



Universidad Autónoma Metropolitana

Unidad Xochimilco

División de Ciencias Biológicas y de la Salud

Departamento de Sistemas biológicos

Maestría en Ciencias Farmacéuticas

Línea de Investigación

Diseño y Evaluación de Formas Farmacéuticas

Proyecto de Investigación

**“Desarrollo y caracterización de una
microemulsión bioadhesiva para administración
vaginal”**

Comunicación idónea de resultados para obtener el
grado de Maestra en Ciencias Farmacéuticas.

P R E S E N T A :

Q.F.B. Nely García González

Matricula: 2143808353

Comité Tutorial:

Tutora: Dra. Elizabeth Piñón Segundo

Tutora: Dra. Luz María Melgoza Contreras

Asesora: Dra. Flora Adriana Ganem Rondero

Junio 2017

**“DESARROLLO Y CARACTERIZACIÓN DE UNA MICROEMULSIÓN
BIOADHESIVA PARA ADMINISTRACIÓN VAGINAL”**

COMITÉ TUTORAL

Cotutoras:

Vo.Bo. Dra. Elizabeth Piñón Segundo

Vo.Bo. Dra. Luz María Melgoza Contreras

Asesora:

Vo.Bo. Dra. Flora Adriana Ganem Rondero

**“DESARROLLO Y CARACTERIZACIÓN DE UNA MICROEMULSIÓN
BIOADHESIVA PARA ADMINISTRACIÓN VAGINAL”**

JURADO DE EXAMEN DE GRADO

Presidente

Dra. María Josefa Bernad Bernad

Vocal

Dra. María Guadalupe Nava Arzaluz

Secretario

Dra. Luz María Melgoza Contreras

RESUMEN

El presente trabajo tiene como objetivo formular y caracterizar microemulsiones (ME's) bioadhesivas con actividad antifúngica para administración vaginal, así como determinar los perfiles de liberación *in vitro* utilizando membranas de diálisis y evaluar la permeación transepitelial del principio activo en mucosa vaginal porcina. En general, esta investigación se divide en tres etapas:

En la primera etapa se evaluó la solubilidad de cuatro agentes antifúngicos imidazólicos (fluconazol, clotrimazol (CTZ), nitrato de miconazol y ketoconazol) en agua, en diferentes aceites (palmitato de isopropilo, miristato de isopropilo, aceite de linaza) y en una mezcla de tensoactivo (Tween® 20 y Tween® 80) con co-tensoactivo (alcohol etílico) para seleccionar los componentes de la microemulsión (ME), la proporción de la mezcla de tensoactivos y co-tensoactivos, así como el principio activo. Una vez seleccionados los componentes de la ME, se elaboraron los diagramas de fase pseudo-ternarios mediante la técnica de titulación con agua, obteniéndose una mayor área de formación de la ME en el diagrama pseudo-ternario construido a partir de miristato de isopropilo, la mezcla de Tween® 80 con etanol (proporción 2 :1 v / v) y agua.

En la segunda etapa se prepararon y caracterizaron ME's conteniendo (CTZ) obteniéndose los siguientes resultados: (i) Las ME's presentaron un tamaño de glóbulo menor a 10 nm, un potencial Z promedio de -2.8 mV y una conductividad mayor a cero. (ii) Las ME's mostraron ser estables en las pruebas de stress físico y ciclado térmico. (iii) Se evaluó la liberación *in vitro* de CTZ a partir de la ME usando membranas de diálisis, mostrando un retardo en la liberación cuando el principio activo es incluido en la ME. (iv) La ME 2 presentó la mayor velocidad de liberación, con una $n < 0.5$ (modelo de Korsmeyer y Peppas), indicando un mecanismo de transporte por difusión fickiana dependiente del tiempo.

Por último, en la tercera etapa, a la ME 2 se le incorporó un agente bioadhesivo (Carbopol® 974P NF) en diferentes concentraciones y fue caracterizada de acuerdo con su apariencia física, viscosidad, bioadhesividad y estabilidad. Todas las ME bioadhesivas obtenidas fueron translúcidas. Su viscosidad aumentó al aumentar la concentración del agente bioadhesivo. Todos los sistemas fueron estables y la bioadhesión se incrementó conforme se aumentó la concentración del agente bioadhesivo hasta el punto en el que la concentración del agente bioadhesivo provocó que el sistema perdiera fluidez; la ME 2 con 1.5 % de Carbopol presentó la mejor bioadhesión. A partir de la ME con una mejor bioadhesión se evaluó la permeación transepitelial del CTZ en mucosa vaginal porcina usando celdas de difusión tipo Franz y fluido vaginal simulado con Tween® 80 al 3 % pH = 4.2 a 37 °C; obteniéndose un flujo de $24.469 \mu\text{g cm}^{-2} \text{ h}^{-1}$ y una permeación menor al 10 % indicando que la mayor parte del CTZ se queda en la superficie vaginal, favoreciendo el efecto local y la eficacia del principio activo en el tratamiento de enfermedades vaginales.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Autónoma Metropolitana por la formación recibida durante este posgrado.

A la Facultad de Estudios Superiores de Cuautitlán, por permitirme realizar este proyecto dentro de sus instalaciones.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca recibida durante la realización de estos estudios de posgrado (CVU: 629202).

A la Dra. Luz María Melgoza por permitirme realizar este proyecto, por su apoyo incondicional.

A la Dra. Elizabeth Piñón por permitirme realizar este proyecto, por compartir sus conocimientos y experiencia, por su apoyo incondicional y su amistad.

A la Dra. Adriana Ganem por sus aportaciones y consejos durante este proyecto.

DEDICATORIAS

A Dios por darme la oportunidad de estar en este maravilloso mundo, porque cada mañana me das la fuerza para salir adelante. Gracias por permitirme terminar una de mis más anheladas metas en esta vida y por llenarme de bendiciones.

A mi esposo Freddy por darme tu paciencia y comprensión, preferiste sacrificar tu tiempo para que yo pudiera cumplir con el mío. Por tu bondad y sacrificio me inspiraste a ser mejor para tí, ahora puedo decir que esta tesis lleva mucho de tí, gracias por estar siempre a mi lado.

A mis hijos Iker Alexander y mi pequeña bebe por ser mi inspiración de cada día.

A mis padres Alejandra y Marcelo por ser el pilar fundamental en todo lo que soy, en toda mi educación, tanto académica, como de la vida, por su incondicional apoyo perfectamente mantenido a través del tiempo.

A todos mis compañeros de la Maestría en Ciencias Farmacéuticas y los del Laboratorio de Sistemas Farmacéuticos de Liberación Modificada (L-13) de la Unidad de Investigación Multidisciplinaria, por brindarme su apoyo incondicional.

ÍNDICE

	Página
ÍNDICE GENERAL	I
ÍNDICE DE FIGURAS	IV
ÍNDICE DE TABLAS	V
ÍNDICE DE GRÁFICOS	VIII
LISTA DE ABREVIATURAS	XI
1. INTRODUCCIÓN	1
2. MARCO TEÓRICO	3
2.1. La vagina	3
2.1.2. Sistemas farmacéuticos de aplicación vaginal.	4
2.1.3. Ventajas de la administración de fármacos por vía vaginal.	4
2.1.4. Absorción de fármacos en la vagina.	5
2.1.5. Mecanismos de permeación de los principios activos en la vagina.	5
2.2. Sistemas bioadhesivos y mucoadhesivos.	5
2.2.1. Los geles como sistemas de aplicación vaginal.	7
2.2.2. Mecanismos de bioadhesión.	8
2.2.3. Métodos empleados para determinar la mucoadhesión.	9
2.3. Evaluación de la liberación del fármaco y los estudios de permeabilidad.	11
2.4. Microemulsiones.	13
2.4.1. Ventajas del uso de las microemulsiones.	15
2.4.2. Estabilidad de las microemulsiones.	15
2.4.3. Diagramas ternarios y pseudo-ternarios.	16
2.4.4. Tensoactivos no iónicos.	17
2.4.5. Co-tensoactivos.	17
2.4.6. Fases orgánicas.	18
2.5. Clotrimazol	19
2.5.1. Mecanismo de acción del clotrimazol	20
2.5.2. Farmacocinética del clotrimazol	20

3. HIPÓTESIS	21
4. OBJETIVOS	21
2.6. Objetivo general.	21
2.7. Objetivos particulares.	21
5. METODOLOGÍA	22
5.1. Materiales.	22
5.1.1. Reactivos.	22
5.1.2. Material biológico.	23
5.1.3. Aparatos y equipos.	23
5.2. Pruebas preliminares.	23
5.3. Preparación y caracterización de las ME's de clotrimazol.	24
5.4. Prueba de estabilidad de las ME's.	26
5.5. Preparación y caracterización de las ME's bioadhesivas con clotrimazol.	26
5.6. Pruebas de bioadhesividad.	27
5.7. Desarrollo de los métodos analíticos.	27
5.8. Cinéticas de liberación <i>in vitro</i> .	28
5.9. Cinéticas de permeación <i>in vitro</i> .	29
5.10. Extracción del clotrimazol remanente en la vagina de cerda.	31
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	32
6.1. Solubilidad cualitativa de los principios activos en los aceites.	32
6.2. Solubilidad cualitativa de los principios activos en dispersiones de tensoactivos con co-tensoactivos.	33 39
6.3. Preparación y caracterización de ME's.	53
6.4. Prueba de estabilidad.	54
6.5. Perfiles de liberación <i>in vitro</i> .	66
6.6. Preparación y caracterización de las ME's bioadhesivas.	72
6.7. Perfiles de liberación <i>in vitro</i> de la ME Bioadhesiva.	77
6.8. Cinéticas de permeación <i>in vitro</i> .	79
6.9. Extracción del clotrimazol remanente en la vagina de cerda.	

7. DESARROLLO DE LOS MÉTODOS ANALÍTICOS	81
7.1. Método 1: Cuantificación de clotrimazol liberado en los estudios <i>in vitro</i> .	81
7.2. Método 2: Cuantificación de clotrimazol permeado en los estudios <i>in vitro</i> .	83
7.3. Método 3: Cuantificación de clotrimazol retenido en la vagina en los estudios <i>in vitro</i> .	84
8. CONCLUSIONES	86
9. PERSPECTIVAS	87
10. REFERENCIAS	88
11. ANEXOS	
Anexo 1. Espectros de absorción.	93
Anexo 2. Resultado de la titulación de los diagramas ternarios.	95
Anexo 3. Preparación de los medios de disolución para los métodos analíticos.	98
Anexo 4. Resultados de los perfiles de liberación <i>in vitro</i> de las ME's.	100
Anexo 5. Modelos matemáticos aplicados a los perfiles de liberación <i>in vitro</i> .	106
Anexo 6. Resultados de los perfiles de liberación <i>in vitro</i> de la ME 2 bioadhesiva con 1 % de CTZ.	114
Anexo 7. Modelo de Peppas y Higuchi aplicado a la ME 2 bioadhesiva, 1 % de CTZ.	117
Anexo 8. Resultados de las cinéticas de permeación <i>in vitro</i> .	119
Anexo 9. Resultados de la extracción del CTZ remanente en la mucosa vaginal porcina.	121
Anexo 10. Curvas de calibración.	123
Anexo 11. Constancia y reconocimientos del trabajo presentado en XLIX Congreso Nacional y VII Internacional de Ciencias Farmacéuticas.	129

ÍNDICE DE FIGURAS

No. de Figura	Nombre de la figura	Página
Figura 1.	Esquema de la mucosa vaginal. 1: vasos capilares; 2: arteria; 3: vena.	3
Figura 2.	Superficies presentes en una unión mucoadhesiva.	6
Figura 3.	Analizador de textura acoplado a un módulo de bioadhesión	10
Figura 4.	Representación esquemática de una celda de difusión tipo Franz.	12
Figura 5.	Microemulsión aceite en agua (o / w).	13
Figura 6.	Microemulsión agua en aceite (w / o).	14
Figura 7.	Microemulsión bicontinua.	14
Figura 8.	Estructura química del miristato de isopropilo.	18
Figura 9.	Estructura química del palmitato de isopropilo.	18
Figura 10.	Estructura química del clotrimazol.	19
Figura 11.	Mecanismo de acción del clotrimazol.	20
Figura 12.	Método de titulación con agua para la construcción de los diagramas pseudo-ternarios.	24
Figura 13.	Modelo de las cinéticas de liberación <i>in vitro</i> y membrana de diálisis en el medio.	29
Figura 14.	Celdas de difusión tipo Franz para estudios de permeación.	30
Figura 15.	Microemulsiones o / w de miristato de isopropilo, Tween® 80 y agua.	45
Figura 16.	Analizador de textura CT3 acoplado al módulo de bioadhesión. 1. CT3 Texture Analyzer, Brookfield; 2 Parrilla con agitación magnética; 3. Punzón; 4. Módulo de bioadhesión y 5. Tejido vaginal.	68
Figura 17.	ME 2 después de la liberación <i>in vitro</i> en forma de gel.	72

ÍNDICE DE TABLAS

No. de Tabla	Descripción	Página
Tabla 1.	Propiedades fisicoquímicas del clotrimazol.	19
Tabla 2.	Composición de las microemulsiones o / w.	25
Tabla 3.	Solubilidad cualitativa de los principios activos en los aceites.	32
Tabla 4.	Preparación de los sistemas para determinar la solubilidad cualitativa de los principios activos con las diferentes proporciones de tensoactivos y co-tensoactivo.	34
Tabla 5.	Solubilidad cualitativa del clotrimazol en Tween® 20 / etanol.	35
Tabla 6.	Solubilidad cualitativa del nitrato de miconazol en Tween® 20 / etanol.	35
Tabla 7.	Solubilidad cualitativa del fluconazol en Tween® 20 / etanol.	36
Tabla 8.	Solubilidad cualitativa del ketoconazol en Tween® 20 / etanol.	36
Tabla 9.	Solubilidad cualitativa del clotrimazol en Tween® 80 / etanol.	37
Tabla 10.	Solubilidad cualitativa del fluconazol en Tween® 80 / etanol.	37
Tabla 11.	Solubilidad cualitativa de nitrato de miconazol en Tween® 80 / etanol.	38
Tabla 12.	Solubilidad cualitativa de ketoconazol en Tween® 80 / etanol.	38
Tabla 13.	Solubilidad del clotrimazol en las microemulsiones.	44
Tabla 14.	Valores de la viscosidad de las microemulsiones.	45
Tabla 15.	Tamaño de glóbulo promedio de las ME's con respecto a la intensidad.	46

Tabla 16.	Tamaño de glóbulo promedio de las microemulsiones con respecto al número.	47
Tabla 17.	Potencial Z y conductividad de la ME 2, ME 4, ME 2 con CTZ al 1 %, ME 4 con CTZ al 1 % y ME 4 con CTZ al 2 %.	52
Tabla 18.	Estudios de estabilidad a 3000 rpm por 15 min y mediante ciclos térmicos de 24 horas a 40 ± 2 °C y 24 horas a 4 ± 2 °C durante cuatro semanas.	53
Tabla 19.	ANOVA simple para los perfiles de liberación <i>in vitro</i> del CTZ, tomando los porcentajes liberados a las 72 horas.	57
Tabla 20.	Mecanismos de transporte y tipo de liberación de acuerdo al valor de “n” en el modelo semi-empírico de Peppas.	57
Tabla 21.	Coeficientes de determinación y valor de “n” de acuerdo al modelo de Peppas para la ME 2 con CTZ al 1 %.	58
Tabla 22.	Coeficientes de determinación y valor de “n” de acuerdo al modelo de Peppas para la ME 4 con CTZ al 1 %.	59
Tabla 23.	Coeficientes de determinación y valor de “n” de acuerdo al modelo de Peppas para la ME 4 con CTZ al 2 %.	60
Tabla 24.	Coeficientes de determinación y valor de K_H de acuerdo al modelo de Higuchi para la ME 2 al 1 % con CTZ.	62
Tabla 25.	Coeficientes de determinación y valor de K_H de acuerdo al modelo de Higuchi para la ME 4 al 1 % con CTZ.	62
Tabla 26.	Coeficientes de determinación y valor de K_H de acuerdo al modelo de Higuchi para la ME 4 al 2 % con CTZ.	64
Tabla 27.	Constantes de liberación y coeficientes de correlación de las ecuaciones de los modelos matemáticos adicionales aplicados a la ME 2 con 1% de CTZ, ME 4 con 1% de CTZ y a la ME 4 con 2% de CTZ.	66
Tabla 28.	Valores de viscosidad de las ME's y apariencia física.	66

Tabla 29.	Prueba de ANOVA simple para fuerza de adhesión por concentración de Carbopol® 974P y la formulación comercial.	69
Tabla 30.	Prueba de Rangos Múltiples para fuerza de adhesión por concentración de Carbopol® 974P, 95 % LSD.	70
Tabla 31.	Contrastes para fuerza de adhesión por concentración de Carbopol® 974P.	70
Tabla 32.	Resumen estadístico para la fuerza de adhesión.	69
Tabla 33.	Coeficientes de determinación y valor de “n” de acuerdo al modelo de Peppas para la ME 2 con CTZ al 1 %.	74
Tabla 34.	Coeficientes de determinación y valor de K_H de acuerdo al modelo de Higuchi para la ME 4 al 1 % con CTZ.	75
Tabla 35.	Prueba de ANOVA simple para constante de Higuchi por concentración de Carbopol® 974P en la ME 2.	76

ÍNDICE DE GRÁFICOS

No. de Gráfico	Descripción	Página
Gráfico 1.	Diagrama pseudo-ternario de palmitato de isopropilo, agua y Tween® 20 / etanol en diferentes proporciones.	40
Gráfico 2.	Diagrama pseudo-ternario de palmitato de isopropilo, agua y Tween® 80 / etanol en diferentes proporciones.	41
Gráfico 3.	Diagrama pseudo-ternario de miristato de isopropilo, agua y Tween® 80 / etanol en diferentes proporciones.	42
Gráfico 4.	Diagrama pseudo-ternario de miristato de isopropilo, agua y Tween® 80 / etanol (2:1) indicando las cuatro formulaciones propuestas.	43
Gráfico 5.	Solubilidad del CTZ en las microemulsiones.	44
Gráfico 6.	Comportamiento del tamaño de glóbulo en función de la cantidad de CTZ incorporada.	48
Gráfico 7.	Distribución del tamaño de glóbulo por número ME 1.	49
Gráfico 8.	Distribución del tamaño de glóbulo por número ME 2.	49
Gráfico 9.	Distribución del tamaño de partícula por número ME 2 con 1 % de CTZ.	50
Gráfico 10.	Distribución del tamaño de partícula por número ME 3.	50
Gráfico 11.	Distribución del tamaño de partícula por número ME 4.	50
Gráfico 12.	Distribución del tamaño de partícula por número ME 4 con 1 % de CTZ.	51
Gráfico 13.	Distribución del tamaño de partícula por número ME 4 con 2 % de CTZ.	51
Gráfico 14.	Perfiles de liberación para la ME 2 con 1 % de CTZ, ME 4 con 1 % de CTZ, ME 4 con 2 % de CTZ y una solución de CTZ utilizando como medio de disolución FVS con Tween® 20 al 3 %.	55

Gráfico 15.	Perfiles de liberación para la ME 2 con 1 % de CTZ, ME 4 con 1 % de CTZ, ME 4 con 2 % de CTZ en FVS con Tween® 20 al 3 %.	56
Gráfico 16.	Modelo de Peppas aplicado a la liberación de la ME 2 con 1 % de CTZ en una solución de FVS con Tween® 20 al 3 % (sextuplicado).	58
Gráfico 17.	Modelo de Peppas aplicado a la liberación de la ME 4 con 1 % de CTZ en una solución de FVS con Tween® 20 al 3 % (sextuplicado).	59
Gráfico 18.	Modelo de Peppas aplicado a la liberación de la ME 4 con 2 % de CTZ en una solución de FVS con Tween® 20 al 3 % (sextuplicado).	60
Gráfico 19.	Modelo de Higuchi aplicado a la liberación de la ME 2 con 1 % de CTZ en una solución de FVS con Tween® 20 al 3 % (sextuplicado).	62
Gráfico 20.	Modelo de Higuchi aplicado a la liberación de la ME 4 con 1 % de CTZ en una solución de FVS con Tween® 20 al 3 % (sextuplicado).	63
Gráfico 21.	Modelo de Higuchi aplicado a la liberación de la ME 4 con 2 % de CTZ en una solución de FVS con Tween® 20 al 3 % (sextuplicado).	64
Gráfico 22.	Viscosidad de las ME's bioadhesivas	67
Gráfico 23.	Fuerza de adhesión de las ME's bioadhesivas y el gel comercial Epaq™	69
Gráfico 24.	La media de la fuerza de adhesión (N) para cada nivel de formulación y el error estándar de cada media	71
Gráfico 25.	Comparación del perfil de liberación <i>in vitro</i> entre la ME 2 con 1 % de CTZ y ME 2 con 1 % de CTZ, 1.5 % Carbopol® 974P NF.	73

Gráfico 26.	Modelo de Peppas aplicado a la liberación de la ME 2 con 1 % de CTZ y 1.5 % Carbopol® 974P NF, en una solución de FVS con Tween® 20 al 3 %.	74
Gráfico 27.	Modelo de Higuchi aplicado a la liberación de la ME 2 con 1 % de CTZ y 1.5 % Carbopol® 974P NF, en una solución de FVS con Tween® 20 al 3 %.	75
Gráfico 28.	Comparación de la constante de Higuchi por % de Carbopol® 974P en la ME 2.	77
Gráfico 29.	Porcentaje total de CTZ permeado a partir de la ME 2 bioadhesiva con 1 % de CTZ y una solución de CTZ.	77
Gráfico 30.	Cinética de permeación de CTZ a través de la mucosa vaginal porcina <i>in vitro</i> .	79
Gráfico 31.	µg de CTZ por unidad de área con respecto al tiempo.	79
Gráfico 32.	Porcentaje de CTZ retenido en el tejido vaginal y permeado en los estudios de liberación <i>in vitro</i> .	80
Gráfico 33.	Barrido del CTZ en FVS con Tween® 20 al 3 % teniendo como blanco el FVS con Tween® 20 al 3 %. y una longitud de onda de máxima absorción de 261 nm.	81
Gráfico 34.	Curva de calibración para cuantificar el CTZ liberado en los estudios <i>in vitro</i> . $Absorbancia = \left[0.00234 \times CTZ \left(\frac{\mu g}{mL} \right) \right] + 0.00319$	82
Gráfico 35.	Curva de calibración para cuantificar el CTZ permeado a través de vagina de cerda. $Absorbancia = \left[0.00233 \times CTZ \left(\frac{\mu g}{mL} \right) \right] + 0.00695$	84
Gráfico 36.	Curva de calibración para cuantificar el CTZ retenido en la vagina al final de los estudios de permeación. $Absorbancia = \left[0.00218 \times CTZ \left(\frac{\mu g}{mL} \right) \right] - 0.000803$	85

LISTA DE ABREVIATURAS

Abs.	Absorbancia
ANVISA	Agencia Nacional de Vigilancia Sanitaria (Brasil)
B	Ordenada al origen
C.V.	Coeficiente de variación
cm	Centímetros
CT	Co-tensoactivo
CTZ	Clotrimazol
d.e.	Desviación estándar
Da	Daltons
FVS	Fluido vaginal simulado
H	Horas
H₀	Hipótesis nula
H_i	Hipótesis alterna
I.P.	Índice de polidispersidad
K_H	Constante de Higuchi
ME	Microemulsión
ME 2	Microemulsión 2
ME 4	Microemulsión 4
ME's	Microemulsiones
M_t	Cantidad de fármaco liberada al tiempo t
M_α	Cantidad de fármaco liberado al equilibrio
o / w	Aceite en agua
pH	Potencial de hidrogeno
p / v	Peso / volumen
v / v	Volumen / volumen
r²	Coeficiente de determinación
T-CT	Mezcla de Tensoactivo y Co-tensoactivo
T	Temperatura
UV-VIS	Ultravioleta visible
w / o	Agua en aceite

1. INTRODUCCIÓN

Las infecciones vaginales son extremadamente frecuentes, particularmente entre las mujeres en edad reproductiva. Aunque no resultan en altas tasas de mortalidad, estas infecciones están asociadas con altos niveles de ansiedad y a la reducción de la calidad de vida. Aproximadamente tres cuartas partes de la población femenina experimenta al menos un episodio de candidiasis vulvovaginal durante su vida y casi la mitad sufre de múltiples episodios [Palmeira de Oliveira R., *et al.*, 2015]. Las manifestaciones de la candidiasis vulvovaginal son a menudo dolorosas e incómodas y pueden incluir picazón intensa, irritación, flujo vaginal y disuria. Estas infecciones pueden ser causadas por diversas entidades, desde bacterias aerobias y anaerobias, así como hongos, virus y parásitos, algunos de éstos pueden ser transmitidos sexualmente. Por lo anterior, se debe dar atención a dicha problemática de salud ya que afecta a mujeres de todas las edades y ámbitos económicos y socio-culturales.

El tratamiento comúnmente prescrito para la candidiasis vulvovaginal en los últimos años incluye a los antifúngicos imidazólicos, entre ellos se encuentra el clotrimazol que es un agente antimicótico lipofílico con un amplio espectro para tratar infecciones fúngicas tanto de la piel como de la vagina [Kalhapure R., *et al.*, 2015].

La administración vaginal de fármacos tiene diversas ventajas sobre la administración oral convencional, una de las más importantes es que se evita el efecto del primer paso hepático, por lo que es posible una reducción de la dosis con la subsecuente disminución de efectos adversos. Además, para fármacos que actúan localmente en el tracto vaginal, la aplicación tópica permite alcanzar una mayor concentración local de fármaco, mejorando la eficacia del tratamiento farmacológico [Das Neves J., *et al.*, 2008 y Machado RM., *et al.*, 2013]. En general, las formas farmacéuticas tradicionales de aplicación vaginal (soluciones, suspensiones, geles, óvulos, cremas) son de bajo costo y fáciles de usar ya que permiten la auto-inserción y extracción. Sin embargo, algunas de ellas se han

asociado una serie de desventajas tales como su bajo tiempo de retención en la vagina y el malestar que generan durante la colocación y posterior a ésta; además, puede haber escurrimientos debido al efecto de la gravedad y a la salida de fluidos vaginales, por tanto, hay pérdida de formulación y la dosis puede resultar deficiente e incluso en algunos casos no hay efecto terapéutico [Woolfson AD., *et al.*, 2000]. Por esta razón, diversas investigaciones han centrado su atención en el desarrollo de nuevos sistemas que puedan aumentar el tiempo de permanencia de las formulaciones en la zona vaginal, básicamente mediante el uso de formulaciones mucoadhesivas capaces de prolongar la permanencia del fármaco en la cavidad vaginal gracias a la formación de enlaces físicos y químicos con la mucosa [Woolfson AD., *et al.*, 2000, Justin –Temu M., *et al.*, 2004, Valenta C., *et al.*, 2005, Merabet J. *et al.*, 2005, Das Neves J., *et al.*, 2006, Machado RM., *et al.*, 2013,].

Uno de estos sistemas son las emulsiones y las microemulsiones (ME's). Una emulsión se puede definir como una preparación compuesta a base de dos líquidos inmiscibles, de los cuales uno está distribuido en el otro en forma de pequeñas gotas estabilizadas por un agente tensoactivo. Las ME's se definen como una dispersión única, ópticamente isotrópica, compuesta de una fase oleosa, una acuosa, un tensoactivo y un co-tensoactivo [Pakpayat N., *et al.*, 2009]. Las ME's son de baja viscosidad, translúcidas y termodinámicamente estables, estas dispersiones han atraído recientemente un interés considerable para ser usadas como posibles vehículos para la administración de fármacos, debido a su sencilla preparación y su capacidad de incorporación de una amplia gama de fármacos con distintos grados de lipofilia [Wei G. y Gao P., 2010].

En este proyecto experimental, se propone el diseño de una microemulsión (ME) bioadhesiva de aplicación vaginal y que pueda ser una alternativa en el tratamiento de infecciones vaginales.

2. MARCO TEÓRICO

2.1. La vagina

Es un órgano tubular, músculo-membranoso que se extiende desde el cuello uterino hacia el vestíbulo vaginal, conducto que pone en comunicación la cavidad uterina con la vulva; la vagina tiene una longitud que oscila entre 8 y 12 cm, con funciones relacionados con la cópula, la concepción y la menstruación. La superficie interna es rugosa, por la presencia de pliegues longitudinales y transversales, formados por cúmulos de tejido elástico que permiten al órgano su gran extensibilidad.

Histológicamente la vagina está compuesta por cuatro capas distintas: epitelio escamoso estratificado, lámina propia, capa muscular y adventicia; su estructura se presenta en la figura 1. La capa de la mucosa forma una serie de pliegues transversales que aumentan la superficie; esta capa de moco tiene importantes funciones fisiológicas ya que juega un papel muy importante en la absorción del fármaco [Das Neves J. y Bahia MF., 2006].

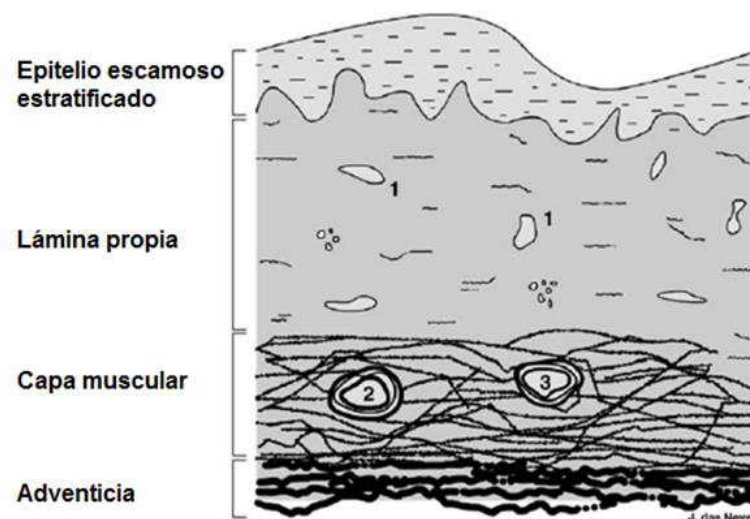


Figura 1. Esquema de la mucosa vaginal. 1: vasos capilares; 2: arteria; 3: vena
[Modificada de Das Neves J. y Bahia MF., 2006].

2.1.1. Sistemas farmacéuticos de aplicación vaginal

La vagina se ha utilizado como una vía de administración de fármacos durante mucho tiempo, tradicionalmente con el fin de obtener un efecto farmacológico local. Los sistemas de aplicación vaginal incluyen una gran variedad de formas farmacéuticas: tabletas, cápsulas, óvulos, formas semi-sólidas, soluciones, espumas, anillos vaginales, pesarios y tampones. Las formas farmacéuticas más utilizadas son las semi-sólidas como son cremas, pomadas, ungüentos y geles. La pared vaginal es muy adecuada para la absorción de fármacos de uso sistémico, ya que contiene una amplia red de vasos sanguíneos [Das-Neves J. y Bahia MF., 2006]. Un fármaco administrado por vía vaginal, para ejercer un efecto local o sistémico, debe poseer al menos cierto grado de solubilidad en el fluido vaginal. Por lo tanto, es importante tener en cuenta la naturaleza del fluido vaginal y en particular, las características del fluido vaginal que pueden afectar la absorción del fármaco [Touitou E. y Barry B., 2007].

2.1.2. Ventajas de la administración de fármacos por vía vaginal

La administración vaginal de fármacos tiene diversas ventajas sobre la administración oral convencional, una de las más importantes es que se evita el efecto del primer paso hepático, por lo que es posible una reducción de la dosis con la subsecuente disminución de efectos adversos. Además, para fármacos que actúan localmente en el tracto vaginal, la aplicación tópica permite alcanzar una mayor concentración de fármaco, mejorando la eficacia del tratamiento farmacológico [Das-Neves J., *et al.*, 2008 y Machado RM., *et al.*, 2013]. En general, las formas farmacéuticas convencionales de aplicación vaginal (soluciones, suspensiones, geles, óvulos, cremas) son de bajo costo y fáciles de usar pues permiten la auto-inserción y extracción. Sin embargo, se han asociado con una serie de desventajas tales como su bajo tiempo de retención vaginal y el malestar que generan a las pacientes durante la colocación y posterior a ésta, ya que puede haber escurrimientos debido al efecto de la gravedad y a la salida de fluidos vaginales, por tanto, hay pérdida de formulación y la dosis puede resultar deficiente e incluso en algunos casos no hay efecto terapéutico [Woolfson AD., *et al.*, 2000].

2.1.3. Absorción del fármaco en la vagina

La absorción de sustancias dentro de la vagina depende de varios factores tales como: tamaño molecular, volumen, el carácter hidrofílico o lipofílico y grado de ionización.

Para fármacos de acción sistémica la absorción depende del grosor de la pared vaginal, la presencia de moco en el cuello uterino y la presencia de receptores específicos citoplasmáticos. La absorción de fármaco también puede modificarse por cambios en el grosor de la pared vaginal influenciados por el ciclo ovárico o por el embarazo y por los cambios en el epitelio vaginal posmenopáusico y pH vaginal.

La secuencia de eventos que conducen a la absorción de un principio activo administrado por vía vaginal depende, en parte, de la naturaleza del sistema de liberación que se emplea; es decir, sólido o semisólido, hinchables o erosionable, soluble o insoluble, liberación inmediata o controlada [Touitou E. y Barry B., 2007].

2.1.4. Mecanismo de permeación de los principios activos en la vagina

El mecanismo de permeación de la mayoría de los principios activos es la difusión simple, donde los principios activos hidrofóbicos son absorbidos preferentemente por vía intracelular, mientras que los hidrofílicos son preferentemente absorbidos por los poros presentes en la mucosa vaginal [Das-Neves J. y Bahia MF., 2006].

2.2. Sistemas bioadhesivos y mucoadhesivos

Se conoce por bioadhesión a la unión de polímeros sintéticos o naturales a un sustrato biológico, este proceso sólo tiene lugar en presencia de agua. Si el sustrato está recubierto por un *mucus* hablamos de mucoadhesión como se muestra en la figura 2. La adhesión entre el polímero y la mucosa se establece mediante mecanismos termodinámicos y cinéticos debidos a la interacción y el entrecruzamiento de cadenas de polímero y glicoproteínas de la capa mucosa. Dependiendo de los grupos funcionales de ambos componentes se van a establecer diversas interacciones físicas o químicas [Beiro F., *et. al.*, 2003].

