO	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
MUESTRA MSA-NO-Np = LOT01AAF01 / 24 HORAS (05/10/17)													
CONCENTRACIÓN en mg/mL	18	9	4.5	2.25	1.13	0.56	0.28	0.14	0.07	0.04			
LECTURA VISUAL (VALOR ASIGNADO)													
A	<i>C. krusei</i> ATCC 6258	0	0	0	0	0	0	0	0	1	3	CONTROL DE CRECIMIENTO	CONTROL DE ESTERILIDAD
B	<i>C. krusei</i> ATCC 6258	0	0	0	0	0	0	0	0	1	3		
C	<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019	0	0	0	0	0	0	0	0	2	3		
D	<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019	0	0	0	0	0	0	0	0	2	3		
E	<i>Candida glabrata</i> INS121768314	0	0	2	0	0	0	0	0	2	3		
F	<i>Candida glabrata</i> INS121768314	0	0	2	0	0	0	0	0	2	3		
G	<i>Candida albicans</i> 024	0	0	0	0	0	2	3	3	4	4		
H	<i>Candida albicans</i> 024	0	0	0	0	0	2	3	3	4	4		
LECTURA VISUAL (VALOR ASIGNADO)													
<p>0= Ópticamente claro; 1= Ligeramente turbio; 2= Considerable reducción de la turbidez 3= Pequeña reducción en la turbidez; 4= Sin reducción de la turbidez</p> <p>ANTIFÚNGICOS: MSA-NO-Np = Ácido S-nitrosomercaptosuccínico en Nanopartículas</p> <p>CMI: Concentración Mínima Inhibitoria (Verde)</p>													

LECTURA VISUAL M27-A3 (CLSI):												
ANTIFÚNGICO/TIEMPO DE INCUBACIÓN												
CMI												
N° POCILLO	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
MUESTRA MSA-NO-Np = LOT01AAF01 / 48 HORAS (06/10/17)												
CONCENTRACIÓN en mg/mL	18	9	4.5	2.25	1.13	0.56	0.28	0.14	0.07	0.04		
LECTURA VISUAL (VALOR ASIGNADO)												
A	<i>C. krusei</i> ATCC 6258											
B	<i>C. krusei</i> ATCC 6258											
C	<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019	0	0	0	0	0	0	1	2	3	3	
D	<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019	0	0	0	0	0	0	1	2	3	3	
E	<i>Candida glabrata</i> INS121768314											
F	<i>Candida glabrata</i> INS121768314											
G	<i>Candida albicans</i> 024											
H	<i>Candida albicans</i> 024											
LECTURA VISUAL (VALOR ASIGNADO)												
<p>0= Ópticamente claro; 1= Ligeramente turbio; 2= Considerable reducción de la turbidez</p> <p>3= Pequeña reducción en la turbidez; 4= Sin reducción de la turbidez</p> <p>ANTIFÚNGICOS: MSA-NO-Np = Ácido S-nitrosomercaptosuccínico en Nanopartículas</p> <p>CMI: Concentración Mínima Inhibitoria (Verde)</p>												

MUESTRA LOT01AAF01. LECTURA A LAS 24 HORAS



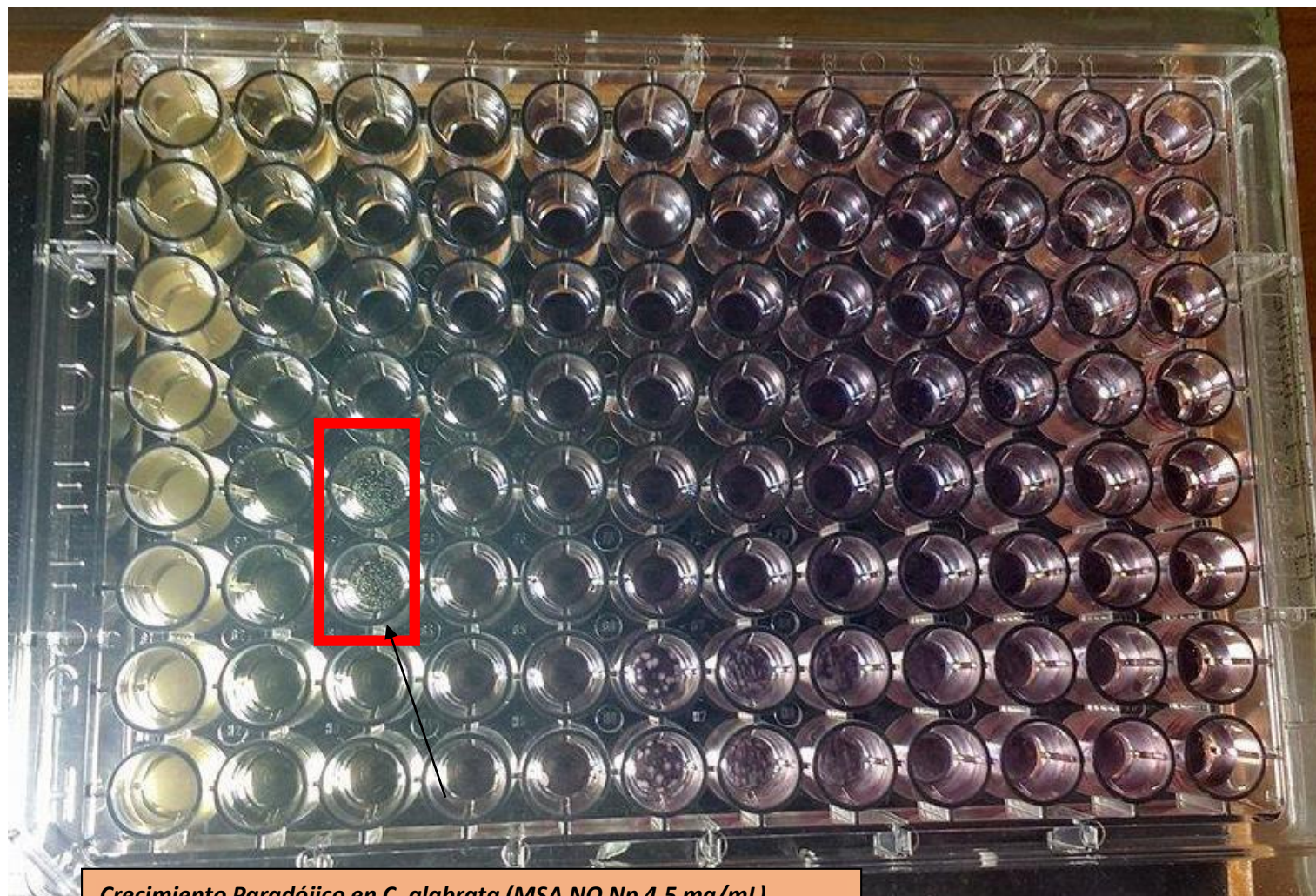
MUESTRA LOT01AAF01. LECTURA A LAS 48 HORAS



LECTURA VISUAL M27-A3 (CLSI):													
ANTIFÚNGICO/TIEMPO DE INCUBACIÓN													
CMI													
N° POCILLO	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
MUESTRA MSA-NO-Np = LOT01AAF02 / 24 HORAS (05/10/17)													
CONCENTRACION en mg/mL	18	9	4.5	2.25	1.13	0.56	0.28	0.14	0.07	0.04	CONTROL DE CRECIMIENTO CONTROL DE ESTERILIDAD		
LECTURA VISUAL (VALOR ASIGNADO)													
A	<i>C. krusei</i> ATCC 6258	0	0	0	0	0	0	0	0	1			3
B	<i>C. krusei</i> ATCC 6258	0	0	0	0	0	0	0	0	1			3
C	<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019	0	0	0	0	0	0	0	0	2			3
D	<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019	0	0	0	0	0	0	0	0	2			3
E	<i>Candida glabrata</i> INS121768314	0	0	2	0	0	0	0	0	2			3
F	<i>Candida glabrata</i> INS121768314	0	0	2	0	0	0	0	0	2			3
G	<i>Candida albicans</i> 024	0	0	0	0	0	2	3	3	4			4
H	<i>Candida albicans</i> 024	0	0	0	0	0	2	3	3	4	4		
LECTURA VISUAL (VALOR ASIGNADO)													
<p>0= Ópticamente claro; 1= Ligeramente turbio; 2= Considerable reducción de la turbidez 3= Pequeña reducción en la turbidez; 4= Sin reducción de la turbidez</p> <p>ANTIFÚNGICOS: MSA-NO-Np = Ácido S-nitrosomercaptosuccínico en Nanopartículas</p> <p>CMI: Concentración Mínima Inhibitoria (Verde)</p>													

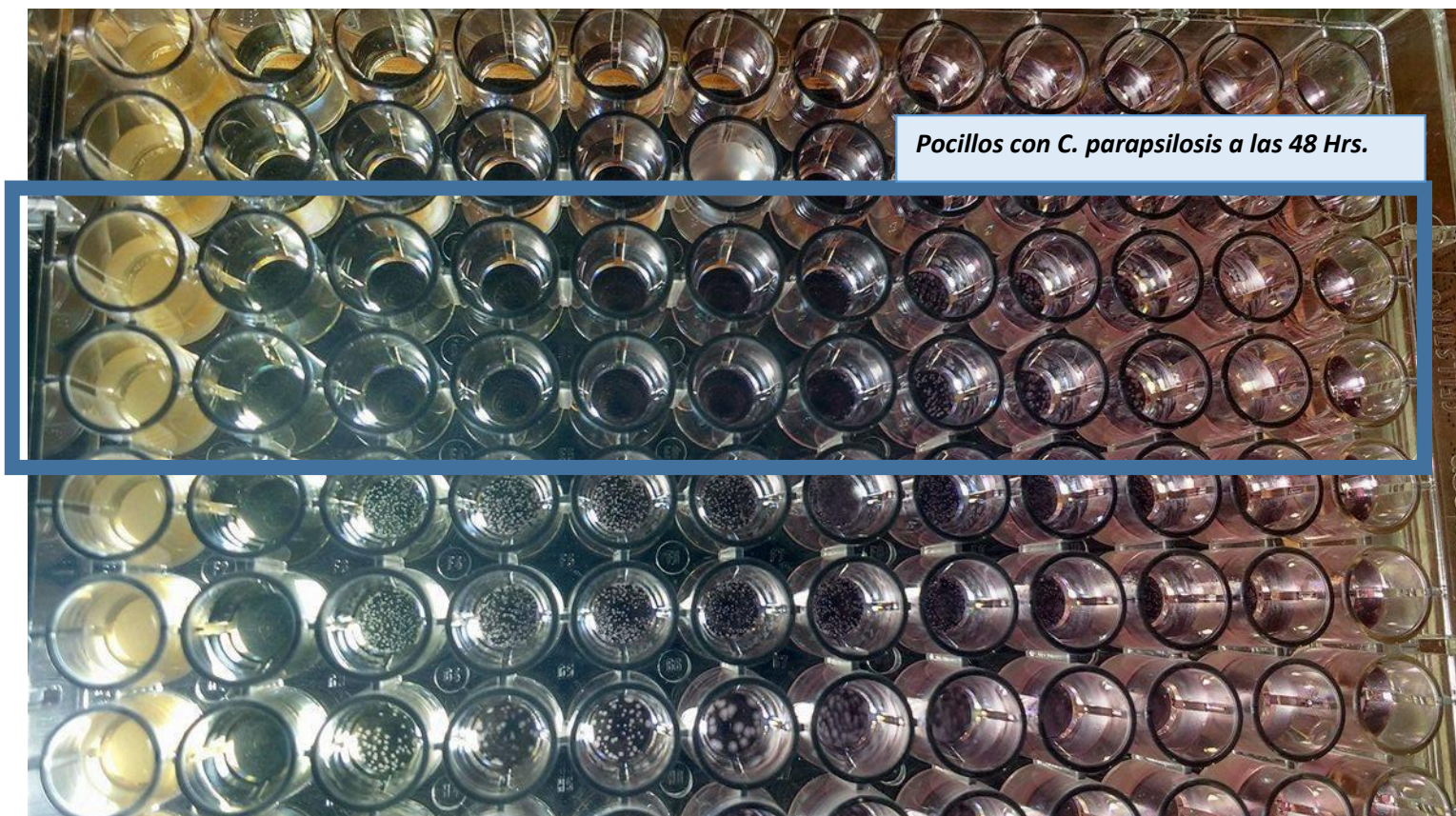
LECTURA VISUAL M27-A3 (CLSI):												
ANTIFÚNGICO/TIEMPO DE INCUBACIÓN												
CMI												
N° POCILLO	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
MUESTRA MSA-NO-Np = LOT01AAF02 / 48 HORAS (06/10/17)												
CONCENTRACIÓN en mg/mL	18	9	4.5	2.25	1.13	0.56	0.28	0.14	0.07	0.04		
LECTURA VISUAL (VALOR ASIGNADO)												
A	<i>C. krusei</i> ATCC 6258											
B	<i>C. krusei</i> ATCC 6258											
C	<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019	0	0	0	0	0	0	1	2	3	3	
D	<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019	0	0	0	0	0	0	1	2	3	3	
E	<i>Candida glabrata</i> INS121768314											
F	<i>Candida glabrata</i> INS121768314											
G	<i>Candida albicans</i> 024											
H	<i>Candida albicans</i> 024											
LECTURA VISUAL (VALOR ASIGNADO)												
<p>0= Ópticamente claro; 1= Ligeramente turbio; 2= Considerable reducción de la turbidez</p> <p>3= Pequeña reducción en la turbidez; 4= Sin reducción de la turbidez</p> <p>ANTIFÚNGICOS: MSA-NO-Np = Ácido S-nitrosomercaptosuccínico en Nanopartículas</p> <p>CMI: Concentración Mínima Inhibitoria (Verde)</p>												

MUESTRA LOT01AAF02. LECTURA A LAS 24 HORAS



Crecimiento Paradójico en C. glabrata (MSA NO Np 4.5 mg/mL)

MUESTRA LOT01AAF02. LECTURA A LAS 48 HORAS

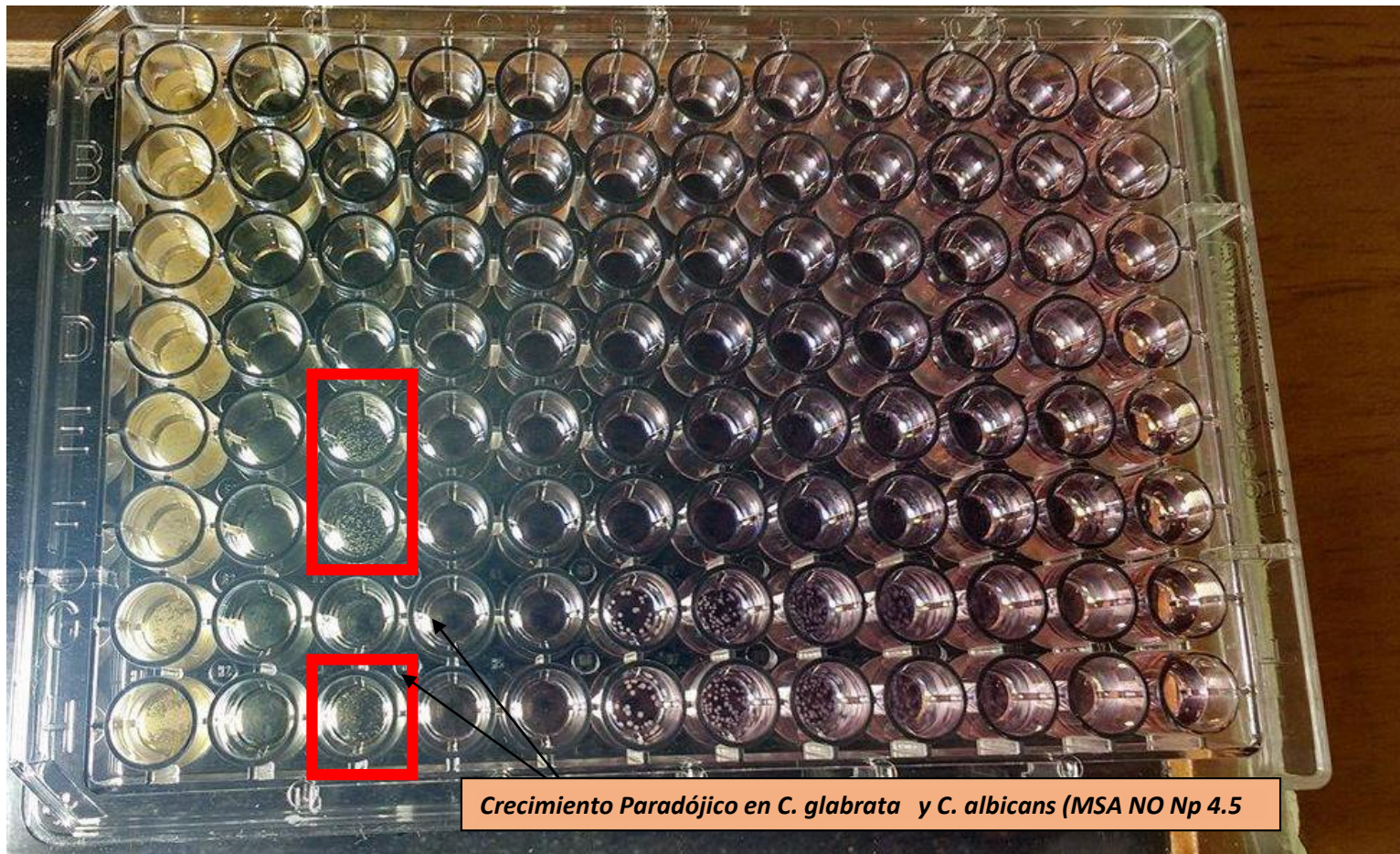


Pocillos con C. parapsilosis a las 48 Hrs.

LECTURA VISUAL M27-A3 (CLSI):													
ANTIFÚNGICO/TIEMPO DE INCUBACIÓN													
CMI													
N° POCILLO	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
MUESTRA MSA-NO-Np = LOT01AAF03 / 24 HORAS (05 /10/17)													
CONCENTRACION en mg/mL	18	9	4.5	2.25	1.13	0.56	0.28	0.14	0.07	0.04			
LECTURA VISUAL (VALOR ASIGNADO)													
A	<i>C. krusei</i> ATCC 6258	0	0	0	0	0	0	0	0	1	3	CONTROL DE CRECIMIENTO	CONTROL DE ESTERILIDAD
B	<i>C. krusei</i> ATCC 6258	0	0	0	0	0	0	0	0	1	3		
C	<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019	0	0	0	0	0	0	0	0	1	3		
D	<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019	0	0	0	0	0	0	0	0	1	3		
E	<i>Candida glabrata</i> INS121768314	0	0	1	0	0	0	0	1	2	3		
F	<i>Candida glabrata</i> INS121768314	0	0	1	0	0	0	0	1	2	3		
G	<i>Candida albicans</i> 024	0	0	0	0	0	2	3	3	3	4		
H	<i>Candida albicans</i> 024	0	0	1	0	0	2	3	3	3	4		
LECTURA VISUAL (VALOR ASIGNADO)													
<p>0= Ópticamente claro; 1= Ligeramente turbio; 2= Considerable reducción de la turbidez 3= Pequeña reducción en la turbidez; 4= Sin reducción de la turbidez</p> <p>ANTIFÚNGICOS: MSA-NO-Np = Ácido S-nitrosomercaptosuccínico en Nanopartículas</p> <p>CMI: Concentración Mínima Inhibitoria (Verde)</p>													

LECTURA VISUAL M27-A3 (CLSI):												
ANTIFÚNGICO/TIEMPO DE INCUBACIÓN												
CMI												
N° POCILLO	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
MUESTRA MSA-NO-Np = LOT01AAF03 / 48 HORAS (06/10/17)												
CONCENTRACIÓN en mg/mL	18	9	4.5	2.25	1.13	0.56	0.28	0.14	0.07	0.04		
LECTURA VISUAL (VALOR ASIGNADO)												
A	<i>C. krusei</i> ATCC 6258											
B	<i>C. krusei</i> ATCC 6258											
C	<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019	0	0	0	0	0	0	1	2	3	3	
D	<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019	0	0	0	0	0	0	1	2	3	3	
E	<i>Candida glabrata</i> INS121768314											
F	<i>Candida glabrata</i> INS121768314											
G	<i>Candida albicans</i> 024											
H	<i>Candida albicans</i> 024											
LECTURA VISUAL (VALOR ASIGNADO)												
<p>0= Ópticamente claro; 1= Ligeramente turbio; 2= Considerable reducción de la turbidez</p> <p>3= Pequeña reducción en la turbidez; 4= Sin reducción de la turbidez</p> <p>ANTIFÚNGICOS: MSA-NO-Np = Ácido S-nitrosomercaptosuccínico en Nanopartículas</p> <p>CMI: Concentración Mínima Inhibitoria (Verde)</p>												

MUESTRA LOT01AAF03. LECTURA A LAS 24 HORAS



MUESTRA LOT01AAF03. LECTURA A LAS 48 HORAS



Pocillos con C. parapsilosis a las 48 Hrs.

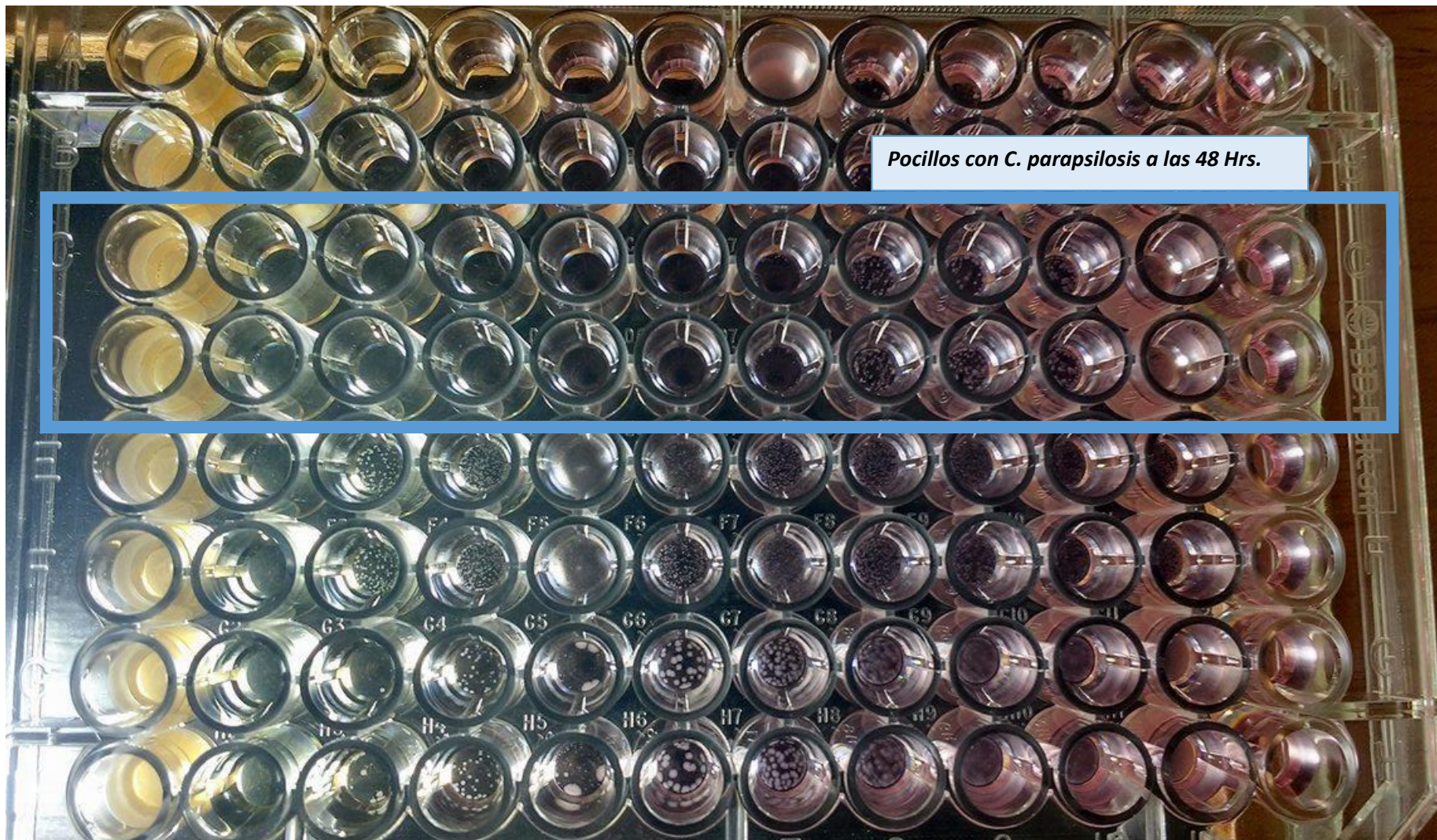
LECTURA VISUAL M27-A3 (CLSI):													
ANTIFÚNGICO/TIEMPO DE INCUBACIÓN													
CMI													
N° POCILLO	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
MUESTRA MSA-NO-Np = LOT02AAF01 / 24 HORAS (05/10/17)													
CONCENTRACIÓN en mg/mL	18	9	4.5	2.25	1.13	0.56	0.28	0.14	0.07	0.04			
LECTURA VISUAL (VALOR ASIGNADO)													
A	<i>C. krusei</i> ATCC 6258	0	0	0	0	0	0	0	0	1	3	CONTROL DE CRECIMIENTO	CONTROL DE ESTERILIDAD
B	<i>C. krusei</i> ATCC 6258	0	0	0	0	0	0	0	0	2	3		
C	<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019	0	0	0	0	0	0	0	0	1	3		
D	<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019	0	0	0	0	0	0	0	0	1	3		
E	<i>Candida glabrata</i> INS121768314	0	0	0	0	0	0	0	1	2	3		
F	<i>Candida glabrata</i> INS121768314	0	0	0	0	0	0	0	1	2	3		
G	<i>Candida albicans</i> 024	0	0	0	0	1	2	2	3	4	4		
H	<i>Candida albicans</i> 024	0	0	0	0	1	2	2	3	4	4		
LECTURA VISUAL (VALOR ASIGNADO)													
<p>0= Ópticamente claro; 1= Ligeramente turbio; 2= Considerable reducción de la turbidez 3= Pequeña reducción en la turbidez; 4= Sin reducción de la turbidez</p> <p>ANTIFÚNGICOS: MSA-NO-Np = Ácido S-nitrosomercaptosuccínico en Nanopartículas</p> <p>CMI: Concentración Mínima Inhibitoria (Verde)</p>													

LECTURA VISUAL M27-A3 (CLSI):												
ANTIFÚNGICO/TIEMPO DE INCUBACIÓN												
CMI												
N° POCILLO	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
MUESTRA MSA-NO-Np = LOT02AAF01 / 48 HORAS (06/10/17)												
CONCENTRACIÓN en mg/mL	18	9	4.5	2.25	1.13	0.56	0.28	0.14	0.07	0.04		
LECTURA VISUAL (VALOR ASIGNADO)												
A	<i>C. krusei</i> ATCC 6258											
B	<i>C. krusei</i> ATCC 6258											
C	<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019	0	0	0	0	0	0	1	2	3	3	
D	<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019	0	0	0	0	0	0	1	2	3	3	
E	<i>Candida glabrata</i> INS121768314											
F	<i>Candida glabrata</i> INS121768314											
G	<i>Candida albicans</i> 024											
H	<i>Candida albicans</i> 024											
LECTURA VISUAL (VALOR ASIGNADO)												
<p>0= Ópticamente claro; 1= Ligeramente turbio; 2= Considerable reducción de la turbidez</p> <p>3= Pequeña reducción en la turbidez; 4= Sin reducción de la turbidez</p> <p>ANTIFÚNGICOS: MSA-NO-Np = Ácido S-nitrosomercaptosuccínico en Nanopartículas</p> <p>CMI: Concentración Mínima Inhibitoria (Verde)</p>												