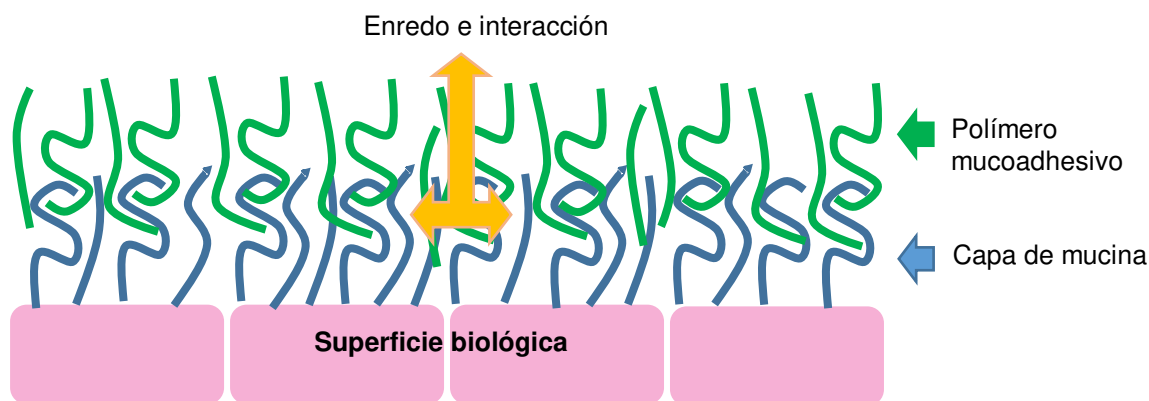


Figura 2. Superficies presentes en una unión mucoadhesiva.

En comparación con las formas farmacéuticas convencionales, los fármacos que se entregan en un sistema bioadhesivo, van a permanecer en contacto por más tiempo con el tejido y se podría pensar en un aumento de la biodisponibilidad del fármaco y en sistemas de administración controlada. Para que el fenómeno de mucoadhesión tenga lugar, el material bioadhesivo debe estar en íntimo contacto con el tejido, que en este caso será una membrana mucosa (mucosa oftálmica, bucal, nasal, vaginal, rectal o intestinal).

La vía vaginal es muy apropiada para llevarse a cabo el fenómeno de mucoadhesión ya que está recubierta por una capa de moco, proporcionando ventajas como: mantener el efecto local, mejorar la absorción, retención y liberación controlada del fármaco [Das-Neves J., Amaral MH. y Bahia M.F., 2008].

Una de las principales características que necesita tener un material para que pueda presentar una capacidad adhesiva apropiada son: tener en su estructura grupos funcionales capaces de formar uniones tipo puentes de hidrógeno (-OH, -COOH), cargas aniónicas, cadenas poliméricas con elasticidad suficiente para poder penetrar a través de la capa de *mucus*, alto peso molecular, poseer una alta capacidad de hidratación e hinchamiento. [Vallejo BM. y Perilla JE., 2008].

Entre las macromoléculas que presentan estas características se encuentran los hidrogeles. Los geles son una de las formulaciones mucoadhesivas más estudiadas para la entrega de medicamentos vaginales. La principal ventaja de estos sistemas es la posibilidad de mucoadherirse y aumentar el tiempo de residencia *in situ*, reduciendo así el número de aplicaciones. Idealmente, la formulación se mantendrá en la superficie biológica y el fármaco estará cerca de la membrana de absorción, con una subsiguiente mejora de la biodisponibilidad. [Das-Neves J. y Bahia MF., 2006].

Los polímeros mucoadhesivos usados en formulaciones comerciales para la aplicación vaginal son numerosos, entre los más comunes se encuentran los derivados del ácido poliacrílico (carbómero y policarbofilo), derivados de celulosa (quitosano y sus derivados), ácido hialurónico, alginato, carragenina y los polisacáridos sulfatados [Valenta C., 2005].

2.2.1. Los geles como sistemas de aplicación vaginal

Los geles son matrices poliméricas tridimensionales que incluyen pequeñas cantidades de sólidos, dispersos en, relativamente, grandes cantidades de líquido; sin embargo, poseen un carácter más sólido; los geles son capaces de hincharse en contacto con agua y extenderse sobre la superficie de moco vaginal. Su afinidad para absorber el agua se atribuye a la presencia de grupos hidrofílicos tales como: -OH, -CONH-, -CONH₂-, y SO₃H que forman la estructuras del polímero. Debido a la contribución de estos grupos y dominios de la red, el polímero es hidratado en diferentes grados (a veces, más del 90 % en peso) dependiendo de la naturaleza del medio acuoso y la composición del polímero. Sin embargo, las redes poliméricas hidrofóbicas, por ejemplo, el ácido poliláctico (PLA) o poliláctico-có-glicólico (PLGA) tienen una limitada capacidad de absorción de agua (< 5 - 10 %).

El contenido de agua de un hidrogel determina sus propiedades fisicoquímicas, estas estructuras tienen algunas propiedades similares a los tejidos vivos que

cualquier otra clase de biomateriales sintéticos: alto contenido de agua, consistencia blanda y su baja tensión interfacial [Mehrdad H., *et al.*, 2008]. Estos sistemas se han utilizado y están recibiendo un gran interés como sistemas de aplicación vaginal ya que además de proporcionar un efecto hidratante y lubricante han sido utilizados como sistemas de entrega de microbicidas, anticonceptivos, inductores de trabajo de parto y otras sustancias [Das-Neves J. y Bahia MF., 2006].

2.2.2. Mecanismos de bioadhesión

Las teorías que se desarrollaron para comprender y explicar el comportamiento adhesivo como pinturas, pegamentos, etc., han sido adaptadas para comprender la mucoadhesión y la bioadhesión. Las cinco teorías más comúnmente presentadas en conjunción con la bioadhesión son las teorías de adsorción, difusión, electrónica, fractura y mojado.

a) La teoría de la adsorción

Según esta teoría, la formulación se adhiere a la mucosa como resultado de enlaces químicos secundarios, tales como fuerzas de van der Waals, interacciones hidrofóbicas, atracciones electrostáticas y puentes de hidrógeno [Edsman K. y Hägerström, 2005].

b) La teoría de la difusión

En esta teoría las cadenas poliméricas de la formulación difunden en la red de moco y viceversa [Edsman K. y Hägerström, 2005].

c) La teoría electrónica

Supone que una transferencia de electrones se desarrolla a partir del contacto entre el polímero de la formulación y el moco como resultado de diferencias en su estructura electrónica. Esto conduce a la formación de una doble capa eléctrica en la interfase. La adhesión se produce debido a fuerzas atractivas a través de la doble capa [Edsman K. y Hägerström, 2005].

d) La teoría de fractura

Está relacionada con la separación de dos superficies después de la adhesión, y la resistencia a la fractura se considera igual a la fuerza adhesiva. Supone que la fractura ocurre exactamente en la interfase. Se utiliza principalmente para el cálculo de los enlaces adhesivos para una formulación rígida [Edsman K. y Hägerström, 2005].

e) La teoría de la humectación

Esta teoría se desarrolló para las preparaciones líquidas, en donde usando la tensión interfacial se predicen la extensión y la adherencia. A partir de la superficie medida y de la tensión interfacial se puede calcular el trabajo realizado en una unión adhesiva [Edsman K. y Hägerström, 2005].

2.2.3. Métodos empleados para determinar la mucoadhesión

Se han propuesto y se utilizan numerosos métodos para cuantificar las propiedades mucoadhesivas de diferentes formas farmacéuticas, estos métodos se pueden clasificar en los directos e indirectos. Los métodos, que evalúan una fuerza para separar una formulación a partir de un tejido de la mucosa o la determinación del tiempo necesario para eliminar una formulación de la mucosa, son las mediciones directas mientras que las mediciones indirectas se caracterizan por interacciones entre el polímero y la capa de moco. El método de análisis de textura es un método directo que se utiliza con frecuencia para la caracterización de polímeros mucoadhesivos, el cual mide la fuerza de desprendimiento y el trabajo total de adhesión que resulta del área bajo la curva de fuerza – distancia. El aparato de bioadhesión consta de un soporte de tejido en el cual la mucosa puede ser fijada, en la parte superior del soporte hay un orificio de 14 mm de diámetro. De este modo, la sonda con un diámetro de 10 mm puede ponerse en contacto con el tejido. El dispositivo de prueba se coloca en un vaso de precipitados con medio simulado y se puede calentar hasta una temperatura definida. Durante las mediciones, el medio se agita con una barra magnética. La formulación mucoadhesiva va en el orificio, la sonda presiona hacia abajo a la mucosa durante un tiempo definido con una fuerza

definida. Posteriormente, la sonda se mueve hacia arriba hasta que la unión adhesiva se rompe como se muestra en la figura 3 [Woertz C., *et al.*, 2013].

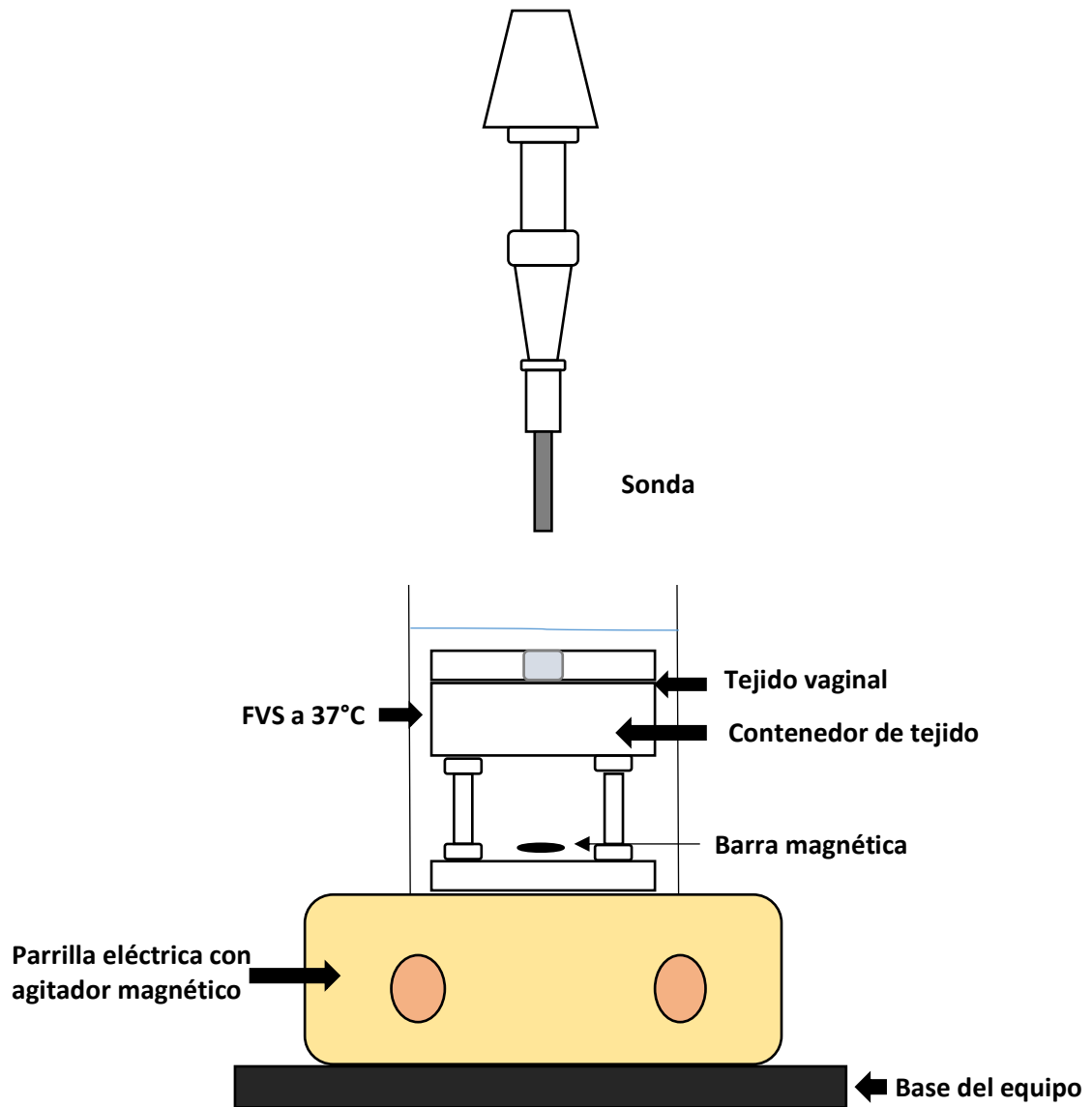


Figura 3. Analizador de textura acoplado a un módulo de bioadhesión [Modificada de Woertz C., *et al.*, 2013].

2.3. Evaluación de la liberación del fármaco y los estudios de permeabilidad

En la industria farmacéutica, la evaluación de la liberación del fármaco es muy importante en el desarrollo de medicamentos y el control de calidad. La elección correcta del método *in vitro* no necesariamente puede imitar muy de cerca el medio ambiente vivo, pero se debe probar el rendimiento de la formulación.

Durante la técnicas *in vitro* para determinar la permeabilidad de un fármaco a través de la mucosa vaginal es difícil hacer pruebas en humanos ya que su disponibilidad está a veces limitada, por lo que la mucosa vaginal animal se utiliza con frecuencia. El modelo animal más utilizado es el cerdo, debido a que sus propiedades bioquímicas e histológicas han mostrado ser similares a las de la piel y mucosa vaginal humana. La mucosa vaginal porcina, se considera apropiada para evaluar el grado de absorción a través de la pared vaginal, ya que da una buena correlación con los resultados de bioadhesividad en humanos [Das-Neves J. y Bahia MF., 2006].

Las celdas de Franz representan, desde su desarrollo en 1975, uno de los principales métodos utilizados para evaluar la penetración transepitelial y a partir de los últimos años, la liberación de fármacos. Este sistema está compuesto principalmente por dos cámaras o compartimentos, uno con la muestra de análisis (donador) y otro de permeado (receptor), estos dos compartimentos están separados por una membrana de origen animal, humana o sintética que permite evaluar la difusión de moléculas de un compartimento al otro como se muestra en la figura 4. En el compartimiento donador se coloca la muestra de análisis. Esta muestra irá difundiendo a través de la membrana hasta el compartimiento receptor permitiendo el monitoreo de las concentraciones dadas a determinado tiempo, que posteriormente son cuantificadas. Entre los parámetros que influyen en la difusión de dicho compuesto, están la temperatura, la velocidad de agitación, el tipo y la naturaleza de la membrana, así como el medio del compartimento receptor [El-Kattan A., *et al.*, 2000].

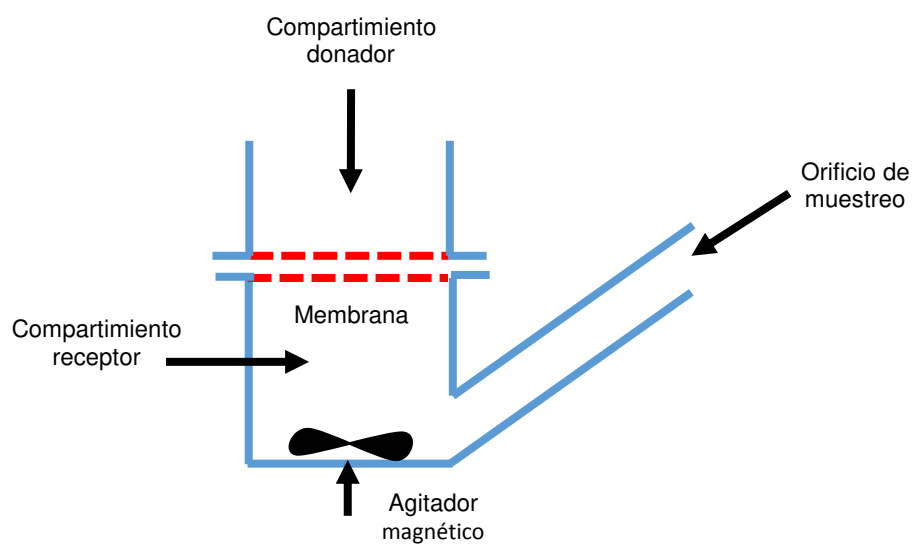


Figura 4. Representación esquemática de una celda de difusión tipo Franz.

2.4. Microemulsiones

Una microemulsión (ME) se define como una dispersión compuesta de una fase oleosa, una acuosa, un tensoactivo y un co-tensoactivo. Estas son ópticamente isotrópicas, de baja viscosidad, translúcidas, termodinámicamente estables con un tamaño de glóbulo de 10 – 100 nm.

Dependiendo de la concentración de los componentes en la ME, existe la posibilidad de formarse tres tipos de ME's: aceite en agua (o / w), agua en aceite (w / o) y bicontinua (Figura 5, 6 y 7). En cada una de éstas, existe una monocapa de tensoactivo interfacial que separa los dominios de aceite y agua. Las micro emulsiones (ME's) o / w son más probables cuando la fracción volumétrica de aceite es baja, por el contrario, cuando la fracción volumétrica de agua es baja son más probables las ME's w / o, y en los sistemas donde las cantidades de agua y aceite son similares, se formará una ME bicontinua [Lawrence M. y Rees G., 2012].

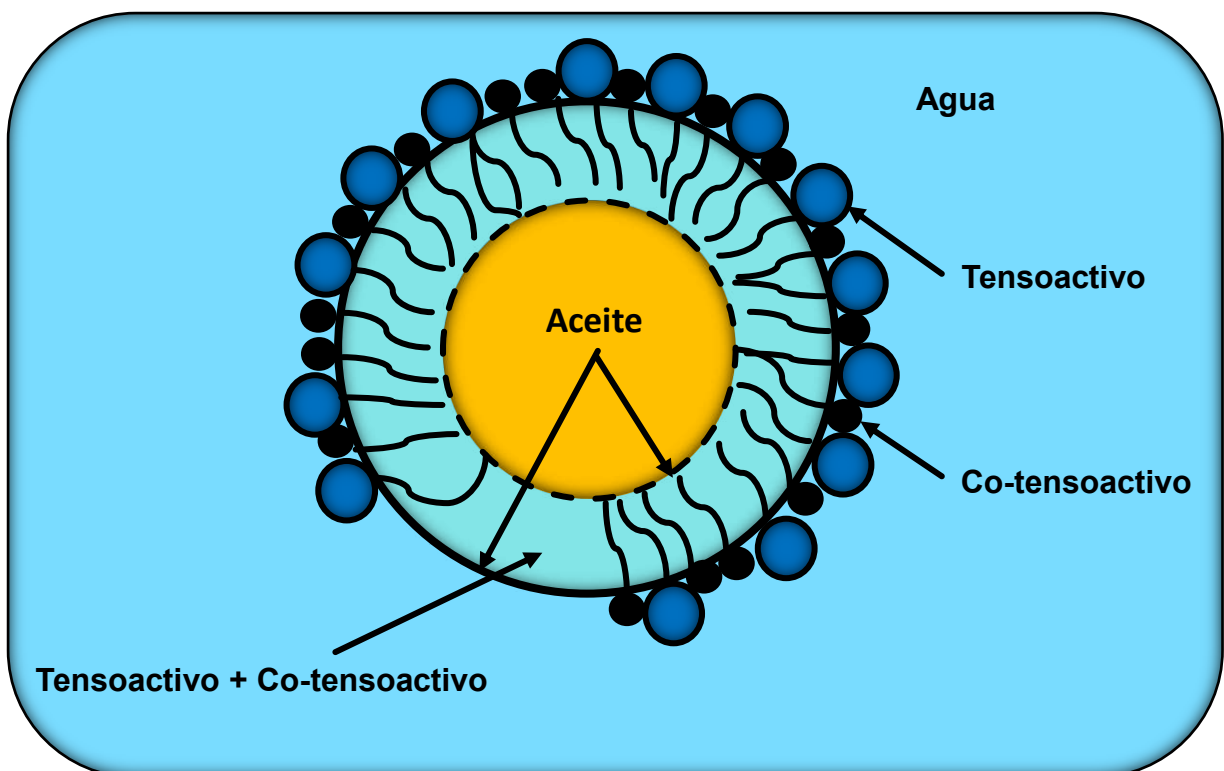


Figura 5. Microemulsión aceite en agua (o / w) [Modificada de Lawrence M. y Rees G., 2012].

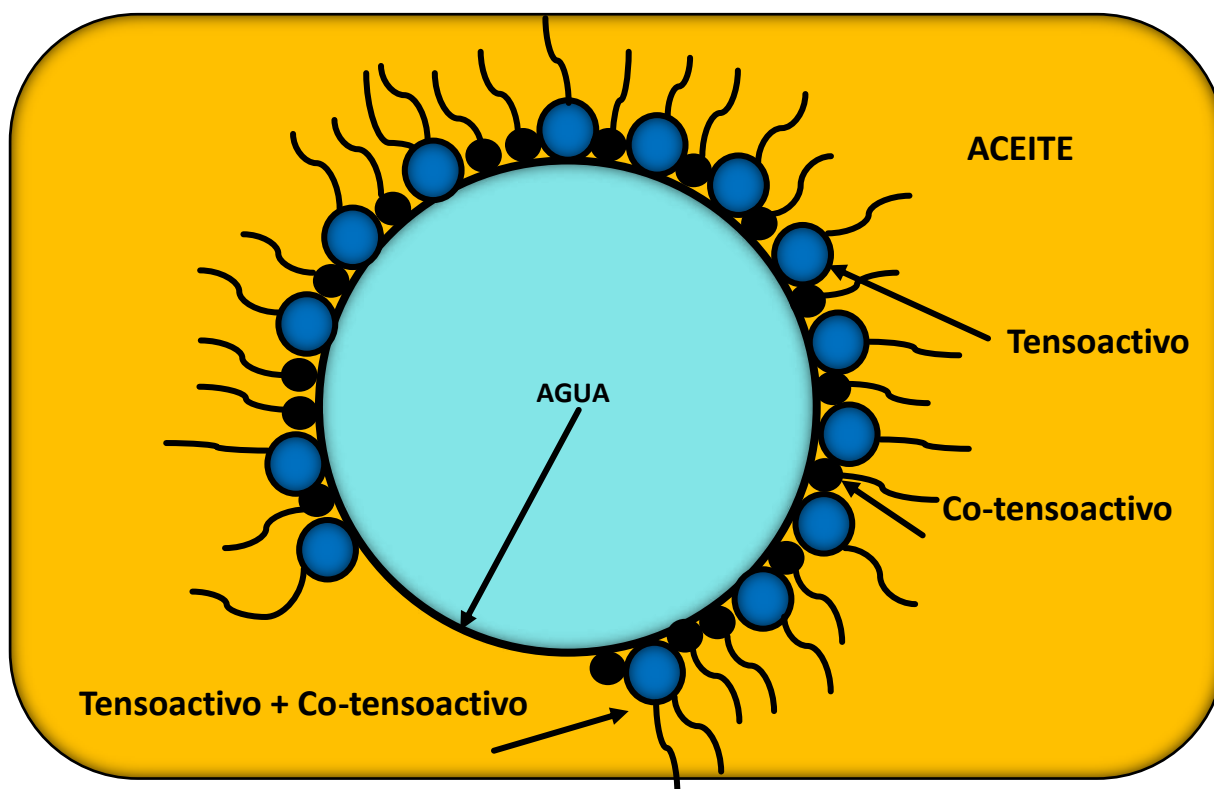


Figura 6. Microemulsión agua en aceite (w / o) [Modificada de Lawrence M. y Rees G., 2012].

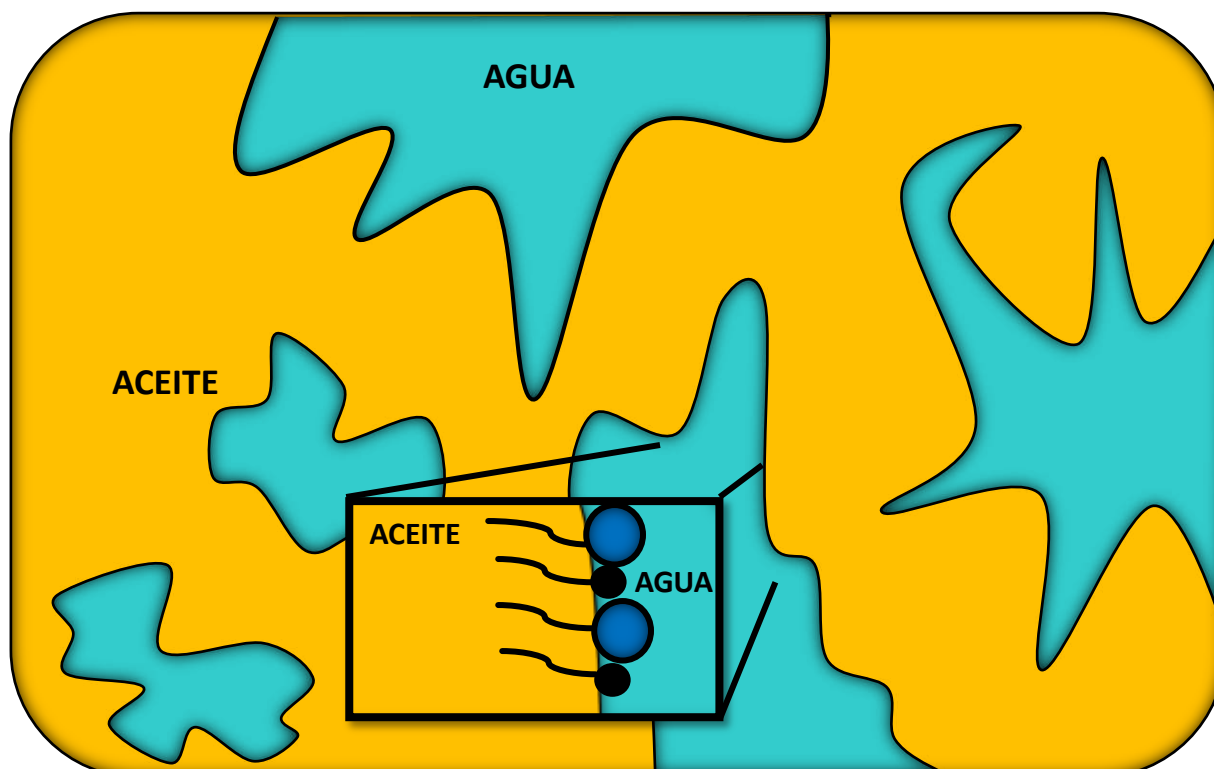


Figura 7. Microemulsión bicontinua [Modificada de Lawrence M. y Rees G., 2012]

2.4.1. Ventajas del uso de las microemulsiones

Dentro de las principales ventajas del uso de ME's de aplicación farmacéutica se encuentran:

- Alto poder de solubilización de lípidos.
- Alto poder de solubilización de principios activos insolubles en agua [Borhade V., *et al.*, 2012].
- Mejora de la difusión y la permeabilidad de las mucosas [Borhade V., *et al.*, 2012].
- Protección de principios activos a la degradación.
- Uso como sistemas acarreadores para una liberación modificada de principios activos.

2.4.2. Estabilidad de las microemulsiones

Históricamente, se han utilizado tres enfoques para explicar la formación y la estabilidad de una ME:

1. Teoría de películas interfaciales o mixtas
2. Teoría de solubilización
3. Tratamientos termodinámicos

Se puede considerar que la energía libre de formación de la ME depende del grado en el que el tensoactivo disminuye la tensión superficial de la interface aceite-agua y el cambio en la entropía del sistema de tal manera que,

$$\Delta G_f = \gamma \Delta A - T \Delta S$$

Donde ΔG_f es la energía libre de formación, γ es la tensión superficial de la interface aceite-agua, ΔA es el cambio en el área interfacial en la microemulsificación, ΔS es el cambio de entropía del sistema que es igual a la entropía de dispersión y T es la temperatura. De tal manera que cuando se forma una ME, el cambio en ΔA es muy grande debido a la formación de un gran número de gotitas muy pequeñas. Originalmente se propuso que para que se formara una ME se requería un valor negativo (transitorio) de γ , ahora se sabe que mientras que el valor de γ es positivo

en todo momento, este es muy pequeño (del orden de las fracciones de mN / m), además está compensado por el componente entrópico. La contribución entrópica dominante favorable es la entropía de dispersión muy grande que surge de la mezcla de una fase en la otra en forma de un gran número de pequeñas gotitas. Sin embargo, también se espera que estas contribuciones entrópicas surjan de otros procesos dinámicos tales como: la difusión de tensoactivos en la capa interfacial y el intercambio de tensoactivos en la micela. Así, una energía libre de formación será negativa y esta se logra cuando grandes reducciones en la tensión superficial se acompañan de un cambio entrópico favorable significativo. En tales casos, la microemulsificación es espontánea y la dispersión resultante es termodinámicamente estable [Lawrence M. y Rees G., 2012].

Sin embargo, también debe recordarse que, aunque las ME's son termodinámicamente estables, pueden existir barreras cinéticas para su formación. Como consecuencia, el orden de adición de los componentes puede afectar a la facilidad de preparación y, en algunos casos, la agitación mecánica o la entrada de calor ayudarán a una microemulsificación más rápida.

2.4.3. Diagramas ternarios y pseudo-ternarios

La relación entre el comportamiento de fase de una mezcla y su composición se puede capturar con ayuda de un diagrama ternario. Las variables de composición también se pueden estudiar en función de la temperatura y la presión. El comportamiento de fase de sistemas de una ME simple que comprende aceite, agua y tensoactivo se puede estudiar con ayuda de un diagrama ternario en donde cada esquina del diagrama representa el 100 % de ese componente en particular. Sin embargo, y casi siempre en el caso de ME's con aplicaciones farmacéuticas, la ME contendrá componentes adicionales tales como un co-tensoactivo y / o fármaco.

En el caso en el que se investigan cuatro o más componentes, se usan diagramas de fase pseudo-ternarios donde una esquina típicamente representará una mezcla binaria de dos componentes tales como tensoactivo / co-tensoactivo. El número de

fases diferentes presentes para una mezcla particular pueden evaluarse visualmente con ayuda del diagrama de fases.

2.4.4. Tensoactivos no iónicos

Los tensoactivos usados para estabilizar las ME's pueden ser: tensoactivos no iónicos, zwitteriónicos, catiónicos o aniónicos. También se pueden utilizar combinados, particularmente iónicos y no iónicos, ya que su unión resulta ser muy eficaz para aumentar la región de formación de la ME. Para ME's de aplicación farmacéutica se prefiere el uso de tensoactivos no iónicos ya que son generalmente menos tóxicos [Lawrence M. y Rees G., 2012, Prieto C. y Calvo L., 2013].

Unos de los tensoactivos no iónicos más utilizados para vía vaginal son los polisorbatos (Tween® 20 y Tween® 80), ya que poseen un alto balance hidrofílico / lipofílico (HLB de 16.7 y 15, respectivamente), son biocompatibles, tienen una baja viscosidad, son no tóxicos y no irritantes [Prieto C. y Calvo L., 2013, Rowe C., *et al.*, 2009].

El HLB tiene en cuenta la contribución relativa de fragmentos hidrófilos e hidrófobos de la molécula de tensoactivo. Generalmente, los tensoactivos con un HLB bajo (3 – 6) favorecen la formación de ME's w / o, mientras que los tensoactivos con HLB alto (8 – 18), favorecen la formación de ME's o / w [Wei G. y Gao P., 2010].

2.4.5. Co-tensoactivo

Los co-tensoactivos son moléculas pequeñas, generalmente son alcoholes de cadena corta. Su principal función es proveer una tensión interfacial muy baja requerida para la formación de la ME y para su estabilidad termodinámica, así como modificar la curvatura de la interface por efecto de los grupos apolares en su estructura y modificar la fluidez de la película interfacial [Vandamme T., 2002].

El etanol es uno de los co-tensoactivos menos tóxicos y su uso es aceptado para productos farmacéuticos [Rowe C., *et al.*, 2009]. La penetración de alcohol en la

película interfacial reduce la repulsión de las colas hidrófobas de tensoactivo favoreciendo su disolución en la fase oleosa. En consecuencia, un aumento en la longitud de la cadena del co-tensoactivo incrementara su actividad superficial [Prieto C. y Calvo L., 2013].

2.4.6. Fases orgánicas

Las fases orgánicas más utilizadas consisten en aceites vegetales y triglicéridos, en los cuales el 95 % de los ácidos grasos están compuestos de 8 a 10 átomos de carbono y de ésteres de ácidos grasos. Entre ellos se encuentra el palmitato de isopropilo (figura 8) y el miristato de isopropilo (figura 9) ambos son solubles en etanol, no tóxicos, no irritantes y están indicados para preparaciones vaginales [Rowe C., et al., 2009].

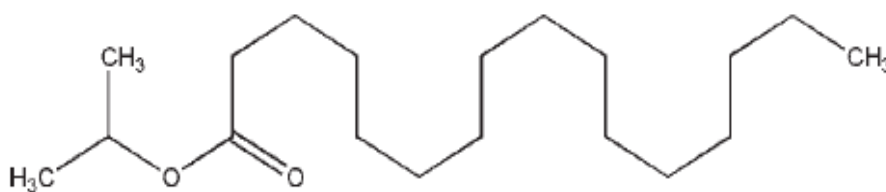


Figura 8. Estructura química del palmitato de isopropilo [Rowe C., et al., 2009].

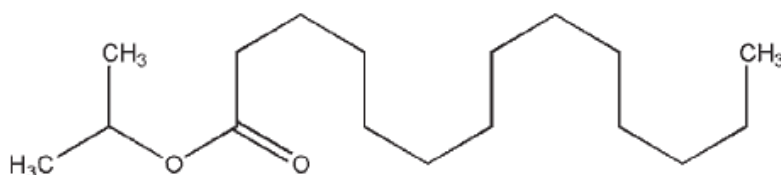


Figura 9. Estructura química del miristato de isopropilo [Rowe C., et al., 2009].