MUESTRA LOT02AAF01. LECTURA A LAS 24 HORAS



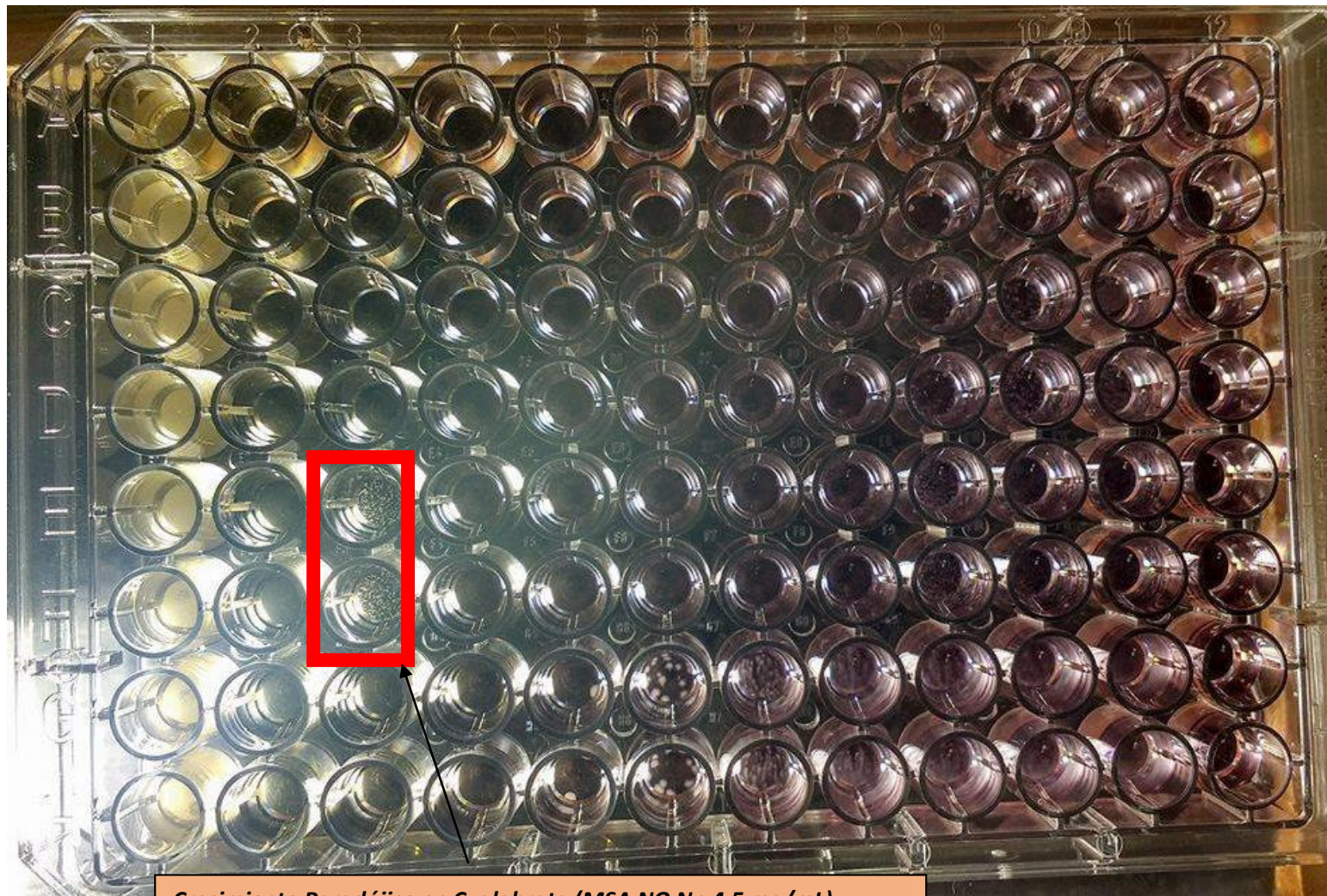
MUESTRA LOT02AAF01. LECTURA A LAS 48 HORAS



LECTURA VISUAL M27-A3 (CLSI):													
ANTIFÚNGICO/TIEMPO DE INCUBACIÓN													
CMI													
N° POCILLO	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
MUESTRA MSA-NO-Np = LOT02AAF02 / 24 HORAS (05/10/17)													
CONCENTRACION en mg/mL	18	9	4.5	2.25	1.13	0.56	0.28	0.14	0.07	0.04			
LECTURA VISUAL (VALOR ASIGNADO)													
A	<i>C. krusei</i> ATCC 6258	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2	CONTROL DE CRECIMIENTO	CONTROL DE ESTERILIDAD
B	<i>C. krusei</i> ATCC 6258	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2		
C	<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2		
D	<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2		
E	<i>Candida glabrata</i> INS121768314	0	0	2	0	0	0	0	1	2	2		
F	<i>Candida glabrata</i> INS121768314	0	0	2	0	0	0	0	1	2	2		
G	<i>Candida albicans</i> 024	0	0	0	0	1	2	3	3	3	4		
H	<i>Candida albicans</i> 024	0	0	0	0	1	2	3	3	3	4		
LECTURA VISUAL (VALOR ASIGNADO)													
<p>0= Ópticamente claro; 1= Ligeramente turbio; 2= Considerable reducción de la turbidez</p> <p>3= Pequeña reducción en la turbidez; 4= Sin reducción de la turbidez</p> <p>ANTIFÚNGICOS: MSA-NO-Np = Ácido S-nitrosomercaptosuccínico en Nanopartículas</p> <p>CMI: Concentración Mínima Inhibitoria (Verde)</p>													

LECTURA VISUAL M27-A3 (CLSI):												
ANTIFÚNGICO/TIEMPO DE INCUBACIÓN												
CMI												
N° POCILLO	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
MUESTRA MSA-NO-Np = LOT02AAF02 / 48 HORAS (06/10/17)												
CONCENTRACIÓN en mg/mL	18	9	4.5	2.25	1.13	0.56	0.28	0.14	0.07	0.04		
LECTURA VISUAL (VALOR ASIGNADO)												
A	<i>C. krusei</i> ATCC 6258											
B	<i>C. krusei</i> ATCC 6258											
C	<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019	0	0	0	0	0	0	1	2	3	3	
D	<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019	0	0	0	0	0	0	1	2	3	3	
E	<i>Candida glabrata</i> INS121768314											
F	<i>Candida glabrata</i> INS121768314											
G	<i>Candida albicans</i> 024											
H	<i>Candida albicans</i> 024											
LECTURA VISUAL (VALOR ASIGNADO)												
<p>0= Ópticamente claro; 1= Ligeramente turbio; 2= Considerable reducción de la turbidez</p> <p>3= Pequeña reducción en la turbidez; 4= Sin reducción de la turbidez</p> <p>ANTIFÚNGICOS: MSA-NO-Np = Ácido S-nitrosomercaptosuccínico en Nanopartículas</p> <p>CMI: Concentración Mínima Inhibitoria (Verde)</p>												

MUESTRA LOT02AAF02. LECTURA A LAS 24 HORAS



Crecimiento Paradójico en C. glabrata (MSA NO Np 4.5 mg/mL)

MUESTRA LOT02AAF02. LECTURA A LAS 48 HORAS

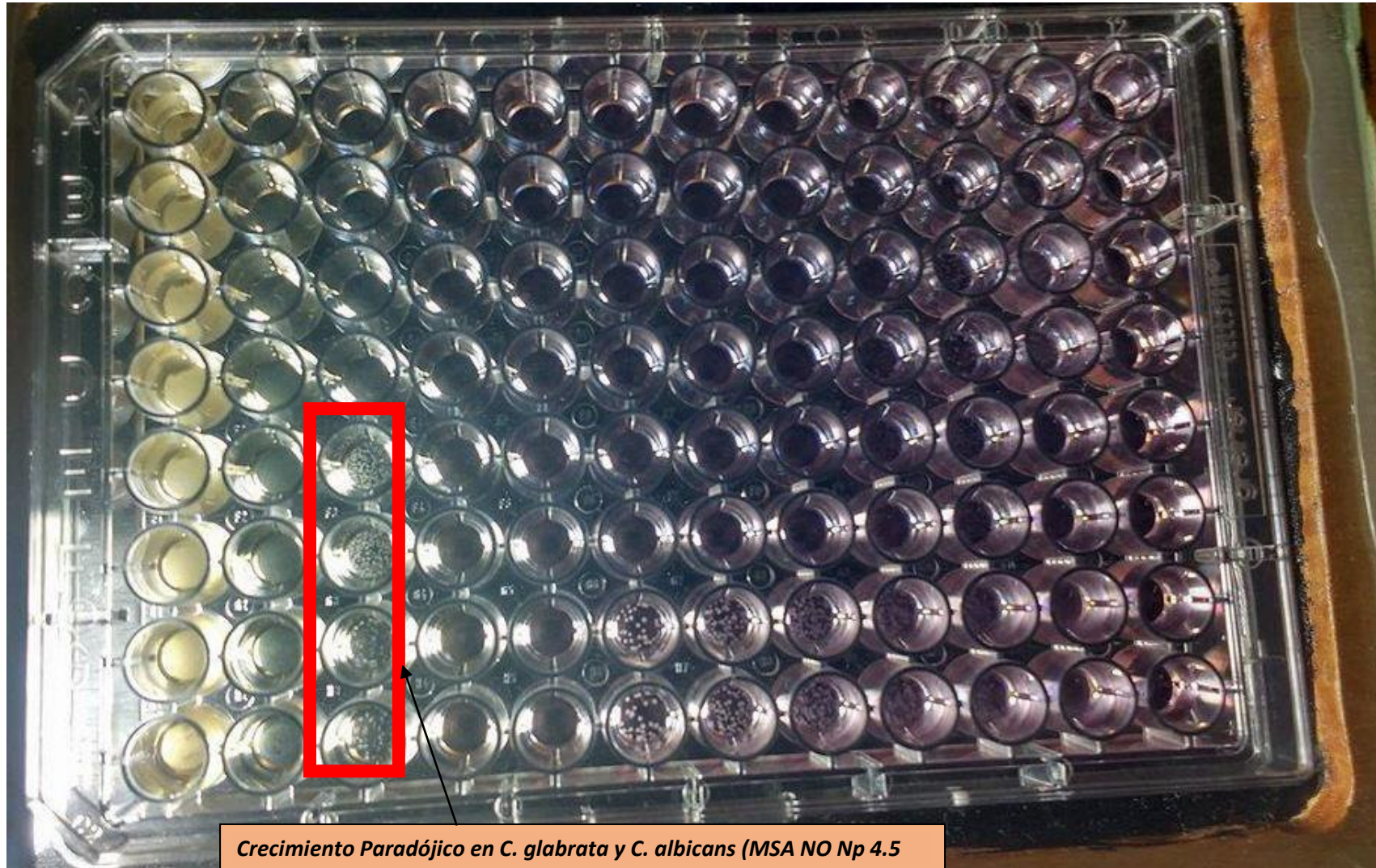


Pocillos con C. parapsilosis a las 48 Hrs.

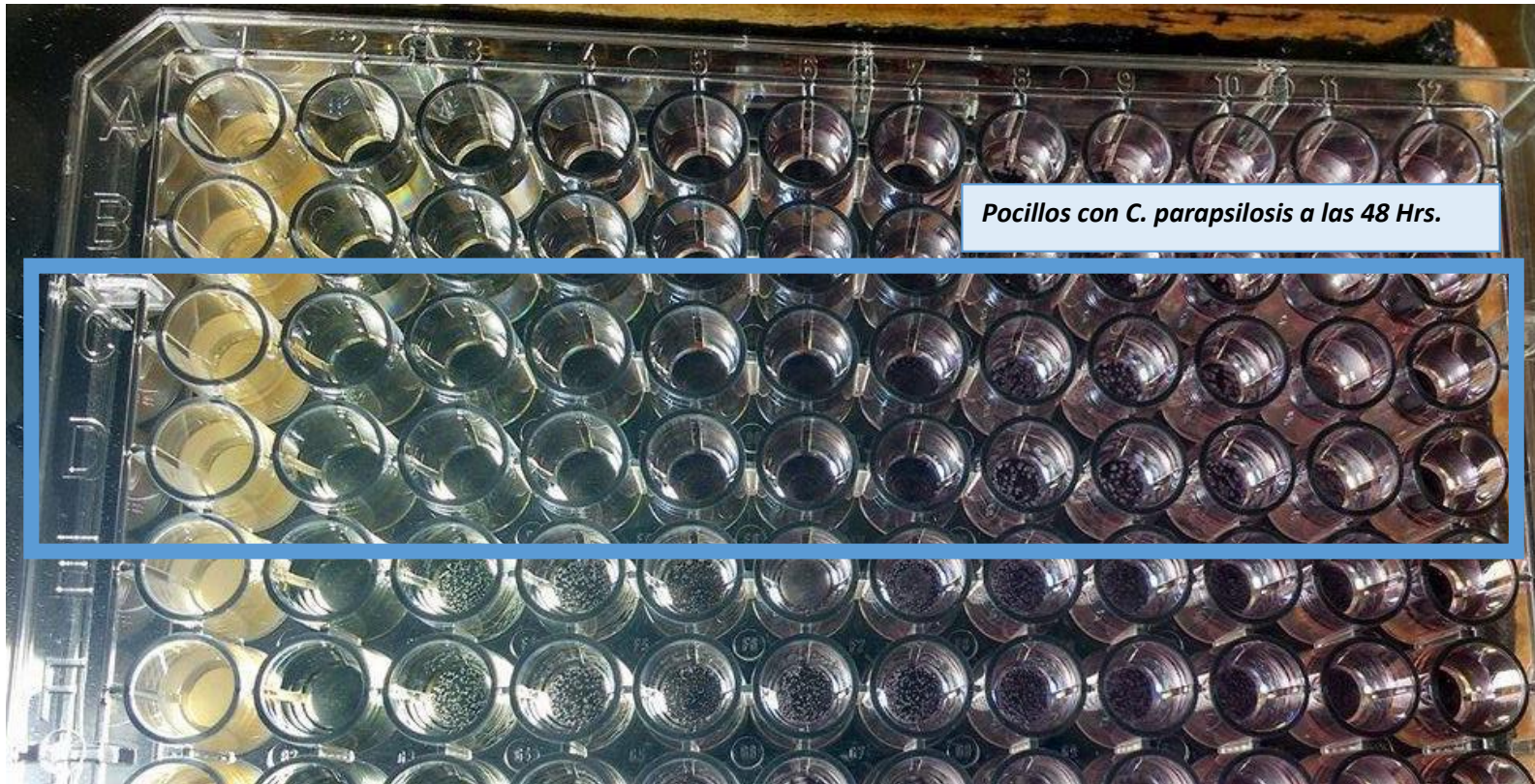
LECTURA VISUAL M27-A3 (CLSI):													
ANTIFÚNGICO/TIEMPO DE INCUBACIÓN													
CMI													
N° POCILLO	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
MUESTRA MSA-NO-Np = LOT02AAF03 / 24 HORAS (05/10/17)													
CONCENTRACION en mg/mL	18	9	4.5	2.25	1.13	0.56	0.28	0.14	0.07	0.04			
LECTURA VISUAL (VALOR ASIGNADO)													
A	<i>C. krusei</i> ATCC 6258	0	0	0	0	0	0	0	0	1	3	CONTROL DE CRECIMIENTO	CONTROL DE ESTERILIDAD
B	<i>C. krusei</i> ATCC 6258	0	0	0	0	0	0	0	0	1	3		
C	<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019	0	0	0	0	0	0	0	0	2	3		
D	<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019	0	0	0	0	0	0	0	0	2	3		
E	<i>Candida glabrata</i> INS121768314	0	0	2	0	0	0	0	0	2	3		
F	<i>Candida glabrata</i> INS121768314	0	0	2	0	0	0	0	0	2	3		
G	<i>Candida albicans</i> 024	0	0	1	0	0	2	3	3	4	4		
H	<i>Candida albicans</i> 024	0	0	1	0	0	2	3	3	4	4		
LECTURA VISUAL (VALOR ASIGNADO)													
<p>0= Ópticamente claro; 1= Ligeramente turbio; 2= Considerable reducción de la turbidez 3= Pequeña reducción en la turbidez; 4= Sin reducción de la turbidez</p> <p>ANTIFÚNGICOS: MSA-NO-Np = Ácido S-nitrosomercaptosuccínico en Nanopartículas</p> <p>CMI: Concentración Mínima Inhibitoria (Verde)</p>													

LECTURA VISUAL M27-A3 (CLSI):												
ANTIFÚNGICO/TIEMPO DE INCUBACIÓN												
N° POCILLO	CMI											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
MUESTRA MSA-NO-Np = LOT02AAF03 / 48 HORAS (06/10/17)												
CONCENTRACIÓN en mg/mL	18	9	4.5	2.25	1.13	0.56	0.28	0.14	0.07	0.04		
LECTURA VISUAL (VALOR ASIGNADO)												
A	<i>C. krusei</i> ATCC 6258											
B	<i>C. krusei</i> ATCC 6258											
C	<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019	0	0	0	0	0	0	1	2	3	3	
D	<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019	0	0	0	0	0	0	1	2	3	3	
E	<i>Candida glabrata</i> INS121768314											
F	<i>Candida glabrata</i> INS121768314											
G	<i>Candida albicans</i> 024											
H	<i>Candida albicans</i> 024											
LECTURA VISUAL (VALOR ASIGNADO)												
<p>0= Ópticamente claro; 1= Ligeramente turbio; 2= Considerable reducción de la turbidez 3= Pequeña reducción en la turbidez; 4= Sin reducción de la turbidez</p> <p>ANTIFÚNGICOS: MSA-NO-Np = Ácido S-nitrosomercaptosuccínico en Nanopartículas</p> <p>CMI: Concentración Mínima Inhibitoria (Verde)</p>												

MUESTRA LOT02AAF03. LECTURA A LAS 24 HORAS



MUESTRA LOT02AAF03. LECTURA A LAS 48 HORAS



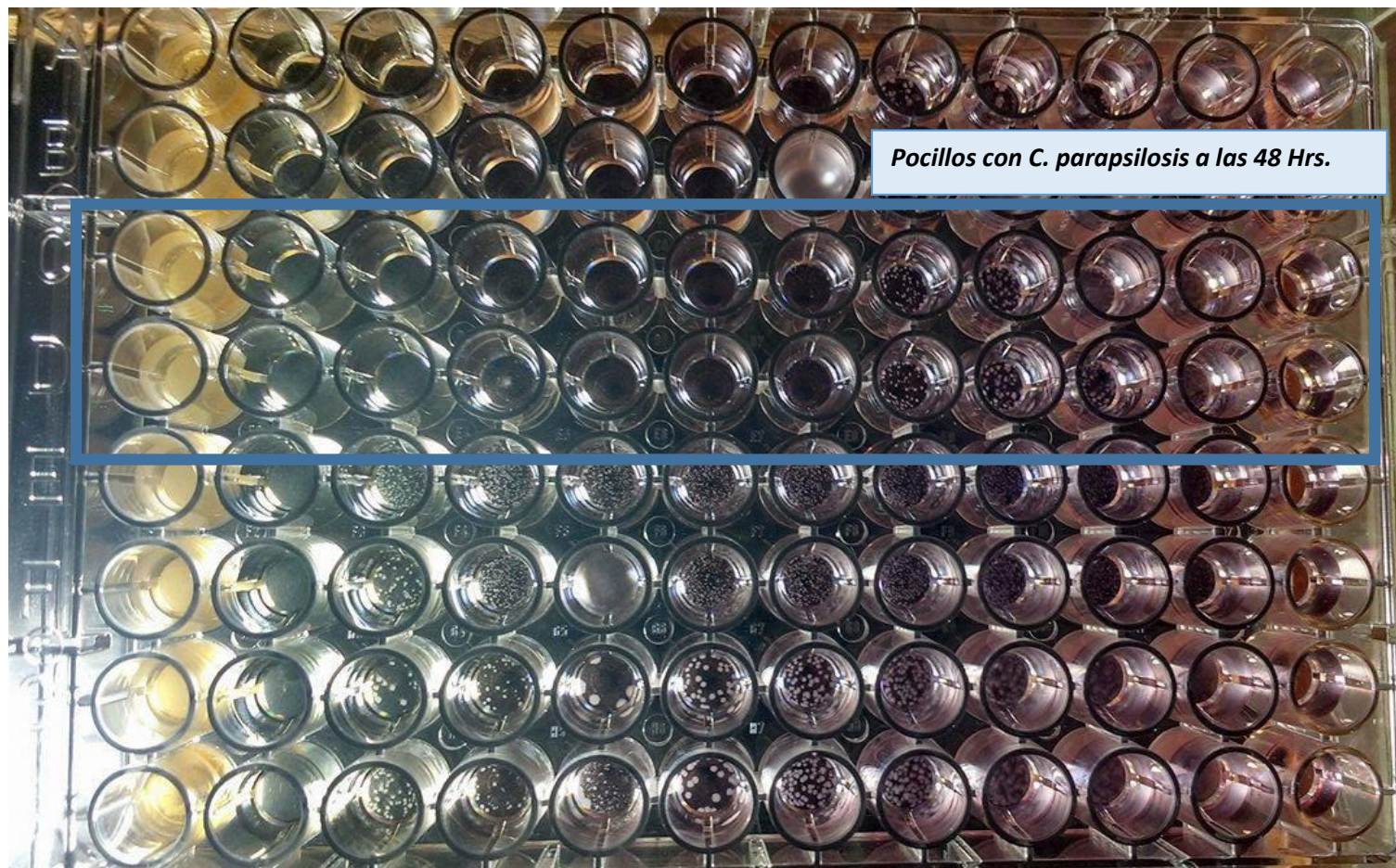
LECTURA VISUAL M27-A3 (CLSI):													
ANTIFÚNGICO/TIEMPO DE INCUBACIÓN													
CMI													
N° POCILLO	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
MUESTRA MSA-NO-Np = LOT03AAF01 / 24 HORAS (05/10/17)													
CONCENTRACION en mg/mL	18	9	4.5	2.25	1.13	0.56	0.28	0.14	0.07	0.04			
LECTURA VISUAL (VALOR ASIGNADO)													
A	<i>C. krusei</i> ATCC 6258	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2	CONTROL DE CRECIMIENTO	CONTROL DE ESTERILIDAD
B	<i>C. krusei</i> ATCC 6258	0	0	0	0	0	0	0	0	2	3		
C	<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2		
D	<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2		
E	<i>Candida glabrata</i> INS121768314	0	0	1	0	0	0	0	1	2	2		
F	<i>Candida glabrata</i> INS121768314	0	0	2	0	0	0	0	1	2	2		
G	<i>Candida albicans</i> 024	0	0	0	0	1	2	2	3	3	4		
H	<i>Candida albicans</i> 024	0	0	0	0	1	2	2	3	3	4		
LECTURA VISUAL (VALOR ASIGNADO)													
<p>0= Ópticamente claro; 1= Ligeramente turbio; 2= Considerable reducción de la turbidez</p> <p>3= Pequeña reducción en la turbidez; 4= Sin reducción de la turbidez</p> <p>ANTIFÚNGICOS: MSA-NO-Np = Ácido S-nitrosomercaptosuccínico en Nanopartículas</p> <p>CMI: Concentración Mínima Inhibitoria (Verde)</p>													

LECTURA VISUAL M27-A3(CLSI):												
ANTIFÚNGICO/TIEMPO DE INCUBACIÓN												
CMI												
N° POCILLO	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
MUESTRA MSA-NO-Np = LOT03AAF01 / 48 HORAS (06/10/17)												
CONCENTRACIÓN en mg/mL	18	9	4.5	2.25	1.13	0.56	0.28	0.14	0.07	0.04		
LECTURA VISUAL (VALOR ASIGNADO)												
A	<i>C. krusei</i> ATCC 6258											
B	<i>C. krusei</i> ATCC 6258											
C	<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019	0	0	0	0	0	0	1	2	3	3	
D	<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019	0	0	0	0	0	0	1	2	3	3	
E	<i>Candida glabrata</i> INS121768314											
F	<i>Candida glabrata</i> INS121768314											
G	<i>Candida albicans</i> 024											
H	<i>Candida albicans</i> 024											
LECTURA VISUAL (VALOR ASIGNADO)												
<p>0= Ópticamente claro; 1= Ligeramente turbio; 2= Considerable reducción de la turbidez</p> <p>3= Pequeña reducción en la turbidez; 4= Sin reducción de la turbidez</p> <p>ANTIFÚNGICOS: MSA-NO-Np = Ácido S-nitrosomercaptosuccínico en Nanopartículas</p> <p>CMI: Concentración Mínima Inhibitoria (Verde)</p>												

MUESTRA LOT03AAF01. LECTURA A LAS 24 HORAS



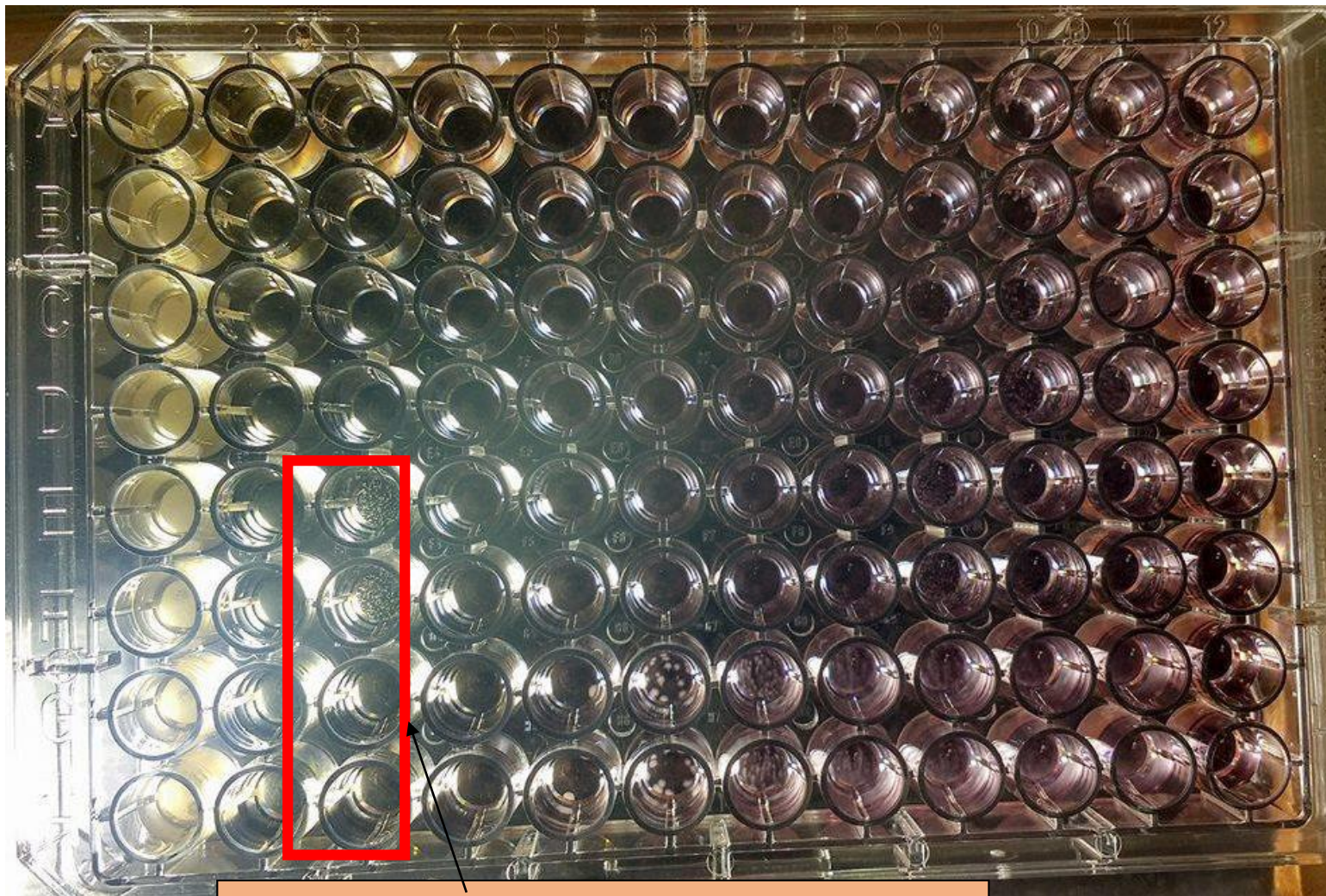
MUESTRA LOT03AAF01. LECTURA A LAS 24 HORAS



LECTURA VISUAL M27-A3 (CLSI):													
ANTIFÚNGICO/TIEMPO DE INCUBACIÓN													
CMI													
N° POCILLO	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
MUESTRA MSA-NO-Np = LOT03AAF02 / 24 HORAS (05/10/17)													
CONCENTRACIÓN en mg/mL	18	9	4.5	2.25	1.13	0.56	0.28	0.07	0.14	0.04			
LECTURA VISUAL (VALOR ASIGNADO)													
A	<i>C. krusei</i> ATCC 6258	0	0	0	0	0	0	0	1	0	3	CONTROL DE CRECIMIENTO	CONTROL DE ESTERILIDAD
B	<i>C. krusei</i> ATCC 6258	0	0	0	0	0	0	0	1	0	3		
C	<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019	0	0	0	0	0	0	0	1	0	3		
D	<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019	0	0	0	0	0	0	0	1	0	3		
E	<i>Candida glabrata</i> INS121768314	0	0	1	0	0	0	0	1	0	2		
F	<i>Candida glabrata</i> INS121768314	0	0	1	0	0	0	0	1	0	2		
G	<i>Candida albicans</i> 024	0	0	1	0	1	2	3	4	3	4		
H	<i>Candida albicans</i> 024	0	0	1	0	0	2	3	4	3	4		
LECTURA VISUAL (VALOR ASIGNADO)													
<p>0= Ópticamente claro; 1= Ligeramente turbio; 2= Considerable reducción de la turbidez 3= Pequeña reducción en la turbidez; 4= Sin reducción de la turbidez</p> <p>ANTIFÚNGICOS: MSA-NO-Np = Ácido S-nitrosomercaptosuccínico en Nanopartículas</p> <p>CMI: Concentración Mínima Inhibitoria (Verde)</p>													