2.5. Clotrimazol

El clotrimazol (CTZ) [1 - [(2-clorofenil) difenilmetil] - 1H - imidazol] (figura 10) es un agente antifúngico imidazólico, que se utiliza en el tratamiento de infecciones producidas por varias especies de dermatofitos patógenos. Algunas de las infecciones en las que el CTZ es eficaz son la tiña (dermatofitosis) y las candidiasis oral y vaginal. Debido a su pequeña penetración a través de la piel, el CTZ está indicado en el tratamiento de las micosis subcutáneas. Está disponible para uso tópico en cremas, lociones, soluciones e insertos.

Es eficaz frente a una amplia gama de microorganismos entre los que se incluyen *Aspergillus fumigatus*, *Candida albicans*, *Cephalosporium*, *Cryptococcus*, *Epidermophyton floccosum*, *Microsporum canis*, *Malassezia furfur*, *Sporothrix*, *Trichophyton rubrum*, y *T. mentagrophytes*. Las propiedades fisicoquímicas del CTZ se mencionan en la tabla 1

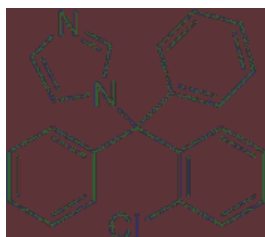


Figura 10. Estructura química del clotrimazol.

Tabla 1. Propiedades fisicoquímicas del clotrimazol, [tabla tomada de Borhade V., *et al* 2012].

Propiedades	Valores
Peso molecular	344.8 g / mol
Formula condensada	(C ₂₂ H ₁₇ Cl N ₂)
Log P	6.30
pK _a	4.70 y 6.02
Naturaleza	Base débil
Punto de fusión	141 – 145 °C
Solubilidad en agua	0.49 (µg / mL)

2.5.1. Mecanismo de acción del clotrimazol

Actúa alterando la membrana de los hongos sensibles. El CTZ inhibe la síntesis del ergosterol al interaccionar con la 14-alfa-metilasa, una enzima del citocromo P-450 que es necesaria para transformar el lanosterol a ergosterol, un componente esencial de la membrana. La ausencia de ergosterol en la membrana aumenta la permeabilidad de la célula ocasionando la pérdida de componentes esenciales de la misma, como el potasio y fosfatos que se escapan a través de las fisuras de la membrana produciendo la muerte del hongo como se muestra en la figura 11 [Bidart H., 2004].

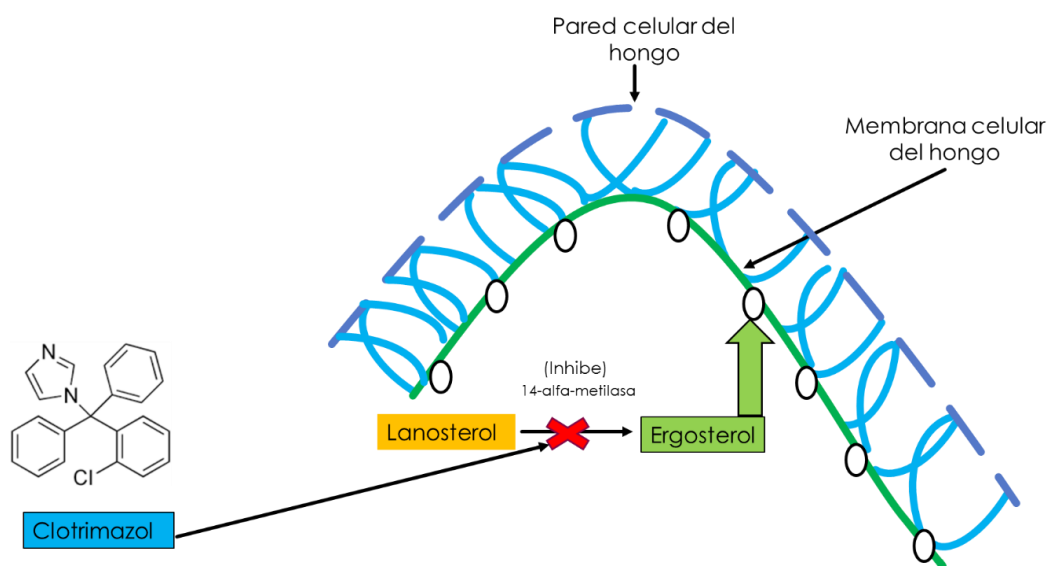


Figura 11. Mecanismo de acción del clotrimazol [Modificada de Bidart H., 2004].

2.5.2. Farmacocinética del clotrimazol

El CTZ no se administra sistémicamente, y después de la aplicación tópica sobre la piel o vaginalmente las concentraciones plasmáticas son mínimas. Por vía vaginal, se absorbe entre el 3 y 10 % de la dosis, pero las concentraciones plasmáticas son muy pequeñas. Debido a que el CTZ se fija a las mucosas oral y vaginal, se detectan concentraciones significativas del fármaco hasta 3 días después de su aplicación. Las pequeñas cantidades que se absorben son metabolizadas en el hígado y excretadas en la bilis. El CTZ para aplicación vaginal está disponible en óvulo de 100 (1 óvulo durante 7 días), 200 mg (1 óvulo durante 3 días) y 500 mg (1 óvulo dosis única) y crema al 1 y 2 % (50 mg durante 7 a 14 días).

3. HIPÓTESIS

La formulación de un fármaco antifúngico en una ME bioadhesiva incrementará el tiempo de residencia del fármaco en la vagina y promoverá su efecto terapéutico.

4. OBJETIVOS

4.1. OBJETIVO GENERAL

- Formular y caracterizar ME's bioadhesivas con actividad antifúngica para administración vaginal.

4.2. OBJETIVOS PARTICULARES

- Formular las ME's.
- Incorporar un principio activo antifúngico para el tratamiento de infecciones vaginales en una ME.
- Caracterizar las ME's obtenidas de acuerdo a su apariencia física, tipo de emulsión, pH, contenido de fármaco, tamaño de glóbulo, potencial zeta y conductividad.
- Incorporar una ME en un material bioadhesivo sin alterar la estructura de la misma.
- Caracterizar el sistema bioadhesivo de acuerdo con su apariencia física, viscosidad y bioadhesividad.
- Determinar los perfiles de liberación *in vitro* con los sistemas preparados usando bolsas de diálisis.
- Evaluar la permeación transepitelial del principio activo en mucosa vaginal porcina.
- Desarrollar métodos analíticos por espectrofotometría UV-Vis para cuantificar el fármaco antifúngico en los estudios de liberación y de permeación.

5. METODOLOGÍA

5.1. Materiales

5.1.1. Reactivos

- Clotrimazol (Sigma-Aldrich® Life Science)
- Fluconazol (Glenmark Pharmaceuticals Ltd)
- Ketoconazol (Piramal Healthcare Limited)
- Nitrato de miconazol (GLOBE CHEMICALS, S.A. de C.V.)
- Miristato de isopropilo (Droguería Cosmopolita, S.A. de C.V.)
- Palmitato de isopropilo (Droguería Cosmopolita, S.A. de C.V.)
- Aceite de linaza (Droguería Cosmopolita, S.A. de C.V.)
- Tween 20® (Droguería Cosmopolita, S.A. de C.V.)
- Tween 80® (Droguería Cosmopolita, S.A. de C.V.)
- Alcohol etílico (REASOL^{MR})
- Cloruro de sodio (Farmacia Paris, S.A. de C.V)
- Hidróxido de potasio (Farmacia Paris, S.A. de C.V)
- Hidróxido de calcio (Farmacia Paris, S.A. de C.V)
- Ácido láctico (Farmacia Paris, S.A. de C.V)
- Ácido acético glacial (Farmacia Paris, S.A. de C.V)
- Urea (Farmacia Paris, S.A. de C.V)
- Glucosa (Farmacia Paris, S.A. de C.V)
- Glicerina (Farmacia Paris, S.A. de C.V)
- Ácido clorhídrico ((FERMONT, S.A. de C.V.)
- Fosfato monobásico de potasio (FERMONT, S.A. de C.V.)
- Hidróxido de sodio (Droguería Cosmopolita, S.A. de C.V.)
- Carbopol® 974P NF Polymer, donado por Lubrizol, México.

5.1.2. Material biológico

- Vagina de cerda obtenida directamente del rastro antes de ser sometida a tratamientos con agua caliente o vapor.

5.1.3. Aparatos y equipo

- Balanza analítica (VELAB VE-204).
- Espectrofotómetro UV-Vis (Genesys® 10S UV / VIS).
- ZETASIZER Nano series - ZS90 (Malvern®)
- Centrifuga (Hettich® UNIVERSAL 320)
- pH metro (HANNA INSTRUMENTS®)
- Parrilla eléctrica con agitación (WISESTIR® MSH-20A).
- Agitador magnético multiplazas (IKA® - WERKE).
- Recirculador de líquidos con termostato (IKA® EH BASIC S001).
- Analizador de textura (CT3 Texture Analyzer, Brookfield)
- Micropipeta Eppendorf (Multipette® M4)
- Micropipeta de 5000 µL (Nichipet EXII)
- Cronómetro.
- Filtros Millex® - GV de 2.5 cm de diámetro y poro de 0.45 µm (Millipore®).
- Membrana de celulosa para diálisis (diámetro de 10 mm y un umbral de peso molecular de 6 – 8000 Da, SIGMA - ALDRICH®).
- Material de cristalería diverso.

5.2. Pruebas preliminares

Se evaluó la solubilidad cualitativa de cuatro agentes antifúngicos imidazólicos (fluconazol, clotrimazol, nitrato de miconazol y ketoconazol) en diferentes aceites (palmitato de isopropilo, miristato de isopropilo, aceite de linaza), tensoactivos (Tween® 20 y Tween® 80) y co-tensoactivos (alcohol etílico) aceptados para la vía de administración vaginal.

5.3. Preparación y caracterización de las ME's de clotrimazol

A partir de las pruebas de solubilidad se eligió la fase oleosa y la proporción de la mezcla de tensoactivo con co-tensoactivo (T-CT) para poder construir los diagramas de fase pseudo-ternarios mediante la técnica de titulación con agua como se muestra en la figura 12. Para realizar la valoración, se prepararon mezclas de aceite con T-CT en diferentes proporciones en volumen: 9:1, 8:2, 7:3, 6:4, 5:5, 4:6, 3:7, 2:8 y 1:9, en distintos viales. La relación en volumen de tensoactivo y co-tensoactivo fue variada (1:1, 2:1 y 3:1), todos los sistemas fueron titulados con adiciones sucesivas de 50 μL de agua desionizada. Después de cada adición, la mezcla se agitó magnéticamente durante 2-3 minutos y se dejó en reposo para examinar visualmente la transparencia de la ME y si presentaba una separación de fases o turbidez. El punto en el que la mezcla se volvió turbia o mostró signos de separación de fases se consideró como el punto final de la valoración.

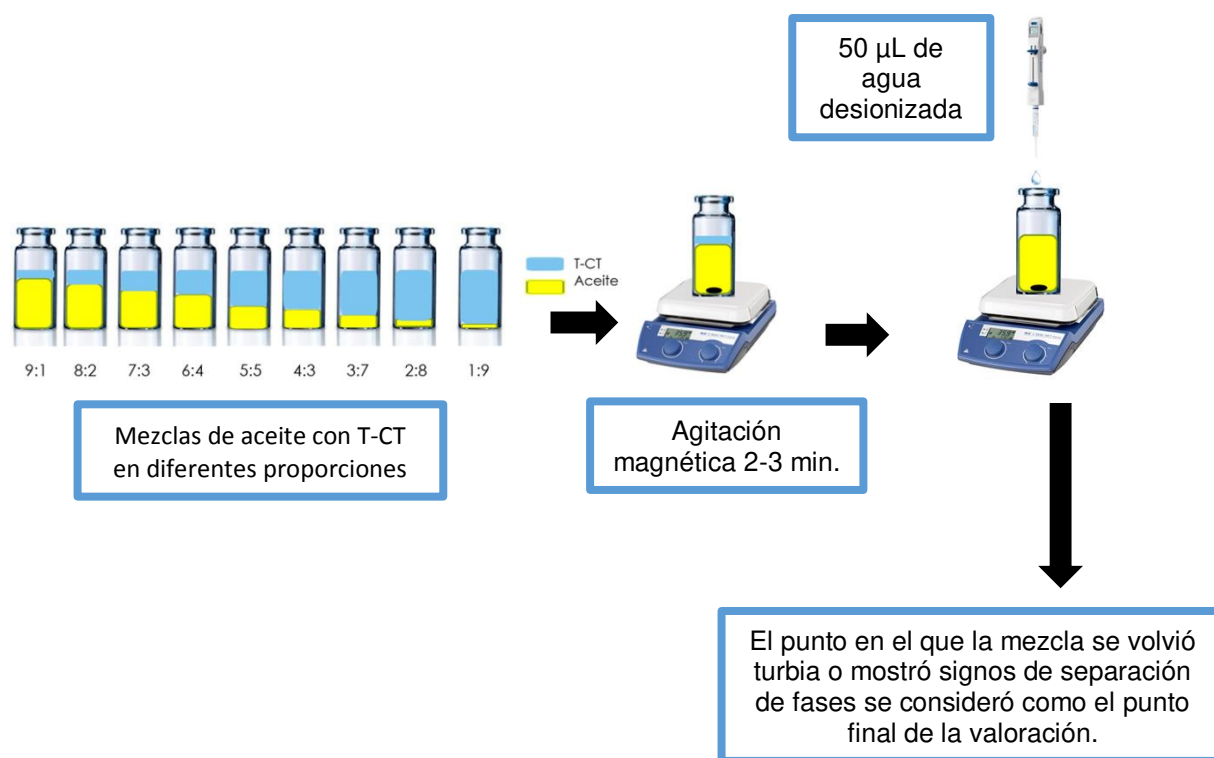


Figura 12. Método de titulación con agua para la construcción de los diagramas pseudoternarios.

El principio activo elegido para la formulación fue el CTZ debido a que es soluble en miristato de isopropilo, palmitato de isopropilo, Tween® 20, Tween® 80 y alcohol etílico. Los excipientes fueron elegidos por ser comúnmente usados para preparar ME's; además, en las concentraciones sugeridas, es factible su administración vaginal.

Se prepararon cuatro formulaciones de ME's aceite en agua (o / w, por sus siglas en inglés) y se evaluó la cantidad máxima de CTZ que puede ser incluida en cada sistema. La composición de las ME's se presenta en la tabla 2.

Tabla 2. Composición de las microemulsiones o / w.

COMPONENTES	ME 1 (% v / v)	ME 2 (% v / v)	ME 3 (% v / v)	ME 4 (% v / v)
Miristato de isopropilo	5.00	5.00	10.00	10.00
Tween® 80	33.33	43.33	33.33	43.33
Alcohol etílico	16.66	21.67	16.66	21.67
Agua	45.00	30.00	40.00	25.00

El principio activo se disolvió en el etanol, a esta solución se le adicionó la fase acuosa (agua y Tween® 80) y posteriormente la fase orgánica (miristato de isopropilo). La mezcla obtenida se agitó con una barra magnética hasta lograr una apariencia translúcida homogénea.

Las ME's obtenidas fueron caracterizadas de acuerdo a su tamaño de glóbulo (ZETASIZER Nano series - ZS90 con un ángulo de medición de 90° a T= 25 °C), potencial Z (ZETASIZER Nano series - ZS90), viscosidad a 25 °C, 20 rpm y con aguja No.1 (Viscosímetro Quimis), se determinó la conductividad en un conductímetro (HI 99300 HANNA Instruments) y se realizaron pruebas de estabilidad física en una centrifuga a 3000 rpm y también se sometieron a ciclos térmicos. A partir de estas pruebas fue seleccionada la mejor ME y con ella se realizaron los estudios posteriores.

Una vez preparadas las ME's se determinó la cantidad máxima de principio activo que puede incorporarse, estas pruebas se realizaron por triplicado. Se adicionaron

cantidades sucesivas de CTZ homogenizando con agitador magnético hasta observar la presencia de cristales de fármaco no disuelto.

5.4. Prueba de estabilidad de las ME's.

A las ME's preparadas se les realizó una prueba de estabilidad física en condiciones de estrés usando una centrífuga a 3,000 rpm durante 15 minutos y también se sometieron a ciclos térmicos de 24 horas a 40 ± 2 °C y 24 horas a 4 ± 2 °C durante cuatro semanas de acuerdo con las pruebas indicadas para emulsiones en la Guía de Estabilidad de Productos Cosméticos de la Agencia Nacional de Vigilancia Sanitaria (ANVISA de Brasil, 2005).

La estabilidad acelerada emplea condiciones extremas de temperatura con el objetivo de acelerar posibles reacciones entre sus componentes y el surgimiento de señales que deben ser observadas y analizadas conforme las características específicas de las ME's. Debido a las condiciones en que es conducido, este estudio no tiene la finalidad de estimar la vida útil del producto, sino de auxiliar en la selección de las formulaciones.

5.5. Preparación y caracterización de las ME's bioadhesivas con clotrimazol

De acuerdo a las pruebas de caracterización y a la liberación *in vitro* se seleccionó a la ME 2, a ésta se le incorporó un agente bioadhesivo que fue el Carbopol® 974P NF Polymer, un excipiente aceptado para vía vaginal. A partir de la ME 2 se prepararon las ME's bioadhesivas con 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5 y 3 % p / v de Carbopol® 974P NF Polymer. Las microemulsiones con el polímero bioadhesivo se caracterizaron de acuerdo con su apariencia física, viscosidad, bioadhesividad y se le realizaron pruebas de estabilidad física mediante ciclos térmicos de 24 horas a 40 ± 2 °C y 24 horas a 4 ± 2 °C durante cuatro semanas.

A partir de las pruebas de bioadhesión y las pruebas antes mencionadas, se seleccionó la ME con una mayor bioadhesividad y a ésta se le incorporó CTZ al 1

% para realizar las cinéticas de liberación *in vitro*, las cinéticas de permeación *in vitro* y la extracción de CTZ remanente en la vagina.

5.6. Pruebas de bioadhesividad

Los estudios de bioadhesión de las ME's bioadhesivas y de un gel comercial (Epaq™) que contiene Carbopol 934P® (de aplicación vaginal) se realizaron por sextuplicado, mediante un analizador de textura (CT3 Texture Analyzer, Brookfield) con una capacidad de carga de 25 Kg. Esta prueba se realizó utilizando como sustrato la mucosa vaginal porcina ya que da una buena correlación con los resultados de bioadhesividad en humanos [Das-Neves J., *et al.*, 2008]. Para realizar las determinaciones de bioadhesión la mucosa vaginal fue cortada en pequeños cuadros de 2 cm de lado e hidratada con FVS pH = 4.2 ± 0.1 a 37 °C por 5 minutos antes de la prueba con el fin de activar las cadenas de mucina y se utilizó 1g de ME bioadhesiva como muestra. Esta prueba se realizó aplicando una fuerza de 0.5 N por 180 s para asegurar que haya un contacto íntimo entre las cadenas de mucina con las cadenas de polímero a una velocidad de 0.5 mm / s.

5.7. Desarrollo de los métodos analíticos

Se desarrollaron tres métodos analíticos mediante espectrofotometría UV-VIS (Espectrofotómetro Genesys® 10S UV / VIS) para cuantificar el CTZ liberado a través de membranas de diálisis (Método 1), el CTZ permeado a través de vagina de cerda (Método 2) y el CTZ retenido en la vagina al final de los estudios de permeación (Método 3).

Los medios de disolución utilizados fueron:

- **Método 1:** Fluido vaginal simulado pH = 4.2 ± 0.1 (FVS) con Tween® 20 al 3 % (ver preparación en el anexo 3), el FVS se obtuvo a partir de la formulación propuesta por Owen, D. and Katz, D. (1999).

- **Método 2:** FVS pH = 4.2 ± 0.1 con Tween® 20 al 3 % en contacto con la cara externa de la vagina de cerda. La cara externa de la vagina se mantuvo en contacto con el FVS pH = 4.2 ± 0.1 con Tween® 20 al 3 % durante 24 h con agitación constante, posteriormente se filtró a través de una membrana de 0.45 μm .
- **Método 3:** Metanol en contacto con porciones de vagina. Se colocaron trozos de vagina de cerda en metanol durante 24 h con agitación constante y posteriormente se filtró a través de una membrana de 0.45 μm .

Las longitudes de onda de máxima absorción para el CTZ se determinaron en los tres diferentes medios de disolución.

Se prepararon soluciones stock utilizando los medios anteriores con una concentración de 360 ($\mu\text{g} / \text{mL}$) y a partir de ésta se tomaron alícuotas para tener una gama de concentraciones las cuales se prepararon por triplicado evaluando selectividad, linealidad y repetibilidad de acuerdo a la Guía de Validación de Métodos Analíticos, Editada por el Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos México, A. C., Edición 2002.

5.8. Cinéticas de liberación *in vitro*

Los estudios de la cinética de liberación *in vitro* de CTZ para la ME 2 y la ME 4 utilizando una membrana de celulosa para diálisis (diámetro de 10 mm y un umbral de peso molecular de 6 – 8000 Da, SIGMA - ALDRICH®) se realizaron por sextuplicado. Para realizar las liberaciones, se cortaron pequeños fragmentos de la membrana los cuales se hidrataron con agua desionizada por 12 horas, al cabo de este tiempo las membranas fueron cerradas por un extremo con hilo y se les adicionó 1 mL de la ME y se cerró por el otro extremo de la misma forma.

Los experimentos se llevaron a cabo en matraces erlenmeyer de 125 mL que contenían como medio 100 mL de una solución de FVS con Tween® 20 al 3 % pH

4.2 ± 1 , la temperatura se mantuvo constante (37 ± 2 °C) mediante un recirculador de líquidos con termostato (IKA® EH BASIC S001). Todos los sistemas se agitaron magnéticamente (IKA® - WERKE), la agitación fue constante durante todo el estudio como se muestra en la figura 13. El grupo control para cada formulación consistió en una ME placebo. Para la ME bioadhesiva se sigue el mismo procedimiento sólo que se pesa 1 g de la formulación en vez de poner 1 mL de muestra dentro de la bolsa.

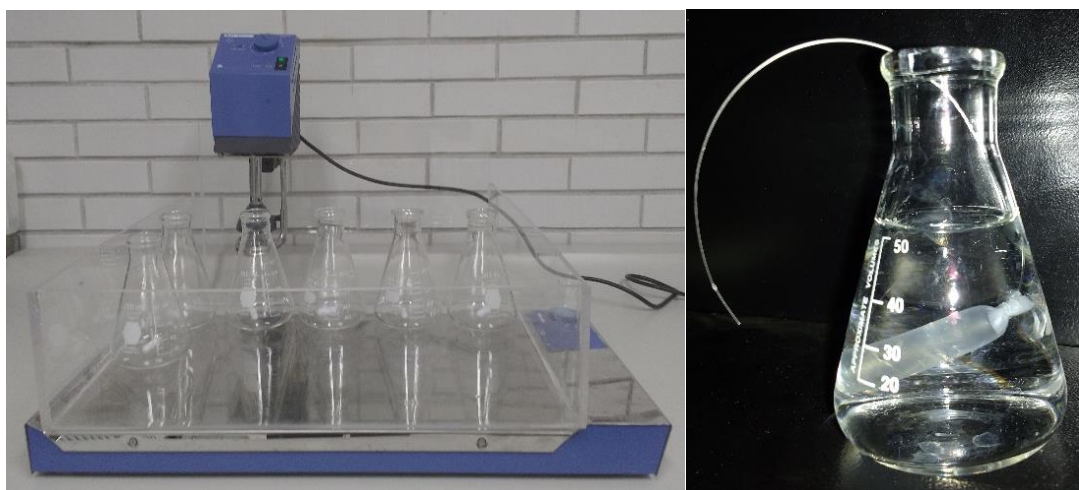


Figura 13. Modelo de las cinéticas de liberación *in vitro* y membrana de diálisis en el medio.

La liberación se siguió durante 72 h continuas, durante las cuales se tomaron muestras (3 mL) del medio a diferentes tiempos (0.25, 0.5, 0.75, 1, 2, 3, 4, 6, 8, 24, 48 y 72 h), el volumen retirado fue repuesto con solución de FVS con Tween® 20 al 3 % pH 4.2 ± 1 a 37 °C. Las muestras obtenidas fueron analizadas por UV-VIS a la longitud de onda de máxima absorción del CTZ ($\lambda_{\text{max}} = 261$ nm).

5.9. Cinéticas de permeación *in vitro*

Los estudios de la cinética de permeación *in vitro* del CTZ en celdas de difusión tipo Franz para la ME 2 bioadhesiva con CTZ al 1 % y una solución de CTZ en FVS con Tween® 20 al 3 % se realizaron por sextuplicado. Para ello se utilizó como membrana la vagina de cerda. La vagina se limpió quitando el exceso de tejido

adiposo y muscular hasta obtener un tejido con un grosor de 2 mm, esto se obtuvo con una máquina rebanadora de acero inoxidable. Esta membrana se colocó entre el compartimiento donador y receptor de la celda, con un área expuesta de 6.157 cm² y un volumen del medio receptor de 20 mL como se muestra en la figura 14. El medio receptor consistió en una solución de FVS pH 4.2 con Tween[®] 20 al 3 %, mantenida a 37 ± 1 °C y con agitación constante durante todo el estudio (24 h). El grupo control para la ME 2 bioadhesiva fue la ME 2 bioadhesiva placebo y para la solución se utilizó FVS pH 4.2 con Tween[®] 20 al 3 %.

La permeación se siguió durante 24 horas continuas, en las cuales se tomaron muestras de 3 mL del compartimiento receptor a diferentes tiempos (1, 2, 4, 6, 8 y 24 h), el volumen fue repuesto con FVS pH 4.2 con Tween[®] 20 al 3 %. Las muestras obtenidas fueron analizadas por UV-VIS a la longitud de onda de máxima absorción del fármaco ($\lambda_{\text{max}} = 261$ nm).

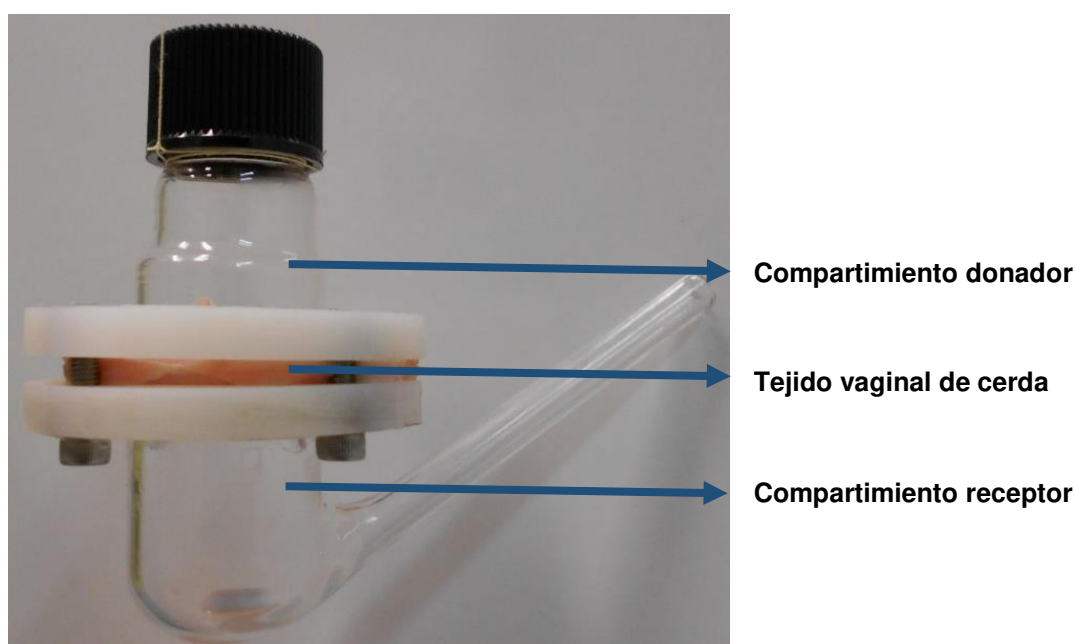


Figura 14. Celdas de difusión tipo Franz para estudios de permeación.

5.10. Extracción de clotrimazol remanente en la vagina de cerda.

Después de la determinación de los estudios de permeación, la piel se lavó con agua desionizada para eliminar el exceso de la formulación, la vagina se cortó en pequeños trozos y se mantuvo en agitación con metanol a temperatura ambiente por 24 horas. Al concluir las 24 horas se filtró el fluido por gravedad para eliminar los trozos de vagina, y posteriormente se filtró por una membrana de 0.45 µm y se analizó por UV-VIS a la longitud de máxima absorción ($\lambda_{\text{max}} = 261 \text{ nm}$).

Para determinar el porcentaje (%) de recobro del método de extracción, se disolvió una cantidad conocida de CTZ en un solvente volátil, esta solución se aplicó sobre una membrana de vagina de cerda previamente montada en una celda de Franz, se dejó evaporar el disolvente y se extrajo el CTZ utilizando metanol (se realizó por sextuplicado). El porcentaje de recobro fue calculado por la siguiente ecuación.

$$\% \text{ de recobro} = \left(\frac{\text{CTZ extraído}}{\text{CTZ inicial}} \right) \times 100$$

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. Solubilidad cualitativa de los principios activos en los aceites

Los principios activos utilizados para las pruebas de solubilidad fueron: clotrimazol, fluconazol, nitrato de miconazol y ketoconazol a los cuales se les determinó su solubilidad cualitativa en tres aceites diferentes: palmitato de isopropilo, miristato de isopropilo y aceite de linaza. En la tabla 3 se muestra la solubilidad cualitativa de los principios activos con los diferentes aceites. El CTZ es más soluble que el fluconazol en los tres aceites y tanto el nitrato de miconazol como el ketoconazol son insolubles en los tres aceites a excepción del ketoconazol en aceite de linaza.

Tabla 3. Solubilidad cualitativa de los principios activos en los aceites.

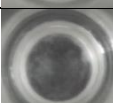
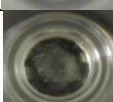
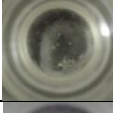
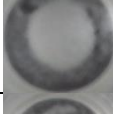
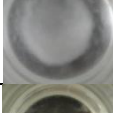
Aceite	Color del aceite	Principio activo	Estado físico del Principio activo	Solubilidad	Sistema
Palmitato de isopropilo	Transparente	Clotrimazol	Sólido color blanco	Soluble	
Miristato de isopropilo	Transparente		Sólido, blanco e inodoro	Soluble	
Aceite de linaza	Amarillo Translúcido		Sólido, blanco e inodoro	Soluble	
Palmitato de isopropilo	Transparente	Fluconazol	Sólido color blanco	Poco soluble	
Miristato de isopropilo	Transparente		Sólido blanco	Poco soluble	
Aceite de linaza	Amarillo Translúcido		Sólido blanco	Poco soluble	

Tabla 3. (Continuación). Solubilidad cualitativa de los principios activos en los aceites.

Aceite	Color del aceite	Principio activo	Estado físico del Principio activo	Solubilidad	Sistema
Palmitato de isopropilo	Transparente	Nitrato de miconazol	Sólido color blanco cremoso y de olor ligero	Insoluble	
Miristato de isopropilo	Transparente		Sólido, blanco cremoso y de olor ligero	Insoluble	
Aceite de linaza	Amarillo Translúcido		Sólido, blanco cremoso y de olor ligero	Insoluble	
Palmitato de isopropilo	Transparente	Ketoconazol	Sólido color blanco	Insoluble	
Miristato de isopropilo	Transparente		Sólido blanco	Insoluble	
Aceite de linaza	Amarillo Translúcido		Sólido blanco	Muy poco soluble	

6.2. Solubilidad cualitativa de los principios activos en dispersiones de tensoactivo con co-tensoactivo.

Se determinó la solubilidad cualitativa de los cuatro principios activos (clotrimazol, fluconazol, nitrato de miconazol y ketoconazol) en dispersiones de tensoactivo con co-tensoactivo en diferentes proporciones como se muestra en la tabla 4, los agentes tensoactivos no iónicos utilizados fueron Tween® 20 y Tween® 80, y como co-tensoactivo se utilizó etanol. Estas pruebas se realizaron para saber a qué proporciones de tensoactivo y co-tensoactivo los principios activos son solubles y así poder realizar los diagramas pseudo-ternarios.

Se prepararon seis sistemas con diferentes proporciones de T-CT los cuales variaban desde 0 a 100 % tanto del tensoactivo como del co-tensoactivo como se muestran en la tabla 4.

Tabla 4. Preparación de los sistemas para determinar la solubilidad cualitativa de los principios activos con las diferentes proporciones de tensoactivos y co-tensoactivo.

Componente	Sistemas					
	1	2	3	4	5	6
Tensoactivo (%)	0	20	40	60	80	100
Co-tensoactivo (%)	100	80	60	40	20	0

En las tablas 5, 6, 7 y 8 se presentan los resultados obtenidos de la solubilidad cualitativa de los principios activos en Tween® 20 / etanol. Se observa que el CTZ, nitrato de miconazol y fluconazol son solubles tanto en el tensoactivo, co-tensoactivo y las mezclas de ambos, mientras que el ketoconazol es insoluble en el sistema donde se encuentra solo tensoactivo. Para los sistemas preparados con Tween® 80 el CTZ es el único principio activo que es soluble a lo largo de todos los sistemas mientras que el nitrato de miconazol, fluconazol y ketoconazol son insolubles cuando se encuentran solo con Tween® 80 como se muestra en las tablas 9, 10, 11 y 12.

A partir de estas pruebas de solubilidad el principio activo que se seleccionó para realizar las ME's fue el CTZ ya que es soluble en los tres aceites y a su vez es soluble tanto en el Tween® 20, Tween® 80, etanol y la mezcla de tensoactivo y co-tensoactivo en diferentes proporciones, ya que bajo estas condiciones será posible incorporar el CTZ en la ME.

Tabla 5. Solubilidad cualitativa del clotrimazol en Tween® 20 / etanol.

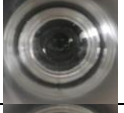
Sistema		Proporciones %	Principio activo	Estado físico del tensoactivo	Estado físico del principio activo	Solubilidad	Sistema
1	Tween® 20	0	CTZ	Transparente y poco viscoso	Sólido y blanco	Soluble	
	Etanol	100					
2	Tween® 20	20				Soluble	
	Etanol	80					
3	Tween® 20	40				Soluble	
	Etanol	60					
4	Tween® 20	60				Soluble	
	Etanol	40					
5	Tween® 20	80				Soluble	
	Etanol	20					
6	Tween® 20	100				Soluble	
	Etanol	0					

Tabla 6. Solubilidad cualitativa del nitrato de miconazol en Tween® 20 / etanol.