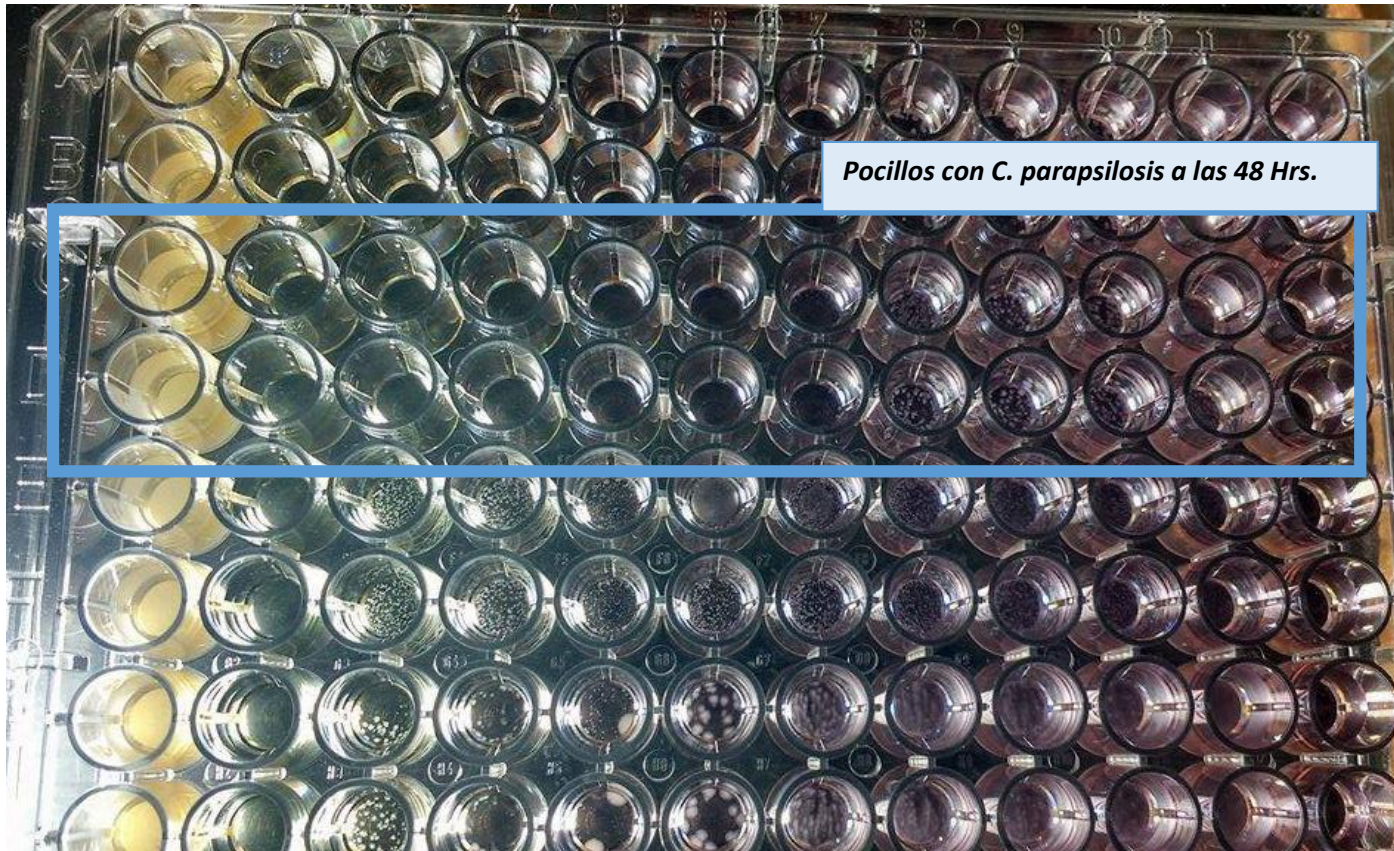
LECTURA VISUAL M27-A3(CLSI):												
ANTIFÚNGICO/TIEMPO DE INCUBACIÓN												
CMI												
N° POCILLO	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
MUESTRA MSA-NO-Np = LOT03AAF02 / 48 HORAS (06/10/17)												
CONCENTRACIÓN en mg/mL	18	9	4.5	2.25	1.13	0.56	0.28	0.07	0.14	0.04		
LECTURA VISUAL (VALOR ASIGNADO)												
A	<i>C. krusei</i> ATCC 6258											
B	<i>C. krusei</i> ATCC 6258											
C	<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019	0	0	0	0	0	0	1	2	3	3	
D	<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019	0	0	0	0	0	0	1	2	3	3	
E	<i>Candida glabrata</i> INS121768314											
F	<i>Candida glabrata</i> INS121768314											
G	<i>Candida albicans</i> 024											
H	<i>Candida albicans</i> 024											
LECTURA VISUAL (VALOR ASIGNADO)												
<p>0= Ópticamente claro; 1= Ligeramente turbio; 2= Considerable reducción de la turbidez</p> <p>3= Pequeña reducción en la turbidez; 4= Sin reducción de la turbidez</p> <p>ANTIFÚNGICOS: MSA-NO-Np = Ácido S-nitrosomercaptosuccínico en Nanopartículas</p> <p>CMI: Concentración Mínima Inhibitoria (Verde)</p>												

MUESTRA LOT03AAF02. LECTURA A LAS 24 HORAS



Crecimiento Paradójico en C. glabrata y C. albicans (MSA NO Np 4.5

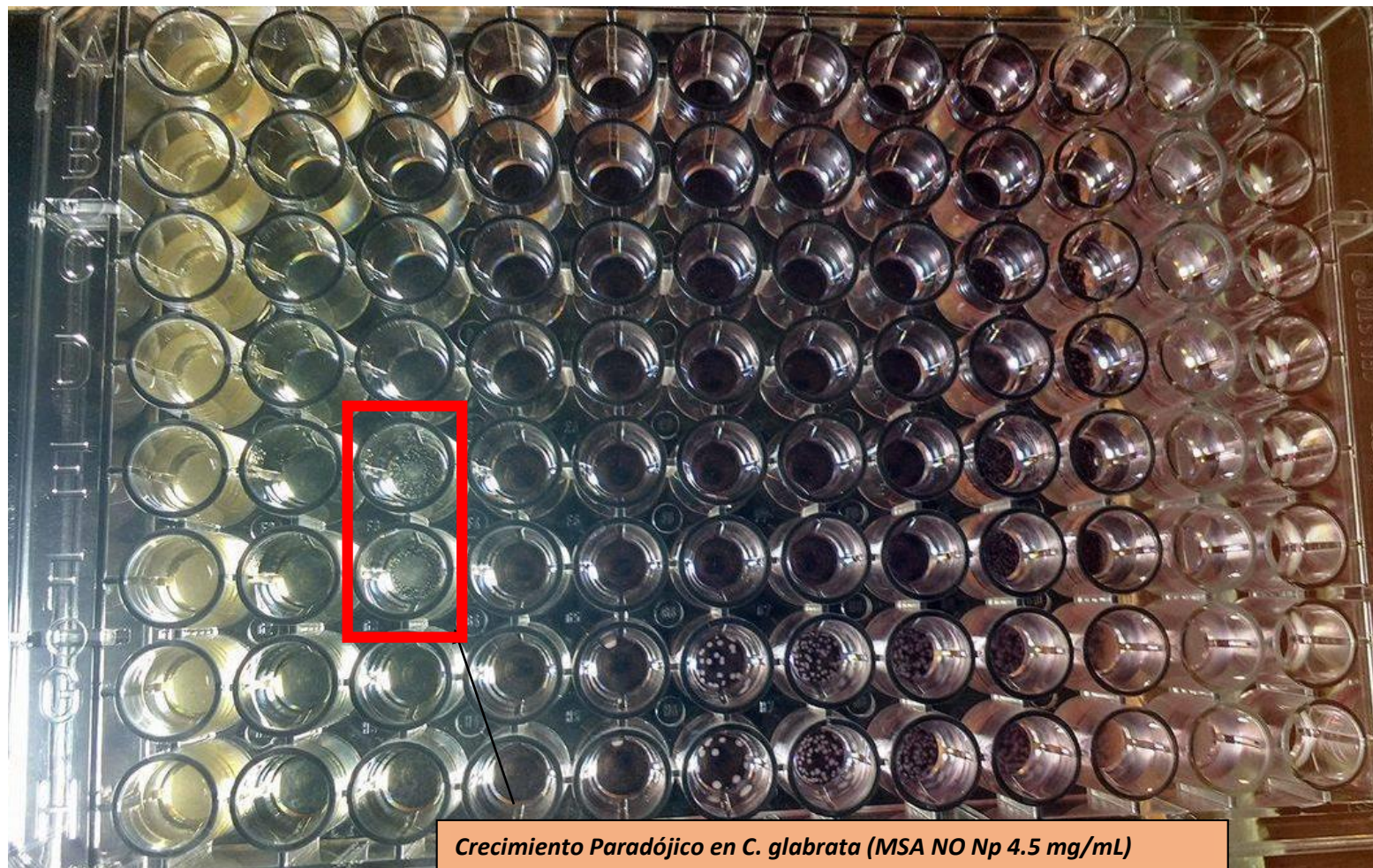
MUESTRA LOT03AAF02. LECTURA A LAS 48 HORAS



LECTURA VISUAL M27-A3 (CLSI):													
ANTIFÚNGICO/TIEMPO DE INCUBACIÓN													
CMI													
N° POCILLO	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
MUESTRA MSA-NO-Np = LOT03AAF03 / 24 HORAS (05/10/17)													
CONCENTRACION en mg/mL	18	9	4.5	2.25	1.13	0.56	0.28	0.14	0.07	0.04			
LECTURA VISUAL (VALOR ASIGNADO)													
A	<i>C. krusei</i> ATCC 6258	0	0	0	0	0	0	0	0	1	3	CONTROL DE CRECIMIENTO	CONTROL DE ESTERILIDAD
B	<i>C. krusei</i> ATCC 6258	0	0	0	0	0	0	0	0	1	3		
C	<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2		
D	<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2		
E	<i>Candida glabrata</i> INS121768314	0	0	2	0	0	0	0	0	3	3		
F	<i>Candida glabrata</i> INS121768314	0	0	2	0	0	0	0	0	3	3		
G	<i>Candida albicans</i> 024	0	0	0	0	1	2	3	3	4	4		
H	<i>Candida albicans</i> 024	0	0	0	0	1	2	3	3	4	4		
LECTURA VISUAL (VALOR ASIGNADO)													
<p>0= Ópticamente claro; 1= Ligeramente turbio; 2= Considerable reducción de la turbidez</p> <p>3= Pequeña reducción en la turbidez; 4= Sin reducción de la turbidez</p> <p>ANTIFÚNGICOS: MSA-NO-Np = Ácido S-nitrosomercaptosuccínico en Nanopartículas</p> <p>CMI: Concentración Mínima Inhibitoria (Verde)</p>													

LECTURA VISUAL M27- A3 (CLSI):												
ANTIFÚNGICO/TIEMPO DE INCUBACIÓN												
CMI												
N° POCILLO	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
MUESTRA MSA-NO-Np = LOT03AAF03 / 48 HORAS (06/10/17)												
CONCENTRACIÓN en mg/mL	18	9	4.5	2.25	1.13	0.56	0.28	0.14	0.07	0.04		
LECTURA VISUAL (VALOR ASIGNADO)												
A	<i>C. krusei</i> ATCC 6258											
B	<i>C. krusei</i> ATCC 6258											
C	<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019	0	0	0	0	0	0	1	2	3	3	
D	<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019	0	0	0	0	0	0	1	2	3	3	
E	<i>Candida glabrata</i> INS121768314											
F	<i>Candida glabrata</i> INS121768314											
G	<i>Candida albicans</i> 024											
H	<i>Candida albicans</i> 024											
LECTURA VISUAL (VALOR ASIGNADO)												
<p>0= Ópticamente claro; 1= Ligeramente turbio; 2= Considerable reducción de la turbidez</p> <p>3= Pequeña reducción en la turbidez; 4= Sin reducción de la turbidez</p> <p>ANTIFÚNGICOS: MSA-NO-Np = Ácido S-nitrosomercaptosuccínico en Nanopartículas</p> <p>CMI: Concentración Mínima Inhibitoria (Verde)</p>												

MUESTRA LOT03AAF03. LECTURA A LAS 24 HORAS



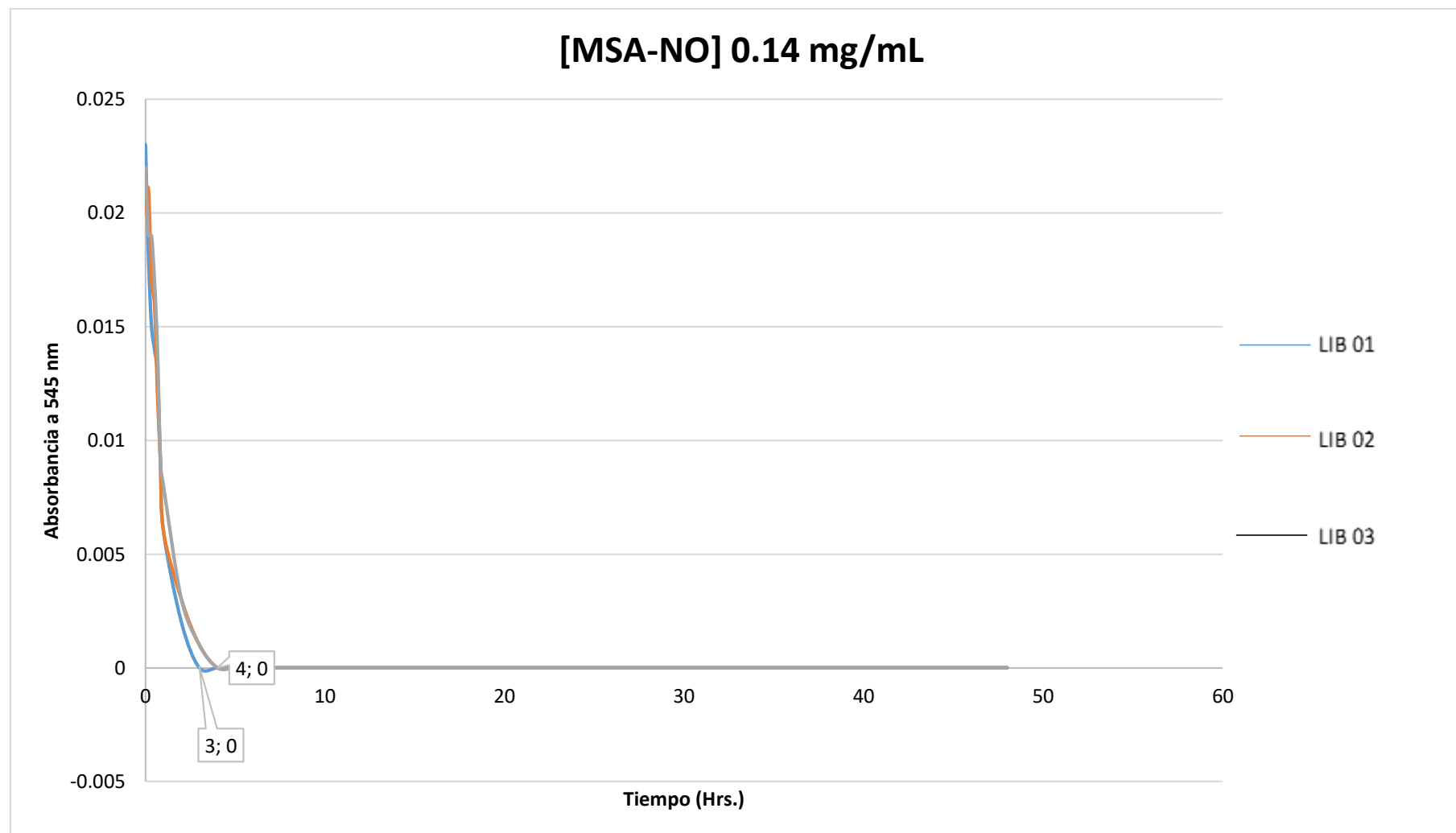
MUESTRA LOT03AAF03. LECTURA A LAS 48 HORAS



ANEXO 16

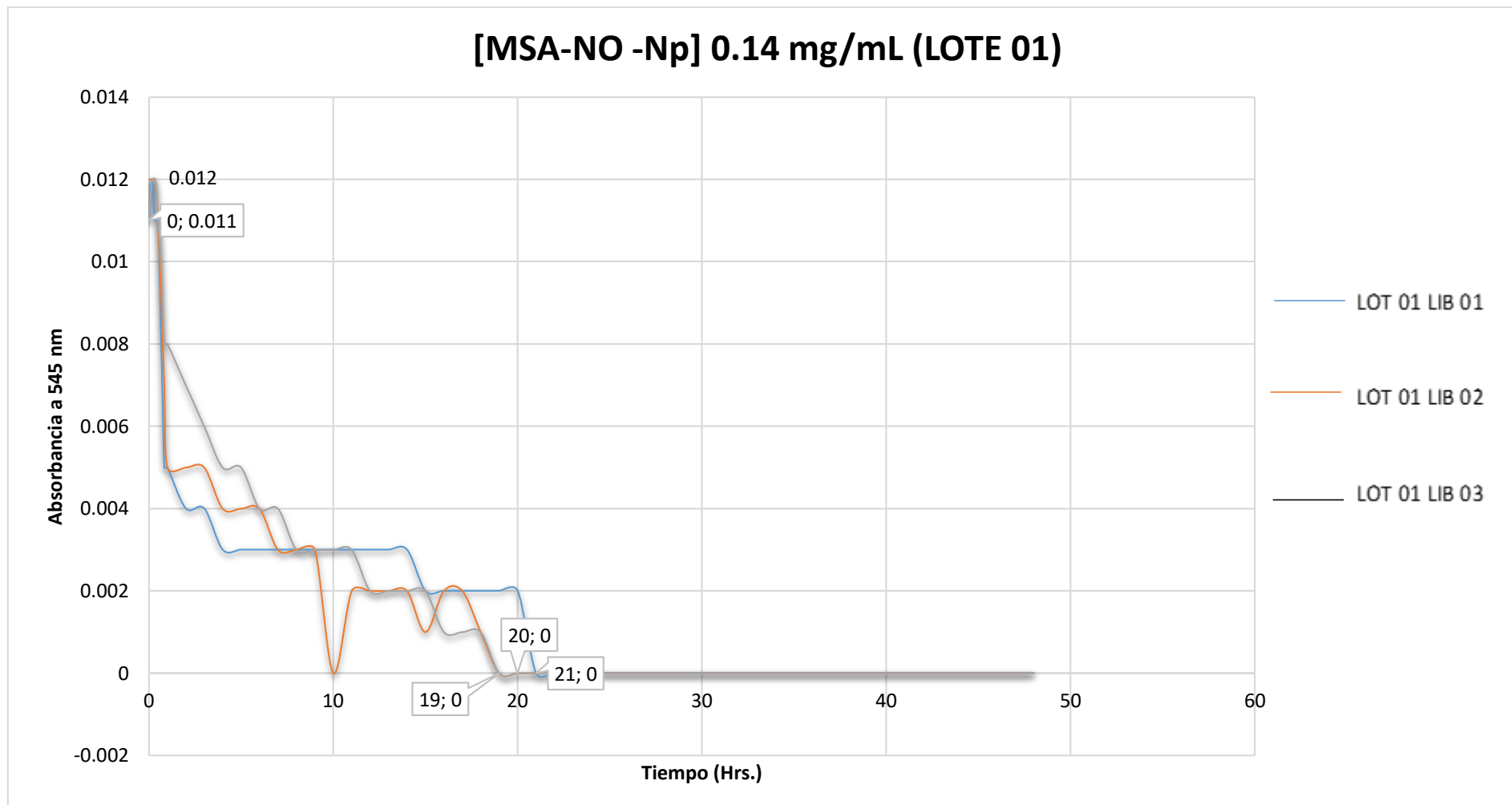
**FORMATO DE ANÁLISIS DEL PERFIL DE LIBERACIÓN DEL ÓXIDO NÍTRICO POR LAS
NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS DE QUITOSANO CARGADAS CON MSA-NO**

Análisis: Estimación del perfil de liberación del óxido nítrico por parte de las nanopartículas poliméricas de quitosano a partir de la descomposición del ácido s-nitrosomercaptosuccínico.				
Método: Espectrofotometría. Lectura a 545 nm.				
ANÁLISIS DE MUESTRAS PROBLEMA				
Fecha y Hora de Inicio: 15 de Octubre (08:20 a.m.)				
Muestra / Concentración	Tiempos de Lectura	Absorbancia de Muestras		
		LIB01	LIB02	LIB03
MSA-NO 0.14 mg/mL	0 minutos (08: 20)	0.023	0.02	0.022
	10 minutos (8 : 30)	0.018	0.021	0.019
	20 minutos (8:40)	0.015	0.017	0.019
	30 minutos (8:50)	0.014	0.016	0.017
	40 minutos (9:00)	0.013	0.012	0.014
	50 minutos (9:10)	0.009	0.009	0.009
	1 hora (9:20)	0.006	0.006	0.008
	2 horas (10: 20)	0.002	0.003	0.003
	3 horas (11:20)	0	0.001	0.001
	4 horas (12:20)	0	0	0
	5 horas (13:20)	0	0	0
	6 horas (14:20)	0	0	0
	7 horas (15:20)	0	0	0
	8 horas (16:20)	0	0	0
	9 horas (17:20)	0	0	0
	10 horas (18:20)	0	0	0
	11 horas (19:20)	0	0	0
	12 horas (20:20)	0	0	0
	13 horas (21:20)	0	0	0
	14 horas (22:20)	0	0	0
	15 horas (23:20)	0	0	0
	16 horas (00: 20) 16/10/17	0	0	0
	17 horas (01: 20)	0	0	0
	18 horas (02 : 20)	0	0	0
	19 horas (03: 20)	0	0	0
	20 horas (04: 20)	0	0	0
	21 horas (05: 20)	0	0	0
	22 horas (06 :20)	0	0	0
	23 horas (07: 20)	0	0	0
	24 horas (08 : 20)	0	0	0
30 horas (14 : 20)	0	0	0	
36 horas (20: 20)	0	0	0	
42 horas (02: 20) 17/10/17	0	0	0	
48 horas (8 :20)	0	0	0	
Fecha de Cierre del Registro: 17/10/17			Firma Analista: Gabriela M	
Leyenda nm = Nanómetro MSA-NO= Ácido S-nitrosomercaptosuccínico Np= Nanopartícula mg= miligramo mL= mililitro				



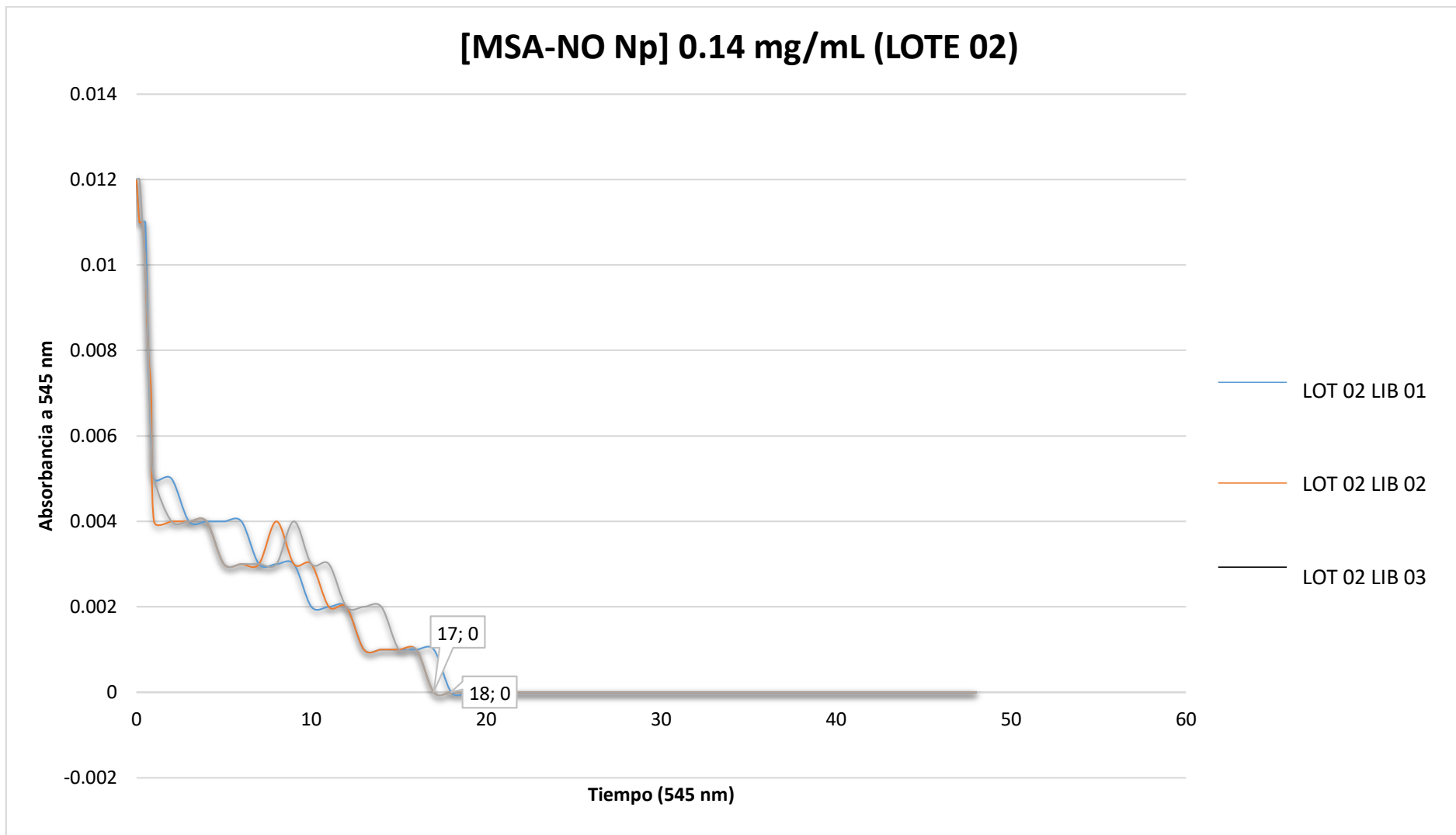
**FORMATO DE ANÁLISIS DEL PERFIL DE LIBERACIÓN DEL ÓXIDO NÍTRICO POR LAS
NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS DE QUITOSANO CARGADAS CON MSA-NO**

Análisis: Estimación del perfil de liberación del óxido nítrico por parte de las nanopartículas poliméricas de quitosano a partir de la descomposición del ácido s-nitrosomercaptosuccínico.				
Método: Espectrofotometría. Lectura a 545 nm.				
ANÁLISIS DE MUESTRAS PROBLEMA				
Fecha y Hora de Inicio: 15 de Octubre (08:20 a.m.)				
Muestra / Concentración	Tiempos de Lectura	Absorbancia de Muestras		
		LOT01LIB01	LOT01LIB02	LOT01LIB03
LOTE 01 Np 0.14 mg/mL MSA-NO	0 minutos (08: 20)	0.011	0.012	0.011
	10 minutos (8 : 30)	0.012	0.012	0.012
	20 minutos (8:40)	0.011	0.012	0.012
	30 minutos (8:50)	0.011	0.011	0.011
	40 minutos (9:00)	0.008	0.009	0.01
	50 minutos (9:10)	0.005	0.007	0.008
	1 hora (9:20)	0.005	0.005	0.008
	2 horas (10: 20)	0.004	0.005	0.007
	3 horas (11:20)	0.004	0.005	0.006
	4 horas (12:20)	0.003	0.004	0.005
	5 horas (13:20)	0.003	0.004	0.005
	6 horas (14:20)	0.003	0.004	0.004
	7 horas (15:20)	0.003	0.003	0.004
	8 horas (16:20)	0.003	0.003	0.003
	9 horas (17:20)	0.003	0.003	0.003
	10 horas (18:20)	0.003	0	0.003
	11 horas (19:20)	0.003	0.002	0.003
	12 horas (20:20)	0.003	0.002	0.002
	13 horas (21:20)	0.003	0.002	0.002
	14 horas (22:20)	0.003	0.002	0.002
	15 horas (23:20)	0.002	0.001	0.002
	16 horas (00: 20) 16/10/17	0.002	0.002	0.001
	17 horas (01: 20)	0.002	0.002	0.001
	18 horas (02 : 20)	0.002	0.001	0.001
	19 horas (03: 20)	0.002	0	0
	20 horas (04: 20)	0.002	0	0
	21 horas (05: 20)	0	0	0
	22 horas (06 :20)	0	0	0
	23 horas (07: 20)	0	0	0
	24 horas (08 : 20)	0	0	0
30 horas (14 : 20)	0	0	0	
36 horas (20: 20)	0	0	0	
42 horas (02: 20) 17/10/17	0	0	0	
48 horas (8 :20)	0	0	0	
Fecha de Cierre del Registro: 17/10/17			Firma Analista: Gabriela M	
Legend nm = Nanómetro MSA-NO= Ácido S-nitrosomercaptosuccínico Np = Nanopartícula mg= miligramo mL=mililitro				



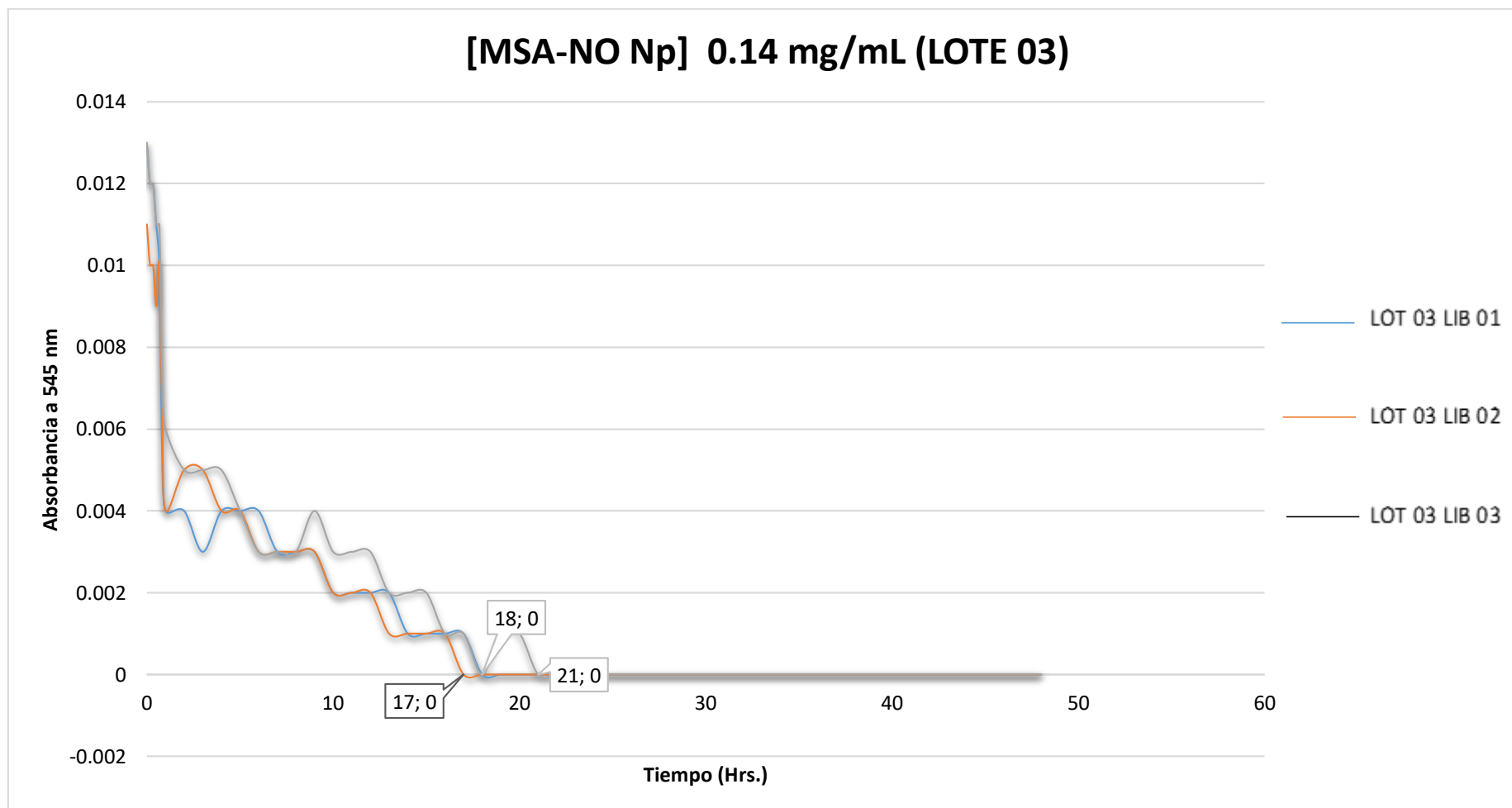
**FORMATO DE ANÁLISIS DEL PERFIL DE LIBERACIÓN DEL ÓXIDO NÍTRICO POR LAS
NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS DE QUITOSANO CARGADAS CON MSA-NO**

Análisis: Estimación del perfil de liberación del óxido nítrico por parte de las nanopartículas poliméricas de quitosano a partir de la descomposición del ácido s-nitrosomercaptosuccínico.				
Método: Espectrofotometría. Lectura a 545 nm.				
ANÁLISIS DE MUESTRAS PROBLEMA				
Fecha y Hora de Inicio: 15 de Octubre (08:20 a.m.)				
Muestra/ Concentración	Tiempos de Lectura	Absorbancia de Muestras		
		LOT02LIB01	LOT02 LIB 02	LOT02 LIB 03
LOTE 02 Np 0.14 mg/mL MSA-NO	0 minutos (08: 20)	0.012	0.012	0.012
	10 minutos (8 : 30)	0.011	0.011	0.012
	20 minutos (8:40)	0.011	0.011	0.011
	30 minutos (8:50)	0.011	0.01	0.01
	40 minutos (9:00)	0.008	0.008	0.008
	50 minutos (9:10)	0.006	0.007	0.006
	1 hora (9:20)	0.005	0.004	0.005
	2 horas (10: 20)	0.005	0.004	0.004
	3 horas (11:20)	0.004	0.004	0.004
	4 horas (12:20)	0.004	0.004	0.004
	5 horas (13:20)	0.004	0.003	0.003
	6 horas (14:20)	0.004	0.003	0.003
	7 horas (15:20)	0.003	0.003	0.003
	8 horas (16:20)	0.003	0.004	0.003
	9 horas (17:20)	0.003	0.003	0.004
	10 horas (18:20)	0.002	0.003	0.003
	11 horas (19:20)	0.002	0.002	0.003
	12 horas (20:20)	0.002	0.002	0.002
	13 horas (21:20)	0.001	0.001	0.002
	14 horas (22:20)	0.001	0.001	0.002
	15 horas (23:20)	0.001	0.001	0.001
	16 horas (00: 20) 16/10/17	0.001	0.001	0.001
	17 horas (01: 20)	0.001	0	0
	18 horas (02 : 20)	0	0	0
	19 horas (03: 20)	0	0	0
	20 horas (04: 20)	0	0	0
	21 horas (05: 20)	0	0	0
	22 horas (06 :20)	0	0	0
23 horas (07: 20)	0	0	0	
24 horas (08 : 20)	0	0	0	
30 horas (14 : 20)	0	0	0	
36 horas (20: 20)	0	0	0	
42 horas (02: 20) 17/10/17	0	0	0	
48 horas (8 :20)	0	0	0	
Fecha de Cierre del Registro: 17/10/17			Firma Analista: Gabriela M.	
Leyenda nm = Nanómetro MSA-NO= Ácido S-nitrosomercaptosuccínico Np= Nanopartícula mg= miligramo mL= mililitro				



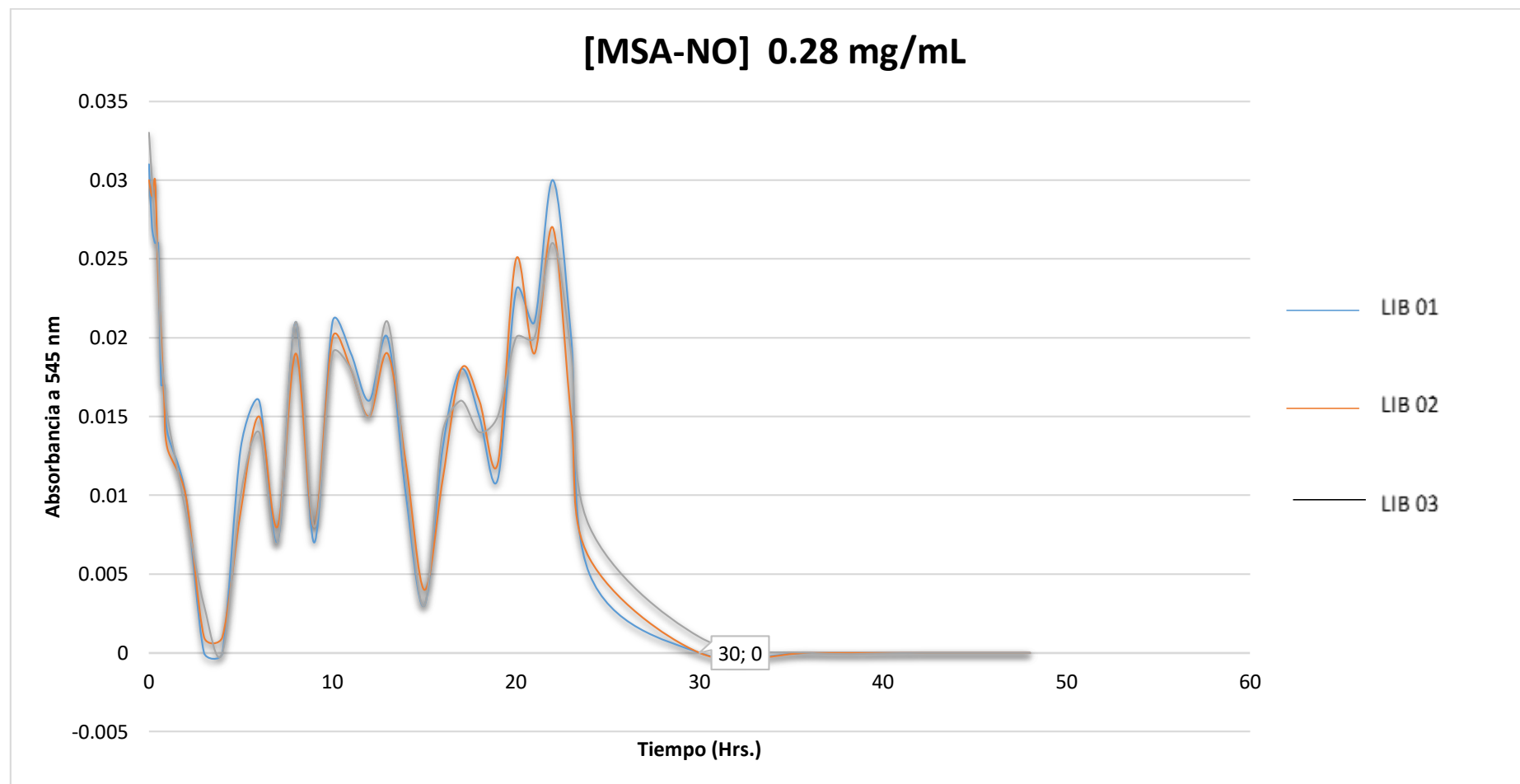
**FORMATO DE ANÁLISIS DEL PERFIL DE LIBERACIÓN DEL ÓXIDO NÍTRICO POR LAS
NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS DE QUITOSANO CARGADAS CON MSA-NO**

Análisis: Estimación del perfil de liberación del óxido nítrico por parte de las nanopartículas poliméricas de quitosano a partir de la descomposición del ácido s-nitrosomercaptosuccínico.				
Método: Espectrofotometría. Lectura a 545 nm.				
ANÁLISIS DE MUESTRAS PROBLEMA				
Fecha y Hora de Inicio: 15 de Octubre (08:20 a.m.)				
Muestra / Concentración	Tiempos de Lectura	Absorbancia de Muestras		
		LOT03 LIB01	LOT03 LIB 02	LOT03 LIB 03
LOTE 03 Np 0.14 mg/mL MSA-NO	0 minutos (08: 20)	0.013	0.011	0.013
	10 minutos (8 : 30)	0.012	0.01	0.012
	20 minutos (8:40)	0.012	0.01	0.012
	30 minutos (8:50)	0.011	0.009	0.011
	40 minutos (9:00)	0.01	0.01	0.011
	50 minutos (9:10)	0.005	0.006	0.007
	1 hora (9:20)	0.004	0.004	0.006
	2 horas (10: 20)	0.004	0.005	0.005
	3 horas (11:20)	0.003	0.005	0.005
	4 horas (12:20)	0.004	0.004	0.005
	5 horas (13:20)	0.004	0.004	0.004
	6 horas (14:20)	0.004	0.003	0.003
	7 horas (15:20)	0.003	0.003	0.003
	8 horas (16:20)	0.003	0.003	0.003
	9 horas (17:20)	0.003	0.003	0.004
	10 horas (18:20)	0.002	0.002	0.003
	11 horas (19:20)	0.002	0.002	0.003
	12 horas (20:20)	0.002	0.002	0.003
	13 horas (21:20)	0.002	0.001	0.002
	14 horas (22:20)	0.001	0.001	0.002
	15 horas (23:20)	0.001	0.001	0.002
	16 horas (00: 20) 16/10/17	0.001	0.001	0.001
	17 horas (01: 20)	0.001	0	0.001
	18 horas (02 : 20)	0	0	0
	19 horas (03: 20)	0	0	0.001
	20 horas (04: 20)	0	0	0.001
	21 horas (05: 20)	0	0	0
	22 horas (06 :20)	0	0	0
23 horas (07: 20)	0	0	0	
24 horas (08 : 20)	0	0	0	
30 horas (14 : 20)	0	0	0	
36 horas (20: 20)	0	0	0	
42 horas (02: 20) 17/10/17	0	0	0	
48 horas (8 :20)	0	0	0	
Fecha de Cierre del Registro: 17/10/17			Firma Analista: Gabriela M	
Leyenda nm = Nanómetro MSA-NO= Ácido S-nitrosomercaptosuccínico Np= Nanopartícula mg= miligramo mL= mililitro				



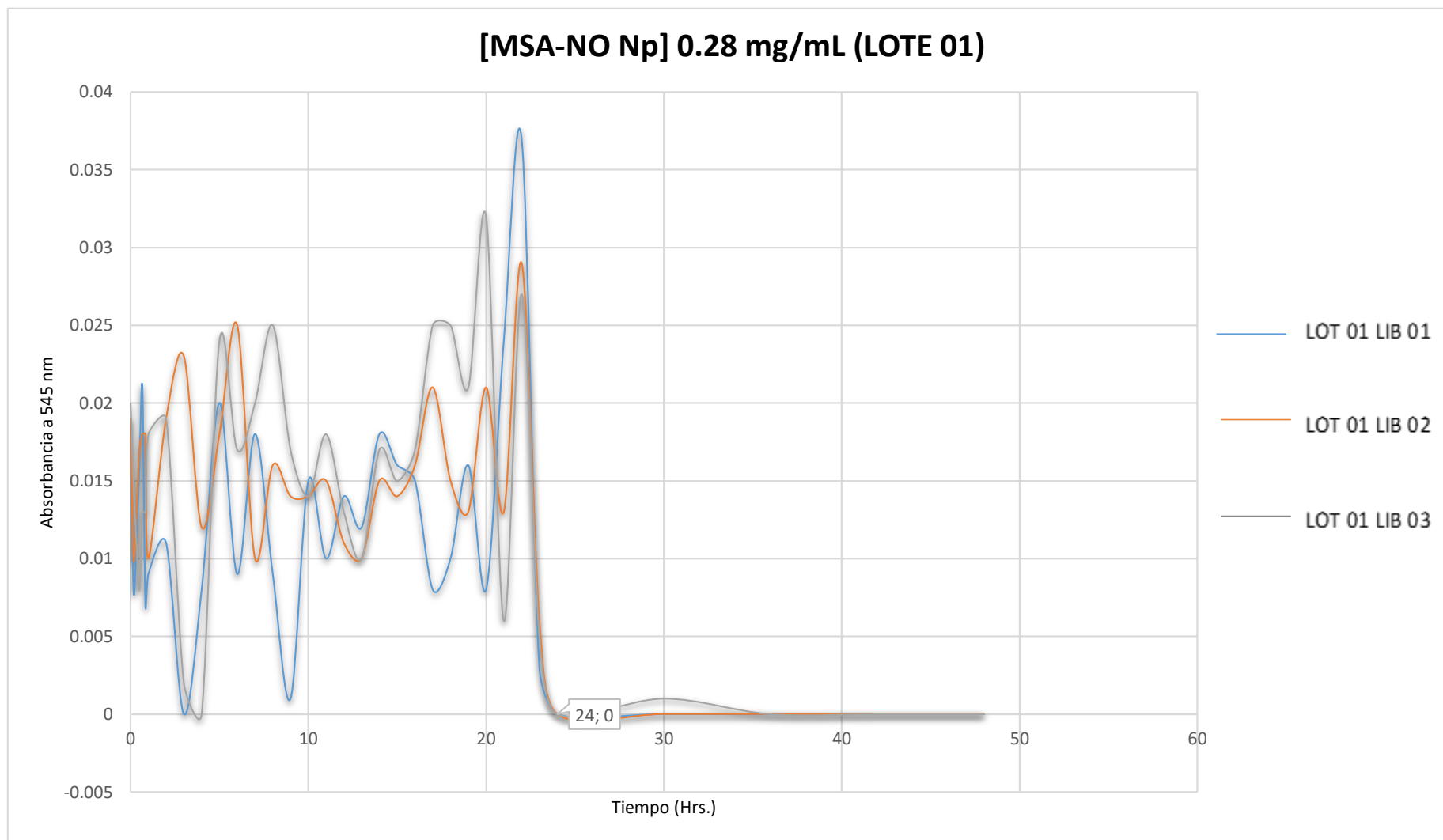
**FORMATO DE ANÁLISIS DEL PERFIL DE LIBERACIÓN DEL ÓXIDO NÍTRICO POR LAS
NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS DE QUITOSANO CARGADAS CON MSA-NO**

Análisis: Estimación del perfil de liberación del óxido nítrico por parte de las nanopartículas poliméricas de quitosano a partir de la descomposición del ácido s-nitrosomercaptosuccínico.				
Método: Espectrofotometría. Lectura a 545 nm.				
ANÁLISIS DE MUESTRAS PROBLEMA				
Fecha y Hora de Inicio: 15 de Octubre (08:20 a.m.)				
Muestra/ Concentración	Tiempos de Lectura	Absorbancia de Muestras		
		LIB01	LIB02	LIB03
MSA-NO 0.28 mg/mL	0 minutos (08: 20)	0.031	0.03	0.033
	10 minutos (8 : 30)	0.027	0.029	0.03
	20 minutos (8:40)	0.026	0.03	0.027
	30 minutos (8:50)	0.026	0.024	0.025
	40 minutos (9:00)	0.017	0.02	0.019
	50 minutos (9:10)	0.017	0.016	0.017
	1 hora (9:20)	0.014	0.013	0.015
	2 horas (10: 20)	0.01	0.01	0.009
	3 horas (11:20)	0	0.001	0.003
	4 horas (12:20)	0	0.001	0
	5 horas (13:20)	0.013	0.009	0.01
	6 horas (14:20)	0.016	0.015	0.014
	7 horas (15:20)	0.007	0.008	0.007
	8 horas (16:20)	0.021	0.019	0.021
	9 horas (17:20)	0.007	0.008	0.008
	10 horas (18:20)	0.021	0.02	0.019
	11 horas (19:20)	0.019	0.018	0.018
	12 horas (20:20)	0.016	0.015	0.015
	13 horas (21:20)	0.02	0.019	0.021
	14 horas (22:20)	0.01	0.012	0.011
	15 horas (23:20)	0.003	0.004	0.003
	16 horas (00: 20) 16/10/17	0.013	0.011	0.014
	17 horas (01: 20)	0.018	0.018	0.016
	18 horas (02 : 20)	0.015	0.016	0.014
	19 horas (03: 20)	0.011	0.012	0.015
	20 horas (04: 20)	0.023	0.025	0.02
	21 horas (05: 20)	0.021	0.019	0.02
	22 horas (06 :20)	0.03	0.027	0.026
	23 horas (07: 20)	0.02	0.015	0.019
	24 horas (08 : 20)	0.005	0.006	0.008
30 horas (14 : 20)	0	0	0.001	
36 horas (20: 20)	0	0	0	
42 horas (02: 20) 17/10/17	0	0	0	
48 horas (8 :20)	0	0	0	
Fecha de Cierre del Registro: 17/10/17			Firma Analista: Gabriela M	
Leyenda nm = Nanómetro MSA-NO= Ácido S-nitrosomercaptosuccínico Np= Nanopartícula mg= miligramo mL=mililitro				



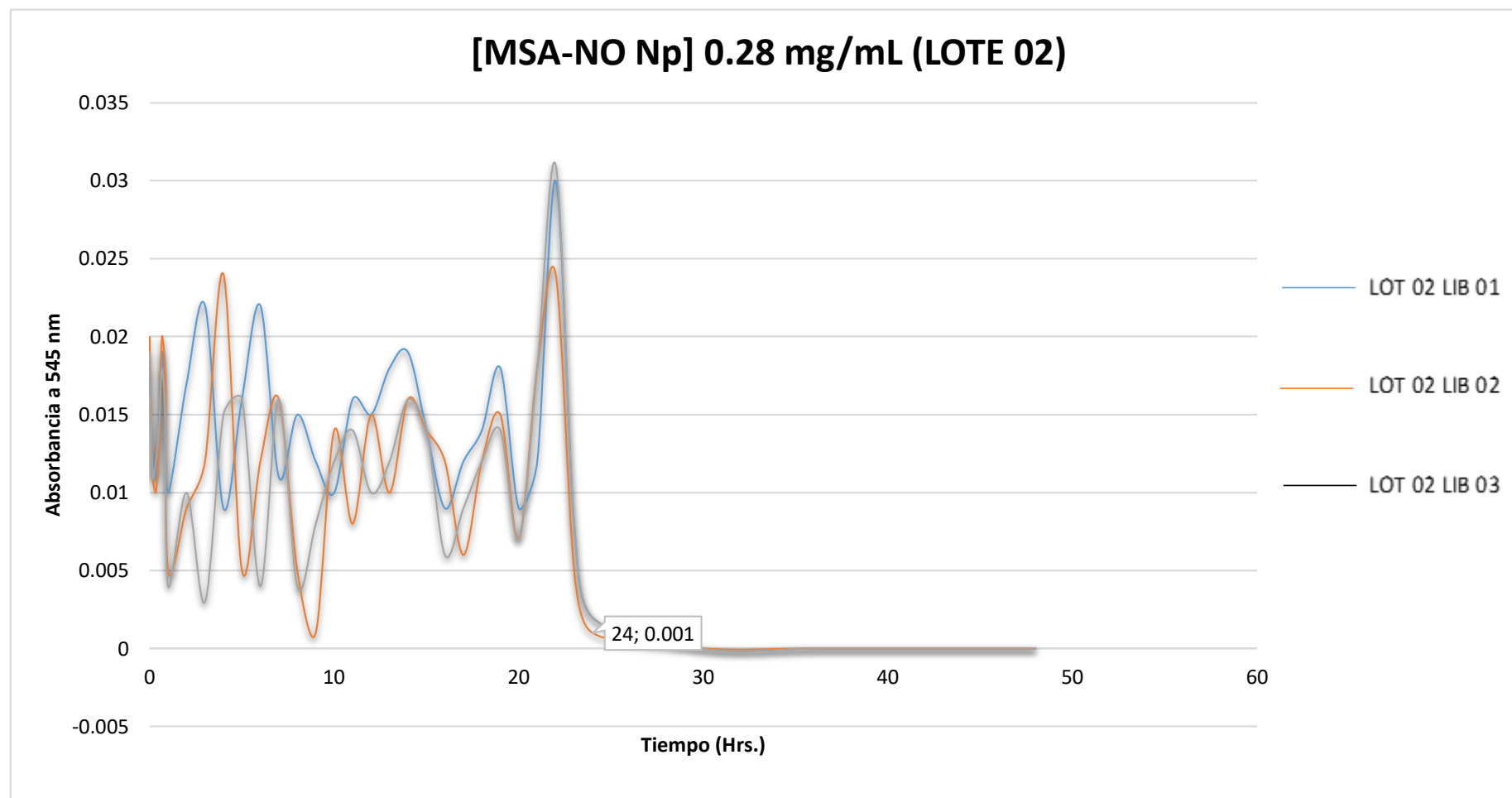
**FORMATO DE ANÁLISIS DEL PERFIL DE LIBERACIÓN DEL ÓXIDO NÍTRICO POR LAS
NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS DE QUITOSANO CARGADAS CON MSA-NO**

Análisis: Estimación del perfil de liberación del óxido nítrico por parte de las nanopartículas poliméricas de quitosano a partir de la descomposición del ácido s-nitrosomercaptosuccínico.				
Método: Espectrofotometría. Lectura a 545 nm.				
ANÁLISIS DE MUESTRAS PROBLEMA				
Fecha y Hora de Inicio: 15 de Octubre (08:20 a.m.)				
Muestra/ Concentración	Tiempos de Lectura	Absorbancia de Muestras		
		LOT01LIB01	LOT01LIB02	LOT01LIB03
LOTE 01 Np 0.28 mg/mL	0 minutos (08: 20)	0.019	0.019	0.02
	10 minutos (8 : 30)	0.008	0.01	0.015
	20 minutos (8:40)	0.011	0.013	0.011
	30 minutos (8:50)	0.016	0.017	0.008
	40 minutos (9:00)	0.021	0.018	0.013
	50 minutos (9:10)	0.007	0.018	0.013
	1 hora (9:20)	0.009	0.01	0.018
	2 horas (10: 20)	0.011	0.019	0.019
	3 horas (11:20)	0	0.023	0.002
	4 horas (12:20)	0.008	0.012	0
	5 horas (13:20)	0.02	0.018	0.024
	6 horas (14:20)	0.009	0.025	0.017
	7 horas (15:20)	0.018	0.01	0.02
	8 horas (16:20)	0.009	0.016	0.025
	9 horas (17:20)	0.001	0.014	0.017
	10 horas (18:20)	0.015	0.014	0.014
	11 horas (19:20)	0.01	0.015	0.018
	12 horas (20:20)	0.014	0.011	0.013
	13 horas (21:20)	0.012	0.01	0.01
	14 horas (22:20)	0.018	0.015	0.017
	15 horas (23:20)	0.016	0.014	0.015
	16 horas (00: 20) 16/10/17	0.015	0.016	0.017
	17 horas (01: 20)	0.008	0.021	0.025
	18 horas (02 : 20)	0.01	0.015	0.025
	19 horas (03: 20)	0.016	0.013	0.021
	20 horas (04: 20)	0.008	0.021	0.032
	21 horas (05: 20)	0.024	0.013	0.006
	22 horas (06 :20)	0.037	0.029	0.027
	23 horas (07: 20)	0.003	0.006	0.005
	24 horas (08 : 20)	0	0	0
30 horas (14 : 20)	0	0	0.001	
36 horas (20: 20)	0	0	0	
42 horas (02: 20) 17/10/17	0	0	0	
48 horas (8 :20)	0	0	0	
Fecha de Cierre del Registro: 17/10/17			Firma Analista: Gabriela M	
Leyenda nm = Nanómetro MSA-NO= Ácido S-nitrosomercaptosuccínico Np= Nanopartícula mg= miligramo mL= mililitro				