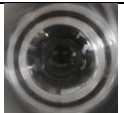
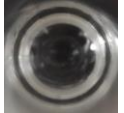
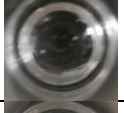
Sistema		Proporciones %	Principio activo	Estado físico del tensoactivo	Estado físico del principio activo	Solubilidad	Sistema
1	Tween® 20	0	Nitrato de miconazol	Transparente y poco viscoso	Sólido y blanco	Soluble	
	Etanol	100					
2	Tween® 20	20				Soluble	
	Etanol	80					
3	Tween® 20	40				Soluble	
	Etanol	60					
4	Tween® 20	60				Soluble	
	Etanol	40					
5	Tween® 20	80				Soluble	
	Etanol	20					
6	Tween® 20	100				Soluble	
	Etanol	0					

Tabla 7. Solubilidad cualitativa del fluconazol en Tween® 20 / etanol.

Sistema		Proporciones %	Principio activo	Estado físico del tensoactivo	Estado físico del principio activo	Solubilidad	Sistema
1	Tween® 20	0	Fluconazol	Transparente y poco viscoso	Sólido y blanco	Soluble	
	Etanol	100					
2	Tween® 20	20				Soluble	
	Etanol	80					
3	Tween® 20	40				Soluble	
	Etanol	60					
4	Tween® 20	60				Soluble	
	Etanol	40					
5	Tween® 20	80				Soluble	
	Etanol	20					
6	Tween® 20	100				Soluble	
	Etanol	0					

Tabla 8. Solubilidad cualitativa del ketoconazol en Tween® 20 / etanol.

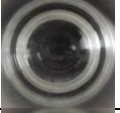
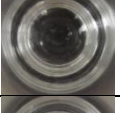
Sistema		Proporciones %	Principio activo	Estado físico del tensoactivo	Estado físico del principio activo	Solubilidad	Sistema
1	Tween® 20	0	Ketoconazol	Transparente y poco viscoso	Sólido y blanco	Soluble	
	Etanol	100					
2	Tween® 20	20				Soluble	
	Etanol	80					
3	Tween® 20	40				Soluble	
	Etanol	60					
4	Tween® 20	60				Soluble	
	Etanol	40					
5	Tween® 20	80				Soluble	
	Etanol	20					
6	Tween® 20	100				Insoluble	
	Etanol	0					

Tabla 9. Solubilidad cualitativa del clotrimazol en Tween® 80 / etanol.

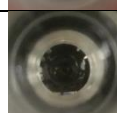
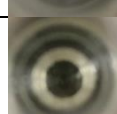
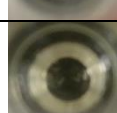
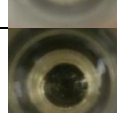
Sistema		Proporciones %	Principio activo	Estado físico del tensoactivo	Estado físico del principio activo	Solubilidad	Sistema
1	Tween® 80	0	Clotrimazol	Amarillo claro transparente y viscoso	Sólido, blanco e inodoro	Soluble	
	Etanol	100					
2	Tween® 80	20	Clotrimazol			Soluble	
	Etanol	80					
3	Tween® 80	40	Clotrimazol			Soluble	
	Etanol	60					
4	Tween® 80	60	Clotrimazol			Soluble	
	Etanol	40					
5	Tween® 80	80	Clotrimazol			Soluble	
	Etanol	20					
6	Tween® 80	100	Clotrimazol			Soluble	
	Etanol	0					

Tabla 10. Solubilidad cualitativa del fluconazol en Tween® 80 / etanol.

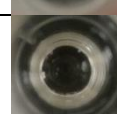
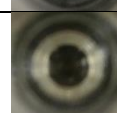
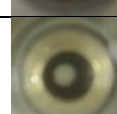
Sistema		Proporciones %	Principio activo	Estado físico del tensoactivo	Estado físico del principio activo	Solubilidad	Sistema
1	Tween® 80	0	Fluconazol	Amarillo claro transparente y viscoso	Sólido y blanco	Soluble	
	Etanol	100					
2	Tween® 80	20	Fluconazol			Soluble	
	Etanol	80					
3	Tween® 80	40	Fluconazol			Soluble	
	Etanol	60					
4	Tween® 80	60	Fluconazol			Soluble	
	Etanol	40					
5	Tween® 80	80	Fluconazol			Soluble	
	Etanol	20					
6	Tween® 80	100	Fluconazol			Poco soluble	
	Etanol	0					

Tabla 11. Solubilidad cualitativa de nitrato de miconazol en Tween® 80 / etanol.

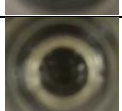
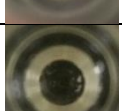
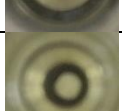
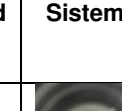
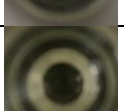
Sistema		Proporciones %	Principio activo	Estado físico del tensoactivo	Estado físico del principio activo	Solubilidad	Sistema
1	Tween® 80	0	Nitrato de miconazol	Amarillo claro transparente y viscoso	Sólido y blanco	Soluble	
	Etanol	100					
2	Tween® 80	20	Nitrato de miconazol			Soluble	
	Etanol	80					
3	Tween® 80	40	Nitrato de miconazol			Soluble	
	Etanol	60					
4	Tween® 80	60	Nitrato de miconazol			Soluble	
	Etanol	40					
5	Tween® 80	80	Nitrato de miconazol			Soluble	
	Etanol	20					
6	Tween® 80	100	Nitrato de miconazol			Insoluble	
	Etanol	0					

Tabla 12. Solubilidad cualitativa de ketoconazol en Tween® 80 / etanol.

Sistema		Proporciones %	Principio activo	Estado físico del tensoactivo	Estado físico del principio activo	Solubilidad	Sistema
1	Tween® 80	0	Ketoconazol	Amarillo claro transparente y viscoso	Sólido y blanco	Soluble	
	Etanol	100					
2	Tween® 80	20				Soluble	
	Etanol	80					
3	Tween® 80	40				Soluble	
	Etanol	60					
4	Tween® 80	60				Soluble	
	Etanol	40					
5	Tween® 80	80				Soluble	
	Etanol	20					
6	Tween® 80	100				Insoluble	
	Etanol	0					

6.3. Preparación y caracterización de ME's.

Los diagramas pseudo-ternarios se prepararon a partir de los datos obtenidos de las titulaciones con agua de una serie de mezclas de aceite con T-CT en diferentes proporciones. También se varió la relación de T-CT con el fin de determinar su comportamiento en la ME.

Se construyeron ocho diagramas ternarios a partir de los resultados incluidos en el anexo 2; tres con palmitato de isopropilo, agua y Tween® 20 / Etanol en diferentes proporciones (1:1, 2:1 y 3:1) (ver gráfico 1), y otros tres con los mismos componentes y proporciones, pero sustituyendo el Tween® 20 por Tween® 80 (ver gráfico 2). También se realizó un diagrama con miristato de isopropilo, agua y Tween® 20 en una proporción 2:1 y otro sistema con las mismas condiciones, pero sustituyendo el Tween® 20 por Tween® 80 (ver gráfico 3). Comparando los tres gráficos de los diagramas pseudo-ternarios se puede observar que a medida que se incrementa la cantidad de tensoactivos aumenta la región de formación de la ME, ya que al aumentar el tensoactivo con relación al co-tensoactivo se favorece la formación de una película interfacial flexible que ayuda a reducir la tensión interfacial y aumentar la fluidez en la interfase [Al-Rohaimi, 2015].

Comparando los gráficos 1 y 2, que tienen misma fase oleosa pero diferente agente tensoactivo, podemos observar que el gráfico 2 con Tween® 80 tiene una mayor área de formación de la ME debido a que el Tween® 80 tiene un HLB más afín a la fase oleosa (HLB = 15).

A partir de los diagramas pseudo-ternarios se escogió el sistema compuesto por miristato de isopropilo, agua y Tween® 80 / etanol en una proporción 2:1 ya que el área donde se forma la ME es más amplia (ver gráfico 4).

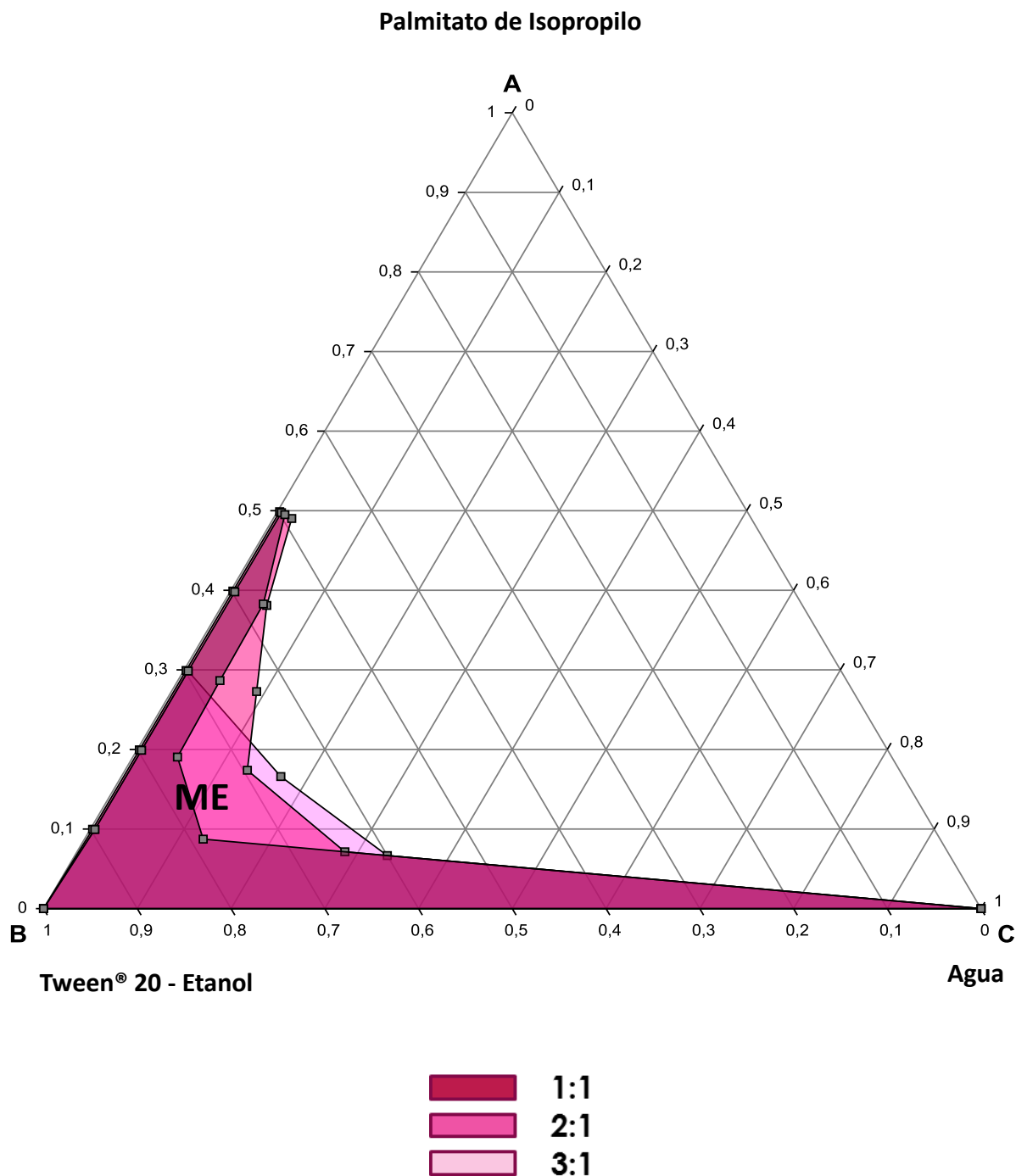


Gráfico 1. Diagrama pseudo-ternario de palmitato de isopropilo, agua y Tween® 20 / etanol en diferentes proporciones.

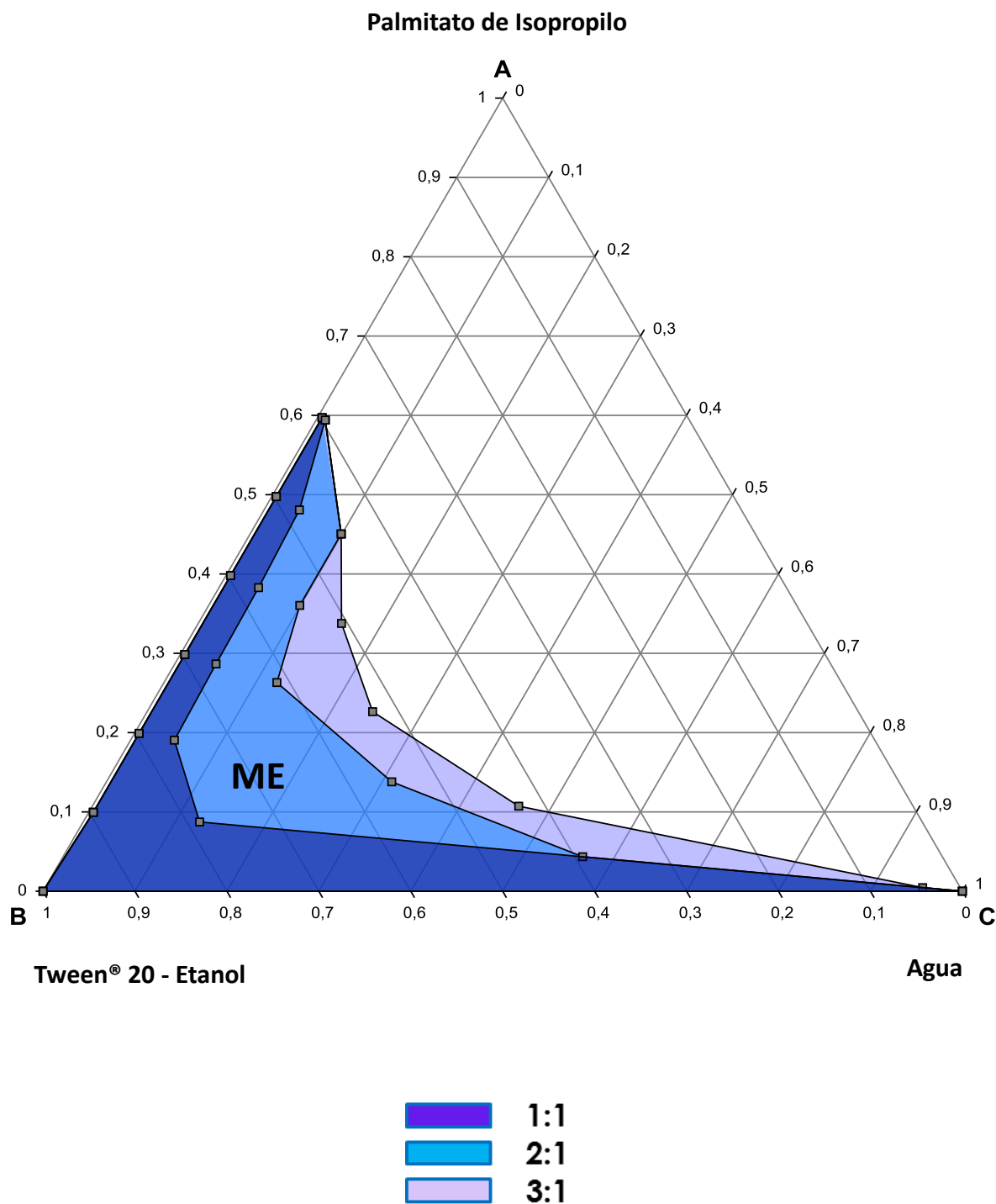


Gráfico 2. Diagrama pseudo-ternario de palmitato de isopropilo, agua y Tween® 80 / etanol en diferentes proporciones.

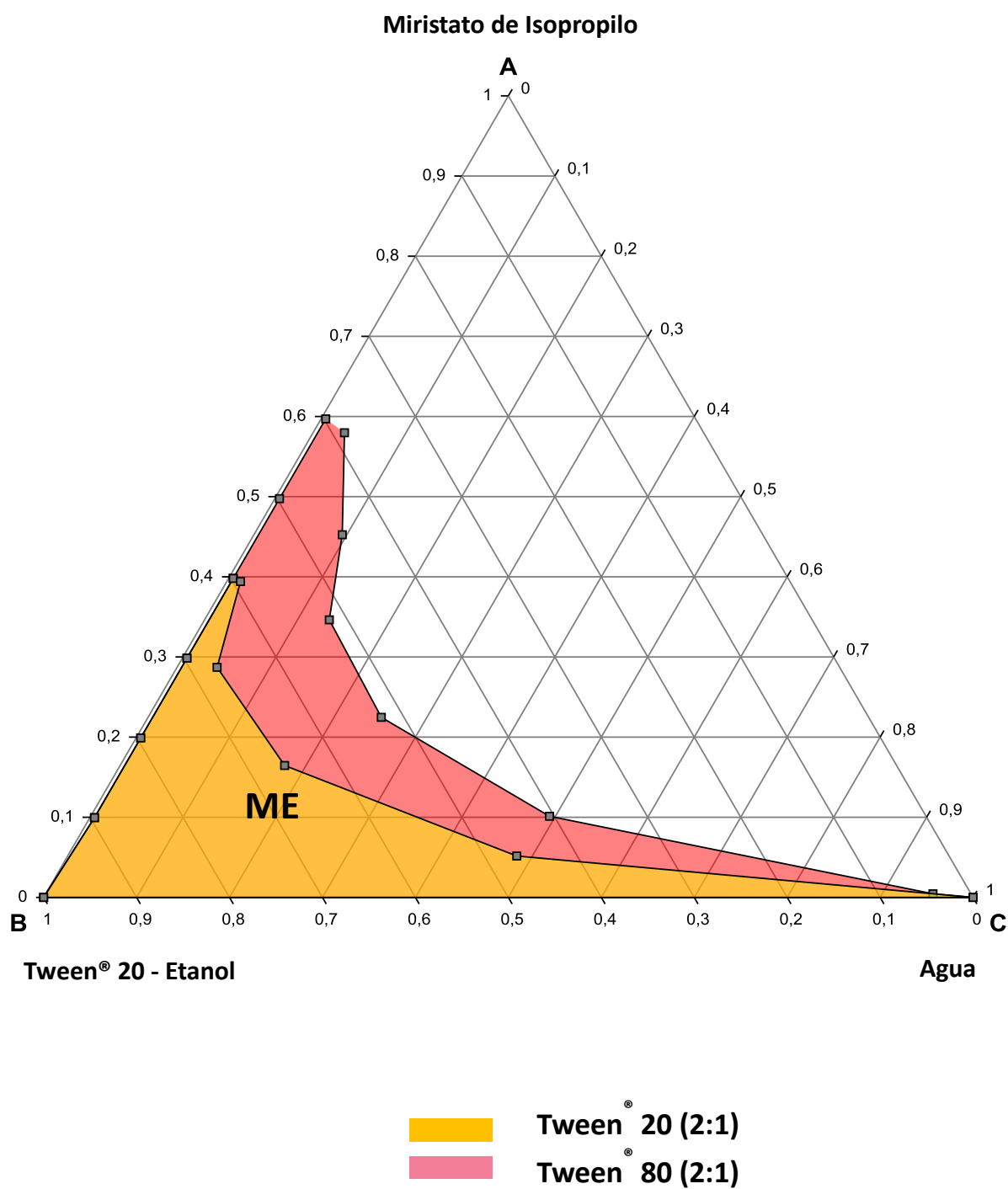


Gráfico 3. Diagrama pseudo-ternario de miristato de isopropilo, agua y Tween® 80 / etanol en diferentes proporciones.

Una vez seleccionados los componentes de la formulación, de acuerdo con la amplitud de la zona del diagrama pseudoternario en donde se forman las MEs, fueron preparadas cuatro formulaciones de ME's aceite en agua o / w, las cuales contenían miristato de isopropilo, agua y Tween® 80 como tensoactivo y etanol como co-tensoactivo (2:1). Se seleccionaron 4 puntos en el diagrama, identificados como ME 1, ME 2, ME 3 y ME 4 (Gráfico 4) procurando no sobrepasar el 70 % de la mezcla de T-CT, no tener más del 50 % de agua y no estar cerca del límite de la zona de formación de ME.

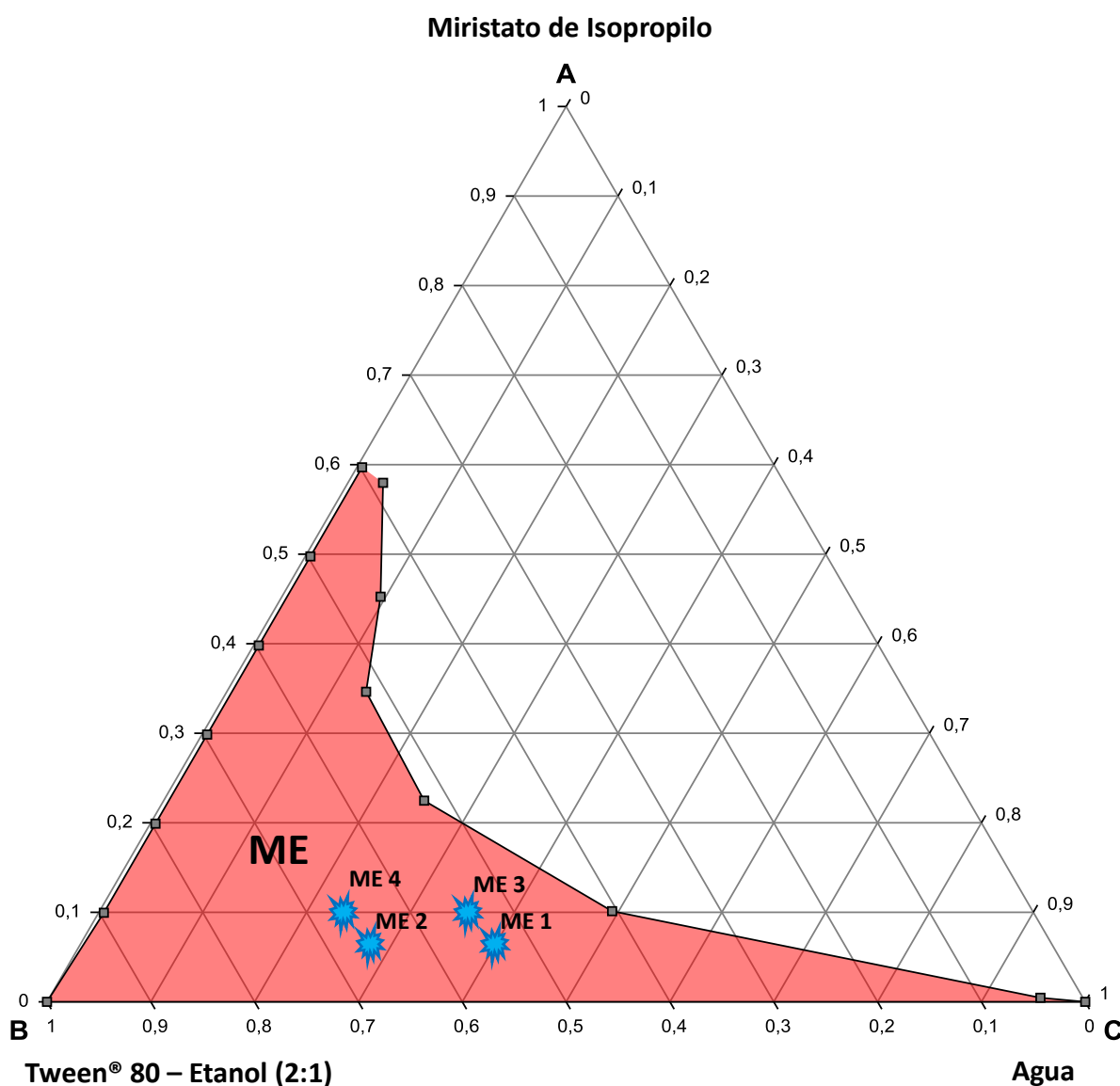


Gráfico 4. Diagrama pseudo-ternario de miristato de isopropilo, agua y Tween® 80 / etanol (2:1) indicando las cuatro formulaciones propuestas.

Se determinó la cantidad máxima de principio activo que podría ser incluida en cada una de las formulaciones propuestas, seleccionándose la ME 2 y la ME 4, ya que en ellas la cantidad de principio activo incorporado fue mayor al 1 % p / v tal como se muestra en la tabla 13 y el gráfico 5. Se seleccionaron estas dos formulaciones ya que las formas farmacéuticas comerciales contienen CTZ al 1 % y al 2 %,

Tabla 13. Solubilidad del clotrimazol en las microemulsiones.

Sistema	g CTZ / 100 mL ME
ME 1	0.903 ± 0.015
ME 2	1.550 ± 0.050
ME 3	1.455 ± 0.043
ME 4	2.193 ± 0.061

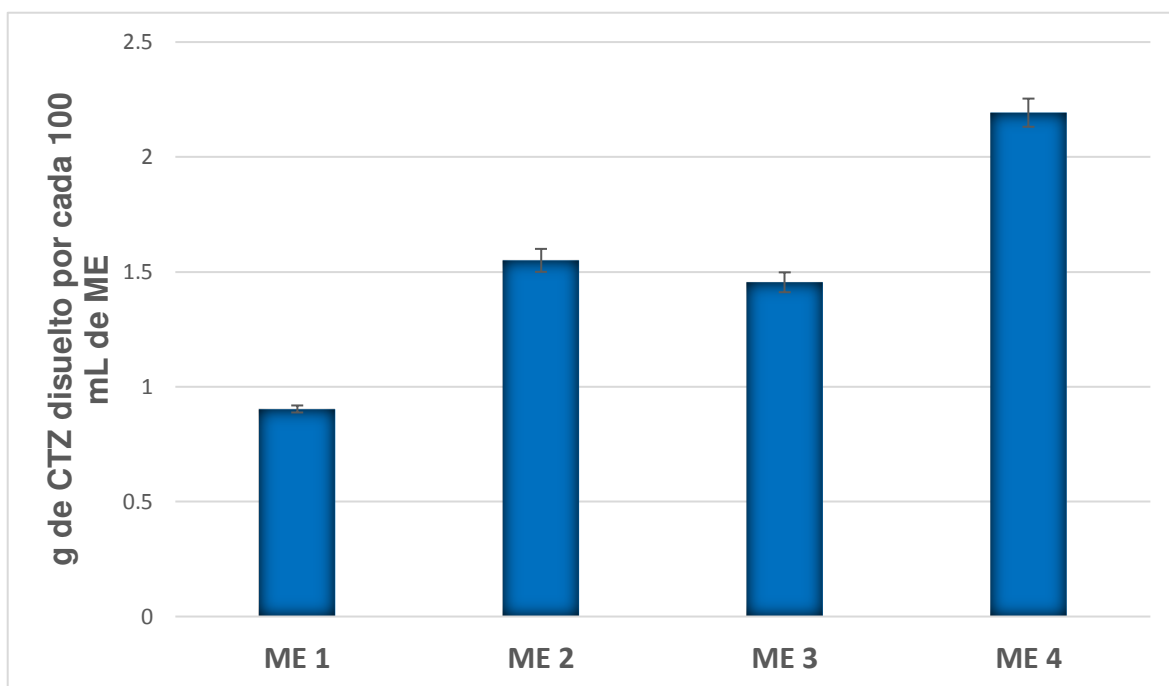


Gráfico 5. Solubilidad del CTZ en las microemulsiones 1, 2, 3 y 4.

Todas las ME's obtenidas fueron estables, translúcidas, de una sola fase y de color amarillo ámbar, característico del Tween® 80, estos sistemas se muestran en la figura 15.

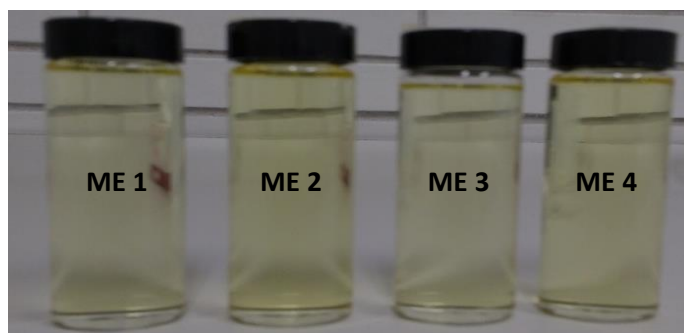


Figura 15. Microemulsiones o / w de miristato de isopropilo, Tween® 80 y agua conteniendo el fármaco.

Los resultados de la caracterización de las ME 2 y ME 4 con fármaco y sin fármaco se presentan en las tablas 14, 15, 16 y 17.

Tabla 14. Valores de la viscosidad de las microemulsiones.

Sistema	Viscosidad (cP) 25 °C, 20 rpm y Aguja No.1	pH
ME 2 placebo	234.8	6.48
ME 2 al 1 % CTZ	264.3	6.73
ME 4 placebo	194.7	6.64
ME 4 al 1 % CTZ	204.6	6.79
ME 4 al 2 % CTZ	197.9	6.89

En la tabla 14 se puede observar que tanto el pH como la viscosidad de las ME no se ven afectados por la presencia del CTZ ya que éste es una base débil (pK_a 's 4.07 y 6.02) e insoluble en agua y por lo tanto el pH no aumenta de una forma notable ya que el CTZ se encuentra disuelto mayoritariamente dentro de los glóbulos de la ME y la fase continua es agua debido a que es una ME o / w.

Para la determinación del tamaño de glóbulo, se utilizó un contador de partículas submicrónicas ZETASIZER Nano series - ZS90 con un ángulo de medición de 90° a 25 °C, se realizaron tres repeticiones con diez corridas cada una. El sistema ZETASIZER determina el tamaño midiendo primero el movimiento browniano de las partículas en una muestra usando dispersión de luz dinámica y luego interpreta un tamaño utilizando la ecuación de Stokes-Einstein.

En la tabla 15 se muestran los resultados obtenidos en las determinaciones del tamaño de glóbulo de acuerdo a valores medidos según la intensidad, y en la tabla 16 se muestran los tamaños de glóbulo, el índice de polidispersidad (IP) y el coeficiente de variación (CV) de acuerdo con la distribución del tamaño de partícula según el número de las mismas, para la ME 2, ME 2 con 1 % CTZ, ME 4, ME 4 con 1 % CTZ y ME 4 con 2 % CTZ. Todas las mediciones se realizaron por triplicado.

Tabla 15. Tamaño de glóbulo promedio de las ME's con respecto a la intensidad.

Sistema	INTENSIDAD Tamaño de glóbulo (nm)						IP	CV
	Población 1	%	Población 2	%	Población 3	%		
ME 1 Placebo	35.350	48.400	4.744	29.300	5164.000	13.500	0.400	0.488
	35.770	46.600	4.670	30.400	5086.000	13.300	0.378	0.489
	37.750	53.300	4.928	31.100	5426.000	10.200	0.594	0.482
Promedio	36.290	49.433	4.781	30.267	5225.333	12.333	0.457	0.486
ME 2 placebo	243.200	58.600	4.580	31.100	62.480	10.300	0.538	0.484
	244.500	54.300	4.875	27.900	78.910	17.800	0.412	0.488
	243.200	59.600	4.782	32.400	58.330	8.000	0.421	0.487
Promedio	243.633	57.500	4.746	30.467	66.573	12.033	0.457	0.486
ME 2 con 1 % CTZ	189.000	62.700	6.211	29.500	38.610	7.800	0.478	0.486
	197.000	58.800	5.072	30.100	48.990	11.100	0.502	0.485
	206.000	60.900	6.365	26.100	51.280	12.400	0.491	0.485
Promedio	197.333	60.800	5.883	28.567	46.293	10.433	0.490	0.485
ME 3 Placebo	45.360	32.200	5.276	23.100	1644.000	29.000	0.658	0.481
	45.080	33.800	5.247	23.900	4641.000	21.300	0.568	0.483
	48.500	30.300	1780.000	23.400	4185.000	24.300	0.655	0.481
Promedio	46.313	32.100	596.841	23.467	3490.000	24.867	0.627	0.481
ME 4 placebo	184.400	71.700	3.482	21.700	10.890	6.500	0.480	0.486
	179.900	66.200	3.000	23.100	14.340	10.700	0.640	0.481
	152.700	66.200	2.572	24.000	7.772	9.800	0.489	0.485
Promedio	172.333	68.033	4e43.018	22.933	11.001	9.000	0.536	0.484
ME 4 con 1 % CTZ	179.600	64.000	4.451	25.800	51.000	10.200	0.414	0.488
	202.700	68.100	5.781	24.900	61.840	7.000	0.416	0.487
	182.300	70.200	4.832	23.200	22.240	6.600	0.525	0.484
Promedio	188.200	67.433	5.021	24.633	45.027	7.933	0.452	0.486
ME 4 con 2 % CTZ	169.900	69.100	5.222	16.400	0.000	0.000	0.576	0.483
	123.000	70.100	5.219	29.900	0.000	0.000	0.480	0.486
	143.100	76.600	6.187	23.400	0.000	0.000	0.498	0.485
Promedio	145.333	71.933	5.543	23.233	0.000	0.000	0.518	0.485

Tabla16. Tamaño de glóbulo promedio de las ME's con respecto al número.

NÚMERO			
Tamaño de glóbulo (nm)			
Sistema	Población	Porcentaje (%)	IP
ME 1 placebo	4.230	100 ± 0.7187	0.400
	4.141	100 ± 0.7006	0.378
	4.219	100 ± 0.7758	0.594
Promedio	4.197 ± 0.0485	100 ± 0.	0.457
ME 2 placebo	3.999	100 ± 0.7137	0.538
	4.413	100 ± 0.7291	0.412
	4.308	100 ± 0.7202	0.421
Promedio	4.240 ± 0.2152	100 ± 0.	0.457
ME 2 al 1 % CTZ	5.572	100 ± 0.9272	0.478
	4.644	100 ± 0.7190	0.502
	5.645	100 ± 0.9654	0.491
Promedio	5.287 ± 0.5580	100 ± 0.	0.490
ME 3 Placebo	4.771	100 ± 0.7786	0.658
	4.460	100 ± 0.8427	0.568
	5.339	100 ± 0.9406	0.655
Promedio	4.857 ± 0.4457	100 ± 0.	0.627
ME 4 placebo	2.916	100 ± 0.5644	0.480
	2.542	100 ± 0.4883	0.640
	2.081	100 ± 0.4133	0.489
Promedio	2.513 ± 0.4183	100 ± 0.	0.536
ME 4 al 1 % CTZ	4.051	100 ± 0.6421	0.414
	4.686	100 ± 0.9486	0.416
	4.244	100 ± 0.7425	0.525
Promedio	4.327 ± 0.3255	100 ± 0.	0.452
ME 4 al 2 % CTZ	4.680	100 ± 0.7799	0.576
	4.600	100 ± 0.8157	0.480
	5.250	100 ± 0.9953	0.498
Promedio	4.843 ± 0.3544	100 ± 0.	0.518

En cuanto a la determinación del tamaño de glóbulo en relación al número podemos observar en la tabla 16 que tanto la ME 2 y ME 4 con principio activo y sin principio activo los glóbulos en mayor cantidad presentes en la ME presentan un tamaño submicrónico y todos los glóbulos obtenidos son menores a 10 nm como se muestran en los gráficos del 7 al 13. También se puede apreciar que al aumentar la

cantidad de CTZ tanto en la ME 2 como en la ME 4 el tamaño de glóbulo se ve incrementado debido a la alteración de la interacción del T-CT con el aceite en la interfaz en presencia de las moléculas de CTZ. Estudios realizados por Borhade V. y colaboradores en el 2012 muestran resultados semejantes que al incrementar la cantidad de principio activo en la ME el glóbulo tiende a aumentar.

Además de que el CTZ es incorporado en los glóbulos de aceite en mayor cantidad ya que este es insoluble en el agua. Esta tendencia se puede apreciar claramente en el Gráfico 6.

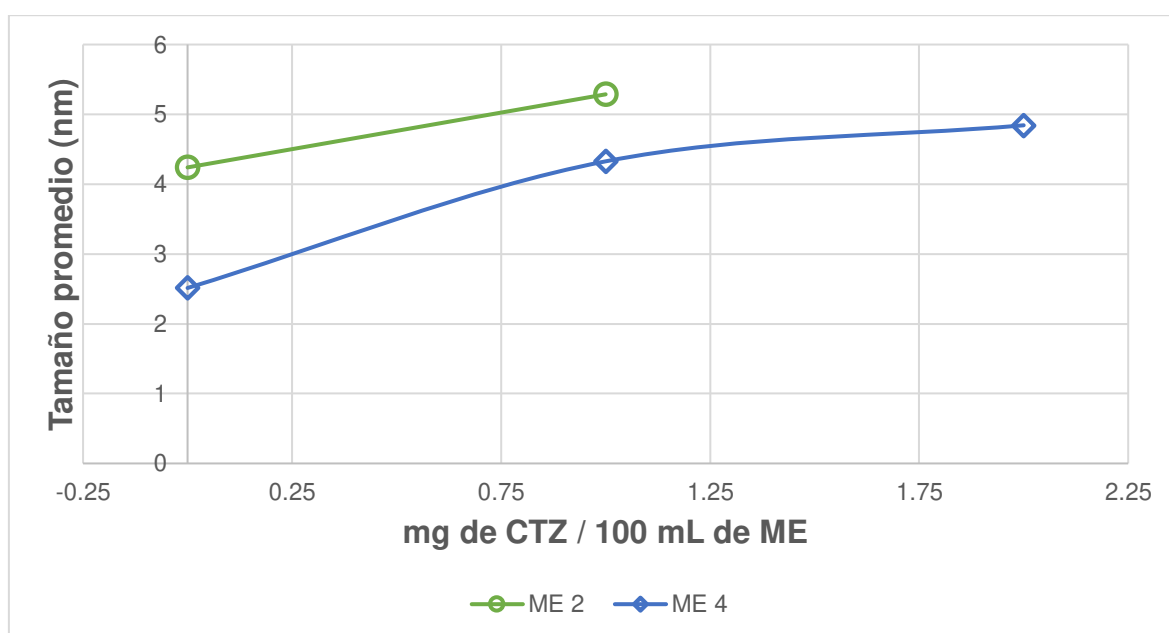


Gráfico 6. Comportamiento del tamaño de glóbulo en función de la cantidad de CTZ incorporada.

Con relación a la medición del tamaño de glóbulo con respecto a la intensidad, se puede observar en la tabla 15 que en la mayoría de las mediciones existe la presencia de tres poblaciones, esto se puede deber a la presencia de agregados de glóbulos de las ME's. Los glóbulos con mayor diámetro (>100 nm) corresponden a los agregados y los diámetros más pequeños están relacionados con los glóbulos independientes [Baroli B., *et al.*, 2000].

El índice de polidispersidad es un parámetro que nos indica qué tan homogénea es la dispersión, un alto índice de polidispersidad nos indica que hay glóbulos con tamaños diferentes.

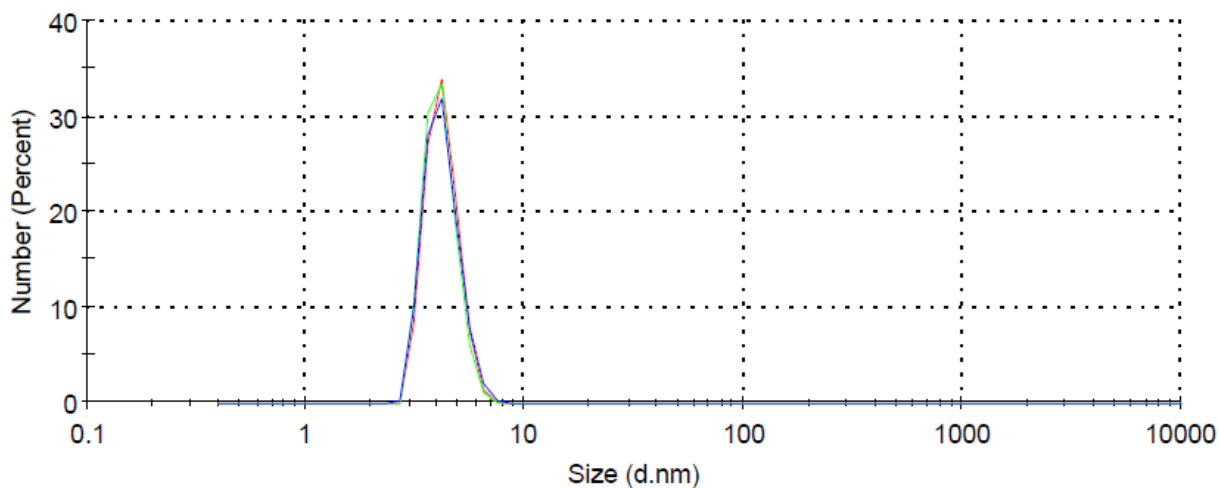


Gráfico 7. Distribución del tamaño de glóbulo por número ME 1.

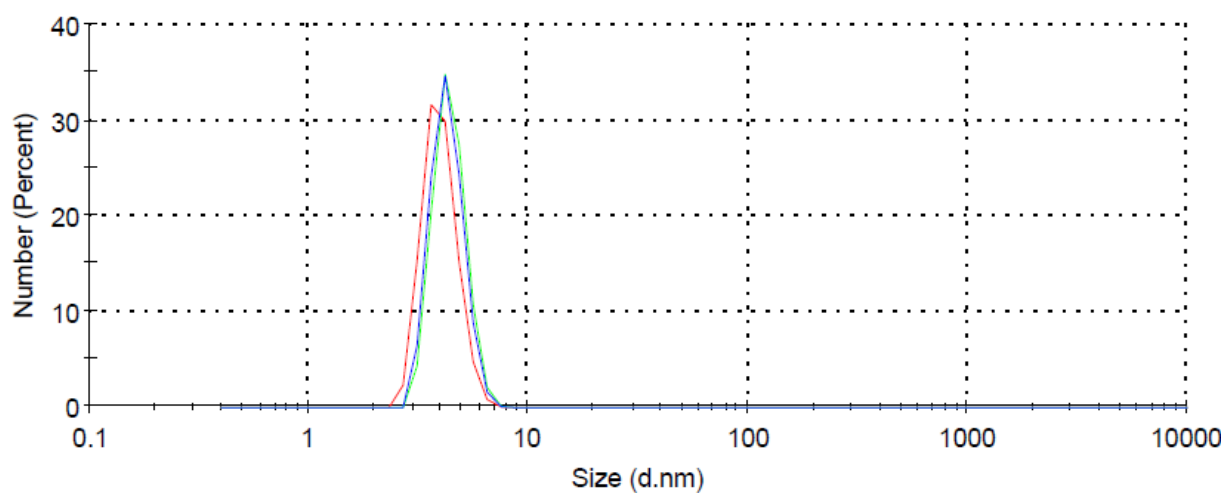
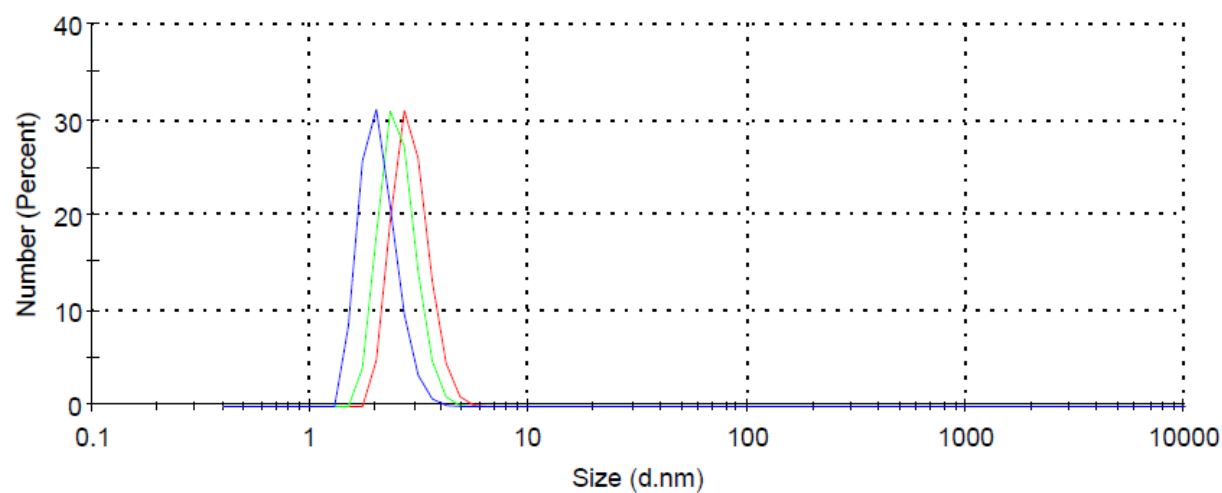
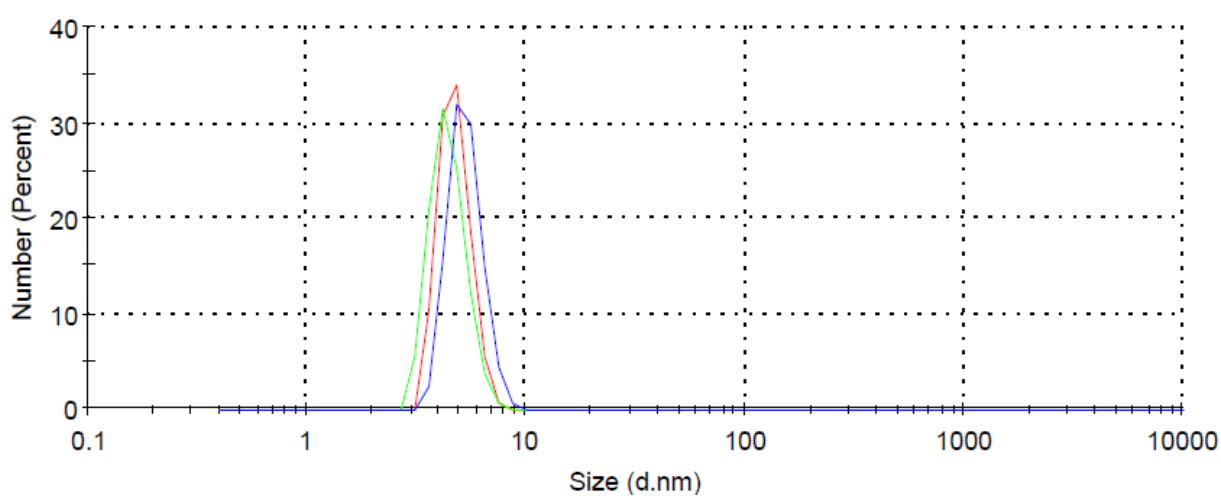
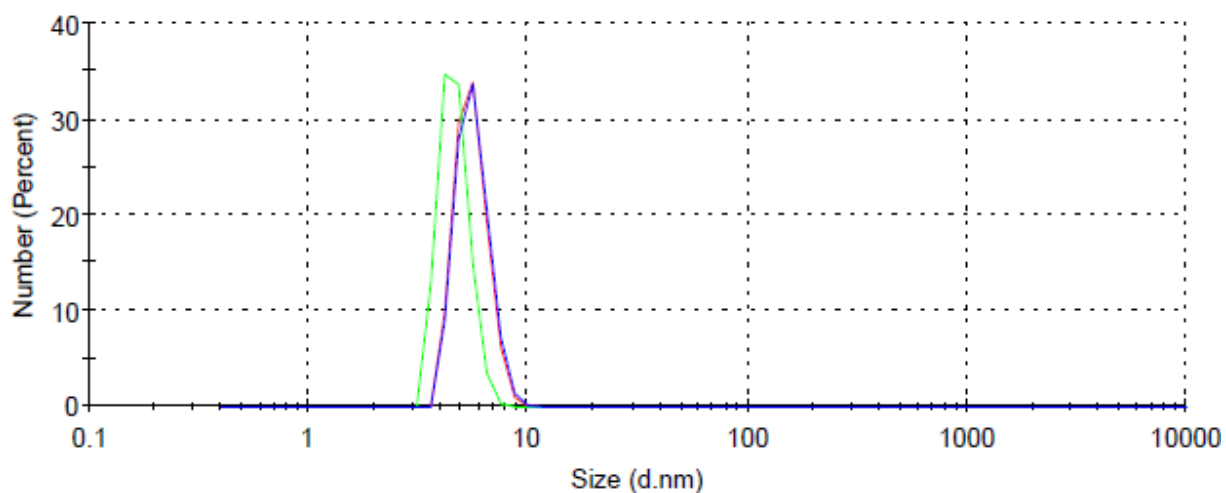


Gráfico 8. Distribución del tamaño de glóbulo por número ME 2.



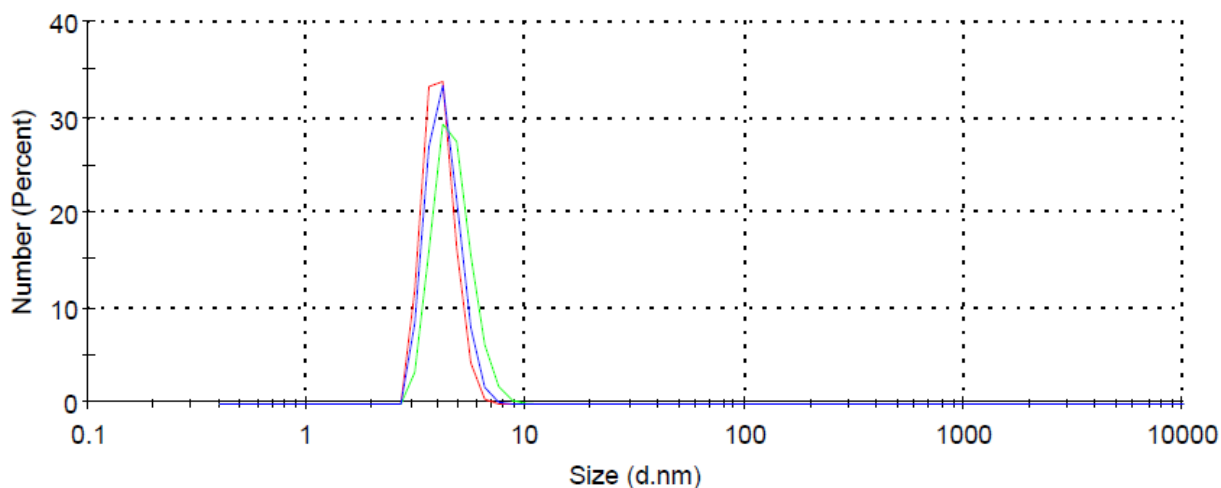


Gráfico 12. Distribución del tamaño de partícula por número ME 4 con 1 % de CTZ.

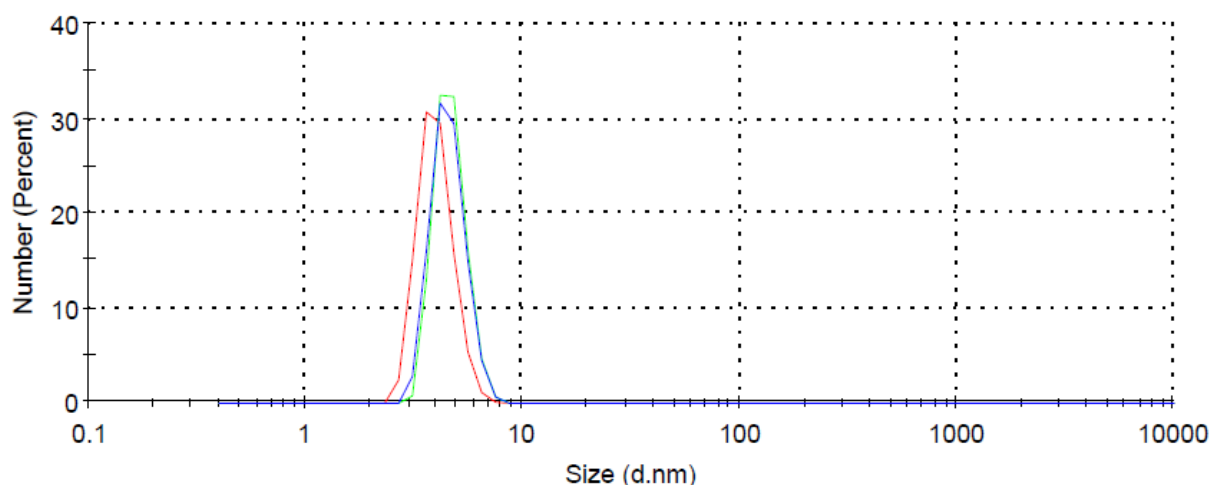


Gráfico 13. Distribución del tamaño de partícula por número ME 4 con 2 % de CTZ.

El potencial Z se midió mediante un ZETASIZER Nano series - ZS90, los resultados obtenidos se muestran en la tabla 17, observándose que los glóbulos de las ME's tienden a ser neutras cuando éstas no contienen el principio activo y cuando lo contienen la carga es negativa, ya que los grupos funcionales presentes en la molécula del CTZ le confieren la carga.

El potencial Z es un parámetro que permite predecir la estabilidad de una dispersión. Por lo tanto, la agregación de los glóbulos es menos probable que ocurra cuando los glóbulos se encuentren cargados (misma carga) siempre y cuando el potencial Z sea mayor a 30 mV [Eccleston G., 2002]. En el caso de las ME's obtenidas el

potencial Z es muy bajo y por consiguiente este parámetro no nos sirve para medir la estabilidad ya que los tensoactivos utilizados para preparar las ME's son de carácter no-iónicos, por ello, no hay cargas y la estabilidad va estar dada mediante un impedimento estérico. Aunque ese parámetro no nos predice la estabilidad de los sistemas nos da una idea de cómo está compuesto el sistema ya que la diferencia de potencial cuando estas se encuentra cargadas con CTZ y cuando no lo están es muy bajo lo cual nos indica que la mayoría del principio activo se encuentra dentro del glóbulo de la ME.

Tabla 17. Potencial Z y conductividad de la ME 2, ME 4, ME 2 con CTZ al 1 %, ME 4 con CTZ al 1 % y ME 4 con CTZ al 2 %.

Sistema	Potencial Z (mV)	Conductividad (μS/cm)
ME 2 placebo	0.3289	57.2
	0.2710	57.4
	0.2897	57.2
Promedio	0.2965	57.26
ME 2 al 1 % CTZ	-2.0008	55.5
	- 2.0876	56.0
	- 2.0900	55.9
Promedio	- 2.0594	55.80
ME4 placebo	0.4978	46.6
	0.4190	45.1
	0.5289	45.1
Promedio	0.4819	45.60
ME4 al 1 % CTZ	- 2.6780	41.7
	-2.4765	41.3
	- 2.5200	41.4
Promedio	- 2.5581	41.46
ME4 al 2 % CTZ	- 2.7895	42.7
	- 2.8650	42.5
	- 2.7630	42.4
Promedio	- 2.8058	42.53

La conductividad es la capacidad de una muestra de conducir corriente eléctrica. En cuanto a la conductividad podemos asegurar que las ME's formuladas a partir de miristato de isopropilo (fase oleosa), Tween® 80 (tensoactivo), etanol (co-tensoactivo) y agua (fase acuosa) en las proporciones elegidas (ME 2 y ME 4) corresponden a una ME aceite en agua (o / w) ya que el valor de la conductividad es mayor a 40 $\mu\text{S} / \text{cm}$, por lo tanto, hay paso de corriente eléctrica lo cual confirma que la fase continua de la ME es agua.

6.4. Prueba de estabilidad.

En los estudios de estabilidad física bajo condiciones de estrés, tanto en la centrífuga como en el ciclado térmico la mayoría de las ME's fueron estables ya que ninguna presentó turbidez ni separación de fases, la única ME que mostró un precipitado blanco correspondiente al principio activo fue la ME 1 cuando se le incorporó CTZ al 1 %, ya que en esta ME hay una mayor cantidad de fase acuosa en relación a las demás y por lo tanto la cantidad de principio activo que se solubiliza es menor ya que el CTZ es altamente lipófilico, pero sin principio activo la ME permanece estable, transparente y homogénea, como se muestra en la tabla 18.

Tabla 18. Estudios de estabilidad a 3000 rpm por 15 min y mediante ciclos térmicos de 24 horas a $40 \pm 2^\circ\text{C}$ y 24 horas a $4 \pm 2^\circ\text{C}$ durante cuatro semanas.

Sistema	3000 rpm / 15 min	Ciclos térmicos de 24h a $40 \pm 2^\circ\text{C}$ y 24 horas a $4 \pm 2^\circ\text{C}$ durante cuatro semanas.
ME 1	Homogénea	Homogénea
ME 1, CTZ 1 %	Precipitado blanco	Precipitado blanco
ME 2	Homogénea	Homogénea
ME 2, CTZ 1 %	Homogénea	Homogénea
ME 3	Homogénea	Homogénea
ME 3, CTZ 1 %	Homogénea	Homogénea
ME 4	Homogénea	Homogénea
ME 4, CTZ 1 %	Homogénea	Homogénea
ME 4, CTZ 2 %	Homogénea	Homogénea

Es importante mencionar que se utilizó como referencia la Guía ANVISA de Brasil ya que es una guía oficial que contiene pruebas de estrés específicas para emulsiones. En la normatividad mexicana no se reportan pruebas de centrifuga ni de ciclado térmico, únicamente se incluyen pruebas de estabilidad acelerada y a corto y mediano plazo controlando temperatura y humedad relativa, pero se requieren al menos 6 meses para tener los resultados de las pruebas bajo condiciones aceleradas (NOM-073-SSA1-2005).

6.5. Perfiles de liberación *in vitro*.

En cuanto al análisis de liberación *in vitro* del CTZ a partir de las ME's, se realizaron estudios empleando un sistema que consta de una membrana de difusión, en donde la ME es separada a través de una membrana de diálisis de la otra fase (FVS con Tween® 20 al 3 %) que se encuentra bajo condiciones "sink". El Tween® 20 al 3% se adiciono al medio de disolución (FVS pH = 4.2) para aumentar la solubilidad del CTZ ya que este es prácticamente insoluble en agua, se trabajó con Tween® 20 al 3 % ya que a esta concentración no interfiere en la detección espectrofotométrica del mismo. En el anexo 1 se muestran los espectros de absorción para el FVS con Tween® 20 al 3 %, en el cual se puede observar que a la longitud de onda de máxima absorción del CTZ (261 nm) no hay interferencia. Se escoge este agente solubilizante ya que estudios realizados por Borhade V., *et al.*, [2012] muestran que el Tween® 20 en comparación de otros agentes tensoactivos, es un buen agente solubilizante para el CTZ. Este tipo de estudios son de gran importancia para determinar el probable mecanismo de liberación del principio activo a partir del acarreador.

Es importante llevar a cabo los estudios de liberación bajo condiciones "sink" para asegurar que el medio de disolución no se va a saturar y por lo tanto la liberación no se va a detener porque el medio se satura, sino porque el principio activo ha alcanzado la liberación máxima. Para corroborar que se trabajó bajo condiciones "sink" se determinó la solubilidad del CTZ en el medio de disolución (FVS con Tween® 20 al 3 %) encontrándose que es de 0.36 mg / mL a un pH = 4.2.

En los gráficos 14 y 15 se incluyen los perfiles de liberación *in vitro* de las ME's hasta las 72 horas. El CTZ no alcanza su liberación total, alcanzando un máximo de liberación por debajo del 50 %, debido a la alta atracción entre el CTZ y la fase oleosa dada la elevada lipofilicidad del principio activo. En el gráfico 14 también se representa la difusión de una solución de CTZ (de una concentración de 0.36 mg / mL) que alcanza la difusión total alrededor de las 6 horas, debido a que el CTZ se encuentra libre y no está atrapado en los glóbulos como es en el caso de las ME's. Se puede decir que la membrana de diálisis no limita la liberación del fármaco a partir de las ME's. En el anexo 4 se incluyen los datos de las liberaciones, las cuales representan la cantidad de fármaco que es capaz de difundir hacia el medio de disolución.

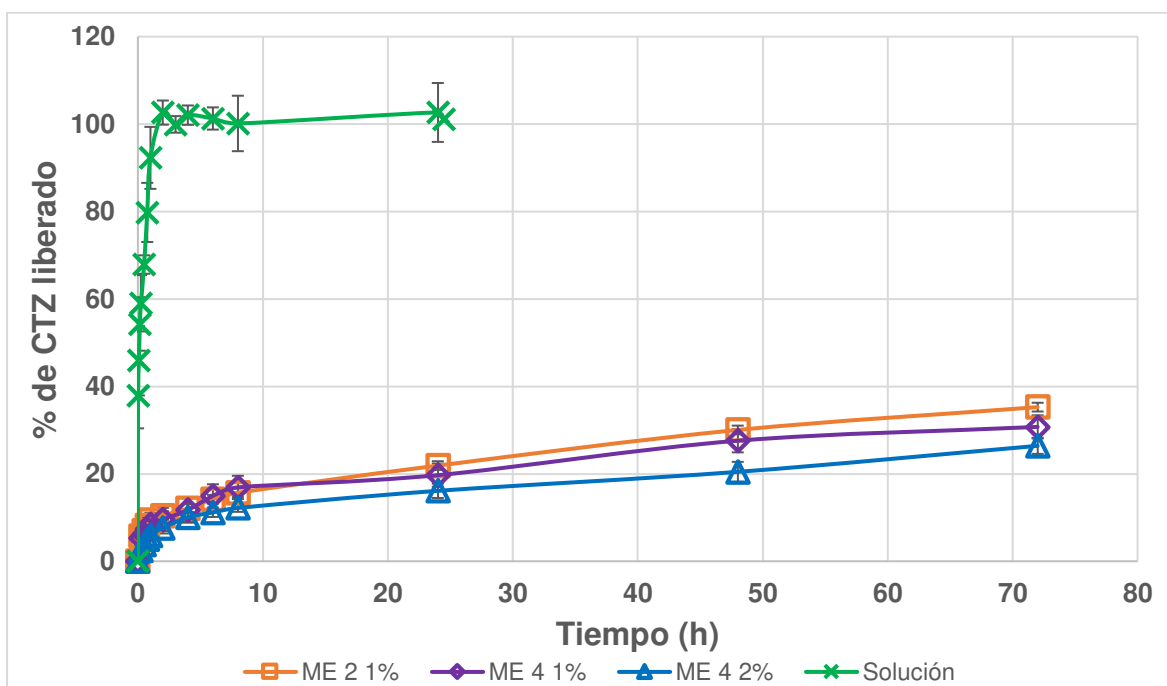


Gráfico 14. Perfiles de liberación para la ME 2 con 1 % de CTZ, ME 4 con 1 % de CTZ, ME 4 con 2 % de CTZ y una solución de CTZ utilizando como medio de disolución FVS con Tween® 20 al 3 %.

Teóricamente, se esperaría que la liberación del principio activo fuera más lenta para la ME que contienen una menor cantidad de fármaco. Sin embargo, en el gráfico 14 se puede observar que las liberaciones obtenidas no presentaron este

comportamiento, ya que tanto la ME 2 como la ME 4, ambas al 1 % con CTZ, tienen una mayor liberación en comparación con la ME 4 que contiene el doble de principio activo. Esto es atribuido a que la ME 4 contiene el doble de fase oleosa que la ME 2 y, por lo tanto, se va a presentar una mayor interacción entre la fase oleosa y el principio activo que es altamente lipofílico. Este comportamiento también es reportado en los estudios realizados por Hashem F., *et al.*, [2011] en donde evalúan formulaciones de ME para aplicación vaginal con CTZ con diferentes fases oleosas en diferentes proporciones, mostrando que la ME que contiene mayor fase oleosa es la que presenta una menor liberación en comparación con la que tiene una menor proporción de fase oleosa debido a la alta interacción entre el principio activo y la fase oleosa por la alta lipofilidad del CTZ.

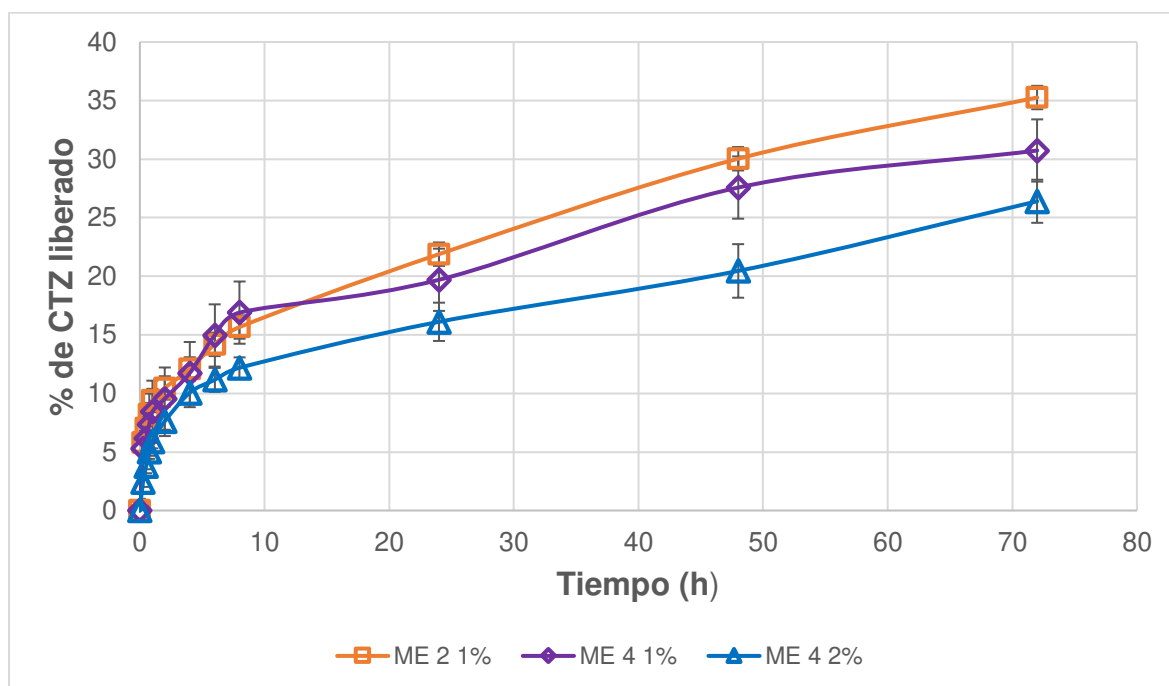


Gráfico 15. Perfiles de liberación para la ME 2 con 1 % de CTZ, ME 4 con 1 % de CTZ, ME 4 con 2 % de CTZ en FVS con Tween® 20 al 3 %.

Para determinar si existen diferencias estadísticamente significativas entre la velocidad de liberación del CTZ en la ME 2 al 1 % y la ME 4 al 2 % se aplicó un análisis de varianza simple (tabla 19). Se trabajó con los porcentajes obtenidos de los perfiles de liberación a un tiempo de 72 horas.

Tabla 19. ANOVA simple para los perfiles de liberación *in vitro* del CTZ, tomando los porcentajes liberados a las 72 horas.

Fuente	Suma de Cuadrados	GI	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	235.318	1	235.318	81.89	0.0000
Intra grupos	28.736	10	2.873		
Total (Corregido)	264.054	11			

De acuerdo con el análisis de varianza, existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media del porcentaje liberado de CTZ a las 72 h entre la ME que contiene 5 % de fase oleosa y la ME que contiene 10 %, con un nivel de confianza de 95.0 % dado que el valor-P es menor a 0.05. Para determinar el probable mecanismo de liberación del CTZ a partir de las ME's, los datos obtenidos se trataron de acuerdo al modelo semi-empírico propuesto por Rigter y Peppas. De acuerdo a este modelo, se graficó $\ln (M_t / M_\infty)$ en función de $\ln t$; donde M_t es la cantidad liberada el tiempo t y M_∞ es la cantidad máxima liberada [Lowman M. y Peppas. N A. 1999 y Peppas N A., et al. 2000].