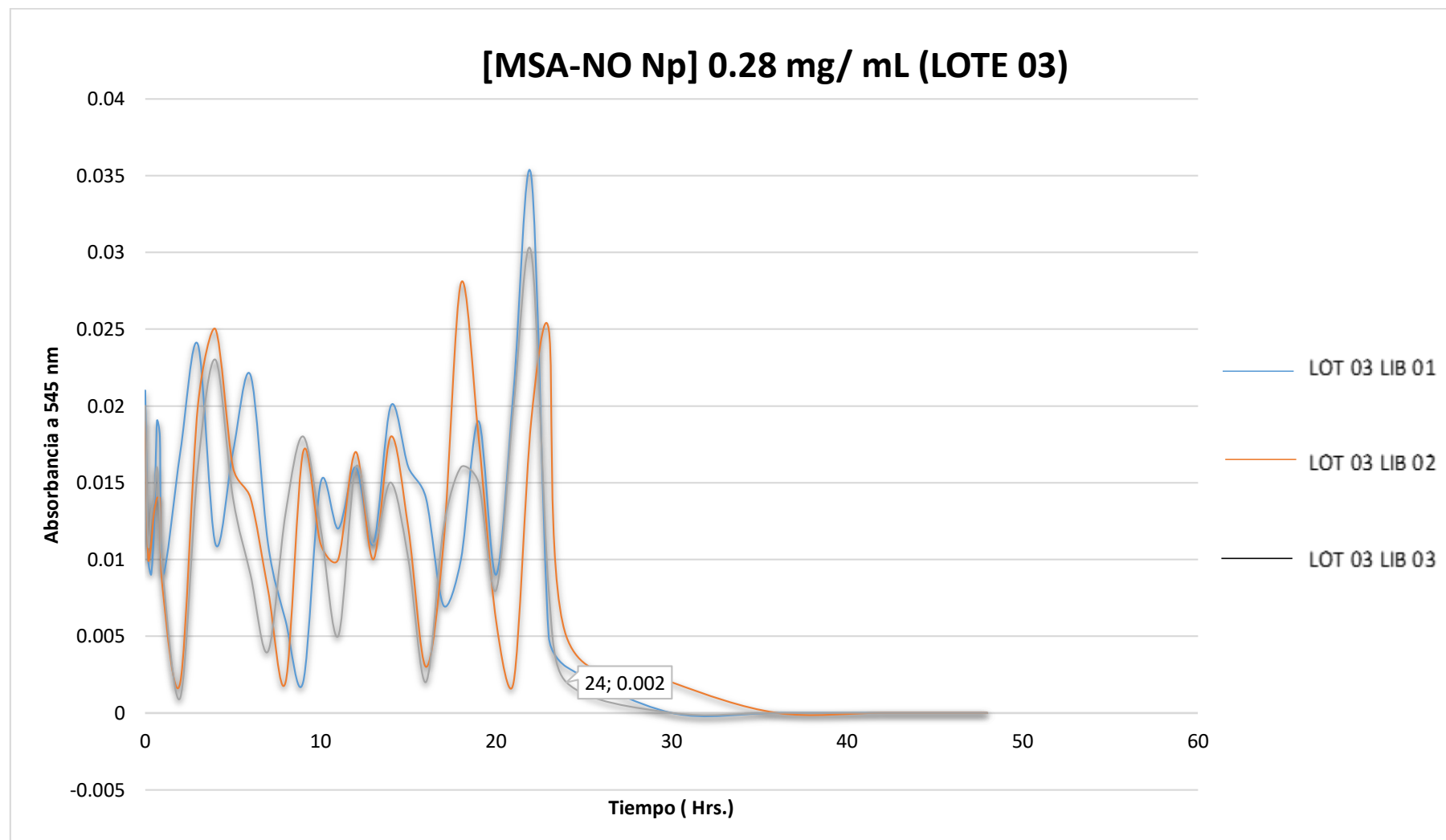
**FORMATO DE ANÁLISIS DEL PERFIL DE LIBERACIÓN DEL ÓXIDO NÍTRICO POR LAS
NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS DE QUITOSANO CARGADAS CON MSA-NO**

Análisis: Estimación del perfil de liberación del óxido nítrico por parte de las nanopartículas poliméricas de quitosano a partir de la descomposición del ácido s-nitrosomercaptosuccínico.				
Método: Espectrofotometría. Lectura a 545 nm.				
ANÁLISIS DE MUESTRAS PROBLEMA				
Fecha y Hora de Inicio: 15 de Octubre (08:20 a.m.)				
Muestra/ Concentración	Tiempos de Lectura	Absorbancia de Muestras		
		LOT02LIB01	LOT02LIB02	LOT02LIB03
LOTE 02 Np 0.28 mg/mL MSA-NO	0 minutos (08: 20)	0.018	0.02	0.019
	10 minutos (8 : 30)	0.012	0.011	0.011
	20 minutos (8:40)	0.011	0.01	0.012
	30 minutos (8:50)	0.014	0.013	0.014
	40 minutos (9:00)	0.019	0.02	0.018
	50 minutos (9:10)	0.016	0.018	0.015
	1 hora (9:20)	0.01	0.005	0.004
	2 horas (10: 20)	0.017	0.009	0.01
	3 horas (11:20)	0.022	0.012	0.003
	4 horas (12:20)	0.009	0.024	0.015
	5 horas (13:20)	0.016	0.005	0.016
	6 horas (14:20)	0.022	0.012	0.004
	7 horas (15:20)	0.011	0.016	0.016
	8 horas (16:20)	0.015	0.005	0.004
	9 horas (17:20)	0.012	0.001	0.008
	10 horas (18:20)	0.01	0.014	0.012
	11 horas (19:20)	0.016	0.008	0.014
	12 horas (20:20)	0.015	0.015	0.01
	13 horas (21:20)	0.018	0.01	0.012
	14 horas (22:20)	0.019	0.016	0.016
	15 horas (23:20)	0.014	0.014	0.014
	16 horas (00: 20) 16/10/17	0.009	0.012	0.006
	17 horas (01: 20)	0.012	0.006	0.009
	18 horas (02 : 20)	0.014	0.012	0.012
	19 horas (03: 20)	0.018	0.015	0.014
	20 horas (04: 20)	0.009	0.007	0.007
	21 horas (05: 20)	0.012	0.018	0.018
	22 horas (06 :20)	0.03	0.024	0.031
	23 horas (07: 20)	0.008	0.005	0.008
	24 horas (08 : 20)	0.002	0.001	0.002
30 horas (14 : 20)	0	0	0	
36 horas (20: 20)	0	0	0	
42 horas (02: 20) 17/10/17	0	0	0	
48 horas (8 :20)	0	0	0	
Fecha de Cierre del Registro: 17/10/17			Firma Analista: Gabriela M.	
Leyenda nm = Nanómetro MSA-NO= Ácido S-nitrosomercaptosuccínico Np= Nanopartícula mg= miligramo mL=mililitro				



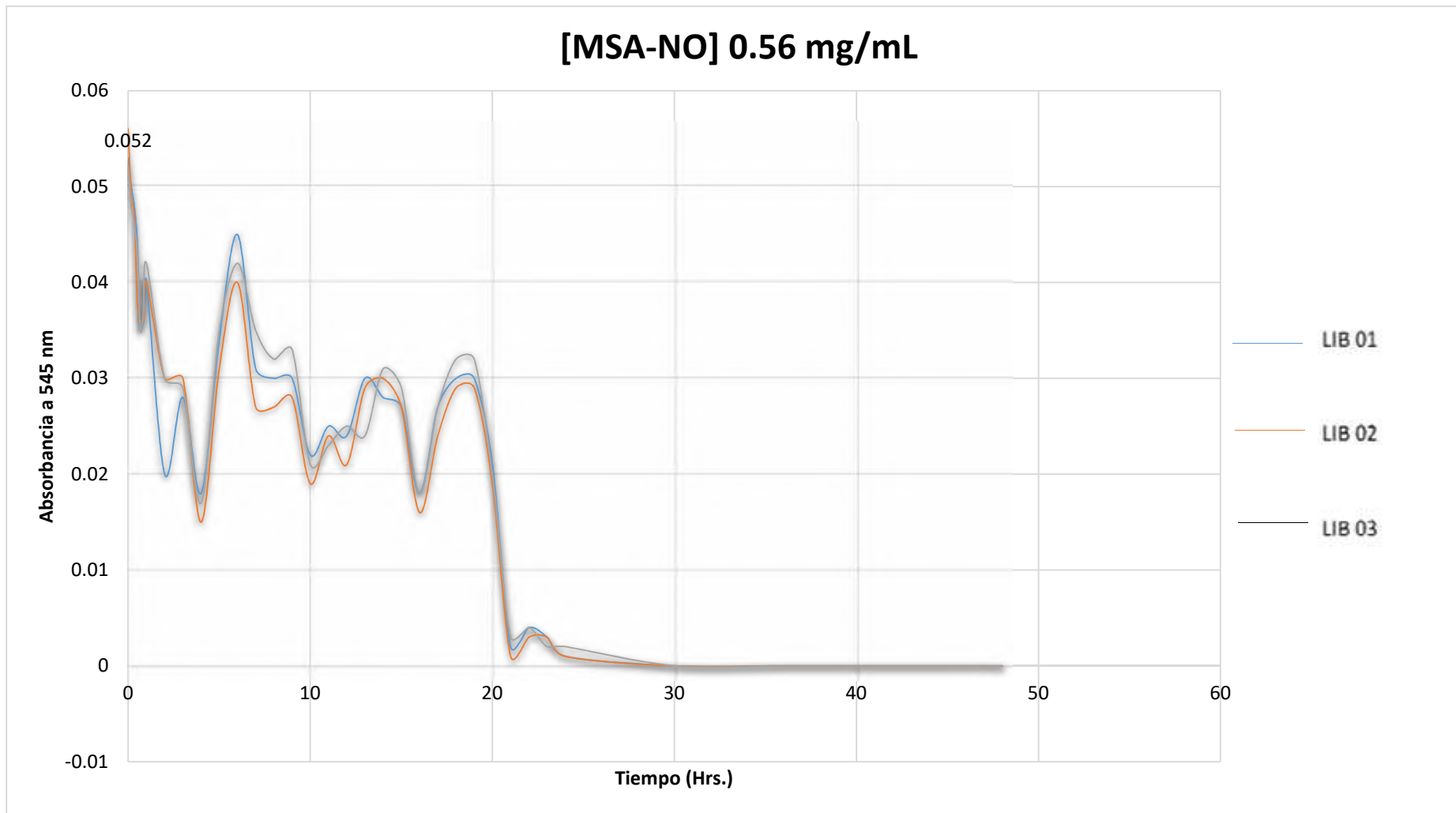
**FORMATO DE ANÁLISIS DEL PERFIL DE LIBERACIÓN DEL ÓXIDO NÍTRICO POR LAS
NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS DE QUITOSANO CARGADAS CON MSA-NO**

Análisis: Estimación del perfil de liberación del óxido nítrico por parte de las nanopartículas poliméricas de quitosano a partir de la descomposición del ácido s-nitrosomercaptosuccínico.				
Método: Espectrofotometría. Lectura a 545 nm.				
ANÁLISIS DE MUESTRAS PROBLEMA				
Fecha y Hora de Inicio: 15 de Octubre (08:20 a.m.)				
Muestra/ Concentración	Tiempos de Lectura	Absorbancia de Muestras		
		LOT03LIB01	LOT03LIB02	LOT03LIB03
LOTE 03 Np 0.28 mg/mL MSA-NO	0 minutos (08: 20)	0.021	0.019	0.02
	10 minutos (8 : 30)	0.01	0.01	0.011
	20 minutos (8:40)	0.009	0.011	0.013
	30 minutos (8:50)	0.012	0.013	0.014
	40 minutos (9:00)	0.019	0.014	0.016
	50 minutos (9:10)	0.018	0.014	0.013
	1 hora (9:20)	0.009	0.008	0.009
	2 horas (10: 20)	0.017	0.002	0.001
	3 horas (11:20)	0.024	0.02	0.016
	4 horas (12:20)	0.011	0.025	0.023
	5 horas (13:20)	0.017	0.016	0.014
	6 horas (14:20)	0.022	0.014	0.009
	7 horas (15:20)	0.011	0.008	0.004
	8 horas (16:20)	0.006	0.002	0.013
	9 horas (17:20)	0.002	0.017	0.018
	10 horas (18:20)	0.015	0.011	0.012
	11 horas (19:20)	0.012	0.01	0.005
	12 horas (20:20)	0.016	0.017	0.016
	13 horas (21:20)	0.011	0.01	0.011
	14 horas (22:20)	0.02	0.018	0.015
	15 horas (23:20)	0.016	0.012	0.01
	16 horas (00: 20) 16/10/17	0.014	0.003	0.002
	17 horas (01: 20)	0.007	0.011	0.012
	18 horas (02 : 20)	0.01	0.028	0.016
	19 horas (03: 20)	0.019	0.018	0.015
	20 horas (04: 20)	0.009	0.006	0.008
	21 horas (05: 20)	0.021	0.002	0.02
	22 horas (06 :20)	0.035	0.019	0.03
	23 horas (07: 20)	0.005	0.025	0.008
	24 horas (08 : 20)	0.003	0.005	0.002
30 horas (14 : 20)	0	0.002	0	
36 horas (20: 20)	0	0	0	
42 horas (02: 20) 17/10/17	0	0	0	
48 horas (8 :20)	0	0	0	
Fecha de Cierre del Registro: 17/10/17			Firma Analista: Gabriela M.	
Leyenda nm = Nanómetro MSA-NO= Ácido S-nitrosomercaptosuccínico Np= Nanopartícula mg= miligramo mL= mililitro				



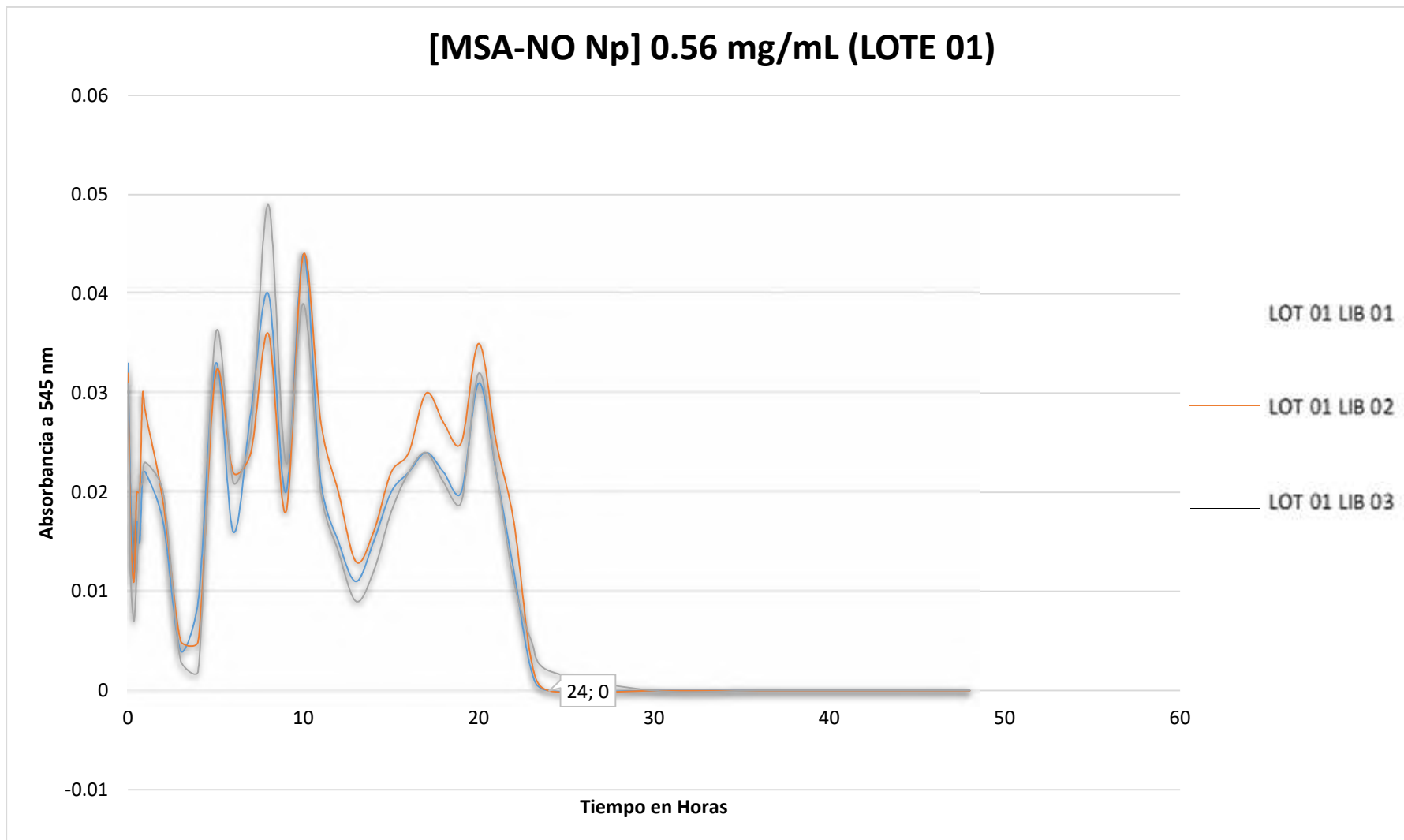
**FORMATO DE ANÁLISIS DEL PERFIL DE LIBERACIÓN DEL ÓXIDO NÍTRICO POR LAS
NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS DE QUITOSANO CARGADAS CON MSA-NO**

Análisis: Estimación del perfil de liberación del óxido nítrico por parte de las nanopartículas poliméricas de quitosano a partir de la descomposición del ácido s-nitrosomercaptosuccínico.				
Método: Espectrofotometría. Lectura a 545 nm.				
ANÁLISIS DE MUESTRAS PROBLEMA				
Fecha y Hora de Inicio: 12 de Octubre (08:40 a.m.)				
Muestra/ Concentración	Tiempos de Lectura	Absorbancia de Muestras		
		LIB01	LIB02	LIB03
MSA-NO 0.56 mg/mL	0 minutos (08: 40)	0.053	0.056	0.052
	10 minutos (08 : 50)	0.05	0.049	0.048
	20 minutos (9:00)	0.048	0.047	0.046
	30 minutos (9:10)	0.044	0.038	0.043
	40 minutos (9:20)	0.035	0.036	0.035
	50 minutos (9:30)	0.036	0.036	0.037
	1 hora (9:40)	0.04	0.04	0.042
	2 horas (10: 40)	0.02	0.03	0.03
	3 horas (11:40)	0.028	0.03	0.029
	4 horas (12:40)	0.018	0.015	0.017
	5 horas (13:40)	0.034	0.031	0.035
	6 horas (14:40)	0.045	0.04	0.042
	7 horas (15:40)	0.031	0.027	0.035
	8 horas (16:40)	0.03	0.027	0.032
	9 horas (17:40)	0.03	0.028	0.033
	10 horas (18:40)	0.022	0.019	0.021
	11 horas (19:40)	0.025	0.024	0.023
	12 horas (20:40)	0.024	0.021	0.025
	13 horas (21:40)	0.03	0.029	0.024
	14 horas (22:40)	0.028	0.03	0.031
	15 horas (23:40)	0.027	0.027	0.029
	16 horas (00: 40) 13/10/17	0.018	0.016	0.018
	17 horas (01: 40)	0.027	0.024	0.027
	18 horas (02 : 40)	0.03	0.029	0.032
	19 horas (03: 40)	0.03	0.029	0.032
	20 horas (04: 40)	0.021	0.019	0.02
	21 horas (05: 40)	0.002	0.001	0.003
	22 horas (06 :40)	0.004	0.003	0.004
	23 horas (07: 40)	0.003	0.003	0.002
	24 horas (08 : 40)	0.001	0.001	0.002
30 horas (14 : 40)	0	0	0	
36 horas (20: 40)	0	0	0	
42 horas (02: 40) 14/10/17	0	0	0	
48 horas (8 :40)	0	0	0	
Fecha de Cierre del Registro: 14/10/17			Firma Analista: Gabriela M	
Leyenda nm = Nanómetro MSA-NO= Ácido S-nitrosomercaptosuccínico Np= Nanopartícula mg= miligramo mL= mililitro				



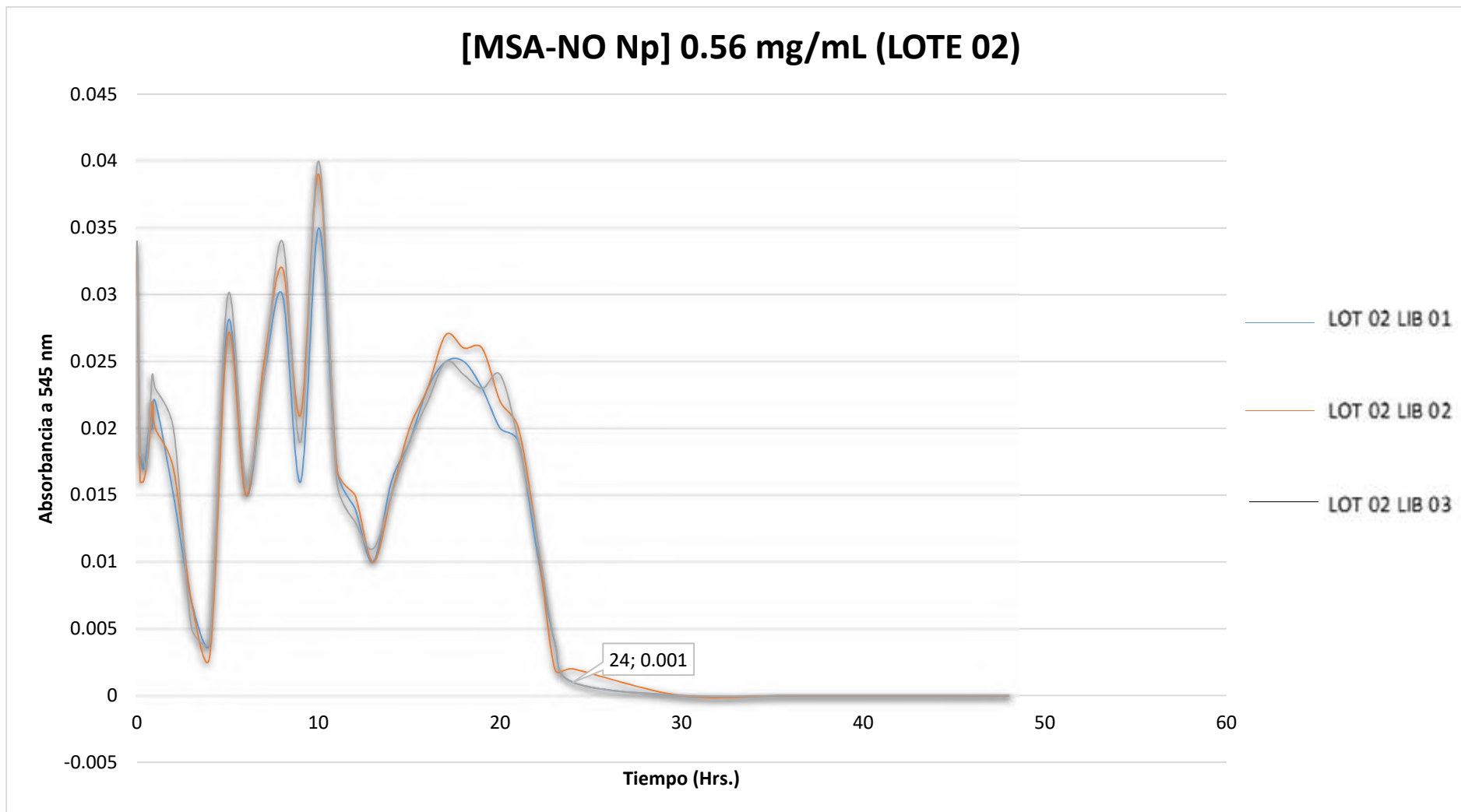
**FORMATO DE ANÁLISIS DEL PERFIL DE LIBERACIÓN DEL ÓXIDO NÍTRICO POR LAS
NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS DE QUITOSANO CARGADAS CON MSA-NO**

Análisis: Estimación del perfil de liberación del óxido nítrico por parte de las nanopartículas poliméricas de quitosano a partir de la descomposición del ácido s-nitrosomercaptosuccínico.				
Método: Espectrofotometría. Lectura a 545 nm.				
ANÁLISIS DE MUESTRAS PROBLEMA				
Fecha y Hora de Inicio: 12 de Octubre (08:40 a.m.)				
Muestra/ Concentración	Tiempos de Lectura	Absorbancia de Muestras		
		LOT01LIB01	LOT01LIB02	LOT01LIB03
LOTE 01 Np 0.56 mg/mL MSA-NO	0 minutos (08: 40)	0.033	0.032	0.031
	10 minutos (8 : 50)	0.018	0.015	0.011
	20 minutos (9:00)	0.012	0.011	0.007
	30 minutos (9:10)	0.017	0.02	0.012
	40 minutos (9:20)	0.015	0.02	0.02
	50 minutos (9:30)	0.022	0.03	0.021
	1 hora (9:40)	0.022	0.028	0.023
	2 horas (10: 40)	0.017	0.019	0.02
	3 horas (11:40)	0.004	0.005	0.003
	4 horas (12:40)	0.009	0.005	0.002
	5 horas (13:40)	0.033	0.032	0.036
	6 horas (14:40)	0.016	0.022	0.021
	7 horas (15:40)	0.028	0.024	0.026
	8 horas (16:40)	0.04	0.036	0.049
	9 horas (17:40)	0.02	0.018	0.023
	10 horas (18:40)	0.044	0.044	0.039
	11 horas (19:40)	0.021	0.027	0.02
	12 horas (20:40)	0.015	0.02	0.014
	13 horas (21:40)	0.011	0.013	0.009
	14 horas (22:40)	0.015	0.016	0.012
	15 horas (23:40)	0.02	0.022	0.018
	16 horas (00: 40) 13/10/17	0.022	0.024	0.022
	17 horas (01: 40)	0.024	0.03	0.024
	18 horas (02 : 40)	0.022	0.027	0.021
	19 horas (03: 40)	0.02	0.025	0.019
	20 horas (04: 40)	0.031	0.035	0.032
	21 horas (05: 40)	0.022	0.025	0.022
	22 horas (06 :40)	0.012	0.017	0.011
	23 horas (07: 40)	0.002	0.003	0.005
	24 horas (08 : 40)	0	0	0.002
30 horas (14 : 40)	0	0	0	
36 horas (20: 40)	0	0	0	
42 horas (02: 40) 14/10/17	0	0	0	
48 horas (8 :40)	0	0	0	
Fecha de Cierre del Registro: 14/10/17			Firma Analista: Gabriela M	
Leyenda nm = Nanómetro MSA-NO= Ácido S-nitrosomercaptosuccínico Np= Nanopartícula mg= miligramo mL=mililitro				



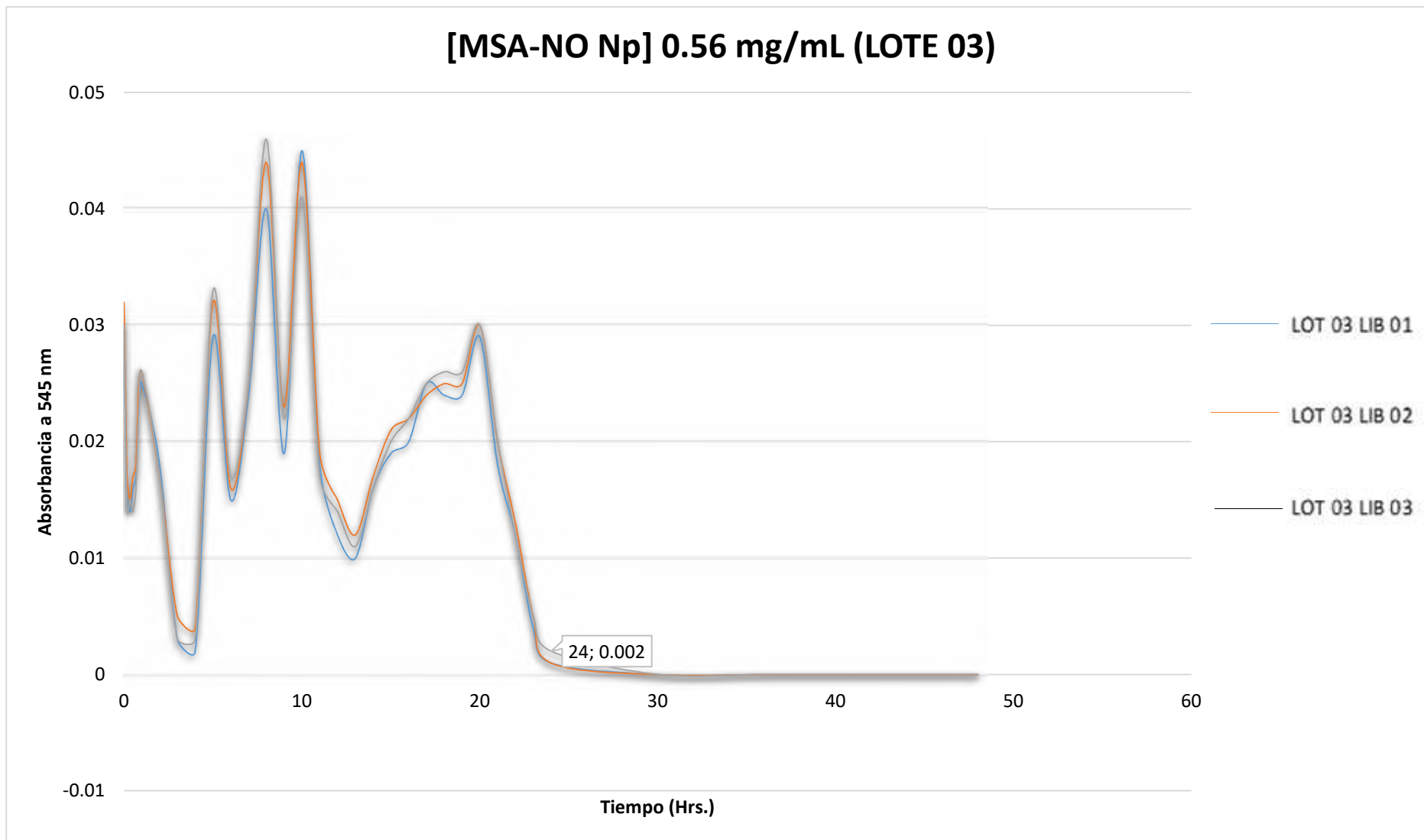
**FORMATO DE ANÁLISIS DEL PERFIL DE LIBERACIÓN DEL ÓXIDO NÍTRICO POR LAS
NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS DE QUITOSANO CARGADAS CON MSA-NO**

Análisis: Estimación del perfil de liberación del óxido nítrico por parte de las nanopartículas poliméricas de quitosano a partir de la descomposición del ácido s-nitrosomercaptosuccínico.				
Método: Espectrofotometría. Lectura a 545 nm.				
ANÁLISIS DE MUESTRAS PROBLEMA				
Fecha y Hora de Inicio: 12 de Octubre (08:40 a.m.)				
Muestra/ Concentración	Tiempos de Lectura	Absorbancia de Muestras		
		LOT02LIB01	LOT02LIB02	LOT02LIB03
LOTE 02 Np 0.56 mg/mL MSA-NO	0 minutos (08: 40)	0.034	0.033	0.034
	10 minutos (8 : 50)	0.018	0.016	0.018
	20 minutos (9:00)	0.017	0.016	0.018
	30 minutos (9:10)	0.018	0.017	0.017
	40 minutos (9:20)	0.02	0.019	0.02
	50 minutos (9:30)	0.02	0.022	0.024
	1 hora (9:40)	0.022	0.02	0.023
	2 horas (10: 40)	0.015	0.017	0.02
	3 horas (11:40)	0.007	0.007	0.005
	4 horas (12:40)	0.004	0.003	0.004
	5 horas (13:40)	0.028	0.027	0.03
	6 horas (14:40)	0.015	0.015	0.016
	7 horas (15:40)	0.024	0.025	0.024
	8 horas (16:40)	0.03	0.032	0.034
	9 horas (17:40)	0.016	0.021	0.019
	10 horas (18:40)	0.035	0.039	0.04
	11 horas (19:40)	0.017	0.017	0.016
	12 horas (20:40)	0.014	0.015	0.013
	13 horas (21:40)	0.01	0.01	0.011
	14 horas (22:40)	0.016	0.015	0.015
	15 horas (23:40)	0.019	0.02	0.019
	16 horas (00: 40) 13/10/17	0.023	0.023	0.022
	17 horas (01: 40)	0.025	0.027	0.025
	18 horas (02 : 40)	0.025	0.026	0.024
	19 horas (03: 40)	0.023	0.026	0.023
	20 horas (04: 40)	0.02	0.022	0.024
	21 horas (05: 40)	0.019	0.02	0.019
	22 horas (06 :40)	0.011	0.012	0.012
	23 horas (07: 40)	0.004	0.002	0.004
	24 horas (08 : 40)	0.001	0.002	0.001
30 horas (14 : 40)	0	0	0	
36 horas (20: 40)	0	0	0	
42 horas (02: 40) 14/10/17	0	0	0	
48 horas (8 :40)	0	0	0	
Fecha de Cierre del Registro: 14/10/17			Firma Analista: Gabriela M	
Leyenda nm = Nanómetro MSA-NO= Ácido S-nitrosomercaptosuccínico Np= Nanopartícula mg= miligramo mL=mililitro				



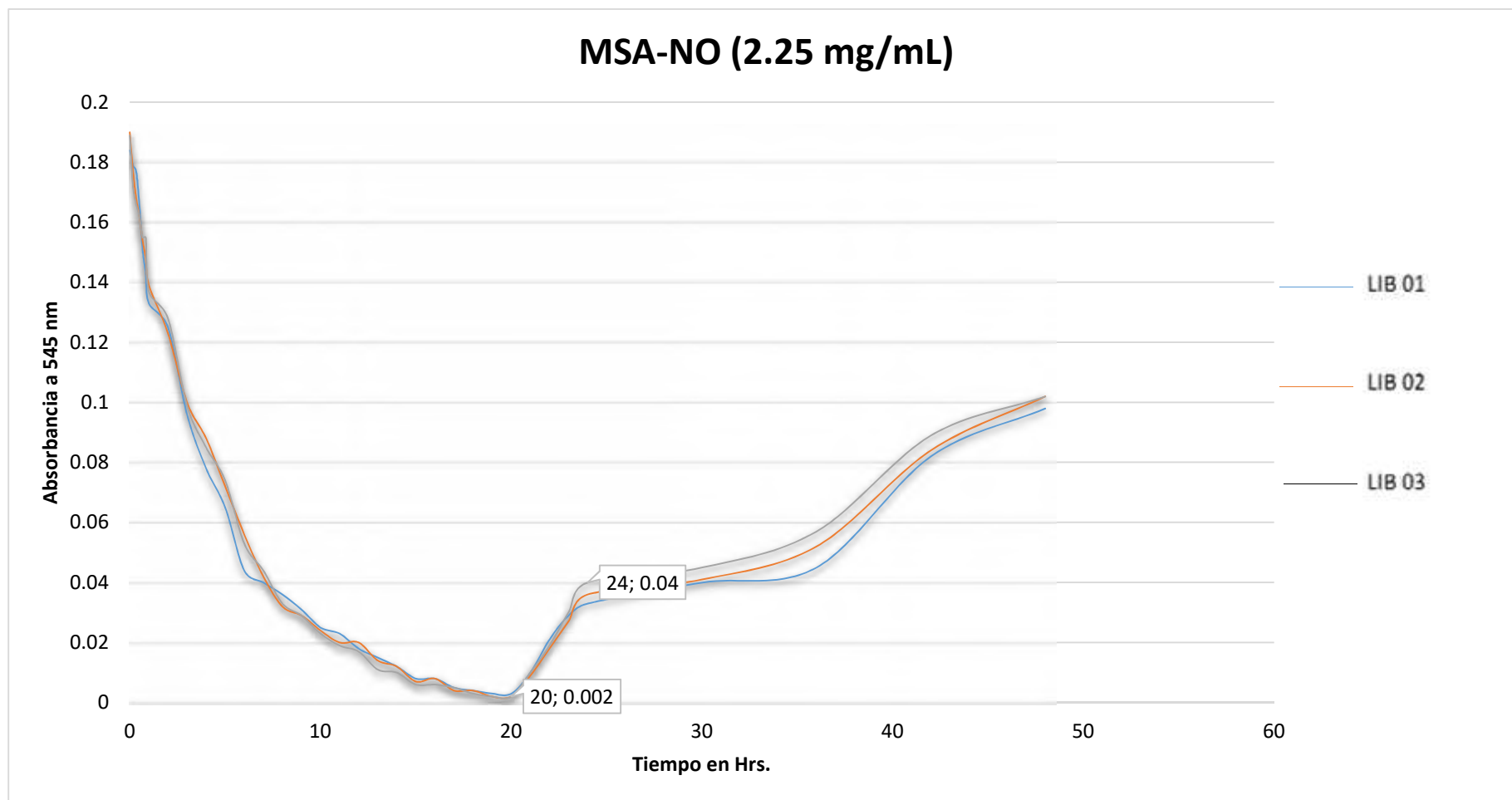
**FORMATO DE ANÁLISIS DEL PERFIL DE LIBERACIÓN DEL ÓXIDO NÍTRICO POR LAS
NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS DE QUITOSANO CARGADAS CON MSA-NO**

Análisis: Estimación del perfil de liberación del óxido nítrico por parte de las nanopartículas poliméricas de quitosano a partir de la descomposición del ácido s-nitrosomercaptosuccínico.				
Método: Espectrofotometría. Lectura a 545 nm.				
ANÁLISIS DE MUESTRAS PROBLEMA				
Fecha y Hora de Inicio: 12 de Octubre (08:40 a.m.)				
Muestra/ Concentración	Tiempos de Lectura	Absorbancia de Muestras		
		LOT03LIB01	LOT03LIB02	LOT03LIB03
LOTE 03 Np 0.56 mg/mL MSA-NO	0 minutos (08: 40)	0.03	0.032	0.03
	10 minutos (08 : 50)	0.015	0.017	0.014
	20 minutos (9:00)	0.014	0.015	0.015
	30 minutos (9:10)	0.016	0.017	0.014
	40 minutos (9:20)	0.017	0.018	0.016
	50 minutos (9:30)	0.023	0.025	0.023
	1 hora (9:40)	0.025	0.026	0.026
	2 horas (10: 40)	0.018	0.017	0.017
	3 horas (11:40)	0.003	0.005	0.003
	4 horas (12:40)	0.002	0.004	0.003
	5 horas (13:40)	0.029	0.032	0.033
	6 horas (14:40)	0.015	0.016	0.017
	7 horas (15:40)	0.024	0.025	0.025
	8 horas (16:40)	0.04	0.044	0.046
	9 horas (17:40)	0.019	0.023	0.022
	10 horas (18:40)	0.045	0.044	0.041
	11 horas (19:40)	0.018	0.019	0.017
	12 horas (20:40)	0.012	0.015	0.014
	13 horas (21:40)	0.01	0.012	0.011
	14 horas (22:40)	0.016	0.017	0.016
	15 horas (23:40)	0.019	0.021	0.02
	16 horas (00: 40) 13/10/17	0.02	0.022	0.022
	17 horas (01: 40)	0.025	0.024	0.025
	18 horas (02 : 40)	0.024	0.025	0.026
	19 horas (03: 40)	0.024	0.025	0.026
	20 horas (04: 40)	0.029	0.03	0.03
	21 horas (05: 40)	0.018	0.02	0.02
	22 horas (06 :40)	0.012	0.013	0.012
	23 horas (07: 40)	0.004	0.005	0.005
	24 horas (08 : 40)	0.001	0.001	0.002
30 horas (14 : 40)	0	0	0	
36 horas (20: 40)	0	0	0	
42 horas (02: 40) 14/10/17	0	0	0	
48 horas (8 :40)	0	0	0	
Fecha de Cierre del Registro: 14/10/17			Firma Analista: Gabriela M	
Leyenda nm = Nanómetro MSA-NO= Ácido S-nitrosomercaptosuccínico Np= Nanopartícula mg= miligramo mL=mililitro				



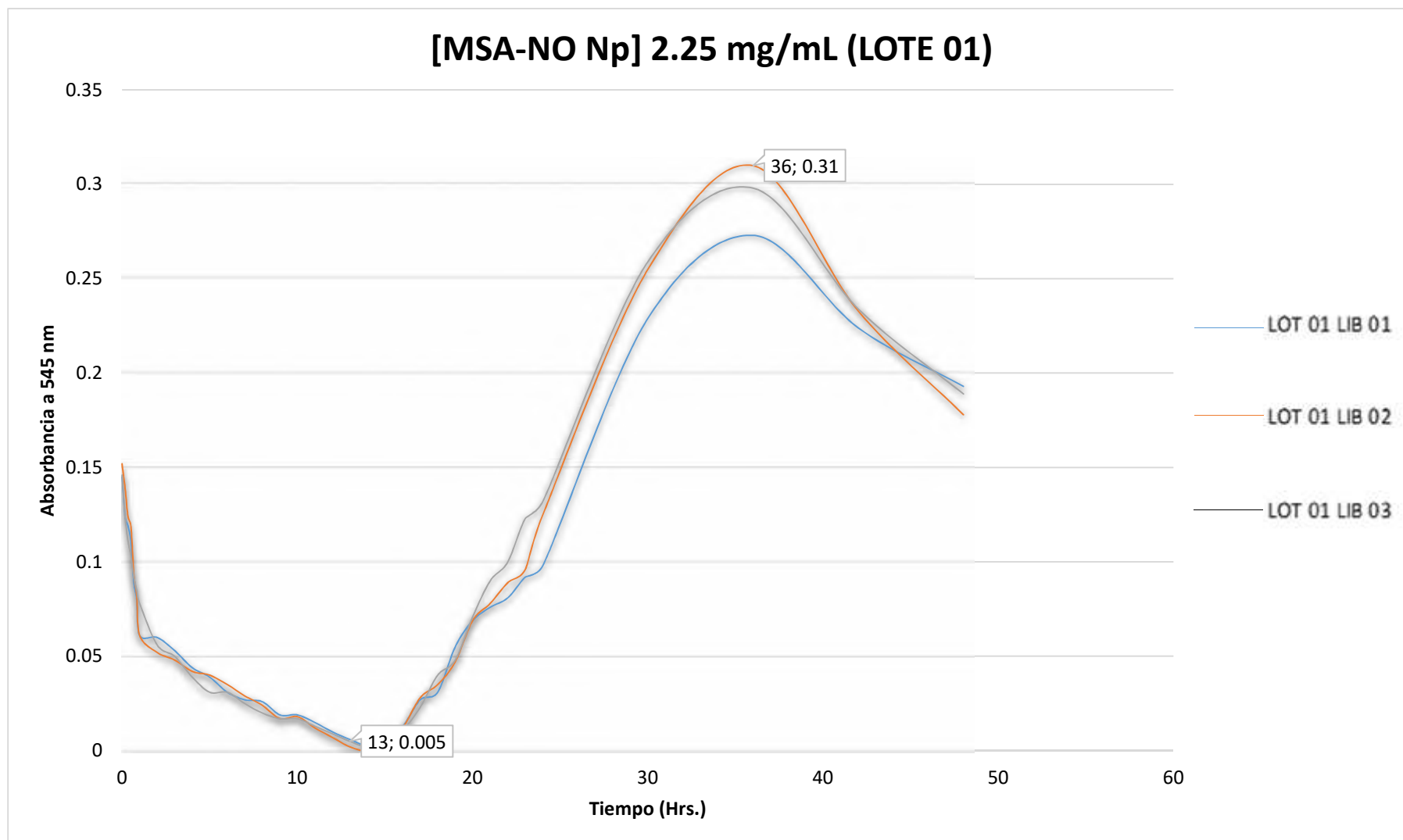
**FORMATO DE ANÁLISIS DEL PERFIL DE LIBERACIÓN DEL ÓXIDO NÍTRICO POR LAS
NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS DE QUITOSANO CARGADAS CON MSA-NO**

Análisis: Estimación del perfil de liberación del óxido nítrico por parte de las nanopartículas poliméricas de quitosano a partir de la descomposición del ácido s-nitrosomercaptosuccínico.				
Método: Espectrofotometría. Lectura a 545 nm.				
ANÁLISIS DE MUESTRAS PROBLEMA				
Fecha y Hora de Inicio: 09 de Octubre (10.20 a.m.)				
Muestra/ Concentración	Tiempos de Lectura	Absorbancia de Muestras		
		LIB01	LIB02	LIB03
MSA-NO 2.25 mg/mL	0 minutos (10: 20)	0.184	0.19	0.189
	10 minutos (10: 30)	0.179	0.177	0.172
	20 minutos (10:40)	0.166	0.162	0.162
	30 minutos (10:50)	0.151	0.154	0.155
	40 minutos (11:00)	0.143	0.148	0.155
	50 minutos (11:10)	0.133	0.139	0.137
	1 hora (11:20)	0.125	0.123	0.128
	2 horas (12: 20)	0.096	0.1	0.099
	3 horas (13:20)	0.078	0.088	0.085
	4 horas (14:20)	0.065	0.072	0.074
	5 horas (15:20)	0.044	0.056	0.053
	6 horas (16:20)	0.04	0.042	0.044
	7 horas (17:20)	0.036	0.032	0.033
	8 horas (18:20)	0.031	0.029	0.029
	9 horas (19:20)	0.025	0.024	0.023
	10 horas (20:20)	0.023	0.02	0.019
	11 horas (21:20)	0.018	0.02	0.017
	12 horas (22:20)	0.015	0.014	0.011
	13 horas (23:20)	0.012	0.012	0.01
	14 horas (00:20) 10/10/17	0.008	0.007	0.006
	15 horas (01:20)	0.008	0.008	0.006
	16 horas (02: 20)	0.005	0.004	0.005
	17 horas (03: 20)	0.004	0.004	0.003
	18 horas (04: 20)	0.003	0.002	0.002
	19 horas (05: 20)	0.003	0.002	0.002
	20 horas (06: 20)	0.01	0.009	0.01
	21 horas (07: 20)	0.021	0.018	0.019
	22 horas (08 :20)	0.029	0.027	0.03
	23 horas (09: 20)	0.033	0.036	0.04
	24 horas (10 : 20)	0.04	0.041	0.045
30 horas (16 : 20)	0.045	0.052	0.057	
36 horas (22: 20)	0.082	0.084	0.089	
42 horas (04 : 20) 11/10/17	0.098	0.102	0.102	
48 horas (10:20)	0.184	0.19	0.189	
Fecha de Cierre del Registro: 11/10/17		Firma Analista:	Gabriela M.	
Leyenda: nm = Nanómetro MSA-NO= Ácido S-nitrosomercaptosuccínico Np= Nanopartícula mg= miligramo mL= mililitro				



**FORMATO DE ANÁLISIS DEL PERFIL DE LIBERACIÓN DEL ÓXIDO NÍTRICO POR LAS
NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS DE QUITOSANO CARGADAS CON MSA-NO**

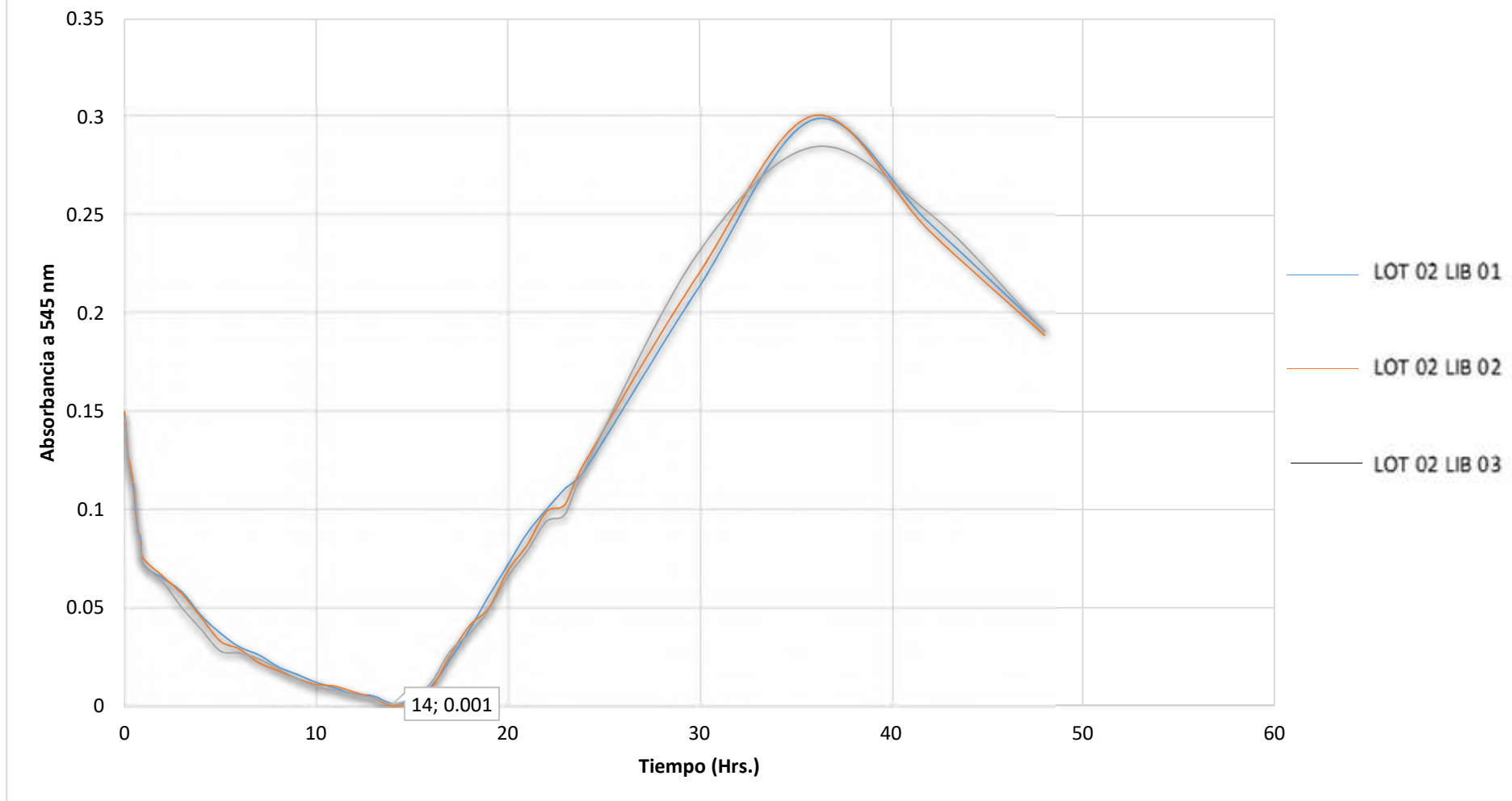
Análisis: Estimación del perfil de liberación del óxido nítrico por parte de las nanopartículas poliméricas de quitosano a partir de la descomposición del ácido s-nitrosomercaptosuccínico.				
Método: Espectrofotometría. Lectura a 545 nm.				
ANÁLISIS DE MUESTRAS PROBLEMA				
Fecha y Hora de Inicio: 09 de Octubre (10.20 a.m.)				
Muestra/ Concentración	Tiempos de Lectura	Absorbancia de Muestras		
		LOT01LIB01	LOT01LIB02	LOT01LIB03
LOTE 01 Np MSA-NO 2.25 mg/mL	0 minutos (10: 20)	0.145	0.152	0.146
	10 minutos (10: 30)	0.124	0.139	0.124
	20 minutos (10:40)	0.119	0.124	0.111
	30 minutos (10:50)	0.111	0.119	0.103
	40 minutos (11:00)	0.089	0.093	0.092
	50 minutos (11:10)	0.08	0.082	0.085
	1 hora (11:20)	0.061	0.061	0.078
	2 horas (12: 20)	0.06	0.052	0.056
	3 horas (13:20)	0.053	0.048	0.05
	4 horas (14:20)	0.044	0.042	0.039
	5 horas (15:20)	0.039	0.04	0.031
	6 horas (16:20)	0.031	0.035	0.031
	7 horas (17:20)	0.027	0.029	0.025
	8 horas (18:20)	0.026	0.024	0.02
	9 horas (19:20)	0.019	0.017	0.017
	10 horas (20:20)	0.019	0.018	0.017
	11 horas (21:20)	0.015	0.012	0.013
	12 horas (22:20)	0.01	0.007	0.009
	13 horas (23:20)	0.006	0.002	0.005
	14 horas (00:20) 10/10/17	0.003	0	0.002
	15 horas (01:20)	0.008	0.004	0.005
	16 horas (02: 20)	0.013	0.012	0.011
	17 horas (03: 20)	0.027	0.028	0.023
	18 horas (04: 20)	0.031	0.035	0.04
	19 horas (05: 20)	0.055	0.047	0.048
	20 horas (06: 20)	0.069	0.069	0.071
	21 horas (07: 20)	0.076	0.078	0.09
	22 horas (08 :20)	0.081	0.089	0.1
	23 horas (09: 20)	0.092	0.096	0.123
	24 horas (10 : 20)	0.098	0.125	0.132
30 horas (16 : 20)	0.229	0.255	0.259	
36 horas (22: 20)	0.273	0.31	0.298	
42 horas (04 : 20) 11/10/17	0.224	0.233	0.234	
48 horas (10:20)	0.193	0.178	0.189	
Fecha de Cierre del Registro: 11/10/17			Firma Analista: Gabriela M	
Leyenda: nm = Nanómetro MSA-NO= Ácido S-nitrosomercaptosuccínico Np= Nanopartícula mg= miligramo mL= mililitro				



**FORMATO DE ANÁLISIS DEL PERFIL DE LIBERACIÓN DEL ÓXIDO NÍTRICO POR LAS
NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS DE QUITOSANO CARGADAS CON MSA-NO**

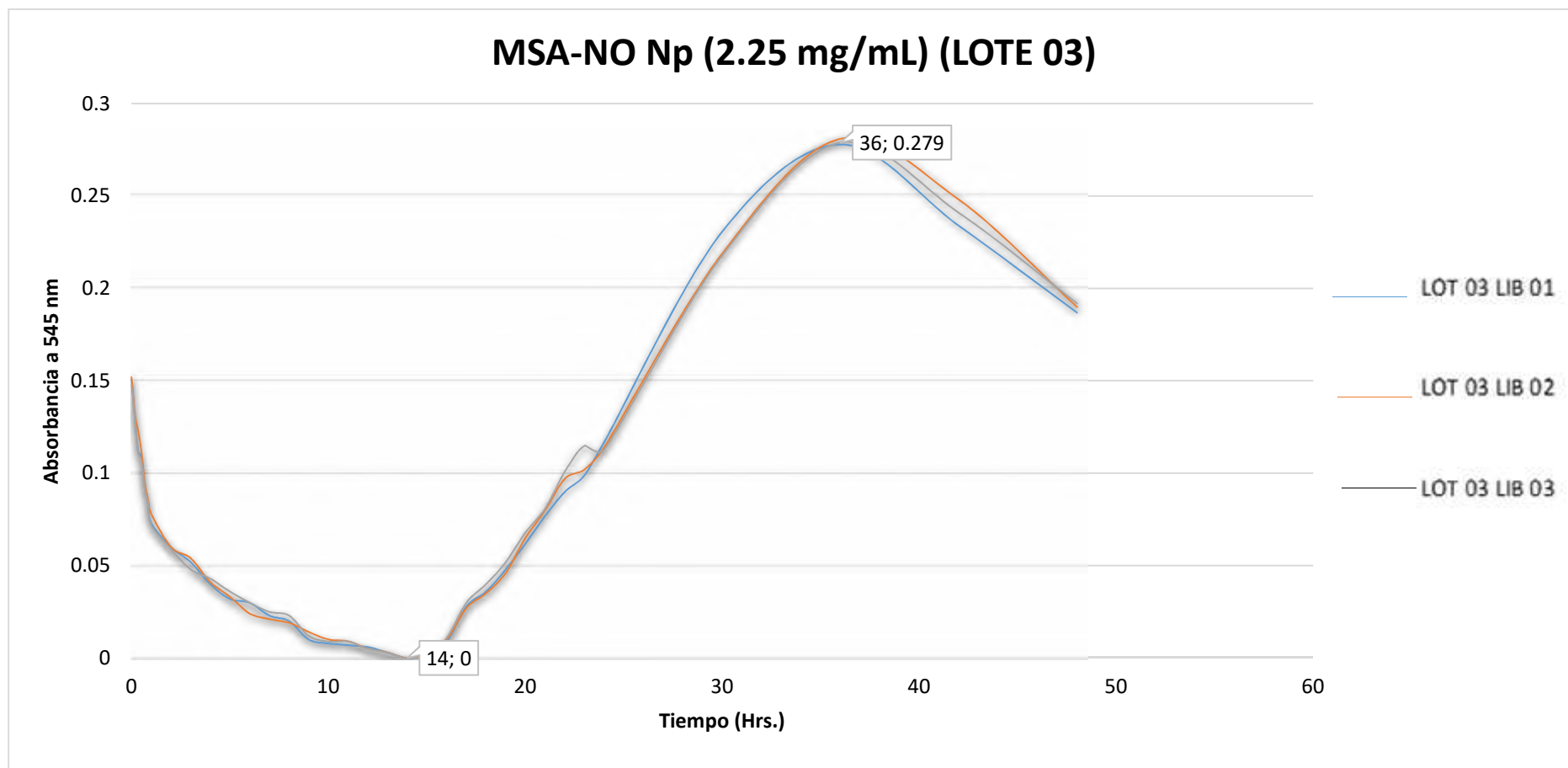
Análisis: Estimación del perfil de liberación del óxido nítrico por parte de las nanopartículas poliméricas de quitosano a partir de la descomposición del ácido s-nitrosomercaptosuccínico.				
Método: Espectrofotometría. Lectura a 545 nm.				
ANÁLISIS DE MUESTRAS PROBLEMA				
Fecha y Hora de Inicio: 09 de Octubre (10.20 a.m.)				
Muestra/ Concentración	Tiempos de Lectura	Absorbancia de Muestras		
		LOT02LIB01	LOT02LIB02	LOT02LIB03
LOTE 02 Np MSA-NO 2.25 mg/mL	0 minutos (10: 20)	0.149	0.15	0.148
	10 minutos (10: 30)	0.126	0.129	0.127
	20 minutos (10:40)	0.117	0.121	0.115
	30 minutos (10:50)	0.108	0.11	0.113
	40 minutos (11:00)	0.091	0.092	0.094
	50 minutos (11:10)	0.085	0.083	0.081
	1 hora (11:20)	0.072	0.075	0.072
	2 horas (12: 20)	0.065	0.066	0.063
	3 horas (13:20)	0.058	0.057	0.05
	4 horas (14:20)	0.046	0.045	0.039
	5 horas (15:20)	0.037	0.033	0.028
	6 horas (16:20)	0.03	0.029	0.027
	7 horas (17:20)	0.026	0.022	0.024
	8 horas (18:20)	0.02	0.018	0.019
	9 horas (19:20)	0.016	0.014	0.014
	10 horas (20:20)	0.012	0.011	0.01
	11 horas (21:20)	0.009	0.01	0.008
	12 horas (22:20)	0.006	0.007	0.006
	13 horas (23:20)	0.005	0.004	0.004
	14 horas (00:20) 10/10/17	0.001	0	0.001
	15 horas (01:20)	0.003	0.002	0.004
	16 horas (02: 20)	0.01	0.009	0.012
	17 horas (03: 20)	0.024	0.026	0.028
	18 horas (04: 20)	0.039	0.041	0.037
	19 horas (05: 20)	0.056	0.05	0.049
	20 horas (06: 20)	0.072	0.069	0.066
	21 horas (07: 20)	0.088	0.082	0.079
	22 horas (08 :20)	0.1	0.099	0.094
	23 horas (09: 20)	0.111	0.103	0.098
	24 horas (10 : 20)	0.12	0.124	0.121
30 horas (16 : 20)	0.214	0.221	0.232	
36 horas (22: 20)	0.299	0.301	0.285	
42 horas (04 : 20) 11/10/17	0.246	0.242	0.251	
48 horas (10:20)	0.191	0.189	0.191	
Fecha de Cierre del Registro: 11/10/17			Firma	
			Analista:	
Leyenda: nm = Nanómetro MSA-NO= Ácido S-nitrosomercaptosuccínico Np= Nanopartícula mg= miligramo mL=mililitro				