De manera general, la ecuación de Peppas describe la liberación de principios activos desde matrices con diferentes formas geométricas. De acuerdo con este modelo, la fracción liberada de una sustancia depende de una constante y de su exponente difusional “n” que indica el probable mecanismo físico de transporte y el tipo de liberación (ver tabla 20). Por ejemplo, si $n = 0.5$ el mecanismo de transporte es difusión fickiana y el tipo de liberación es dependiente del tiempo.

Tabla 20. Mecanismos de transporte y tipo de liberación de acuerdo al valor de “n” en el modelo semi-empírico de Peppas.

Valor de “n”	Mecanismo de Transporte	Tipo de liberación
0.5	Difusión Fickiana Únicamente para sistemas planos	Dependiente del tiempo $f(t^{1/2})$
$0.5 < n < 1$	Trasporte No Fickiano (Anómalo)	Dependiente del tiempo $f(t^{n-1})$
1	Trasporte Caso II	Independiente del tiempo (orden cero)
$n > 1$	Trasporte Súper Caso II	Dependiente del tiempo $f(t^{n-1})$

En los gráficos 16, 17 y 18 se reportan los datos obtenidos de acuerdo con el modelo de Peppas, en las tablas 21, 22 y 23 se muestran los valores de “n” para los diferentes sistemas evaluados. Los gráficos se obtuvieron a partir de los datos incluidos en el anexo 5.

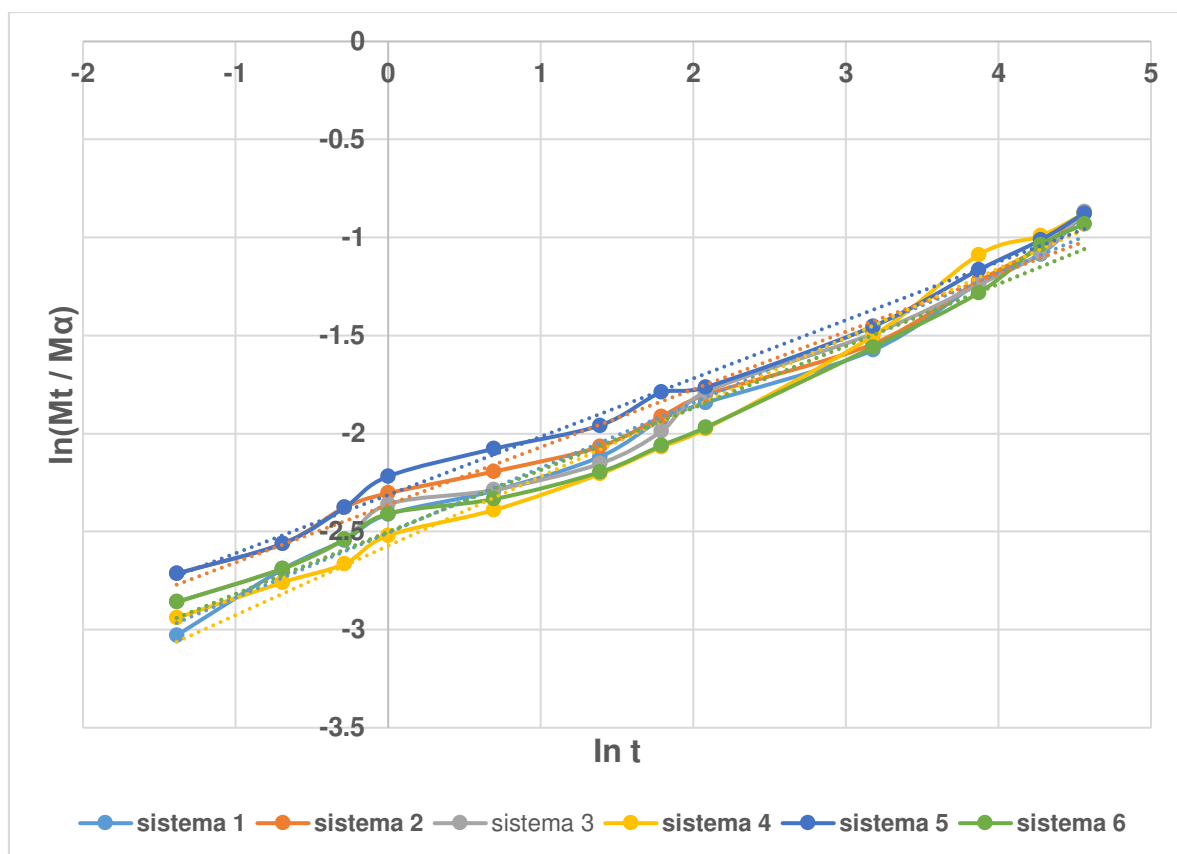


Gráfico 16. Modelo de Peppas aplicado a la liberación de la ME 2 con 1 % de CTZ en una solución de FVS con Tween® 20 al 3 % (sextuplicado).

Tabla 21. Coeficientes de determinación y valor de “n” de acuerdo al modelo de Peppas para la ME 2 con CTZ al 1 %.

Sistema	n	r ²	b
1	0.3313	0.9893	-2.5062
2	0.2941	0.9823	-2.3629
3	0.3213	0.9866	-2.4669
4	0.3535	0.9818	-2.5722
5	0.2972	0.9913	-2.3130
6	0.3162	0.9775	-2.5019
Promedio	0.3189	0.9848	-2.4538

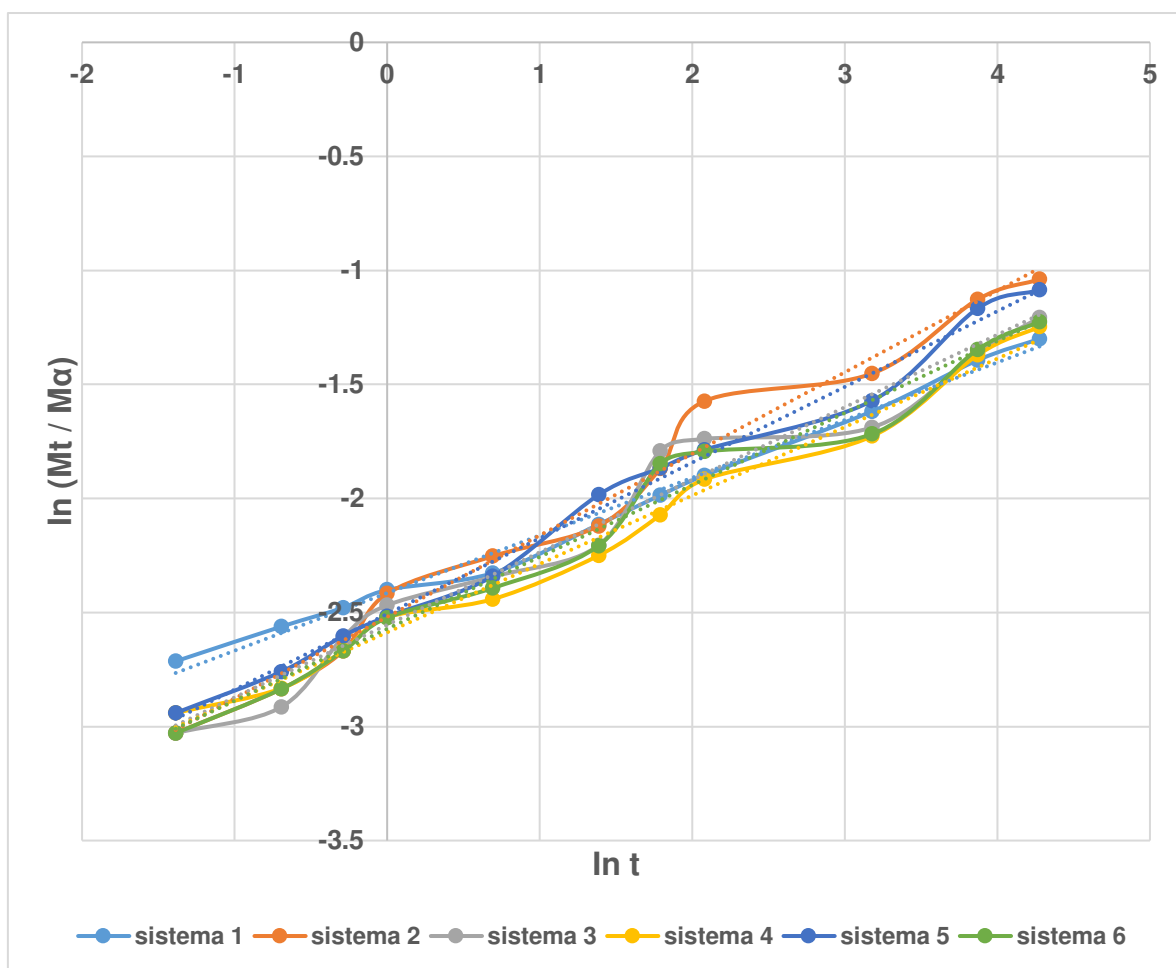


Gráfico 17. Modelo de Peppas aplicado a la liberación de la ME 4 con 1 % de CTZ en una solución de FVS con Tween® 20 al 3 % (sextuplicado).

Tabla 22. Coeficientes de determinación y valor de “n” de acuerdo al modelo de Peppas para la ME 4 con CTZ al 1 %.

Sistema	n	r ²	b
1	0.2528	0.9872	-2.4147
2	0.3576	0.9643	-2.5194
3	0.3181	0.9663	-2.5542
4	0.3001	0.9884	-2.5872
5	0.3319	0.9925	-2.5064
6	0.3155	0.9796	-2.5719
Promedio	0.3127	0.9797	-2.5256

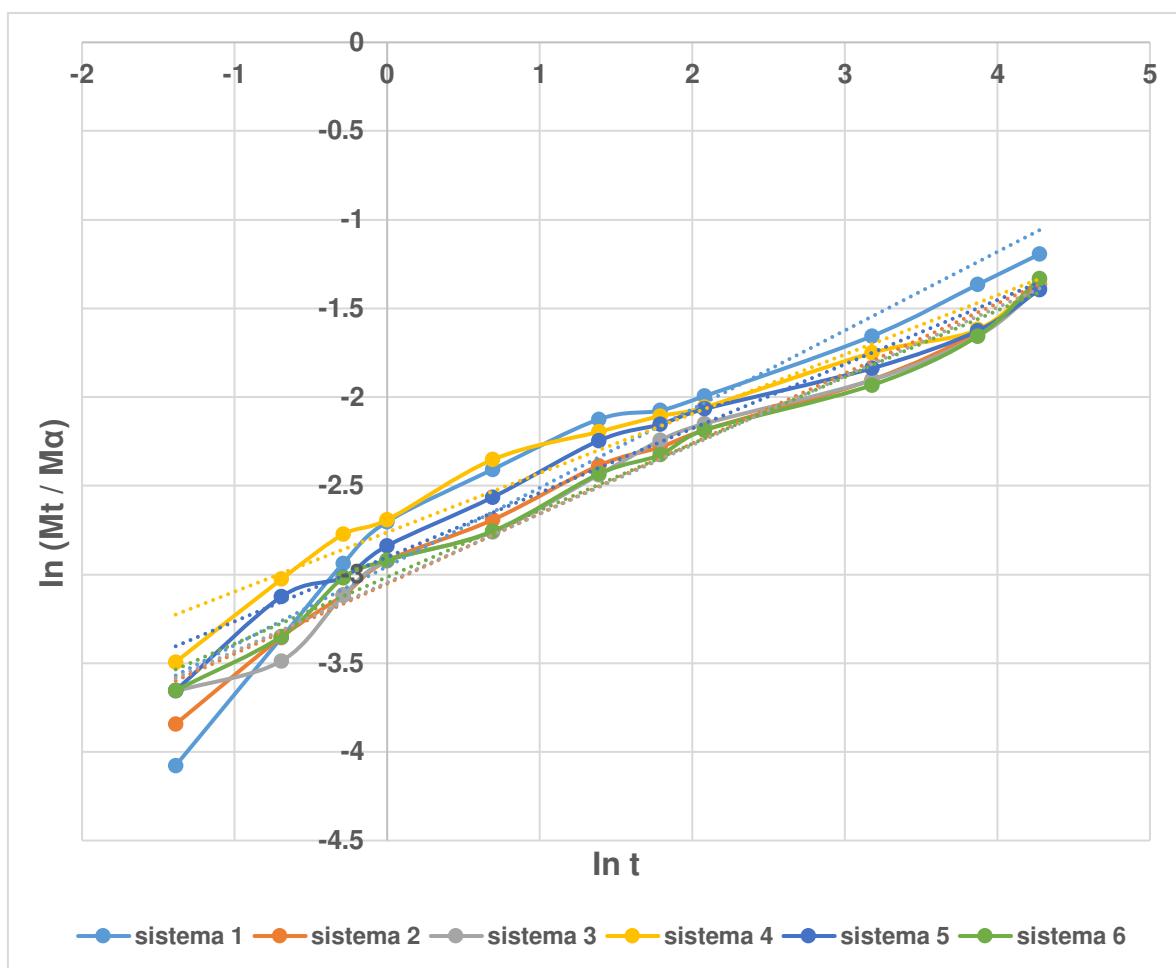


Gráfico 18. Modelo de Peppas aplicado a la liberación de la ME 4 con 2 % de CTZ en una solución de FVS con Tween® 20 al 3 % (sextuplicado).

Tabla 23. Coeficientes de determinación y valor de “n” de acuerdo al modelo de Peppas para la ME 4 con CTZ al 2 %.

Sistema	n	r ²	b
1	0.3874	0.9667	-2.8128
2	0.3949	0.9772	-3.0517
3	0.3878	0.9821	-3.0457
4	0.3878	0.9821	-3.0457
5	0.3342	0.9622	-2.7626
6	0.3625	0.9709	-2.9022
Promedio	0.3758	0.9735	-2.9368

Los valores obtenidos del coeficiente difusional “n” para las liberaciones de las ME’s (ME 2 con 1 % de CTZ, ME 4 con 1 % de CTZ y la ME 4 con 2 % de CTZ) son menores a 0.5 (tabla 21, 22 y 23). El menor valor propuesto por Peppas para “n” es de 0.5, lo cual nos indica que el mecanismo de transporte es por difusión fickiana y el tipo de liberación es dependiente del tiempo.

Los datos obtenidos a partir de las liberaciones fueron tratados de acuerdo al modelo propuesto por Higuchi, el cual estudia la liberación de fármacos a partir de sistemas matriciales. Este modelo asume que al estar en contacto la matriz con el medio de disolución, éste es capaz de penetrar formando una capa de hidratación y cuando sólo una cara de la matriz está expuesta al medio de disolución, el grosor de la capa de hidratación aumenta de manera unidireccional. Sin embargo, la hidratación relativa disminuye al incrementar la profundidad de la penetración del fármaco contenido en la matriz y la liberación obedece el modelo de la raíz cuadrada del tiempo. Aunque originalmente este modelo fue aplicado solo a sistemas matriciales actualmente se ha expandido su uso a otro tipo de sistemas [Washington C., 1990].

En los gráficos 19, 20 y 21 se reportan los datos obtenidos de acuerdo al modelo de Higuchi en las tablas 24, 25 y 26 se muestran los valores obtenidos de la constante de Higuchi (K_H) para las ME’s y los coeficientes de determinación. Los gráficos se obtuvieron a partir de los datos incluidos en el anexo 5.

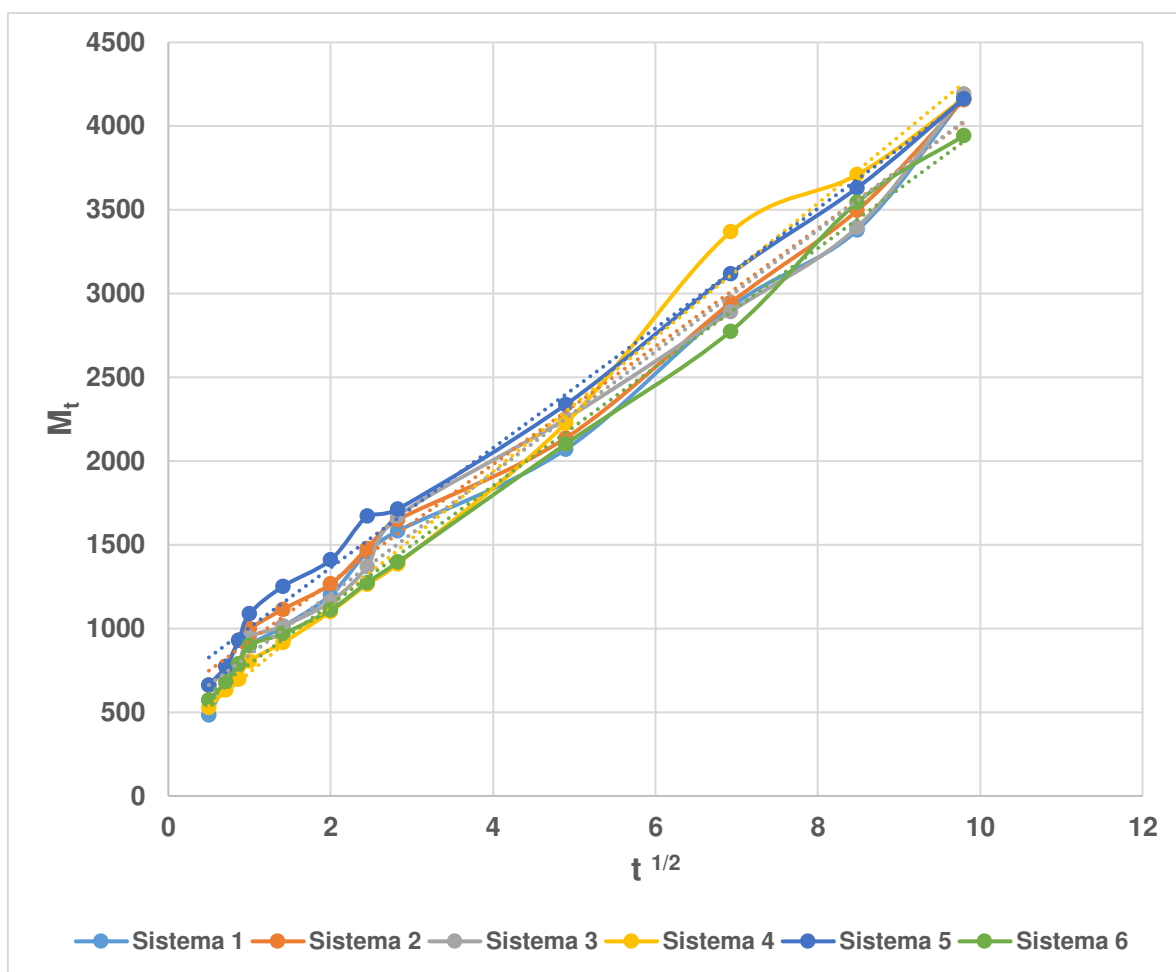


Gráfico 19. Modelo de Higuchi aplicado a la liberación de la ME 2 con 1 % de CTZ en una solución de FVS con Tween® 20 al 3 % (sextuplicado).

Tabla 24. Coeficientes de determinación y valor de k_H de acuerdo al modelo de Higuchi para la ME 2 al 1 % con CTZ.

Sistema	k_H	r^2
1	361.3200	0.9913
2	351.3200	0.9944
3	362.0800	0.9927
4	400.2200	0.9948
5	357.3600	0.9937
6	354.500	0.9966
Promedio	364.46666	0.9939

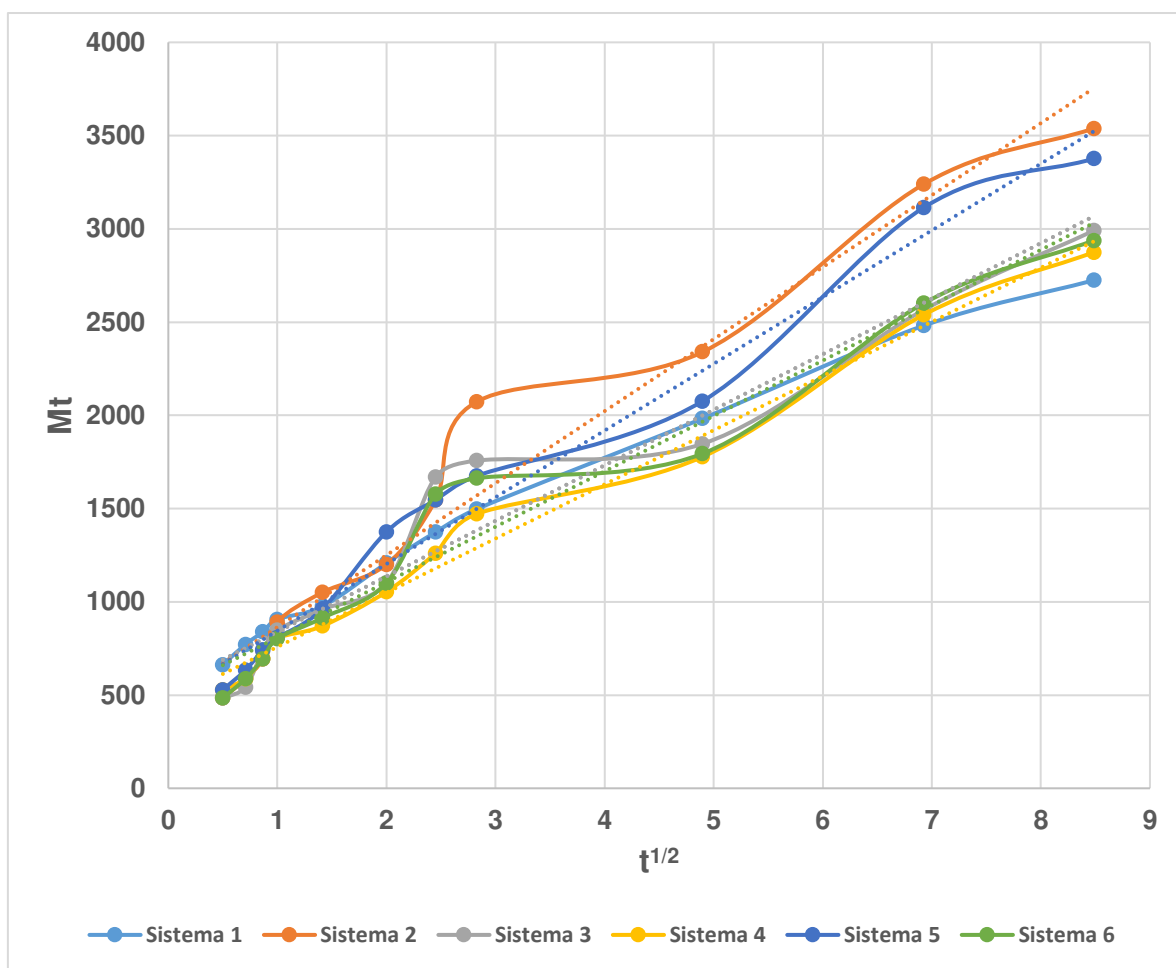


Gráfico 20. Modelo de Higuchi aplicado a la liberación de la ME 4 con 1 % de CTZ en una solución de FVS con Tween® 20 al 3 % (sextuplicado).

Tabla 25. Coeficientes de determinación y valor de k_H de acuerdo al modelo de Higuchi para la ME 4 al 1 % con CTZ.

Sistema	k_H	r^2
1	259.8000	0.9872
2	386.0800	0.9643
3	297.7800	0.9390
4	240.9800	0.9877
5	357.7800	0.9790
6	297.0200	0.9957
Promedio	306.5733	0.9755

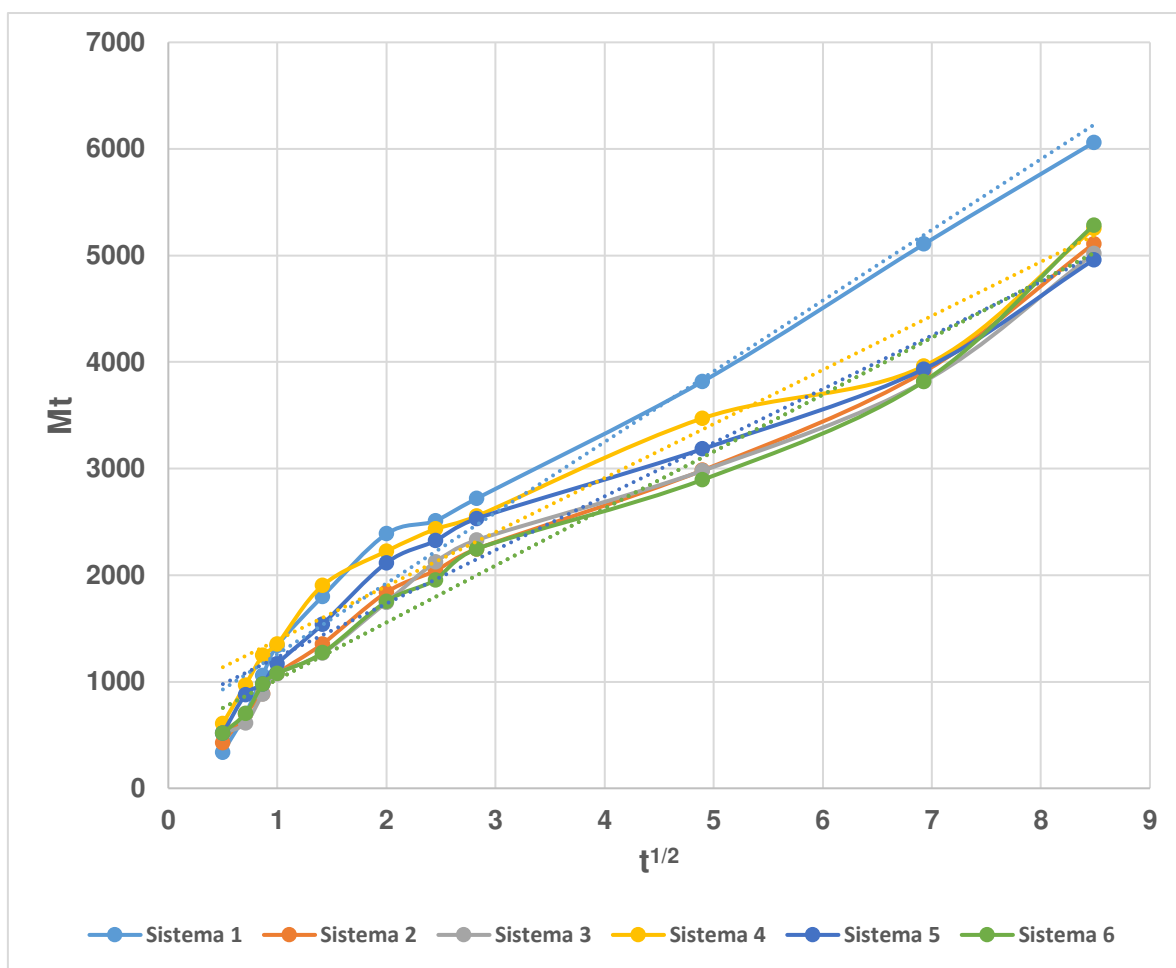


Gráfico 21. Modelo de Higuchi aplicado a la liberación de la ME 4 con 2 % de CTZ en una solución de FVS con Tween® 20 al 3 % (sextuplicado).

Tabla 26. Coeficientes de determinación y valor de k_H de acuerdo al modelo de Higuchi para la ME 4 al 2 % con CTZ.

Sistema	k_H	r^2
1	663.4800	0.9707
2	530.9700	0.9783
3	520.9300	0.9743
4	507.2100	0.9535
5	503.2500	0.9585
6	534.4000	0.9782
Promedio	543.3733	0.9689

Los valores de los coeficientes de determinación obtenidos después del análisis de regresión lineal por el modelo propuesto por Higuchi son superiores a 0.96 tanto para la ME 2 con 1 % de CTZ, ME 4 con 1 % de CTZ y la ME 4 con 2 % de CTZ, indicando que este modelo permite describir la liberación del CTZ a partir de las ME obtenidas.

Las ME's preparadas son sistemas dispersos en donde el principio activo (CTZ) se encuentra disperso homogéneamente dentro de la fase continua en forma de glóbulos de manera que el fármaco que sale primero es el que se encuentra localizado en la parte más superficial de la fase continua y posteriormente el que se encuentra en la región más interna mediante un gradiente de concentración, por lo tanto, el fármaco que se encuentra en la región más interna va a tardar más en difundir. Hashem M. y colaboradores en el 2011 realizaron cuatro ME's usando el mismo tensoactivo y co-tensoactivo, pero diferente fase oleosa, tres de estos sistemas se ajustan a la cinética de orden cero y uno de ellos a Higuchi, por lo tanto, la velocidad de liberación de cada una de las ME's van a depender de los componentes de la formulación.

También es importante mencionar que los datos obtenidos a partir de los perfiles de liberación *in vitro* se analizaron usando otros modelos matemáticos aparte del modelo de Higuchi y el de Korsmeyer-Peppas antes mencionados, se evaluaron: orden cero, primer orden, y Hixon-Crowell, no encontrándose una correlación con estos modelos para las ME's formuladas sin en cambio en la solución de CTZ el fármaco se encuentra libre y solo difunde a través de la membrana ajustándose al modelo matemático de orden cero como se muestra en la tabla 27, estos datos se obtuvieron a partir del anexo 5.

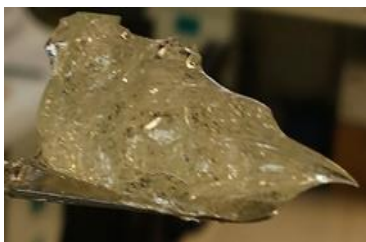
Tabla 27. Constantes de liberación y coeficientes de correlación de las ecuaciones de los modelos matemáticos adicionales aplicados a la ME 2 con 1% de CTZ, ME 4 con 1% de CTZ y a la ME 4 con 2% de CTZ.

	Orden cero		Primer orden		Hixon-Crowell	
	k_0	r^2	k_1	r^2	k_{HC}	r^2
ME 2 con 1% de CTZ	39.407	0.934	0.022	0.776	0.087	0.840
ME 4 con 1% de CTZ	33.912	0.873	0.021	0.698	0.080	0.764
ME 4 con 2% de CTZ	58.862	0.884	0.024	0.614	0.105	0.722
Solución de CTZ	176.768	0.965	0.670	0.913	1.626	0.935

6.6. Preparación y caracterización de las ME's bioadhesivas

A partir de la ME 2 se prepararon seis sistemas con diferentes concentraciones (0.5, 1, 1.5, 2, 2.5 y 3 % p / v) de Carbopol® 974P NF. Estas formulaciones se prepararon agregando el agente bioadhesivo directamente a la ME 2. Todas las ME's formuladas fueron estables, translúcidas, de una sola fase y de coloración ligeramente amarilla como se muestra en la tabla 28. La viscosidad de la ME 2 con 2.5 y 3 % Carbopol® 974P NF no fue posible medirla con el equipo disponible en el laboratorio (10 – 600000 cP).

Tabla 28. Valores de viscosidad de las ME's y apariencia física.

Sistema	Apariencia física	Viscosidad (cP)
ME 2 con 0.5 % Carbopol® 974P NF		6431.5
ME 2 con 1 % Carbopol® 974P NF		224120
ME 2 con 1.5 % Carbopol® 974P NF		272525
ME 2 con 2 % Carbopol® 974P NF		320599
ME 2 con 2.5 % Carbopol® 974P NF		-
ME 2 con 3 % Carbopol® 974P NF		-

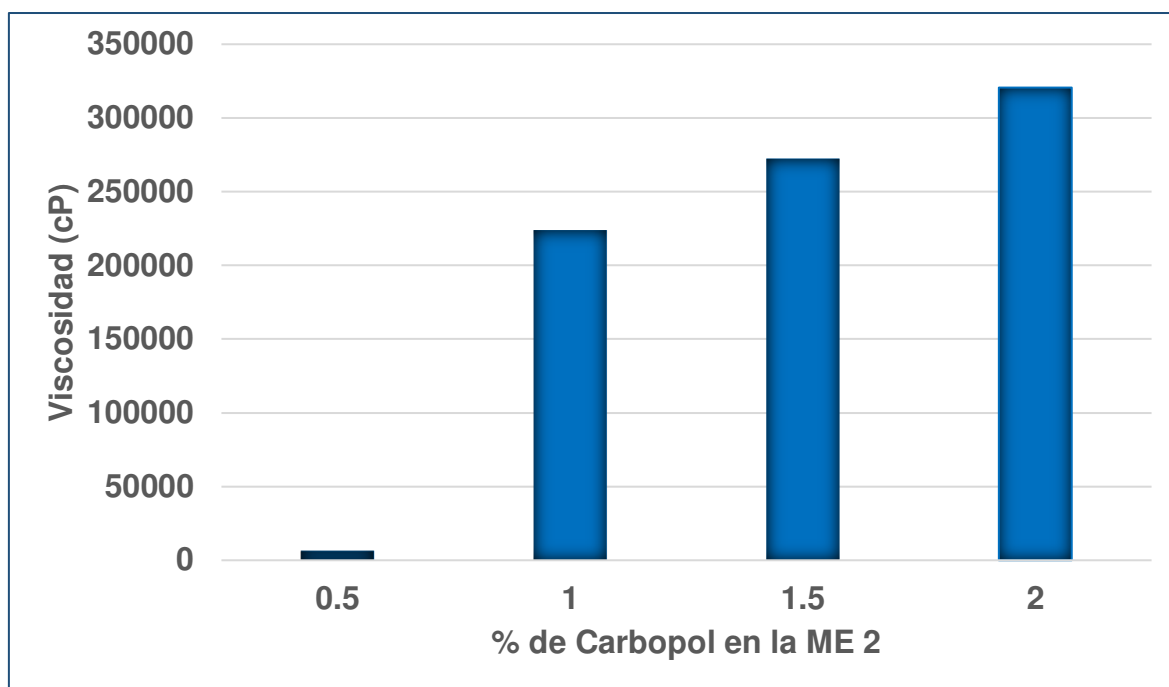


Gráfico 22. Viscosidad de las ME's bioadhesivas.

En cuanto a la viscosidad se puede observar en el gráfico 22, que al ir aumentando la concentración de agente bioadhesivo aumenta la viscosidad de la ME, esto es debido a que el polímero es hidratado en diferentes grados. El alto contenido de agua de un hidrogel es una característica fisicoquímica que los hace únicos, los geles tienen más propiedades físicas parecidas a los tejidos vivos que cualquier otra clase de biomateriales sintéticos (alto contenido de agua y consistencia blanda) [Mehrddad, H., Amir, A., y Pedram, R., 2008].