[MSA-NO Np] 2.25 mg/mL (LOTE 02)



**FORMATO DE ANÁLISIS DEL PERFIL DE LIBERACIÓN DEL ÓXIDO NÍTRICO POR LAS
NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS DE QUITOSANO CARGADAS CON MSA-NO**

Análisis: Estimación del perfil de liberación del óxido nítrico por parte de las nanopartículas poliméricas de quitosano a partir de la descomposición del ácido s-nitrosomercaptosuccínico.				
Método: Espectrofotometría. Lectura a 545 nm.				
ANÁLISIS DE MUESTRAS PROBLEMA				
Fecha y Hora de Inicio: 09 de Octubre (10:20 a.m.)				
Muestra/ Concentración	Tiempos de Lectura	Absorbancia de Muestras		
		LOT03LIB01	LOT03LIB02	LOT03LIB03
LOTE 03 Np MSA-NO 2.25 mg/mL	0 minutos (10: 20)	0.151	0.152	0.148
	10 minutos (10: 30)	0.13	0.132	0.129
	20 minutos (10:40)	0.112	0.123	0.111
	30 minutos (10:50)	0.109	0.112	0.107
	40 minutos (11:00)	0.093	0.095	0.092
	50 minutos (11:10)	0.084	0.086	0.084
	1 hora (11:20)	0.073	0.078	0.072
	2 horas (12: 20)	0.06	0.06	0.059
	3 horas (13:20)	0.052	0.054	0.048
	4 horas (14:20)	0.04	0.041	0.043
	5 horas (15:20)	0.032	0.033	0.036
	6 horas (16:20)	0.03	0.024	0.03
	7 horas (17:20)	0.023	0.021	0.025
	8 horas (18:20)	0.02	0.019	0.023
	9 horas (19:20)	0.01	0.014	0.012
	10 horas (20:20)	0.008	0.01	0.009
	11 horas (21:20)	0.007	0.009	0.009
	12 horas (22:20)	0.006	0.005	0.005
	13 horas (23:20)	0.003	0.003	0.003
	14 horas (00:20) 10/10/17	0	0	0
	15 horas (01:20)	0.002	0.003	0.002
	16 horas (02: 20)	0.009	0.01	0.011
	17 horas (03: 20)	0.028	0.027	0.03
	18 horas (04: 20)	0.036	0.035	0.04
	19 horas (05: 20)	0.048	0.046	0.052
	20 horas (06: 20)	0.062	0.065	0.068
	21 horas (07: 20)	0.077	0.08	0.081
	22 horas (08 :20)	0.09	0.097	0.101
23 horas (09: 20)	0.099	0.102	0.115	
24 horas (10 : 20)	0.117	0.114	0.113	
30 horas (16 : 20)	0.231	0.219	0.218	
36 horas (22: 20)	0.278	0.281	0.279	
42 horas (04 : 20) 11/10/17	0.234	0.248	0.241	
48 horas (10:20)	0.187	0.19	0.192	
Fecha de Cierre del Registro: 14/10/17			Firma Analista: Gabriela M	
Leyenda nm = Nanómetro MSA-NO= Ácido S-nitrosomercaptosuccínico Np= Nanopartícula mg= miligramo mL=mililitro				



ANEXO 17

ANEXO 17. TRATAMIENTO ESTADÍSTICO DE RESULTADOS

1. Análisis Estadístico de Parámetros Físicos

1.1. Diámetro Efectivo

1.1.1. Prueba de Normalidad Shapiro-Wilk

1.1.1.1. Hipótesis

H_0 = Los valores de Diámetro Efectivo del lote “n” de MSA Np provienen de una distribución normal (Hipótesis nula).

H_a = Los valores de Diámetro Efectivo del lote “n” de MSA Np no provienen de una distribución normal (Hipótesis alterna).

Donde $n = 1, 2, 3$.

1.1.1.2. Criterios de Rechazo de Hipótesis Nula

Se rechazará la H_0 cuando se cumplan los siguientes escenarios:

- El valor p obtenido es menor que el nivel de significancia ($p < 0.05$)
- El valor del estadístico de Shapiro-Wilk obtenido es mayor al valor ji cuadrado (χ^2) crítico para una distribución de ji cuadrada.

1.1.1.3. Tabla de Resultados Estadísticos

Pruebas de normalidad

	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
DE_Lote01	,360	3	.	,808	3	,133
DE_Lote02	,245	3	.	,970	3	,670
DE_Lote03	,333	3	.	,862	3	,272

a. Corrección de significación de Lilliefors

Fuente: SPSS Statistics

1.1.1.4. Interpretación de Resultados

Muestra	Interpretación del Valor Estadístico Shapiro-Wilk	Interpretación de Valor p
DE Lote 01	0.133 < 7.815 Se retiene hipótesis nula	0.133 > 0.05 Se retiene hipótesis nula
DE Lote 02	0.670 < 7.815 Se retiene hipótesis nula	0.670 > 0.05 Se retiene hipótesis nula
DE Lote 03	0.272 < 7.815 Se retiene hipótesis nula	0.272 > 0.05 Se retiene hipótesis nula

*Según Tabla de Distribución Ji Cuadrada, χ^2 crítico = 7.815 Grados de Libertad:3; Nivel de significancia $\alpha = 0.05$ (Ver Anexo 18).

1.1.1.5. Conclusión:

Se asume que la distribución de los valores de Diámetro Efectivo de los lotes 01, 02 y 03 de MSA Np es **normal**. Se procede a realizar prueba de **Homogeneidad de Varianzas**.

1.1.2. Prueba de Homogeneidad de Varianzas

1.1.2.1. Hipótesis

H_0 = Las varianzas del Diámetro Efectivo de los lotes de MSA Np son homogéneas.

H_a = Las varianzas del Diámetro Efectivo de los lotes de MSA Np provienen no son homogéneas.

1.1.2.2. Criterios de Rechazo de Hipótesis Nula

Se rechazará la H_0 cuando se cumplan los siguientes escenarios:

- El valor p obtenido es menor al nivel de significancia ($p < 0.05$)
- El valor estadístico de Levene es mayor al valor F crítico para una distribución de Fisher.

1.1.2.3. Tabla de Resultados Estadísticos

Prueba de homogeneidad de varianzas

		Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
Diámetro_Efectivo	Se basa en la media	4,759	2	6	,058
	Se basa en la mediana	,505	2	6	,627
	Se basa en la mediana y con gl ajustado	,505	2	2,683	,652
	Se basa en la media recortada	4,054	2	6	,077

Fuente: SPSS Statistics

1.1.2.4. Interpretación

Muestra	Interpretación del Valor Estadístico de Levene*	Interpretación del Valor p
Diámetro Efectivo	4.759 < 5.14 Se retiene hipótesis nula	0.058 > 0.05 Se retiene hipótesis nula
*Según Tabla de Distribución Fisher, F crítico = 5.14 Grados de Libertad del Numerador:2; Grados de Libertad del Denominador : 6 ; Nivel de significancia $\alpha = 0.05$ (Ver Anexo 19).		

1.1.2.5. Conclusión:

Los valores de Diámetro Efectivo de los lotes de MSA Np poseen **varianzas homogéneas**.

Se procede al análisis de varianzas con el test **ANOVA- Unifactorial**.

1.1.3. Prueba de Análisis de Varianzas (ANOVA - Unifactorial)

1.1.3.1. Hipótesis

H_0 = Las medias de valores de Diámetro Efectivo de los lotes de MSA Np son iguales

H_a = Las medias de valores de Diámetro Efectivo de los lotes de MSA Np no son iguales

1.1.3.2. Criterios de Rechazo de Hipótesis Nula

Se rechazará la H_0 cuando se cumplan los siguientes escenarios:

- El valor p obtenido es menor que el nivel de significancia ($p < 0.05$)
- El valor F obtenido es mayor al valor F crítico para una distribución de Fisher.

1.1.3.3. Tablas de Resultados Estadísticos

ANOVA

Diámetro_Efectivo

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	1959,049	2	979,524	6,426	,032
Dentro de grupos	914,620	6	152,437		
Total	2873,669	8			

Fuente: SPSS Statistics

Pruebas post hoc: Comparaciones Múltiples

Variable dependiente: Diámetro_Efectivo

HSD Tukey

(I) Lote	(J) Lote	Diferencia de medias (I-J)	Desv. Error	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
Lote 01	Lote 02	-1,60000	10,08090	,986	-32,5310	29,3310
	Lote 03	-32,06667*	10,08090	,044	-62,9976	-1,1357
Lote 02	Lote 01	1,60000	10,08090	,986	-29,3310	32,5310
	Lote 03	-30,46667	10,08090	,053	-61,3976	,4643
Lote 03	Lote 01	32,06667*	10,08090	,044	1,1357	62,9976
	Lote 02	30,46667	10,08090	,053	-,4643	61,3976

*. La diferencia de medias es significativa en el nivel 0.05.

Fuente: SPSS Statistics

Subconjuntos homogéneos: Diámetro_Efectivo

HSD Tukey^a

Lote	N	Subconjunto para alfa = 0.05	
		1	2
Lote 01	3	230,4667	
Lote 02	3	232,0667	232,0667
Lote 03	3		262,5333
Sig.		,986	,053

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 3,000.

Fuente: SPSS Statistics

1.1.3.4. Interpretación de Resultados

Muestra	Interpretación del Valor Estadístico de Fisher	Interpretación del Valor p
Diámetro Efectivo	6.426 > 5.14 Se rechaza hipótesis nula	0.032 < 0.05 Se rechaza hipótesis nula
*Según Tabla de Distribución Fisher, F crítico = 5.14 Grados de Libertad del Numerador:2; Grados de Libertad del Denominador : 6 ; Nivel de significancia $\alpha = 0.05$ (Ver Anexo 19).		

Análisis de Subconjuntos Homogéneos		
Subconjunto	Valor p Observado	Interpretación
Lote 01*Lote 02	0.986	p>0.05 : Las medias de los valores DE de los lotes 01 y 02 de MSA Np son iguales.
Lote 02*Lote 03	0.053	p>0.05 : Las medias de los valores DE de los lotes 02 y 03 de MSA Np son iguales.
Lote 03*Lote 01	0.044	p<0.05 : Las medias de los valores DE de los lotes 03 y 01 de MSA Np no son iguales.

1.1.3.5. Conclusión

Basándonos en los valores calculados p y F, se rechaza la hipótesis nula, por lo tanto, se asume que existe una diferencia significativa entre los tres lotes de MSA Np respecto a la media de sus diámetros efectivos de partícula. No obstante, al ejercer la comparación de medias lote a lote (análisis de subconjuntos) se observó que entre los lotes 01 - 02 y los lotes 02 – 03 no existe una diferencia significativa respecto a las medias de sus diámetros efectivos de partícula. Por otro lado, los lotes 01 – 03 difieren significativamente en este aspecto.

1.2. Índice de Polidispersidad

1.2.1. Prueba de Normalidad Shapiro-Wilk

1.2.1.1. Hipótesis

H_0 = Los valores de Índice de Polidispersidad del lote “n” de MSA Np provienen de una distribución normal.

H_a = Los valores de Índice de Polidispersidad del lote “n” de MSA Np no provienen de una distribución normal.

Donde $n = 1, 2, 3$.

1.2.1.2. Criterios de Rechazo de Hipótesis Nula

Se rechazará la H_0 cuando se cumplan los siguientes escenarios:

- El valor p obtenido es menor al nivel de significancia ($p < 0.05$).
- El valor del estadístico de Shapiro-Wilk obtenido es mayor al valor ji cuadrado (χ^2) crítico para una distribución de ji cuadrada.

1.2.1.3. Tablas de Resultados Estadísticos

Pruebas de normalidad						
	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	Gl	Sig.
IPD_Lote01	,219	3	.	,987	3	,780
IPD_Lote02	,253	3	.	,964	3	,637
IPD_Lote03	,323	3	.	,879	3	,321

a. Corrección de significación de Lilliefors

Fuente: SPSS Statistics

1.2.1.4. Interpretación de Resultados

Muestra	Interpretación del Valor Estadístico Shapiro Wilk*	Interpretación del Valor p
IPD Lote 01	0.987 < 7.815 Se retiene hipótesis nula	0.780 > 0.05 Se retiene hipótesis nula
IPD Lote 02	0.637 < 7.815 Se retiene hipótesis nula	0.637 > 0.05 Se retiene hipótesis nula
IPD Lote 03	0.321 < 7.815 Se retiene hipótesis nula	0.321 > 0.05 Se retiene hipótesis nula

*Según Tabla de Distribución Ji Cuadrada, χ^2 crítico = 7.815 Grados de Libertad:3; Nivel de significancia α = 0.05 (Ver Anexo 18).

1.2.1.5. Conclusión:

Se asume que la distribución de los valores de Índice de Polidispersidad de los lotes 01, 02 y 03 de MSA Np es **normal**.

Proceder a realizar una prueba de **Homogeneidad de Varianzas**.

1.2.2. Análisis de Homogeneidad de Varianzas

1.2.2.1. Hipótesis

H_0 = Las varianzas del Índice de Polidispersidad de los lotes de MSA Np son homogéneas.

H_a = Las varianzas del Índice de Polidispersidad de los lotes de MSA Np no son homogéneas.

1.2.2.2. Criterios de Rechazo de Hipótesis Nula

Se rechazará la H_0 cuando se cumplan los siguientes escenarios:

- El valor p obtenido es menor al nivel de significancia ($p < 0.05$)

- El valor estadístico de Levene es mayor al valor F crítico para una distribución de Fisher.

1.2.2.3. Tabla de Resultados Estadísticos

Prueba de homogeneidad de varianzas

		Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
Índice_de_Polidispersidad	Se basa en la media	,019	2	6	,982
	Se basa en la mediana	,034	2	6	,967
	Se basa en la mediana y con gl ajustado	,034	2	5,930	,967
	Se basa en la media recortada	,020	2	6	,980

Fuente: SPSS Statistics

1.2.2.4. Interpretación

Muestra	Interpretación del Valor Estadístico de Levene	Interpretación del Valor p
Índice de Polidispersidad	0.019 < 5.14 Se retiene hipótesis nula	0.982 > 0.05 Se retiene hipótesis nula
*Según Tabla de Distribución Fisher, F crítico = 5.14 Grados de Libertad del Numerador:2; Grados de Libertad del Denominador : 6 ; Nivel de significancia $\alpha = 0.05$ (Ver Anexo 19).		

1.2.2.5. Conclusión

Los valores de Índice de Polidispersidad de los lotes de MSA Np poseen **varianzas homogéneas**. Se procede al análisis de varianzas con el test **ANOVA- Unifactorial**.

1.2.3. Prueba de Análisis de Varianzas (ANOVA - Unifactorial)

1.2.3.1. Hipótesis

H_0 = Las medias de valores de Índice de Polidispersidad de los lotes de MSA Np son iguales

H_a = Las medias de valores de Índice de Polidispersidad de los lotes de MSA Np no son iguales

1.2.3.2. Criterios de Rechazo de Hipótesis Nula

Se rechazará la H_0 cuando se cumplan los siguientes escenarios:

- El valor p obtenido es menor que el nivel de significancia ($p < 0.05$)
- El valor F obtenido es mayor al valor F crítico para una distribución de Fisher.

1.2.3.3. Tablas de Resultados Estadísticos

ANOVA

Indice_de_Polidispersidad

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	,000	2	,000	,192	,830
Dentro de grupos	,002	6	,000		
Total	,002	8			

Fuente: SPSS Statistics

Pruebas post hoc: Comparaciones múltiples

Variable dependiente: Indice_de_Polidispersidad

HSD Tukey

(I) Lote	(J) Lote	Diferencia de medias (I-J)	Desv. Error	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
Lote 01	Lote 02	,0083333	,0134633	,816	-,032976	,049642
	Lote 03	,0036667	,0134633	,960	-,037642	,044976
Lote 02	Lote 01	-,0083333	,0134633	,816	-,049642	,032976
	Lote 03	-,0046667	,0134633	,937	-,045976	,036642
Lote 03	Lote 01	-,0036667	,0134633	,960	-,044976	,037642
	Lote 02	,0046667	,0134633	,937	-,036642	,045976

Fuente: SPSS Statistics

Subconjuntos homogéneos

Indice_de_Polidispersidad

HSD Tukey^a

Lote	N	Subconjunto para alfa =
		0.05
		1
Lote 02	3	,269333
Lote 03	3	,274000
Lote 01	3	,277667
Sig.		,816

- Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.
- Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 3,000. Fuente: SPSS Statistics

1.2.3.4. Interpretación de Resultados

Muestra	Interpretación del Valor Estadístico de Fisher	Interpretación del Valor p
Diámetro Efectivo	0.192 < 5.14 Se retiene hipótesis nula	0.830 > 0.05 Se retiene hipótesis nula

*Según Tabla de Distribución Fisher, F crítico = 5.14 Grados de Libertad del Numerador:2; Grados de Libertad del Denominador : 6 ; Nivel de significancia $\alpha = 0.05$ (Ver Anexo 19).

Análisis de Subconjuntos Homogéneos		
Subconjunto	Valor p Observado	Interpretación
Lote 01*Lote 02*Lote 03	0.816	p>0.05 : Las medias de los valores IPD de los lotes 01, 02 y 03 de MSA Np son iguales.

1.2.3.5. Conclusión:

Basados en los valores calculados p y F, no se rechaza la hipótesis nula, por lo que se asume que las medias de los valores de índice de polidispersidad de los tres lotes de MSA Np son iguales.

2. Análisis Estadístico de Eficiencia de Encapsulación

2.1. Prueba de Normalidad Shapiro-Wilk

2.1.1.1. Hipótesis

H_0 = Los valores de Eficiencia de Encapsulación del lote “n” de MSA Np provienen de una distribución normal.

H_a = Los valores de Eficiencia de Encapsulación del lote “n” de MSA Np no provienen de una distribución normal.

Donde $n = 1, 2, 3$.

2.1.1.2. Criterios de Rechazo de Hipótesis Nula

Se rechazará la H_0 cuando se cumplan los siguientes escenarios:

- El valor p obtenido es menor que el nivel de significancia ($p < 0.05$)
- El valor del estadístico de Shapiro-Wilk obtenido es mayor al valor ji cuadrado (χ^2) crítico para una distribución de ji cuadrada.

2.1.1.3. Tablas de Resultados Estadísticos

Pruebas de normalidad

	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
EE%_Lote01	.	3	.	.	3	.
EE%_Lote02	,385	3	.	,750	3	,000
EE%_Lote03	,385	3	.	,750	3	,000

a. Corrección de significación de Lilliefors

Fuente: SPSS Statistics

2.1.1.4. Interpretación de Resultados

Muestra	Interpretación del Valor Estadístico Shapiro Wilk*	Interpretación del Valor p
EE% Lote 01	No se puede interpretar	No se puede interpretar
EE % Lote 02	0.750 < 7.815 Se retiene hipótesis nula	0.000 < 0.05 Se rechaza hipótesis nula
EE% Lote 03	0.750 < 7.815 Se retiene hipótesis nula	0.000 > 0.05 Se rechaza hipótesis nula
*Según Tabla de Distribución Ji Cuadrada, χ^2 crítico = 7.815 Grados de Libertad:3; Nivel de significancia $\alpha = 0.05$ (Ver Anexo 18).		

2.1.1.5. Conclusión

Se rechaza la hipótesis nula, por lo tanto se asume que la distribución de los valores de eficiencia de encapsulación de los lotes 01, 02 y 03 de MSA Np **no es normal**.

No se procede a la prueba de Homogeneidad de Varianzas. Se procede al análisis de varianzas mediante una prueba no paramétrica, el test **Kruskal – Wallis para “k” muestras independientes**.

2.2. Prueba No Paramétrica de Análisis de Varianzas Kruskal-Wallis

2.2.1. Hipótesis

H_0 = Los valores de eficiencia de encapsulación de los lotes MSA Np provienen de una población idéntica con una misma mediana.

H_a = Los valores de eficiencia de encapsulación de los lotes de MSA Np no provienen de una población idéntica ni poseen una misma mediana.

2.2.2. Criterios de Rechazo de Hipótesis Nula

Se rechazará la H_0 cuando se cumplan los siguientes escenarios:

- El valor p obtenido es menor al nivel de significancia ($p < 0.05$)
- El valor del estadístico de Kruskal-Wallis (H) obtenido es mayor al valor ji cuadrado (χ^2) crítico para una distribución de ji cuadrada.

2.2.3. Tablas de Resultados Estadísticos

Estadísticos de prueba^{a,b}

	Eficiencia_de_Encapsulación
H de Kruskal-Wallis	1,175
gl	2
Sig. asintótica	,556

a. Prueba de Kruskal Wallis

b. Variable de agrupación: Lote

Fuente: SPSS Statistics

2.2.4. Interpretación de Resultados

Muestra	Interpretación del Valor Estadístico de Kruskal Wallis	Interpretación del Valor p
Eficiencia de Encapsulación	1.175 < 5.14 Se retiene hipótesis nula	0.556 > 0.05 Se retiene hipótesis nula
*Según Tabla de Distribución Ji Cuadrada, χ^2 crítico = 5.992 Grados de Libertad :2; Nivel de significancia α = 0.05 (Ver Anexo 18).		

2.2.5. Conclusión

Los valores de eficiencia de encapsulación para los lotes 01, 02 y 03 de MSA Np **pertenecen a una población idéntica y con una misma mediana.**

3. Concentración Mínima Inhibitoria (CMI)

3.1. CMI *Candida albicans*

3.1.1. Prueba de Normalidad Shapiro-Wilk

3.1.1.1. Hipótesis

H_0 = Los valores CMI de *Candida albicans* del lote “n” de MSA-NO Np provienen de una distribución normal.

H_a = Los valores CMI de *Candida albicans* del lote “n” de MSA-NO Np no provienen de una distribución normal.

Donde n = 1, 2 ,3.

3.1.1.2. Criterios de Rechazo de Hipótesis Nula

Se rechazará la H_0 cuando se cumplan los siguientes escenarios:

- El valor p obtenido es menor que el nivel de significancia ($p < 0.05$)
- El valor del estadístico de Shapiro-Wilk obtenido es mayor al valor ji cuadrado (χ^2) crítico para una distribución de ji cuadrada.

3.1.1.3. Tablas de Resultados Estadísticos

Pruebas de normalidad

	Lote	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
CMI_C_albicans	Lote 01	.	3	.	.	3	.
	Lote 02	,385	3	.	,750	3	,000
	Lote 03	.	3	.	.	3	.

a. Corrección de significación de Lilliefors

Fuente: SPSS Statistics

3.1.1.4. Interpretación de Resultados

Muestra	Interpretación del Valor Estadístico Shapiro Wilk*	Interpretación del Valor p
CMI <i>C. albicans</i> Lote 01	No se puede interpretar	No se puede interpretar
CMI <i>C. albicans</i> Lote 02	0.750 < 7.815 Se retiene hipótesis nula	0.000 < 0.05 Se rechaza hipótesis nula
CMI <i>C. albicans</i> Lote 03	No se puede interpretar	No se puede interpretar

*Según Tabla de Distribución Ji Cuadrada, χ^2 crítico = 7.815 Grados de Libertad:3; Nivel de significancia $\alpha = 0.05$ (Ver Anexo 18).

3.1.1.5. Conclusión

Se rechaza la hipótesis nula, por lo tanto se asume que la distribución de los valores CMI de *Candida albicans* de los lotes 01, 02 y 03 de MSA-NO Np **no es normal**.

No se procede a la prueba de Homogeneidad de Varianzas. Se procede al análisis de varianzas mediante una prueba no paramétrica, el test **Kruskal – Wallis para “k” muestras independientes**.

3.1.2. Prueba No Paramétrica de Análisis de Varianzas Kruskal-Wallis

3.1.2.1. Hipótesis

H_0 = Los valores CMI de *Candida albicans* de los lotes de MSA- NO Np provienen de una población idéntica con una misma mediana.

H_a = Los valores CMI de *Candida albicans* de los lotes de MSA- NO Np no provienen de una población idéntica ni poseen una misma mediana.

3.1.2.2. Criterios de Rechazo de Hipótesis Nula

Se rechazará la H_0 cuando se cumplan los siguientes escenarios:

- El valor p obtenido es menor al nivel de significancia ($p < 0.05$)
- El valor del estadístico de Kruskal-Wallis (H) obtenido es mayor al valor ji cuadrado (χ^2) crítico para una distribución de ji cuadrada.

3.1.2.3. Tablas de Resultados Estadísticos

	CMI_C_albicans
H de Kruskal-Wallis	5,600
GI	2
Sig. Asintótica	,061

a. Prueba de Kruskal Wallis

b. Variable de agrupación: Lote Fuente: SPSS Statistics

3.1.2.4. Interpretación de Resultados Estadísticos

Muestra	Interpretación del Valor Estadístico de Kruskall Wallis	Interpretación del Valor p
CMI <i>C. albicans</i>	5.600 < 5.992 Se retiene hipótesis nula	0.061 > 0.05 Se retiene hipótesis nula

*Según Tabla de Distribución Ji Cuadrada, χ^2 crítico = 5.992 Grados de Libertad :2; Nivel de significancia $\alpha = 0.05$ (Ver Anexo 18).

3.1.2.5. Conclusión

Los valores CMI de *Candida albicans* de los lotes 01, 02 y 03 de MSA-NO Np provienen de una población idéntica y con medianas iguales.

3.2. CMI *Candida glabrata*

3.2.1. Prueba de Normalidad Shapiro-Wilk

3.2.1.1. Hipótesis

H_0 = Los valores CMI de *Candida glabrata* del lote “n” de MSA-NO Np provienen de una distribución normal.

H_a = Los valores CMI de *Candida glabrata* del lote “n” de MSA-NO Np no provienen de una distribución normal.

Donde $n = 1, 2, 3$.

3.2.1.2. Criterios de Rechazo de Hipótesis Nula

Se rechazará la H_0 cuando se cumplan los siguientes escenarios:

- El valor p obtenido es menor que el nivel de significancia ($p < 0.05$)
- El valor del estadístico de Shapiro-Wilk obtenido es mayor al valor ji cuadrado (χ^2) crítico para una distribución de ji cuadrada.

3.2.1.3. Tablas de Resultados Estadísticos

Pruebas de normalidad							
	Lote	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
CMI_C_glabrata	Lote 01	,385	3	.	,750	3	,000
	Lote 02	,385	3	.	,750	3	,000
	Lote 03	,385	3	.	,750	3	,000

a. Corrección de significación de Lilliefors

Fuente: SPSS Statistics

3.2.1.4. Interpretación de Resultados

Muestra	Interpretación del Valor Estadístico Shapiro Wilk*	Interpretación del Valor p
CMI <i>C. glabrata</i> Lote 01	0.750 < 7.815 Se retiene hipótesis nula	0.000 < 0.05 Se rechaza hipótesis nula
CMI <i>C. glabrata</i> Lote 02	0.750 < 7.815 Se retiene hipótesis nula	0.000 < 0.05 Se rechaza hipótesis nula
CMI <i>C. glabrata</i> Lote 03	0.750 < 7.815 Se retiene hipótesis nula	0.000 < 0.05 Se rechaza hipótesis nula
*Según Tabla de Distribución Ji Cuadrada, χ^2 crítico = 7.815 Grados de Libertad:3; Nivel de significancia $\alpha = 0.05$ (Ver Anexo 18).		