Se eligió el Carbopol® 974P NF como agente bioadhesivo ya que es un polímero altamente reticulado que produce geles muy viscosos y además existen reportes donde se ha usado en sistemas vaginales.

La capacidad bioadhesiva fue determinada mediante la medición de la máxima fuerza requerida para separar la formulación del tejido biológico mediante un analizador de textura (CT3 Texture Analyzer, Brookfield) como se muestra en la figura 16. En el gráfico 23 se puede observar que al aumentar la cantidad de agente bioadhesivo la fuerza de adhesión aumenta hasta llegar al 2 % y al ir aumentando

la concentración de este, la fuerza de bioadhesión disminuye, esto es debido, a que a mayor concentración de agente bioadhesivo aumenta la viscosidad y la moléculas tienden a enrollarse, reduciendo la flexibilidad y por lo tanto disminuyendo la posibilidad de interpenetración y la formación de enredos entre las cadenas del polímero y las cadenas de mucina [Edsman K. y Hägerström H., 2005]. En consecuencia, la ME bioadhesiva con 2.5 y 3 % Carbopol® 974P NF no se extiende con facilidad sobre la superficie del tejido vaginal, además de que este presenta una superficie irregular y por ello hay una mayor variación entre las mediciones.

También se determinó la capacidad bioadhesiva de una formulación comercial (Epaq™) que contiene Carbopol® 934P y que además es de aplicación vaginal. Esta determinación se realizó con el fin de hacer una comparación entre la capacidad bioadhesiva de las ME bioadhesivas y la del gel comercial.

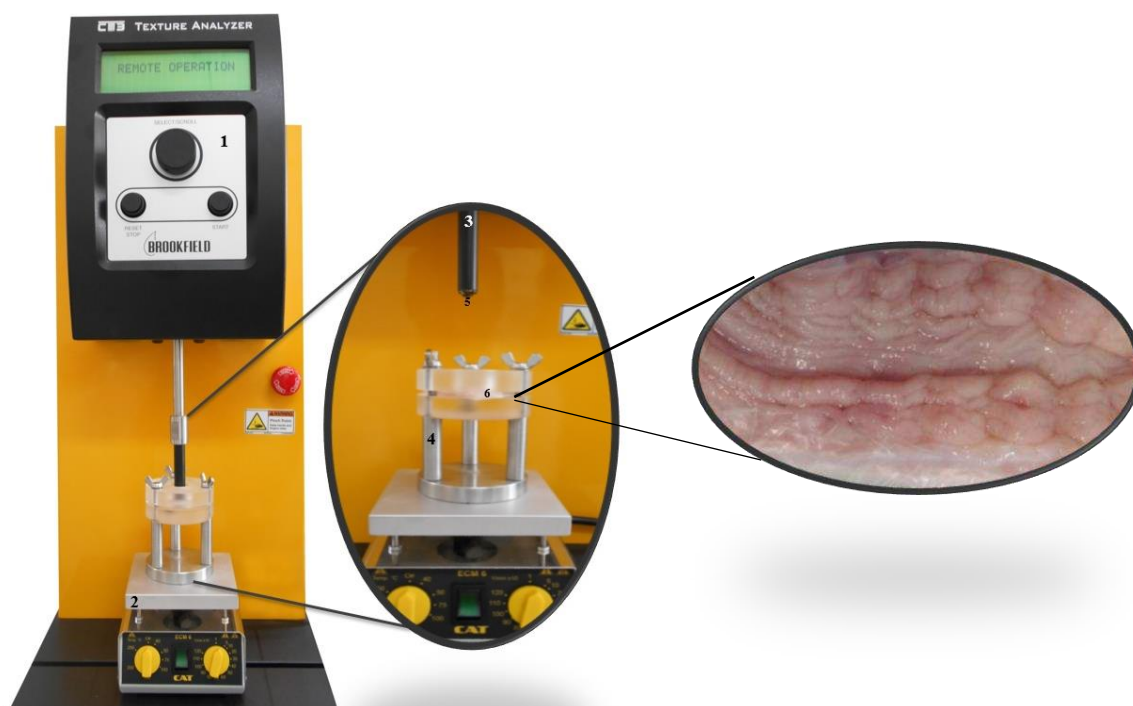


Figura 16. Analizador de textura CT3 acoplado al módulo de bioadhesión. 1. CT3 Texture Analyzer, Brookfield; 2. Parrilla con agitación magnética; 3. Punzón; 4. Módulo de bioadhesión y 5. Tejido vaginal

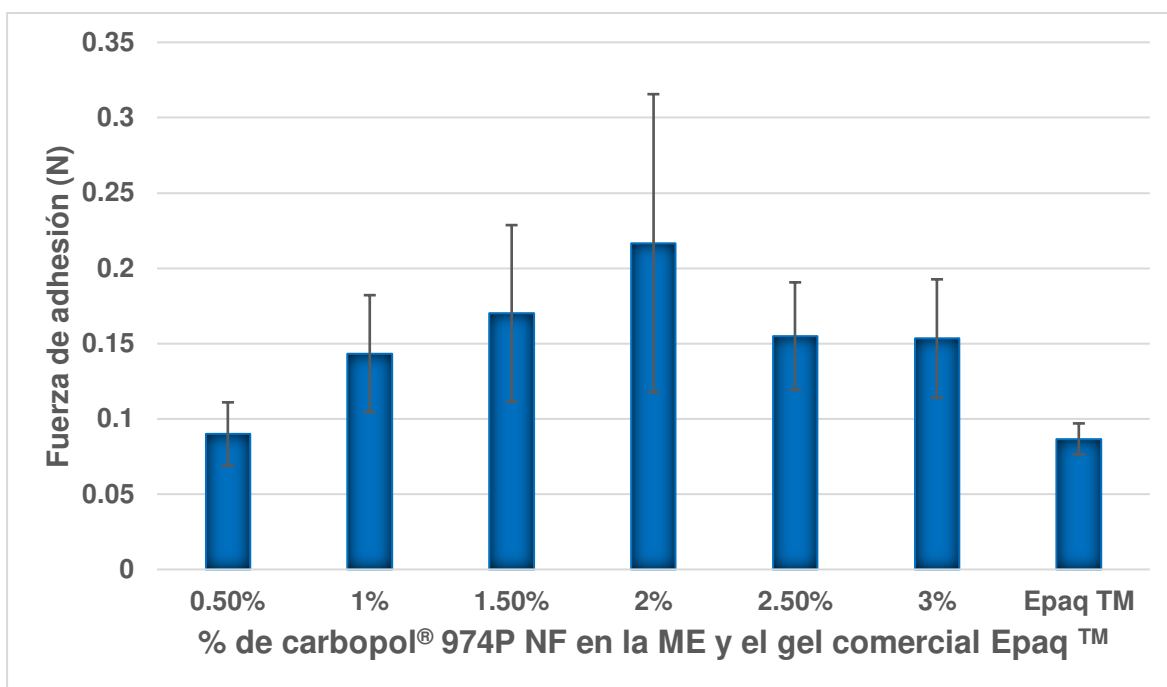


Gráfico 23. Fuerza de adhesión de las ME's bioadhesivas y el gel comercial Epaq™.

Los resultados de la fuerza de adhesión de todos los sistemas fueron comparados utilizando una prueba de ANOVA simple (tabla 29) para determinar si existe diferencias estadísticamente significativas entre los sistemas, encontrándose que si existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media de la fuerza de adhesión entre los diferentes niveles de concentración de Carbopol® 974P NF y la formulación comercial Epaq™, ya que el valor P es menor a 0.05 con un nivel de confianza del 95.0 %.

Tabla 29. Prueba de ANOVA simple para fuerza de adhesión por concentración de Carbopol® 974P y la formulación comercial.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	0.0741667	6	0.0123611	4.78	0.0012
Intra grupos	0.0904833	35	0.00258524		
Total (Corregido)	0.16465	41			

Para definir entre que muestras existe una diferencia significativa se realizaron las pruebas de rangos múltiples, mostrando una diferencia significativa entre las formulaciones 0.5 - 1.5, 0.5 – 2, 0.5 – 2.5, 0.5 - 3 y 1 – 2. En relación a la formulación

comercial con respecto a las formulaciones de ME bioadhesivas, todas las formulaciones mostraron una diferencia significativa, menos la ME 2 con 0.5 % de Carbopol® 974P con un nivel de confianza del 95.0 % como se muestra en la tabla 30 y 31.

Tabla 30. Prueba de Rangos Múltiples para fuerza de adhesión por concentración de Carbopol® 974P, 95 % LSD.

% Carbopol® en la ME 2 y el gel comercial	Casos	Media	Grupos Homogéneos
Epaq™	6	0.0866667	X
0.5	6	0.09	X
1	6	0.143333	XX
3	6	0.153333	X
2.5	6	0.155	X
1.5	6	0.17	XX
2	6	0.216667	X

Tabla 31. Contrastes para fuerza de adhesión por concentración de Carbopol® 974P.

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
0.5 – 1		-0.0533333	0.059595
0.5 - 1.5	*	-0.08	0.059595
0.5 – 2	*	-0.126667	0.059595
0.5 - 2.5	*	-0.065	0.059595
0.5 – 3	*	-0.0633333	0.059595
0.5 – Epaq™		0.00333333	0.059595
1 - 1.5		-0.0266667	0.059595
1 – 2	*	-0.0733333	0.059595
1 - 2.5		-0.0116667	0.059595
1 – 3		-0.01	0.059595
1 – Epaq™		0.0566667	0.059595
1.5 – 2		-0.0466667	0.059595
1.5 - 2.5		0.015	0.059595
1.5 – 3		0.0166667	0.059595
1.5 – Epaq™	*	0.0833333	0.059595
2 - 2.5	*	0.0616667	0.059595
2 – 3	*	0.0633333	0.059595
2 – Epaq™	*	0.13	0.059595
2.5 – 3		0.00166667	0.059595
2.5 – Epaq™	*	0.0683333	0.059595
3 – Epaq™	*	0.0666667	0.059595

* indica una diferencia significativa.

De acuerdo al análisis estadístico, se seleccionó la ME 2 con 1.5 % de Carbopol® 974P NF, ya que hay una diferencia significativa entre 0.5 y 1.5. A pesar de que entre la formulación 0.5 y 2 también existe una diferencia significativa entre la fuerza de adhesión, se escogió como óptima la formulación con 1.5 %, ya que a mayor concentración de agente bioadhesivo hay una mayor viscosidad y al tener una viscosidad alta, la ME bioadhesiva en el tejido no se extiende sobre la superficie vaginal, además de que el coeficiente de variación es menor para la ME 2 con 1.5 % de Carbopol® 974P NF como se muestra en la tabla 32 y gráfico 24. Por otra parte, la ME 2 con 1.5 % de Carbopol® 974P NF presenta una mejor bioadhesión entre el tejido vaginal y la formulación en comparación con la formulación comercial (Epaq™)

Tabla 32. Resumen estadístico para la fuerza de adhesión.

Concentración (%) de Carbopol® y gel comercial	Recuento	Promedio	Desviación Estándar	Coefficiente de Variación
0.5	6	0.09	0.0209762	23.3069 %
1	6	0.143333	0.0388158	27.0808 %
1.5	6	0.17	0.0586515	34.5009 %
2	6	0.216667	0.0989276	45.6589 %
2.5	6	0.155	0.0356371	22.9917 %
3	6	0.153333	0.0393277	25.6485 %
Epaq™	6	0.0866667	0.010328	11.9169 %
Total	42	0.145	0.0633708	43.7040 %

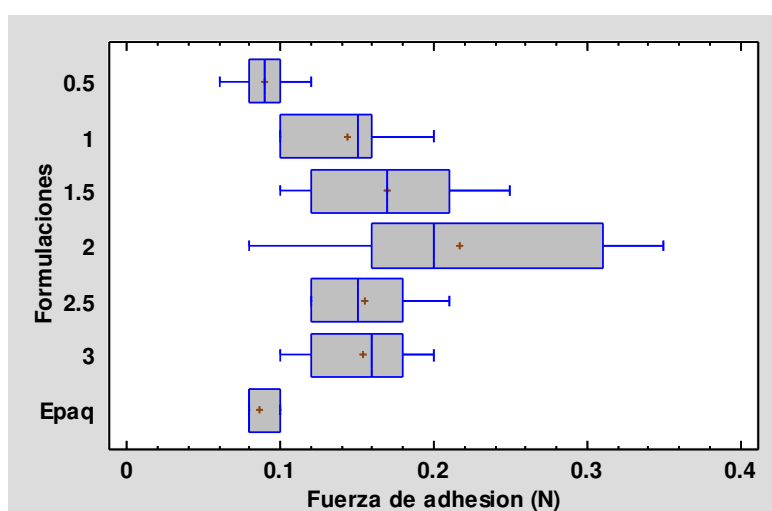


Gráfico. 24 La media de la fuerza de adhesión (N) para cada nivel de formulación y el error estándar de cada media.

6.7. Perfiles de liberación *in vitro* de la ME Bioadhesiva.

A partir de las pruebas de bioadhesión se seleccionó la ME 2 con 1.5 % de Carbopol® 974P NF para continuar los estudios de liberación *in vitro* del CTZ. La ME es separada a través de una membrana de diálisis del medio de disolución (FVS con Tween® 20 al 3 %), manteniendo condiciones sink y siguiendo la prueba en matraces mantenidos a 37°C con agitación magnética. Los resultados se muestran en el anexo 6.

En el gráfico 25 se muestra una comparación del perfil de liberación de la ME 2 con 1 % CTZ y la ME 2 bioadhesiva con la misma cantidad de principio activo. Teóricamente se esperaría que la liberación del CTZ a partir de la ME que contiene el agente bioadhesivo fuese menor que la ME que no lo contiene, ya que en la ME bioadhesiva el principio activo se encuentra dentro de los glóbulos de la ME que a su vez se encuentran atrapados dentro de la red polimérica y por lo tanto tardaría más en liberarse; sin embargo, este comportamiento no es muy notable ya que la ME por sí sola después de ponerla en contacto con el medio de disolución esta tiende a aumentar su viscosidad, como se muestra en la figura 17 y por lo tanto el comportamiento es muy similar en cuanto a su liberación.



Figura 17. ME 2 después de la liberación *in vitro* en forma de gel.

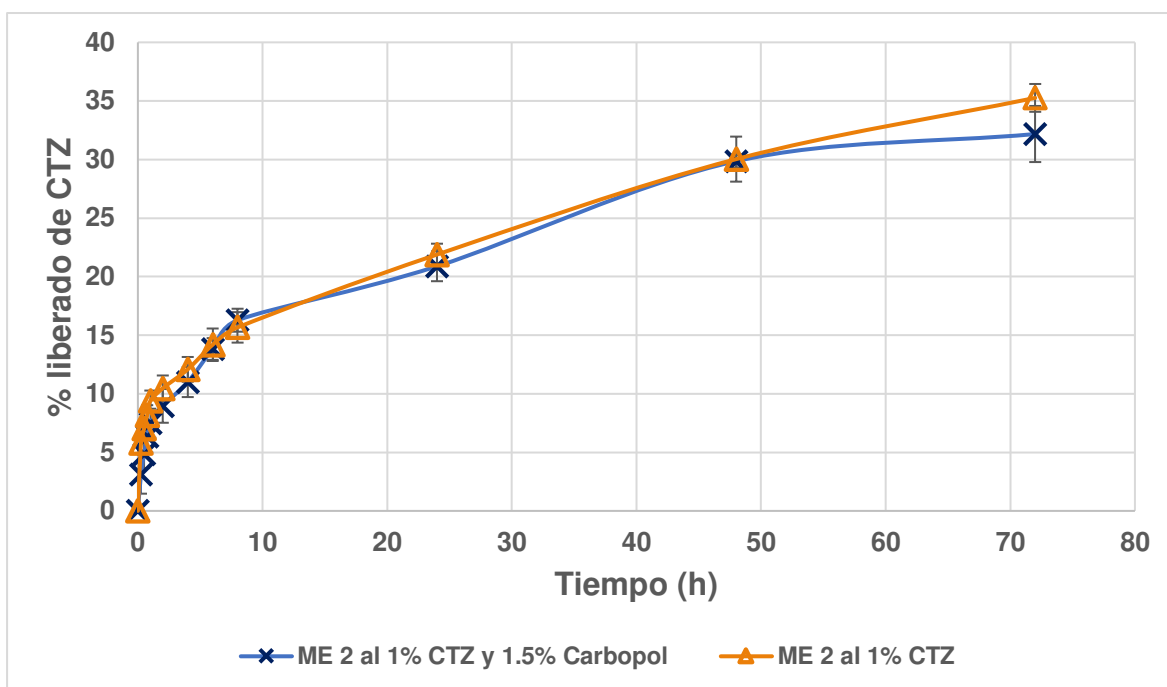


Gráfico 25. Comparación del perfil de liberación *in vitro* entre la ME 2 con 1 % de CTZ y ME 2 con 1 % de CTZ, 1.5 % Carbopol® 974P NF.

A esta liberación también se aplicó el modelo de Peppas y Higuchi para determinar el probable mecanismo de liberación. En el gráfico 26 se reportan los datos obtenidos de acuerdo al modelo de Peppas y en el gráfico 27 los de Higuchi, en la tabla 33 se muestran los valores de “n” y en la tabla 34 se muestran las constantes de Higuchi para los diferentes sistemas. Los gráficos se obtuvieron a partir de los datos incluidos en el anexo 7.

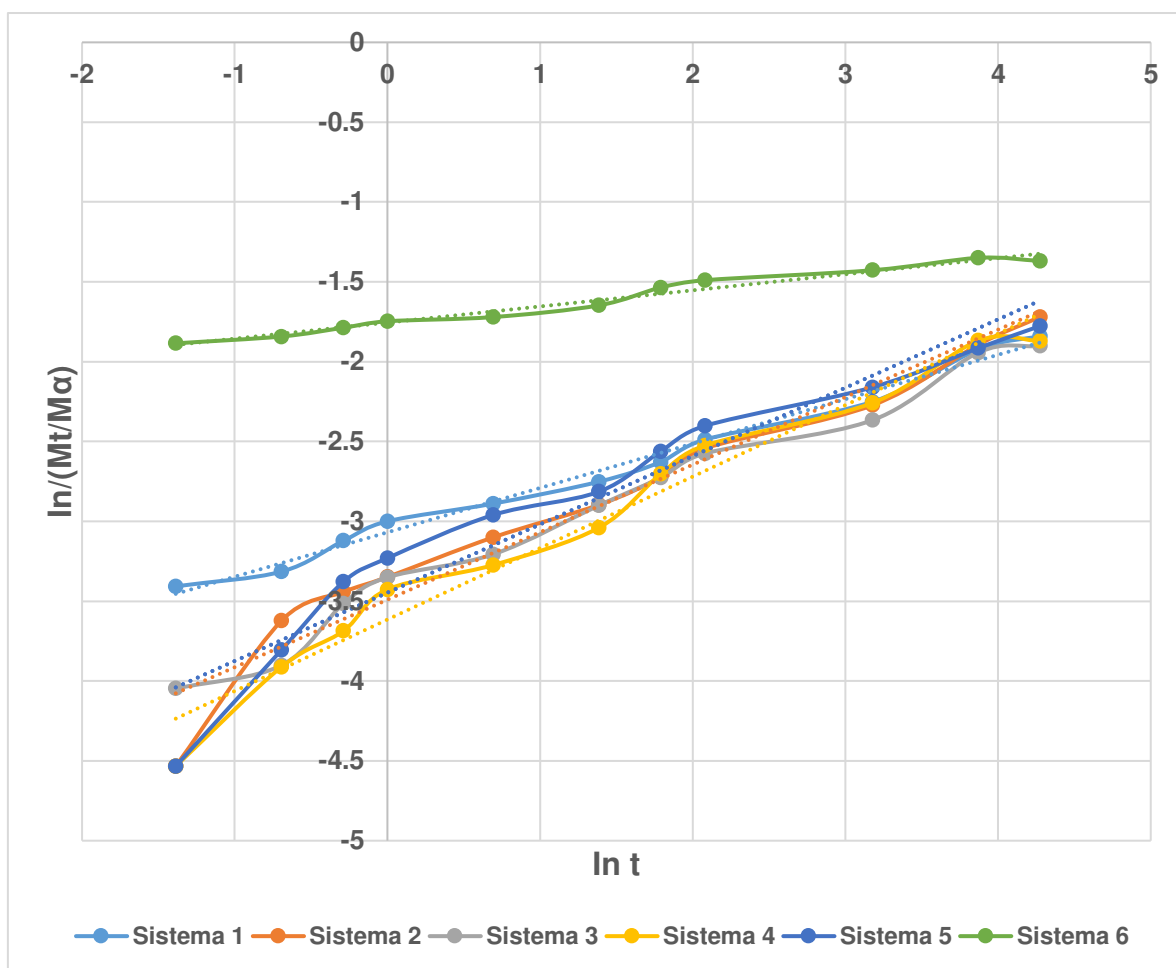


Gráfico 26. Modelo de Peppas aplicado a la liberación de la ME 2 con 1 % de CTZ y 1.5 % Carbopol® 974P NF, en una solución de FVS con Tween® 20 al 3 %.

Tabla 33. Coeficientes de determinación y valor de “n” de acuerdo al modelo de Peppas para la ME 2 con CTZ al 1 %.

Sistema	n	r ²
1	0.2780	0.9894
2	0.3728	0.9952
3	0.3831	0.9845
4	0.4471	0.9725
5	0.4279	0.9351
6	0.1009	0.9739
Promedio	0.3349	0.9751

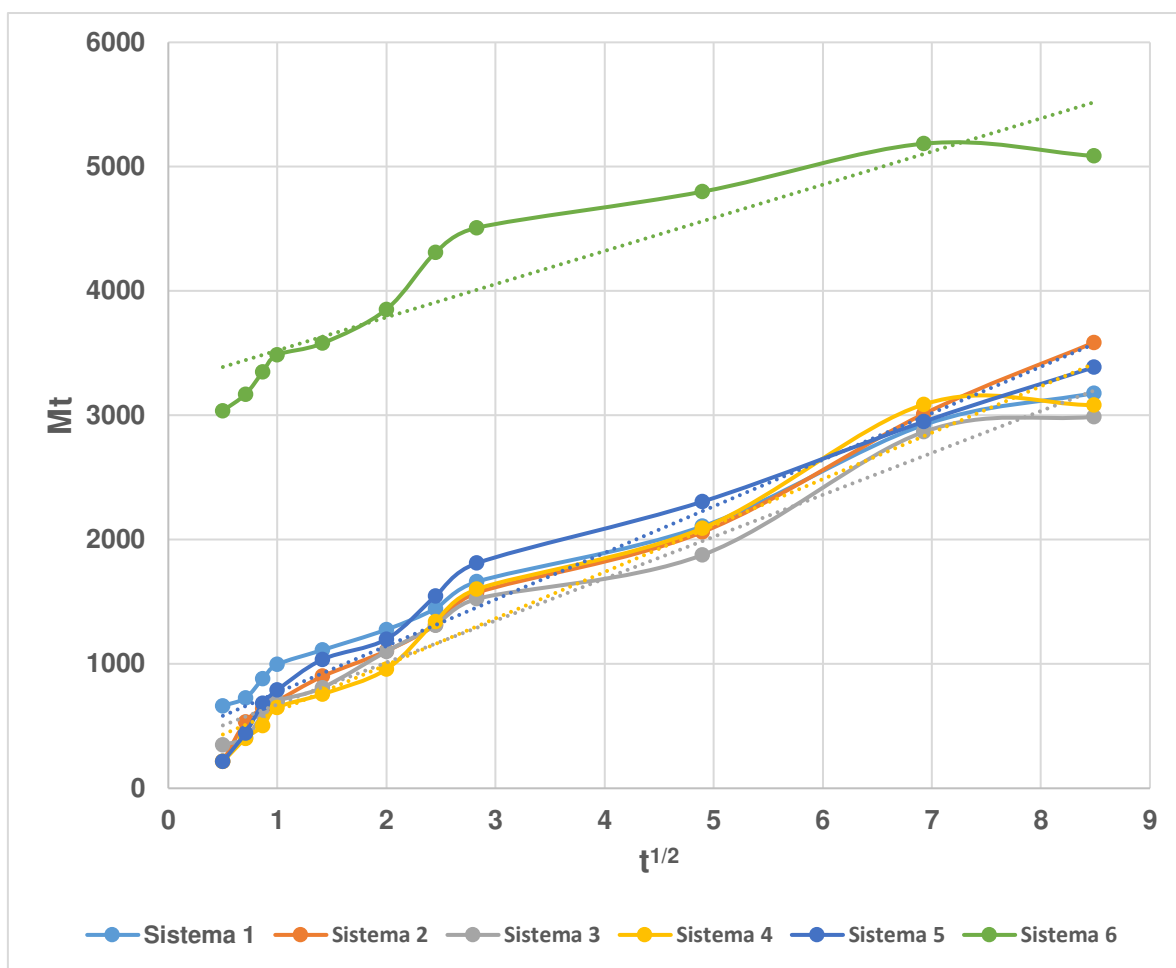


Gráfico 27. Modelo de Higuchi aplicado a la liberación de la ME 2 con 1 % de CTZ y 1.5 % Carbopol® 974P NF, en una solución de FVS con Tween® 20 al 3 %.

Tabla 34. Coeficientes de determinación y valor de k_H de acuerdo al modelo de Higuchi para la ME 4 al 1 % con CTZ.

Sistema	k_H	r^2
1	315.600	0.9879
2	292.870	0.9882
3	337.160	0.9726
4	373.430	0.9654
5	374.360	0.9604
6	266.610	0.8591
Promedio	326.671	0.9556

Los valores obtenidos del coeficiente difusional “n” para los seis sistemas de las ME’s bioadhesivas son menores a 0.5, indicando un mecanismo de transporte por difusión fickiana la cual se ajusta al modelo de Higuchi ya que el coeficiente de correlación es mayor a 0.96 como se muestra en la tabla 33. En estudios posteriores Djekic L., *et al.*, [2016] prepararon ME’s bioadhesivas de ibuprofeno con un hidrogel no iónico obteniéndose para los perfiles de liberación *in vitro* un ajuste al modelo de Higuchi ($r^2 > 0.99$), ya que dentro del hidrogel los glóbulos de la ME se encuentran dispersos en los cuales el ibuprofeno esta disuelto, por lo tanto, el proceso de liberación es la difusión del fármaco a través de la red de gel al medio aceptor conducido por el gradiente de concentración de fármaco.

Los resultados de la constante de Higuchi de la ME 2 al 1 % con CTZ fueron comparados con la ME 2 bioadhesiva al 1 % con CTZ, utilizando una prueba de ANOVA simple (tabla 35) para determinar si existe diferencias estadísticamente significativas entre la velocidad de liberación de la ME 2 con y sin agente bioadhesivo, encontrándose que no existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media de la k_H entre la ME que contiene un agente bioadhesivo y la que no lo contiene, ya que el valor P es mayor a 0.05, con un nivel de confianza del 95.0 %. Lo anterior indica que la liberación es igual cuando la ME contiene un agente bioadhesivo como cuando este se encuentra ausente como se muestra en el gráfico 28.

Tabla 35. Prueba de ANOVA simple para constante de Higuchi por concentración de Carbopol® 974P en la ME 2.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	4285.39	1	4285.39	3.87	0.0773
Intra grupos	11059.60	10	1105.96		
Total (Corregida)	15345.00	11			

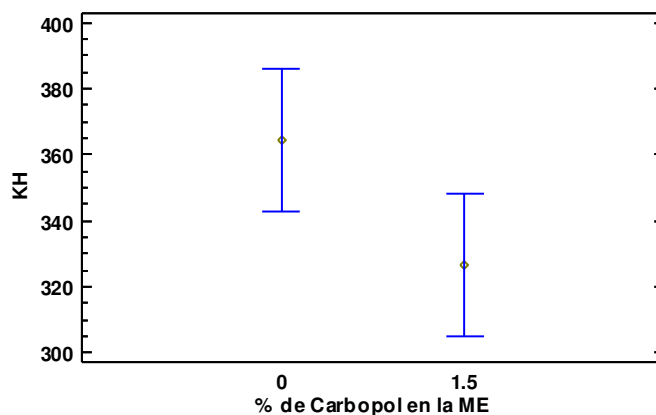


Gráfico 28. Comparación de la constante de Higuchi por % de Carbopol® 974P en la ME 2.

6.8. Cinéticas de permeación *in vitro*.

La permeación *in vitro* a través de la mucosa vaginal porcina fue llevada a cabo en celdas verticales tipo Franz; el estudio se realizó por sextuplicado tanto para la ME 2 bioadhesiva con 1 % de CTZ como para una solución de CTZ. En el gráfico 29 sólo se muestra la permeación *in vitro* del CTZ formulado en la ME 2 bioadhesiva, ya que con respecto a la solución no hubo permeación en el lapso de las 24 h los resultados obtenidos se muestran en el anexo 9.

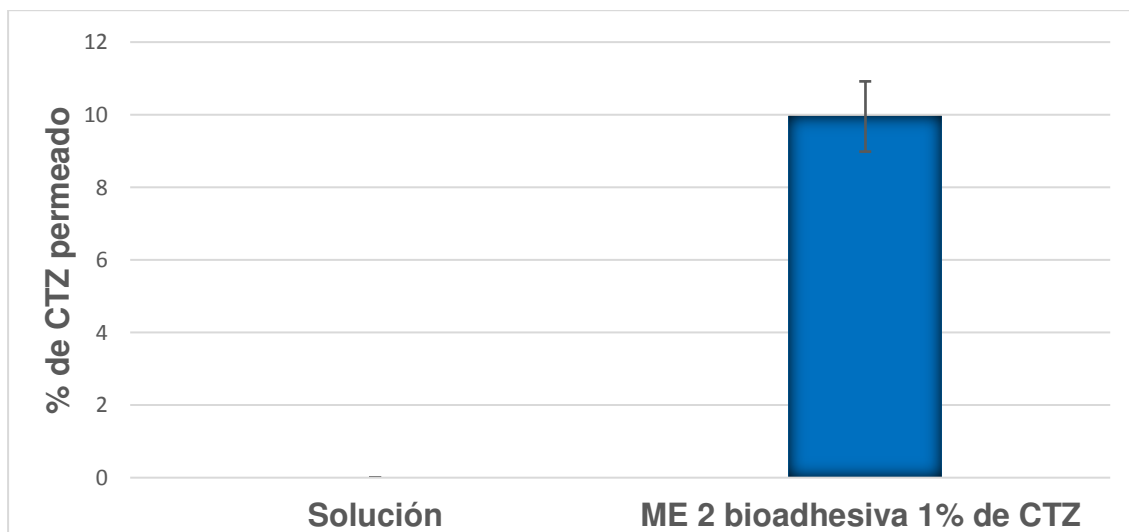


Gráfico 29. Porcentaje total de CTZ permeado a partir de la ME 2 bioadhesiva con 1 % de CTZ y una solución de CTZ.

En el caso de la solución no hubo permeación a través de la mucosa vaginal porcina ya que el CTZ es altamente lipofílico y por lo tanto no atraviesa la capa de moco que recubre el tejido vaginal; sin embargo, la ME 2 bioadhesiva (o / w) está compuesta por una mayor cantidad de agua, de manera que va a permitir que los glóbulos puedan atravesar el moco vaginal. Dado que la ME contiene miristato de isopropilo se puede favorecer la permeación, a pesar de estar presente en una baja concentración, éste puede entrar en la capa lipídica disminuyendo el empaquetamiento de los ácidos grasos y favoreciendo la permeación. Además, se ha sugerido que el miristato de isopropilo puede interactuar con los lípidos fijando el grupo isopropilo en la región polar de la capa lipídica produciendo un aumento en la fluidez de los lípidos y una disminución en la resistencia a la permeación provocando un aumento en la difusión del principio activo [Hirata K., *et al.*, 2013].

El efecto que se pretende obtener con la formulación de la ME bioadhesiva es de tipo local ya que va actuar directamente en el sitio afectado, por lo que no se pretende que haya permeación. Sin embargo, hay una permeación no mayor al 10 % debido a los componentes de la ME.

Otro componente de la ME que puede favorecer la permeación del CTZ a través de la mucosa vaginal es el Tween[®] 80 ya que puede penetrar en las regiones intercelulares aumentando la fluidez y eventualmente solubilizando y extrayendo componentes lipídicos [Shokri J., *et al.*, 2001 y Nokhodchi A., *et al.*, 2003].

Con los datos obtenidos se construyó la gráfica de CTZ permeado por unidad de área expuesta en función del tiempo (h) (Gráfico 30), a partir de esta gráfica sólo se seleccionaron las primeras ocho horas ya que con ellas se obtiene una línea recta con el fin de obtener el flujo (J) de CTZ desde los sistemas hacia el medio receptor como se muestra en el gráfico 31.

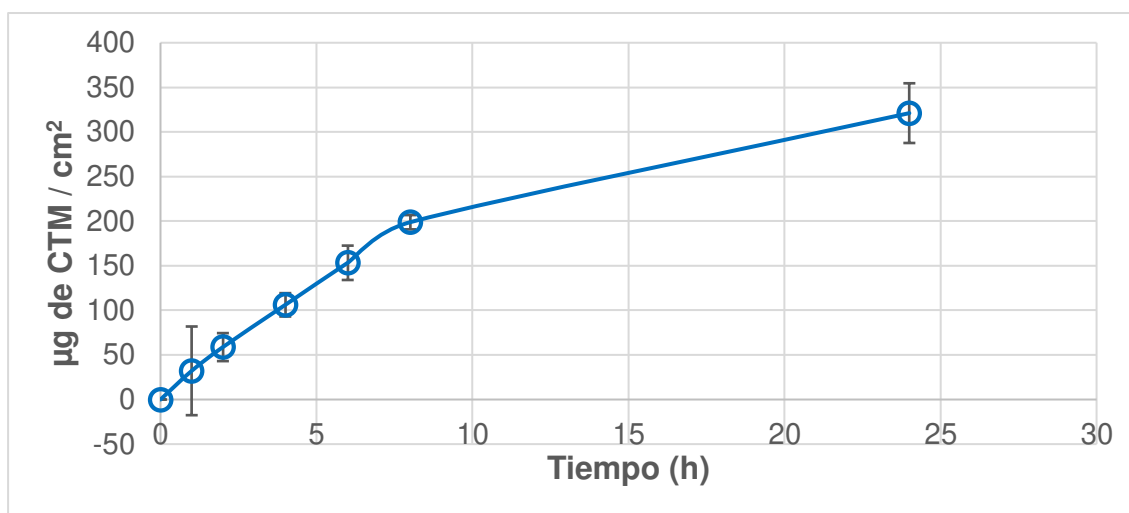


Gráfico 30. Cinética de permeación de CTZ a través de la mucosa vaginal porcina *in vitro*.