3.2.1.5. Conclusión

En función al resultado del valor p observado (Sig), se rechaza la hipótesis nula, por lo tanto se asume que la distribución de los valores CMI de *Candida glabrata* de los lotes 01, 02 y 03 de MSA-NO Np **no es normal**.

No se procede a la prueba de Homogeneidad de Varianzas. Se procede al análisis de varianzas mediante una prueba no paramétrica, el test **Kruskal – Wallis para “k” muestras independientes**.

3.2.2. Prueba No Paramétrica de Análisis de Varianzas Kruskal-Wallis

3.2.2.1. Hipótesis

H_0 = Los valores CMI de *Candida glabrata* de los lotes de MSA-NO Np provienen de una población idéntica con una misma mediana.

H_a = Los valores CMI de *Candida glabrata*.de los lotes de MSA-NO Np no provienen de una población idéntica ni poseen una misma mediana.

3.2.2.2. Criterios de Rechazo de Hipótesis Nula

Se rechazará la H_0 cuando se cumplan los siguientes escenarios:

1. El valor p obtenido es menor al nivel de significancia ($p < 0.05$)
2. El valor del estadístico de Kruskal-Wallis (H) obtenido es mayor al valor ji cuadrado (χ^2) crítico para una distribución de ji cuadrada.

3.2.2.3. Tablas de Resultados Estadísticos

Estadísticos de prueba^{a,b}

	CMI_C_glabrata
H de Kruskal-Wallis	,800
GI	2
Sig. Asintótica	,670

a. Prueba de Kruskal Wallis

b. Variable de agrupación: Lote

Fuente: SPSS Statistics

3.2.2.4. Interpretación de Resultados Estadísticos

Muestra	Interpretación del Valor Estadístico de Kruskal Wallis	Interpretación del Valor p
CMI <i>C. glabrata</i>	0.800 < 5.992 Se retiene hipótesis nula	0.670 > 0.05 Se retiene hipótesis nula
*Según Tabla de Distribución Ji Cuadrada, χ^2 crítico = 5.992 Grados de Libertad :2; Nivel de significancia $\alpha = 0.05$ (Ver Anexo 18).		

3.2.2.5. Conclusión

Los valores CMI de *Candida glabrata* de los lotes 01, 02 y 03 de MSA-NO Np provienen de una población idéntica y con medianas iguales.

3.3. CMI *Candida parapsilosis*

3.3.1. Prueba de Normalidad Shapiro-Wilk

3.3.1.1. Hipótesis

H_0 = Los valores CMI de *Candida parapsilosis* del lote “n” de MSA-NO Np provienen de una distribución normal.

H_a = Los valores CMI de *Candida parapsilosis* del lote “n” de MSA-NO Np no provienen de una distribución normal.

Donde n = 1, 2, 3.

3.3.1.2. Criterios de Rechazo de Hipótesis Nula

Se rechazará la H_0 cuando se cumplan los siguientes escenarios:

1. El valor p obtenido es menor que el nivel de significancia ($p < 0.05$)
2. El valor del estadístico de Shapiro-Wilk obtenido es mayor al valor ji cuadrado (χ^2) crítico para una distribución de ji cuadrada.

3.3.1.3. Tablas de Resultados Estadísticos

Pruebas de normalidad							
	Lote	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
CMI_C_parapsilosis	Lote 01	.	3	.	.	3	.
	Lote 02	.	3	.	.	3	.
	Lote 03	.	3	.	.	3	.

Fuente: SPSS Statistics

3.3.1.4. Interpretación de Resultados

Muestra	Interpretación del Valor Estadístico Shapiro Wilk*	Interpretación del Valor p
CMI <i>C. parapsilosis</i> Lote 01	No se puede interpretar	No se puede interpretar
CMI <i>C. parapsilosis</i> Lote 02		
CMI <i>C. parapsilosis</i> Lote 03		
*Según Tabla de Distribución Ji Cuadrada, χ^2 crítico = 7.815 Grados de Libertad:3; Nivel de significancia $\alpha = 0.05$ (Ver Anexo 18).		

3.3.1.5. Conclusión

Se asume que la distribución de los valores CMI de *Candida parapsilosis* de los lotes 01, 02 y 03 de MSA-NO Np **no es normal**.

No se procede a la prueba de Homogeneidad de Varianzas. Se procede al análisis de varianzas mediante una prueba no paramétrica, el test **Kruskal – Wallis para “k” muestras independientes**.

3.3.2. Prueba No Paramétrica de Análisis de Varianzas Kruskal-Wallis

3.3.2.1. Hipótesis

H_0 = Los valores CMI de *Candida parapsilosis* de los lotes de MSA-NO Np provienen de una población idéntica con una misma mediana.

H_a = Los valores CMI de *Candida parapsilosis* de los lotes de MSA-NO Np no provienen de una población idéntica ni poseen una misma mediana.

3.3.2.2. Criterios de Rechazo de Hipótesis Nula

Se rechazará la H_0 cuando se cumplan los siguientes escenarios:

1. El valor p obtenido es menor al nivel de significancia ($p < 0.05$)
2. El valor del estadístico de Kruskal-Wallis (H) obtenido es mayor al valor ji cuadrado crítico para una distribución de ji cuadrada

3.3.2.3. Tablas de Resultados Estadísticos

Estadísticos de prueba ^{a,b}	
CMI_C_parapsilosis	
H de Kruskal-Wallis	,000
gl	2
Sig. asintótica	1,000

a. Prueba de Kruskal Wallis

b. Variable de agrupación: Lote Fuente: SPSS Statistics

3.3.2.4. Interpretación de Resultados Estadísticos

Muestra	Interpretación del Valor Estadístico de Kruskall Wallis	Interpretación del Valor p
CMI <i>C. parapsilosis</i>	0.000 < 5.992 Se retiene hipótesis nula	1.000 > 0.05 Se retiene hipótesis nula
*Según Tabla de Distribución Ji Cuadrada, χ^2 crítico = 5.992 Grados de Libertad :2; Nivel de significancia $\alpha = 0.05$ (Ver Anexo 18).		

3.3.2.5. Conclusión

Se asume que las CMI de *C. parapsilosis* de los lotes 01, 02 y 03 de MSA-NO Np provienen de una población idéntica y con medianas iguales.

3.4. CMI de *C.krusei*

3.4.1. Prueba de Normalidad Shapiro-Wilk

3.4.1.1. Hipótesis

H₀= Los valores CMI de *Candida krusei* del lote “n” de MSA-NO Np provienen de una distribución normal.

H_a= Los valores CMI de *Candida krusei* del lote “n” de MSA-NO Np no provienen de una distribución normal.

Donde n = 1, 2 ,3.

3.4.1.2. Criterios de Rechazo de Hipótesis Nula

Se rechazará la H₀ cuando se cumplan los siguientes escenarios:

1. El valor p obtenido es menor que el nivel de significancia ($p < 0.05$)
2. El valor del estadístico de Shapiro-Wilk obtenido es mayor al valor ji cuadrado (χ^2) crítico para una distribución de ji cuadrada.

3.4.1.3. Tablas de Resultados Estadísticos

Pruebas de normalidad

	Lote	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
CMI_C_krusei	Lote 01	.	3	.	.	3	.
	Lote 02	.	3	.	.	3	.
	Lote 03	.	3	.	.	3	.

a. Corrección de significación de Lilliefors

Fuente: SPSS Statistics

3.4.1.4. Interpretación de Resultados

Muestra	Interpretación del Valor Estadístico Shapiro Wilk*	Interpretación del Valor p
CMI <i>C. krusei</i> Lote 01	No se puede interpretar	No se puede interpretar
CMI <i>C. krusei</i> Lote 02		
CMI <i>C. krusei</i> Lote 03		
*Según Tabla de Distribución Ji Cuadrada, χ^2 crítico = 7.815 Grados de Libertad:3; Nivel de significancia $\alpha = 0.05$ (Ver Anexo 18).		

3.4.1.5. Conclusión

Se asume que la distribución de los valores CMI de *Candida krusei* de los lotes 01, 02 y 03 de MSA-NO Np **no es normal**.

No se procede a la prueba de Homogeneidad de Varianzas. Se procede al análisis de varianzas mediante una prueba no paramétrica, el test **Kruskal – Wallis para “k” muestras independientes**.

3.4.2. Prueba No Paramétrica de Análisis de Varianzas Kruskal-Wallis

3.4.2.1. Hipótesis

H_0 = Los valores CMI de *Candida krusei* de los lotes de MSA-NO Np provienen de una población idéntica con una misma mediana.

H_a = Los valores CMI de *Candida krusei* de los lotes de MSA-NO Np no provienen de una población idéntica ni poseen una misma mediana.

3.4.2.2. Criterios de Rechazo de Hipótesis Nula

Se rechazará la H_0 cuando se cumplan los siguientes escenarios:

1. El valor p obtenido es menor al nivel de significancia ($p < 0.05$)
2. El valor del estadístico de Kruskal-Wallis (H) obtenido es mayor al valor ji cuadrado crítico para una distribución de ji cuadrada.

3.4.2.3. Tablas de Resultados Estadísticos

Estadísticos de prueba^{a,b}

	CMI_C_krusei
H de Kruskal-Wallis	,000
gl	2
Sig. asintótica	1,000

a. Prueba de Kruskal Wallis

b. Variable de agrupación: Lote Fuente: SPSS Statistics

3.4.2.4. Interpretación de Resultados Estadísticos

Muestra	Interpretación del Valor Estadístico de Kruskal Wallis	Interpretación del Valor p
CMI <i>C. krusei</i>	0.000 < 5.992 Se retiene hipótesis nula	1.000 > 0.05 Se retiene hipótesis nula
*Según Tabla de Distribución Ji Cuadrada, χ^2 crítico = 5.992 Grados de Libertad :2; Nivel de significancia $\alpha = 0.05$ (Ver Anexo 19).		

3.4.2.5. Conclusión

Se asume que las CMI de *C. krusei* de los lotes 01, 02 y 03 de MSA-NO Np provienen de una población idéntica y con medianas iguales.

ANEXO 18

ANEXO 18. TABLA DE DISTRIBUCIÓN JI CUADRADA CON NIVEL DE SIGNIFICANCIA 0.05

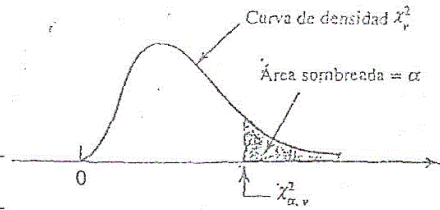


Tabla A.7 Valores críticos para la distribución de ji cuadrada

ν	α									
	.995	.99	.975	.95	.90	.10	.05	.025	.01	.005
1	0.000	0.000	0.001	0.004	0.016	2.706	3.843	5.025	6.637	7.882
2	0.010	0.020	0.051	0.103	0.211	4.605	5.992	7.378	9.210	10.597
3	0.072	0.115	0.216	0.352	0.584	6.251	7.815	9.348	11.344	12.837
4	0.207	0.297	0.484	0.711	1.064	7.779	9.488	11.143	13.277	14.860
5	0.412	0.554	0.831	1.145	1.610	9.236	11.070	12.832	15.085	16.748
6	0.676	0.872	1.237	1.635	2.204	10.645	12.592	14.440	16.812	18.548
7	0.989	1.239	1.690	2.167	2.833	12.017	14.067	16.012	18.474	20.276
8	1.344	1.646	2.180	2.733	3.490	13.362	15.507	17.534	20.090	21.954
9	1.735	2.088	2.700	3.325	4.168	14.684	16.919	19.022	21.665	23.587
10	2.156	2.558	3.247	3.940	4.865	15.987	18.307	20.483	23.209	25.188
11	2.603	3.053	3.816	4.575	5.578	17.275	19.675	21.920	24.724	26.755
12	3.074	3.571	4.404	5.226	6.304	18.549	21.026	23.337	26.217	28.300
13	3.565	4.107	5.009	5.892	7.041	19.812	22.362	24.735	27.687	29.817
14	4.075	4.660	5.629	6.571	7.790	21.064	23.685	26.119	29.141	31.319
15	4.600	5.229	6.262	7.261	8.547	22.307	24.996	27.488	30.577	32.799
16	5.142	5.812	6.908	7.962	9.312	23.542	26.296	28.845	32.000	34.267
17	5.697	6.407	7.564	8.682	10.085	24.769	27.587	30.190	33.408	35.716
18	6.265	7.015	8.231	9.390	10.865	25.989	28.869	31.526	34.805	37.156
19	6.843	7.632	8.906	10.117	11.651	27.203	30.143	32.852	36.190	38.580
20	7.434	8.260	9.591	10.851	12.443	28.412	31.410	34.170	37.566	39.997
21	8.033	8.897	10.283	11.591	13.240	29.615	32.670	35.478	38.930	41.399
22	8.643	9.542	10.982	12.338	14.042	30.813	33.924	36.781	40.289	42.796
23	9.260	10.195	11.688	13.090	14.848	32.007	35.172	38.075	41.637	44.179
24	9.886	10.856	12.401	13.848	15.659	33.196	36.415	39.364	42.980	45.558
25	10.519	11.523	13.120	14.611	16.473	34.381	37.652	40.646	44.313	46.925
26	11.160	12.198	13.844	15.379	17.292	35.563	38.885	41.923	45.642	48.290
27	11.807	12.878	14.573	16.151	18.114	36.741	40.113	43.194	46.962	49.642
28	12.461	13.565	15.308	16.928	18.939	37.916	41.337	44.461	48.278	50.993
29	13.120	14.256	16.147	17.708	19.768	39.087	42.557	45.772	49.586	52.333
30	13.787	14.954	16.991	18.493	20.599	40.256	43.773	46.979	50.892	53.672
31	14.457	15.655	17.838	19.280	21.433	41.422	44.985	48.231	52.190	55.000
32	15.134	16.362	18.691	20.072	22.271	42.585	46.194	49.480	53.486	56.328
33	15.814	17.073	19.546	20.866	23.110	43.745	47.400	50.724	54.774	57.646
34	16.501	17.789	20.406	21.664	23.952	44.903	48.602	51.966	56.061	58.964
35	17.191	18.508	21.269	22.465	24.796	46.059	49.802	53.203	57.340	60.272
36	17.887	19.233	22.136	23.269	25.643	47.212	50.998	54.437	58.619	61.581
37	18.584	19.960	22.105	24.075	26.492	48.363	52.192	55.667	59.891	62.880
38	19.289	20.691	22.878	24.884	27.343	49.513	53.384	56.896	61.162	64.181
39	19.994	21.425	23.654	25.695	28.196	50.660	54.572	58.119	62.426	65.473
40	20.706	22.164	24.433	26.509	29.050	51.805	55.758	59.342	63.691	66.766

Para $\nu > 40$, $\chi^2_{\alpha, \nu} \approx \nu \left(1 - \frac{2}{9\nu} + z_{\alpha} \sqrt{\frac{2}{9\nu}} \right)^3$

ν = grados de libertad
 α = nivel de significancia

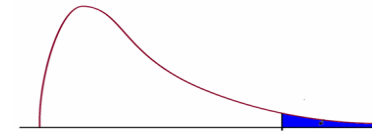
ANEXO 19

ANEXO 19. TABLA DE DISTRIBUCIÓN DE FISHER CON NIVEL DE SIGNIFICANCIA 0.05

En las columnas se encuentran los valores F que corresponden al área 0.05 a la derecha

En las columnas se encuentran los grados de libertad del numerador

En los renglones se encuentran los grados de libertad del denominador.



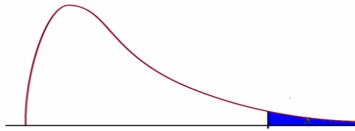
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	15	20	24	30	40	60	120
1	161.4	199.5	215.7	224.6	230.2	234.0	236.8	238.9	240.5	241.9	243.0	243.9	245.9	248.0	249.1	250.1	251.1	252.2	253.3
2	18.51	19.00	19.16	19.25	19.30	19.33	19.35	19.37	19.38	19.40	19.40	19.41	19.43	19.45	19.45	19.46	19.47	19.48	19.49
3	10.13	9.55	9.28	9.12	9.01	8.94	8.89	8.85	8.81	8.79	8.76	8.74	8.70	8.66	8.64	8.62	8.59	8.57	8.55
4	7.71	6.94	6.59	6.39	6.26	6.16	6.09	6.04	6.00	5.96	5.94	5.91	5.86	5.80	5.77	5.75	5.72	5.69	5.66
5	6.61	5.79	5.41	5.19	5.05	4.95	4.88	4.82	4.77	4.74	4.70	4.68	4.62	4.56	4.53	4.50	4.46	4.43	4.40
6	5.99	5.14	4.76	4.53	4.39	4.28	4.21	4.15	4.10	4.06	4.03	4.00	3.94	3.87	3.84	3.81	3.77	3.74	3.70
7	5.59	4.74	4.35	4.12	3.97	3.87	3.79	3.73	3.68	3.64	3.60	3.57	3.51	3.44	3.41	3.38	3.34	3.30	3.27
8	5.32	4.46	4.07	3.84	3.69	3.58	3.50	3.44	3.39	3.35	3.31	3.28	3.22	3.15	3.12	3.08	3.04	3.01	2.97
9	5.12	4.26	3.86	3.63	3.48	3.37	3.29	3.23	3.18	3.14	3.10	3.07	3.01	2.94	2.90	2.86	2.83	2.79	2.75
10	4.96	4.10	3.71	3.48	3.33	3.22	3.14	3.07	3.02	2.98	2.94	2.91	2.85	2.77	2.74	2.70	2.66	2.62	2.58
11	4.84	3.98	3.59	3.36	3.20	3.09	3.01	2.95	2.90	2.85	2.82	2.79	2.72	2.65	2.61	2.57	2.53	2.49	2.45
12	4.75	3.89	3.49	3.26	3.11	3.00	2.91	2.85	2.80	2.75	2.72	2.69	2.62	2.54	2.51	2.47	2.43	2.38	2.34
13	4.67	3.81	3.41	3.18	3.03	2.92	2.83	2.77	2.71	2.67	2.63	2.60	2.53	2.46	2.42	2.38	2.34	2.30	2.25
14	4.60	3.74	3.34	3.11	2.96	2.85	2.76	2.70	2.65	2.60	2.57	2.53	2.46	2.39	2.35	2.31	2.27	2.22	2.18
15	4.54	3.68	3.29	3.06	2.90	2.79	2.71	2.64	2.59	2.54	2.51	2.48	2.40	2.33	2.29	2.25	2.20	2.16	2.11
16	4.49	3.63	3.24	3.01	2.85	2.74	2.66	2.59	2.54	2.49	2.46	2.42	2.35	2.28	2.24	2.19	2.15	2.11	2.06
17	4.45	3.59	3.20	2.96	2.81	2.70	2.61	2.55	2.49	2.45	2.41	2.38	2.31	2.23	2.19	2.15	2.10	2.06	2.01
18	4.41	3.55	3.16	2.93	2.77	2.66	2.58	2.51	2.46	2.41	2.37	2.34	2.27	2.19	2.15	2.11	2.06	2.02	1.97
19	4.38	3.52	3.13	2.90	2.74	2.63	2.54	2.48	2.42	2.38	2.34	2.31	2.23	2.16	2.11	2.07	2.03	1.98	1.93
20	4.35	3.49	3.10	2.87	2.71	2.60	2.51	2.45	2.39	2.35	2.31	2.28	2.20	2.12	2.08	2.04	1.99	1.95	1.90
21	4.32	3.47	3.07	2.84	2.68	2.57	2.49	2.42	2.37	2.32	2.28	2.25	2.18	2.10	2.05	2.01	1.96	1.92	1.87
22	4.30	3.44	3.05	2.82	2.66	2.55	2.46	2.40	2.34	2.30	2.26	2.23	2.15	2.07	2.03	1.98	1.94	1.89	1.84
23	4.28	3.42	3.03	2.80	2.64	2.53	2.44	2.37	2.32	2.27	2.24	2.20	2.13	2.05	2.01	1.96	1.91	1.86	1.81
24	4.26	3.40	3.01	2.78	2.62	2.51	2.42	2.36	2.30	2.25	2.22	2.18	2.11	2.03	1.98	1.94	1.89	1.84	1.79
25	4.24	3.39	2.99	2.76	2.60	2.49	2.40	2.34	2.28	2.24	2.20	2.16	2.09	2.01	1.96	1.92	1.87	1.82	1.77
26	4.23	3.37	2.98	2.74	2.59	2.47	2.39	2.32	2.27	2.22	2.18	2.15	2.07	1.99	1.95	1.90	1.85	1.80	1.75
27	4.21	3.35	2.96	2.73	2.57	2.46	2.37	2.31	2.25	2.20	2.17	2.13	2.06	1.97	1.93	1.88	1.84	1.79	1.73
28	4.20	3.34	2.95	2.71	2.56	2.45	2.36	2.29	2.24	2.19	2.15	2.12	2.04	1.96	1.91	1.87	1.82	1.77	1.71
29	4.18	3.33	2.93	2.70	2.55	2.43	2.35	2.28	2.22	2.18	2.14	2.10	2.03	1.94	1.90	1.85	1.81	1.75	1.70
30	4.17	3.32	2.92	2.69	2.53	2.42	2.33	2.27	2.21	2.16	2.13	2.09	2.01	1.93	1.89	1.84	1.79	1.74	1.68
40	4.08	3.23	2.84	2.61	2.45	2.34	2.25	2.18	2.12	2.08	2.04	2.00	1.92	1.84	1.79	1.74	1.69	1.64	1.58
60	4.00	3.15	2.76	2.53	2.37	2.25	2.17	2.10	2.04	1.99	1.95	1.92	1.84	1.75	1.70	1.65	1.59	1.53	1.47
120	3.92	3.07	2.68	2.45	2.29	2.18	2.09	2.02	1.96	1.91	1.87	1.83	1.75	1.66	1.61	1.55	1.50	1.43	1.35

Distribución F 0.01

En las columnas se encuentran los valores F que corresponden al área 0.05 a la derecha

En las columnas se encuentran los grados de libertad del numerador

En los renglones se encuentran los grados de libertad del denominador.



	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	15	20	24	30	40	60	120
1	4052	4999	5403	5625	5764	5859	5928	5981	6022	6056	6083	6106	6157	6209	6235	6261	6287	6313	6339
2	98.50	99.00	99.17	99.25	99.30	99.33	99.36	99.37	99.39	99.40	99.41	99.42	99.43	99.45	99.46	99.47	99.47	99.48	99.49
3	34.12	30.82	29.46	28.71	28.24	27.91	27.67	27.49	27.35	27.23	27.13	27.05	26.87	26.69	26.60	26.50	26.41	26.32	26.22
4	21.20	18.00	16.69	15.98	15.52	15.21	14.98	14.80	14.66	14.55	14.45	14.37	14.20	14.02	13.93	13.84	13.75	13.65	13.56
5	16.26	13.27	12.06	11.39	10.97	10.67	10.46	10.29	10.16	10.05	9.96	9.89	9.72	9.55	9.47	9.38	9.29	9.20	9.11
6	13.75	10.92	9.78	9.15	8.75	8.47	8.26	8.10	7.98	7.87	7.79	7.72	7.56	7.40	7.31	7.23	7.14	7.06	6.97
7	12.25	9.55	8.45	7.85	7.46	7.19	6.99	6.84	6.72	6.62	6.54	6.47	6.31	6.16	6.07	5.99	5.91	5.82	5.74
8	11.26	8.65	7.59	7.01	6.63	6.37	6.18	6.03	5.91	5.81	5.73	5.67	5.52	5.36	5.28	5.20	5.12	5.03	4.95
9	10.56	8.02	6.99	6.42	6.06	5.80	5.61	5.47	5.35	5.26	5.18	5.11	4.96	4.81	4.73	4.65	4.57	4.48	4.40
10	10.04	7.56	6.55	5.99	5.64	5.39	5.20	5.06	4.94	4.85	4.77	4.71	4.56	4.41	4.33	4.25	4.17	4.08	4.00
11	9.65	7.21	6.22	5.67	5.32	5.07	4.89	4.74	4.63	4.54	4.46	4.40	4.25	4.10	4.02	3.94	3.86	3.78	3.69
12	9.33	6.93	5.95	5.41	5.06	4.82	4.64	4.50	4.39	4.30	4.22	4.16	4.01	3.86	3.78	3.70	3.62	3.54	3.45
13	9.07	6.70	5.74	5.21	4.86	4.62	4.44	4.30	4.19	4.10	4.02	3.96	3.82	3.66	3.59	3.51	3.43	3.34	3.25
14	8.86	6.51	5.56	5.04	4.69	4.46	4.28	4.14	4.03	3.94	3.86	3.80	3.66	3.51	3.43	3.35	3.27	3.18	3.09
15	8.68	6.36	5.42	4.89	4.56	4.32	4.14	4.00	3.89	3.80	3.73	3.67	3.52	3.37	3.29	3.21	3.13	3.05	2.96
16	8.53	6.23	5.29	4.77	4.44	4.20	4.03	3.89	3.78	3.69	3.62	3.55	3.41	3.26	3.18	3.10	3.02	2.93	2.84
17	8.40	6.11	5.18	4.67	4.34	4.10	3.93	3.79	3.68	3.59	3.52	3.46	3.31	3.16	3.08	3.00	2.92	2.83	2.75
18	8.29	6.01	5.09	4.58	4.25	4.01	3.84	3.71	3.60	3.51	3.43	3.37	3.23	3.08	3.00	2.92	2.84	2.75	2.66
19	8.18	5.93	5.01	4.50	4.17	3.94	3.77	3.63	3.52	3.43	3.36	3.30	3.15	3.00	2.92	2.84	2.76	2.67	2.58
20	8.10	5.85	4.94	4.43	4.10	3.87	3.70	3.56	3.46	3.37	3.29	3.23	3.09	2.94	2.86	2.78	2.69	2.61	2.52
21	8.02	5.78	4.87	4.37	4.04	3.81	3.64	3.51	3.40	3.31	3.24	3.17	3.03	2.88	2.80	2.72	2.64	2.55	2.46
22	7.95	5.72	4.82	4.31	3.99	3.76	3.59	3.45	3.35	3.26	3.18	3.12	2.98	2.83	2.75	2.67	2.58	2.50	2.40
23	7.88	5.66	4.76	4.26	3.94	3.71	3.54	3.41	3.30	3.21	3.14	3.07	2.93	2.78	2.70	2.62	2.54	2.45	2.35
24	7.82	5.61	4.72	4.22	3.90	3.67	3.50	3.36	3.26	3.17	3.09	3.03	2.89	2.74	2.66	2.58	2.49	2.40	2.31
25	7.77	5.57	4.68	4.18	3.85	3.63	3.46	3.32	3.22	3.13	3.06	2.99	2.85	2.70	2.62	2.54	2.45	2.36	2.27
26	7.72	5.53	4.64	4.14	3.82	3.59	3.42	3.29	3.18	3.09	3.02	2.96	2.81	2.66	2.58	2.50	2.42	2.33	2.23
27	7.68	5.49	4.60	4.11	3.78	3.56	3.39	3.26	3.15	3.06	2.99	2.93	2.78	2.63	2.55	2.47	2.38	2.29	2.20
28	7.64	5.45	4.57	4.07	3.75	3.53	3.36	3.23	3.12	3.03	2.96	2.90	2.75	2.60	2.52	2.44	2.35	2.26	2.17
29	7.60	5.42	4.54	4.04	3.73	3.50	3.33	3.20	3.09	3.00	2.93	2.87	2.73	2.57	2.49	2.41	2.33	2.23	2.14
30	7.56	5.39	4.51	4.02	3.70	3.47	3.30	3.17	3.07	2.98	2.91	2.84	2.70	2.55	2.47	2.39	2.30	2.21	2.11
40	7.31	5.18	4.31	3.83	3.51	3.29	3.12	2.99	2.89	2.80	2.73	2.66	2.52	2.37	2.29	2.20	2.11	2.02	1.92
60	7.08	4.98	4.13	3.65	3.34	3.12	2.95	2.82	2.72	2.63	2.56	2.50	2.35	2.20	2.12	2.03	1.94	1.84	1.73
120	6.85	4.79	3.95	3.48	3.17	2.96	2.79	2.66	2.56	2.47	2.40	2.34	2.19	2.03	1.95	1.86	1.76	1.66	1.53

Para calcular el valor F en excel, se utiliza la función de la distribución F inversa

=distr.f.inv(0.01; gl num; gl den)

© Ing. Jesús Alberto Mellado Bosque