A partir de la gráfica 31 se obtuvo un flujo de $24.469 \mu\text{g cm}^{-2} \text{h}^{-1}$ con un coeficiente de correlación de 0.9976.

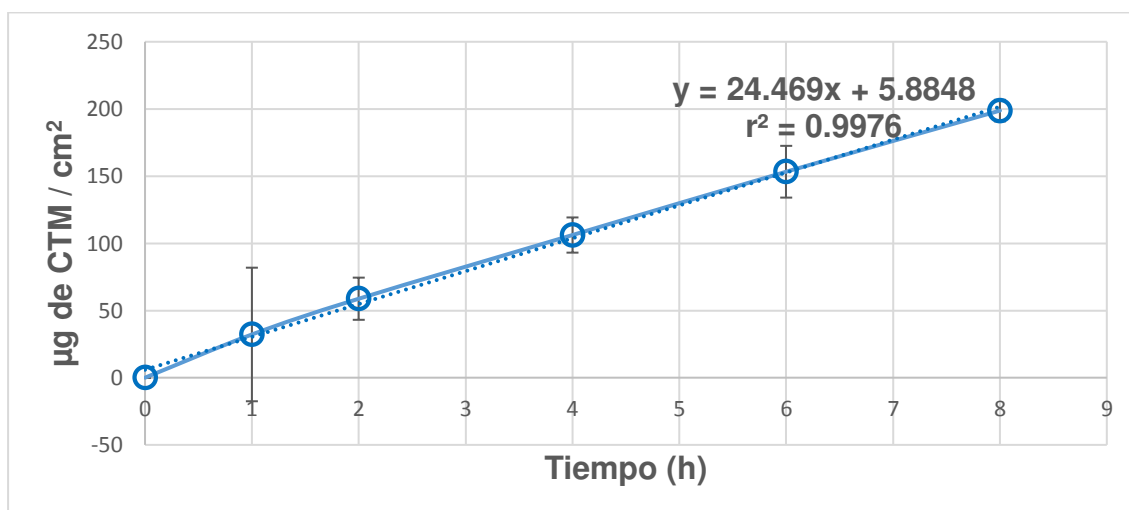


Gráfico 31. Microgramos de CTZ por unidad de área con respecto al tiempo.

6.9. Extracción del CTZ remanente en la vagina de cerda

Después de realizar las pruebas de permeación, se llevó a cabo la extracción del CTZ remanente en la mucosa vaginal porcina. El porcentaje de recobro obtenido con una cantidad conocida de CTZ fue de 82.2 % (ver anexo 9), de acuerdo a lo expuesto en el punto 5.10 de la metodología. Los datos fueron corregidos con el porcentaje de recobro obtenido, utilizando la siguiente ecuación:

$$\% \text{ de CTZ retenido corregido} = \frac{\% \text{ de CTZ retenido}}{\% \text{ de recobro}} * 100$$

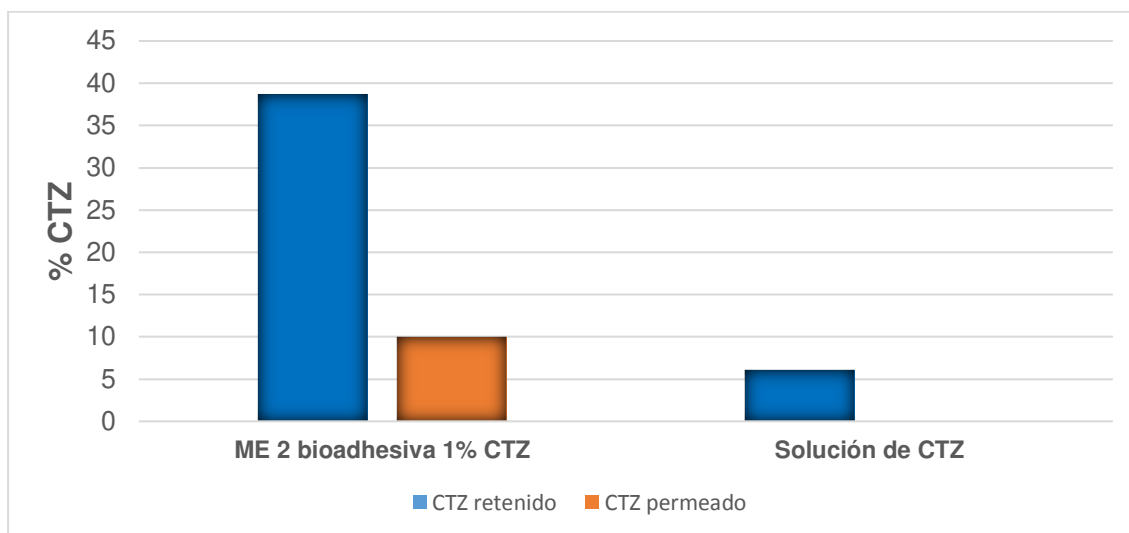


Gráfico 32. Porcentaje de CTZ retenido en el tejido vaginal y permeado en los estudios de liberación *in vitro*.

De acuerdo con el gráfico 32 el porcentaje de CTZ retenido en la vagina al aplicar la ME 2 bioadhesiva es mayor en comparación con la solución, ya que en la ME está presente el miristato de isopropilo, así como el Tween® 80 los cuales pueden aumentar la fluidez de los lípidos de la membrana y permitir que el CTZ difunda más fácilmente mientras que en la solución no hay promotores de permeación y este no es capaz de pasar a través de la mucina hacia la mucosa vaginal.

7. DESARROLLO DEL MÉTODO ANALÍTICO

Se desarrollaron tres métodos analíticos mediante espectrofotometría UV-VIS (Espectrofotómetro Genesys® 10S UV / VIS) para cuantificar el CTZ.

7.1. Método 1: Cuantificación del clotrimazol liberado en los estudios *in vitro*.

El medio de disolución utilizado fue FVS con Tween® 20 al 3 %, en el cual el CTZ es soluble.

Se realizó un barrido espectrofotométrico de 200 a 400 nm del medio de disolución y de CTZ disuelto en dicho medio, no encontrándose interferencias a las condiciones de estudio por lo que el método es selectivo. La longitud de onda de máxima absorción para el CTZ fue de 261 nm como se muestra en el gráfico 33 y anexo 1.

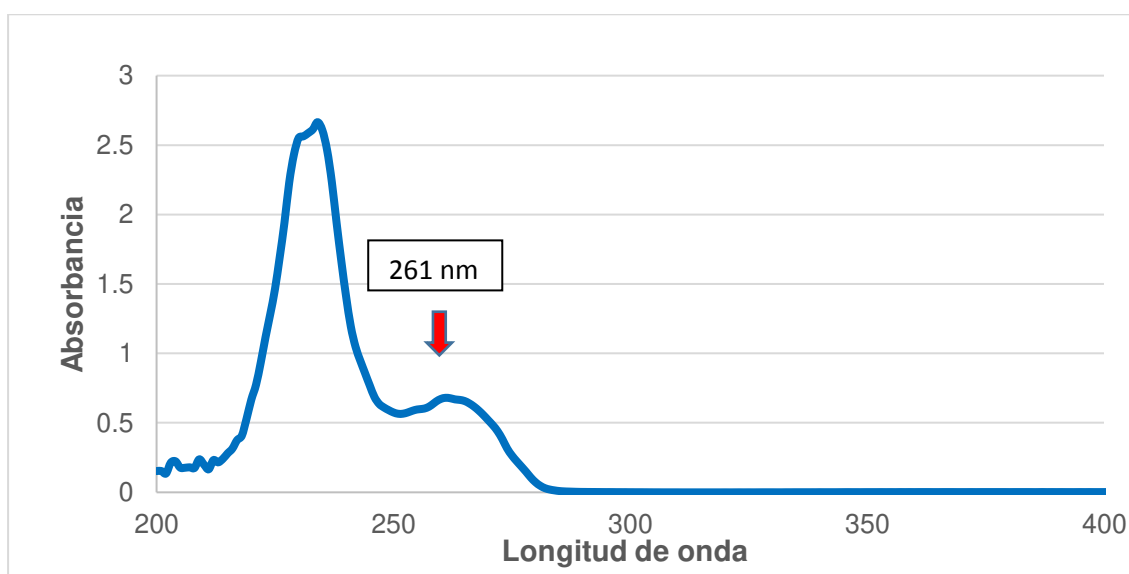


Gráfico 33. Barrido del CTZ en FVS con Tween® 20 al 3 % teniendo como blanco el FVS con Tween® 20 al 3 % y una longitud de onda de máxima absorción de 261 nm.

La curva de calibración se preparó a partir de una solución stock de CTZ en FVS con Tween® 20 al 3 % (p / v). Se prepararon seis sistemas por triplicado a partir de la solución stock tomando diferentes alícuotas de ésta y llevándolas a un volumen

total de 10 mL (1 mL / 10 mL, 2 mL / 10 mL, 3 mL / 10 mL, 4 mL / 10 mL, 5 mL / 10 mL y 6 mL / 10 mL) obteniéndose diferentes concentraciones para los sistemas que fueron leídos en el espectrofotómetro Genesys® 10S UV / VIS con una celda de cuarzo a una longitud de onda de 261 nm. El método demostró ser lineal en un intervalo de 36 a 252 $\mu\text{g} / \text{mL}$ ($\text{CV} = 1.705$) ($r^2 = 0.999$) según mostrado en el gráfico 34 y anexo 10. El método mostró ser repetible ($\text{CV} = 0.584$).

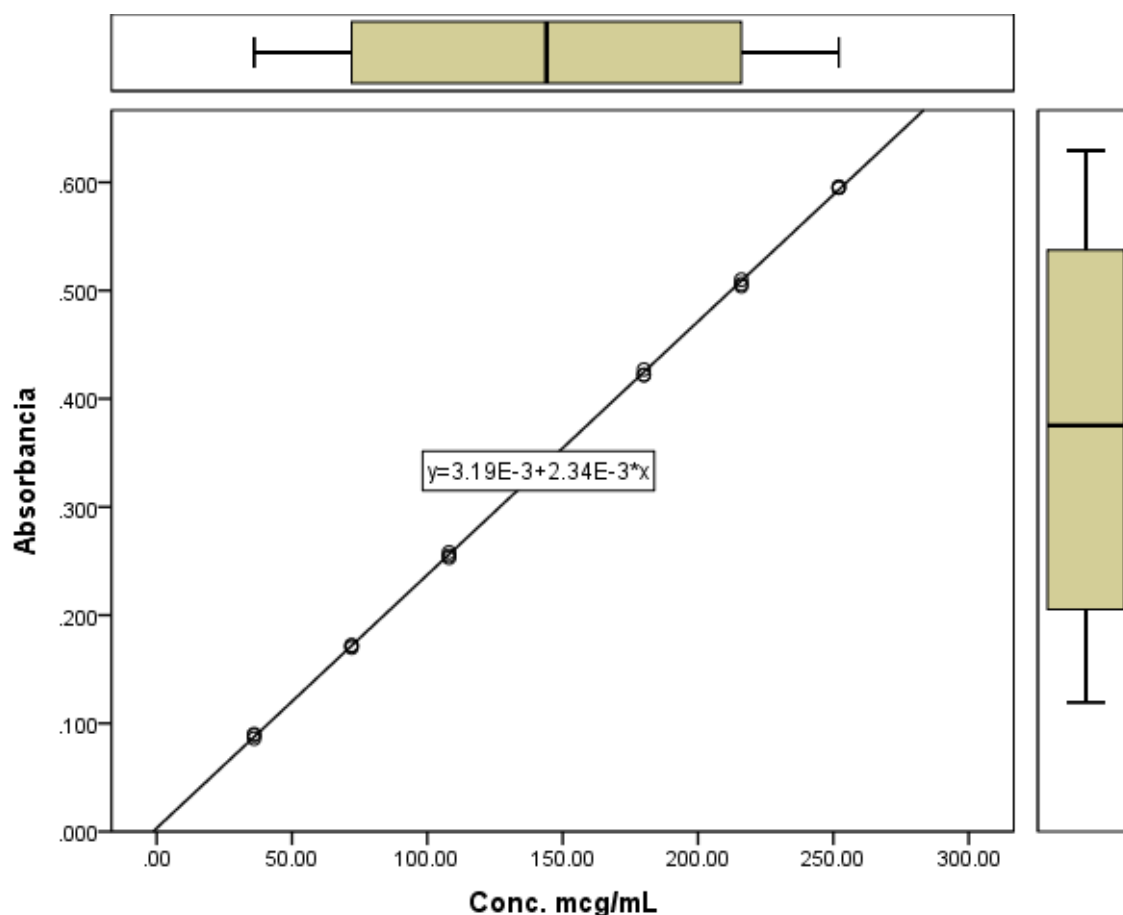


Gráfico 34. Curva de calibración para cuantificar el CTZ liberado en los estudios *in vitro*.

$$\text{Absorbancia} = \left[0.00234 \times \text{CTZ} \left(\frac{\mu\text{g}}{\text{mL}} \right) \right] + 0.00319$$

7.2. Método 2. El clotrimazol permeado a través de vagina de cerda.

Para cuantificar el CTZ permeado a través de la vagina de cerda primeramente se propuso un método en el cual se utilizó como medio una solución amortiguadora de fosfatos $\text{pH} = 7.4 \pm 0.1$ con Tween® 20 al 3 % en contacto con la cara interna de la vagina de cerda con el fin de mantener las condiciones de pH de la cara interna de la vagina.

Se realizó un barrido espectrofotométrico de 200 a 400 nm del medio de disolución y del CTZ disuelto en dicho medio. Este método no se pudo desarrollar ya que la solubilidad del CTZ depende del pH y a este pH (7.4) el CTZ no es soluble, por lo tanto, la solubilidad del CTZ aumenta cuando disminuye el pH del medio (medio ácido) [Borhade V., et al., 2012].

Por lo que se optó por el siguiente método en donde el CTZ es soluble a $\text{pH} = 4.2$, utilizando como medio de FVS $\text{pH} = 4.2 \pm 0.1$ con Tween® 20 al 3 % en contacto con la cara interna de la vagina de cerda.

Se realizó un barrido espectrofotométrico de 200 a 400 nm para el CTZ disuelto en la matriz biológica. No se encontraron interferencias a las condiciones de estudio por lo que el método es selectivo. La longitud de onda de máxima absorción para el CTZ fue de 261 nm (ver anexo 1). A partir de una solución stock de CTZ se construyó una curva de calibración como se describió anteriormente. El método presentó linealidad en un intervalo de 24.2 a 193.6 $\mu\text{g} / \text{mL}$ ($\text{CV} = 1.139$) ($r^2 = 0.999$) (ver gráfico 35 y anexo 10) y mostró ser repetible ($\text{CV} = 0.545$).

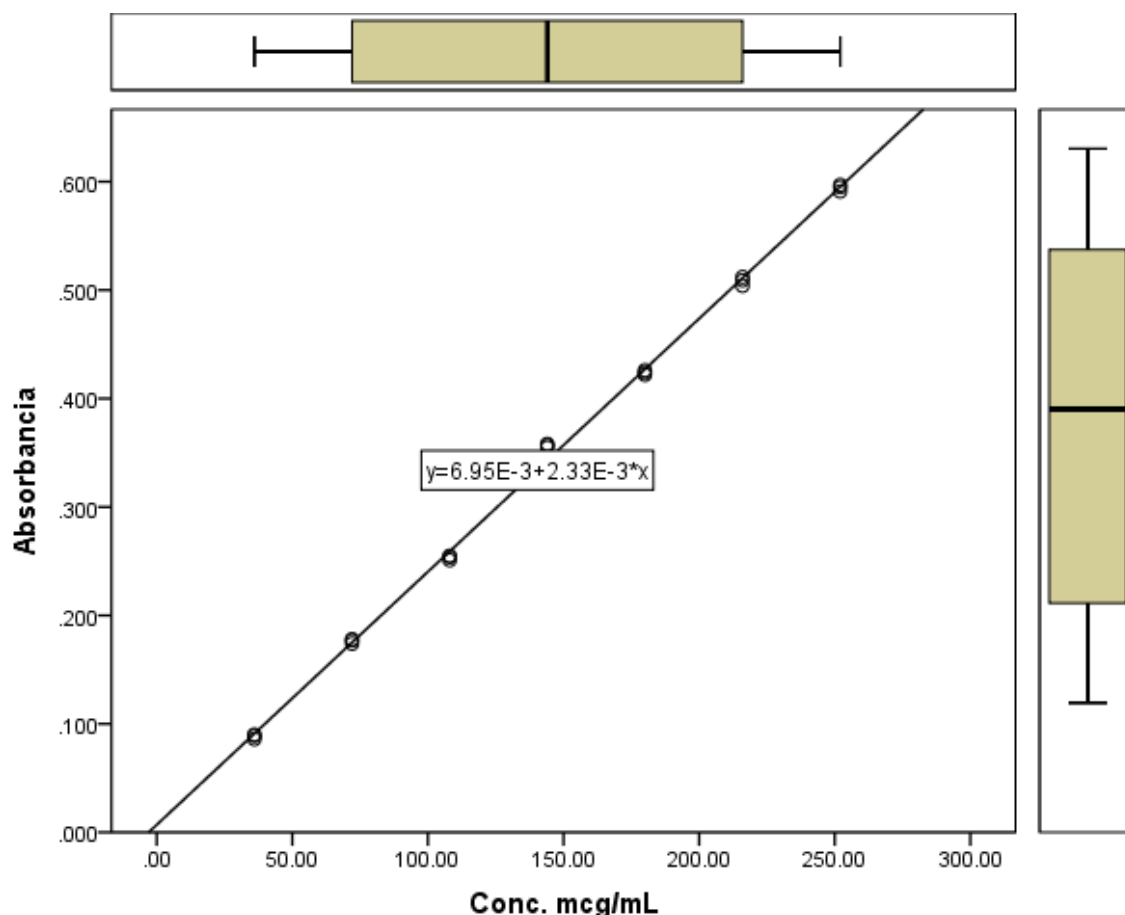


Gráfico 35. Curva de calibración para cuantificar el CTZ permeado a través de vagina de cerda. $Absorbancia = \left[0.00233 \times CTZ \left(\frac{\mu g}{mL} \right) \right] + 0.00695$

7.3. Método 3. El clotrimazol retenido en la vagina al final de los estudios de permeación

En este caso, el medio de disolución fue metanol en contacto con porciones de vagina de cerda.

Se realizó un barrido espectrofotométrico de 200 a 400 nm para el CTZ disuelto en el medio. Sin encontrar interferencias a las condiciones de estudio por lo que el método es selectivo. La longitud de onda de máxima absorción para el CTZ fue de 261 nm (ver anexo 1). El método presentó linealidad en un intervalo de 24.2 a 193.6 $\mu g / mL$ ($CV = 1.139$) ($r^2 = 0.999$) y fue repetible ($CV = 0.545$) como se aprecia en el gráfico 36 y anexo 10.

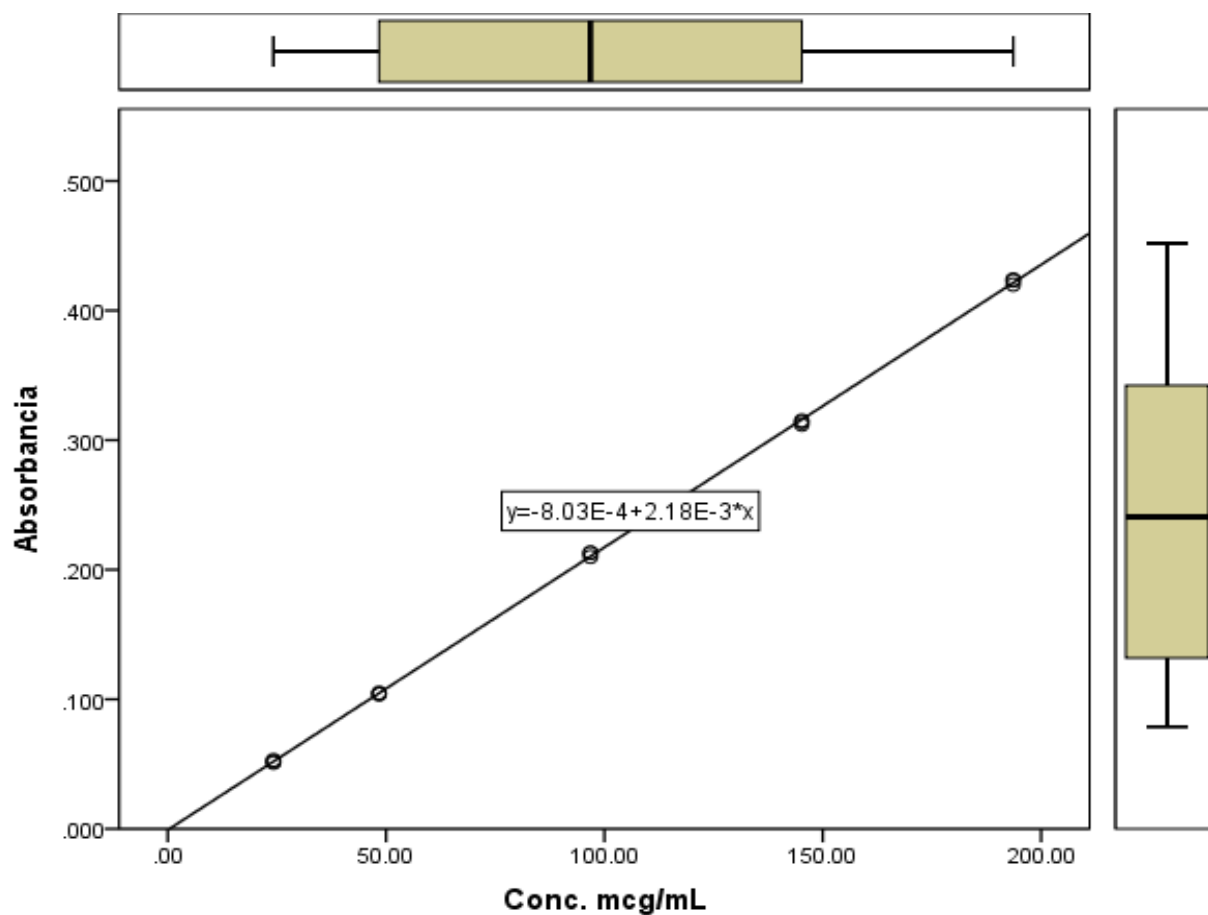


Gráfico 36. Curva de calibración para cuantificar el CTZ retenido en la vagina al final de los estudios de permeación. $Absorbancia = [0.00218 \times CTZ \left(\frac{\mu g}{mL} \right)] - 0.000803$

8. CONCLUSIONES

- Se obtuvieron ME aceite en agua (o / w) conteniendo CTZ con el fin de ser aplicadas por vía vaginal, con un tamaño de glóbulo menor a 10 nm y estables después de pruebas de ciclado térmico.
- El tamaño de los glóbulos tiende a aumentar conforme se incrementa la cantidad de principio activo.
- Se logró obtener una ME bioadhesiva aceite en agua (o / w) con un tamaño de glóbulo menor a 10 nm, incorporando CTZ al 1%, principio activo eficaz para el tratamiento de infecciones vaginales.
- Se encontró que la inclusión de Carbopol® 974P NF al 1.5 % en la ME 2 presenta una mayor bioadhesión que el gel comercial (Epaq™) que contiene Carbopol® 934P.
- En general, la liberación del CTZ a partir de los glóbulos de la ME fue más lenta, en comparación con la solución, y los datos obtenidos se adaptan al modelo propuesto por Korsmeyer Peppas y al modelo de Higuchi.
- La ME 2 bioadhesiva presentó una permeación del 10 % por su contenido de miristato de isopropilo y Tween® 80 dentro de la formulación, mientras que en la solución no se presenta este efecto promotor de permeación.
- Los métodos espectrofotométricos para la cuantificación de CTZ tanto liberado a partir de las ME's, permeado a través de la mucosa vaginal porcina y retenido en la mucosa vaginal porcina, mostraron ser lineales dentro del intervalo de concentración señalado, selectivos y repetibles.

9. PERSPECTIVAS

- Evaluar el comportamiento reológico de la microemulsión sin bioadhesivos a diferentes tiempos durante las pruebas de liberación *in vitro*.
- Estudiar el desempeño microbiológico de la microemulsión con cepas de *Candida albicans*.
- Realizar pruebas de toxicidad e irritación del tejido vaginal con la ME bioadhesiva.

10. REFERENCIAS

- Al-Rohaimi A., Comparative anti-inflammatory potential of crystalline and amorphous nano curcumin in topical drug delivery. *Journal of Oleo Science*. 2015; 64: 27- 40.
- Baroli B., López-Quintela M., Delgado-Charro M., Fadda A. y Blanco-Mendez J. Microemulsions for topical delivery of 8-methosalen. *Journal of Controlled Release*. 2000; 69: 209 - 218
- Beiro R., Vidal MC. y Orgeira J. Papel de los bioadhesivos en el tratamiento tópico de las enfermedades orales. *Revista de la SEMG*. 2003; 56: 489 - 490.
- Bidart H. Rol de voriconazol y caspofungina en terapia antifúngica. *Rev Chil Infect*. 2004; 21: 13 - 19
- Borhade V., Pathak S., Sharma S. y Patravale V. Clotrimazole nanoemulsion for malaria chemotherapy. Part 1: Preformulation studies, formulation design and physicochemical evaluation. *Pharmaceutical Nanotechnology*. 2012; 431: 138 - 148
- Caramella CM., Rossi S., Ferrari F., Bonferoni MC. y Sandri G. Mucoadhesive and thermogelling systems for vaginal drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2015; 92: 39 - 52
- Das Neves J., Amaral M. y Bahia MF. Performance of an in vitro mucoadhesion testing method for vaginal semisolid: Influence of different testing conditions and instrumental parameters. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2008; 69: 622 - 632
- Das Neves J. y Bahia MF. Gels as vaginal drug delivery systems. *International Journal of Pharmaceutics*. 2006; 318: 1 - 14

- Das Neves J., Nunes R., Machado A. y Sarmento B. Polymer- based nanocarriers for vaginal drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2015; 92: 53 – 70
- Djekic L., Martinovic M., Stepanović-Petrović R., Micov A., Tomić M. y Primorac M. Formulation of hydrogel-thickened nonionic microemulsions with enhanced percutaneous delivery of ibuprofen assessed in vivo in rats. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2016; 92: 255 - 265.
- Eccleston G. Emulsions and microemulsions. *Encyclopedia of Pharmaceutical Technology*. Ed. Marcel Dekker. 2002; 61 - 65
- El-Kattan A., Asbill C. y Haidar S. Transdermal testing: practical aspects and methods. *Research focus*. 2000; 3: 426 - 430.
- Edsman K. y Hägerström H. Pharmaceutical of mucoadhesion for the non-oral routes. *Pharmacy and Pharmacology*. 2005; 57: 3 - 22.
- Guía de Validación de Métodos Analíticos, Editada por el Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos México, A. C., Edición 2002.
- Guía de Estabilidad de Productos Cosméticos, Editada por la Agencia Nacional de Vigilancia Sanitaria (ANVISA), Vol. 1, Brasil, 2005.
- Hashem M., Shaker S., Khalid M., Nasr M. y Ismail A. Formulation, characterization and clinical evaluation of microemulsion containing Clotrimazole for topical delivery. *AAPS PharmSciTech*. 2011; 12: 879 – 886
- Hirata K., Helal F., Hadgraft J. y Lane M. Formulation of carbenoxolone for delivery to the skin. *International Journal of Pharmaceutics*. 2013; 448: 360 – 365
- Justin-Temu M., Damian F., Kinget R. y Van Den Mooter G. Intravaginal gels as drug delivery systems. *Journal of Women's Health*. 2004; 13:10.

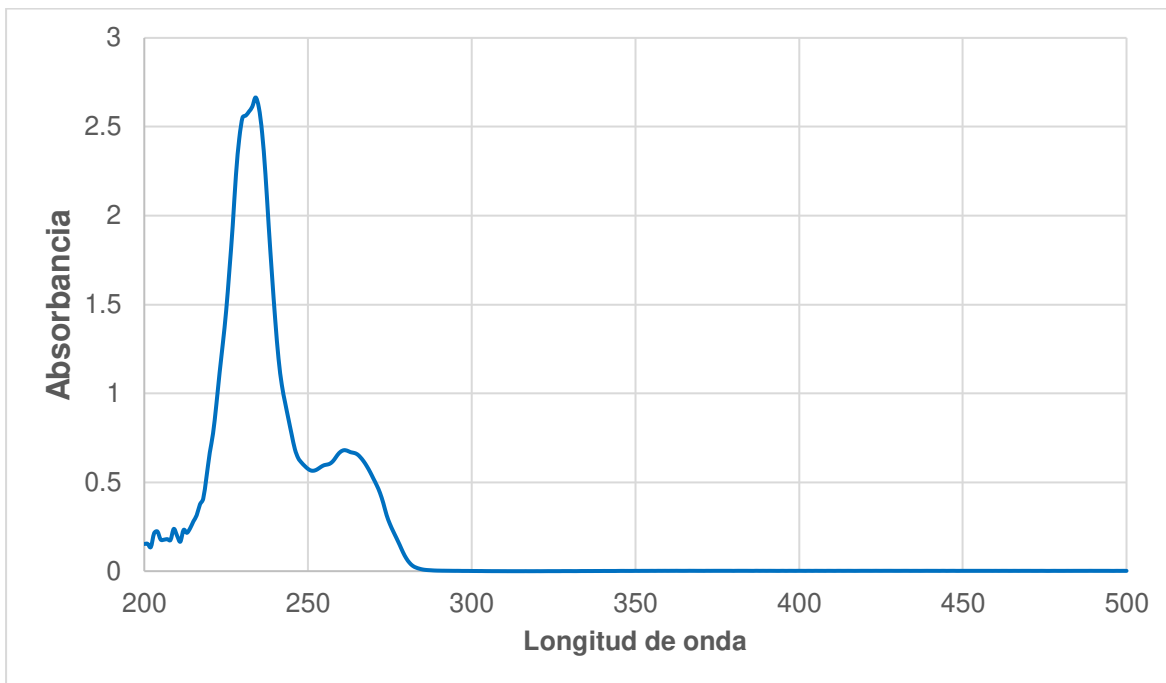
- Kalhapure R., Sonawane S., Sikwal D., Jadhav M., Rambharose S., Mocktar C. y Govender T. Solid lipid nanoparticles of clotrimazole silver complex: An efficient nano antibacterial against *Staphylococcus aureus* and MRSA. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2015; 136:651- 658
- Lawrence M. y Rees G. Microemulsion-based media as novel drug delivery systems. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2012; 64: 175-193
- Lowman, M. y Peppas, N. A. "Hydrogels" en *Encyclopedia of Controlled Drug Delivery*, Vol. 1. (Mathiowitz, E., ed) John Wiley & Sons, Inc. E. U. A. 1999; pp. 397- 418.
- Machado RM., Palmeira-de-oliveira A., Martinez-de-oliveira J. y Palmeira-de-oliveira R. Vaginal Films for Drug Delivery. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2013; 102: 2069-2081
- Mehrdad H., Amir A. y Pedram R. Hydrogel nanoparticles in drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2008; 60: 1638–1649
- Meis J., Petrou M., Bille J., Ellis D. y Gibbs D. A global evaluation of the susceptibility of *Candida* species to fluconazole by disk diffusion. *Ugeskr Laeger*. 2000; 162:1907-1908
- Merabet J., Thompson D. y Levinson R. Advancing vaginal drug delivery. *Expert Opinion on Drug Delivery*. 2005; 2: 769–777
- Nokhodchi A., Shokri J., Dashbolaghi A., Hassan-Zadeh D., Ghafourian T. y Barzegar-Jalali M. The enhancement effect of surfactants on the penetration of lorazepam through rat skin. *International Journal of Pharmaceutics*. 2003; 359 - 369
- Norma Oficial Mexicana NOM-073-SSA1-2015, Estabilidad de fármacos y medicamentos, así como de remedios herbolarios.

- Owen D. and Katz D. A Vaginal Fluid Simulant. Department of Biomedical Engineering and Department of Obstetrics and Gynecology, Duke University, Durham, North Carolina. 1999; 59: 91 – 95
- Palmeira de Oliveira R., Palmeira de Oliveira A. y Martinez de Oliveira J. New strategies for local treatment of vaginal infections. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2015; 92: 105 - 122
- Pakpayat N., Nielloud F., Fortune R., Tourne-Peteilh C., Villareal A., Grillo I. y Bataille B. Formulation of ascorbic acid microemulsions with alkyl polyglycosides. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2009; 72: 444 – 452
- Peppas, N. A., Bures, P., Leobandung, W. y Ichikawa, H. “Hydrogels in pharmaceutical formulations”. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2000; 50: 27-46
- Prieto C. y Calvo L. Performance of the biocompatible Surfactant Tween 80, for the formation microemulsions suitable for new pharmaceutical processing. *Journal of Applied Chemistry*. 2013; 1 – 10, ID 930356
- Rowe C., Sheskey J. y Quinn E. (Editores) *Handbook of Pharmaceutical Excipients*. Pharmaceutical Press. 6° ed. 2009; pp. 348 – 351
- Shokri J., Nokhodchi A., Dashbolaghi A., Hassan-Zadeh D., Ghafourian T. y Barzegar M. The effect of surfactants on the skin penetration of diazepam. *International Journal of Pharmaceutics*. 2001; 228: 99–107
- Touitou E., y Barry B., (Eds.). *Enhancement in Drug Delivery*. United States of America: CRC Pres Taylon & Francis Group. 2007
- Valenta C. The use of mucoadhesive polymers in vaginal delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2005; 57: 1692-1712

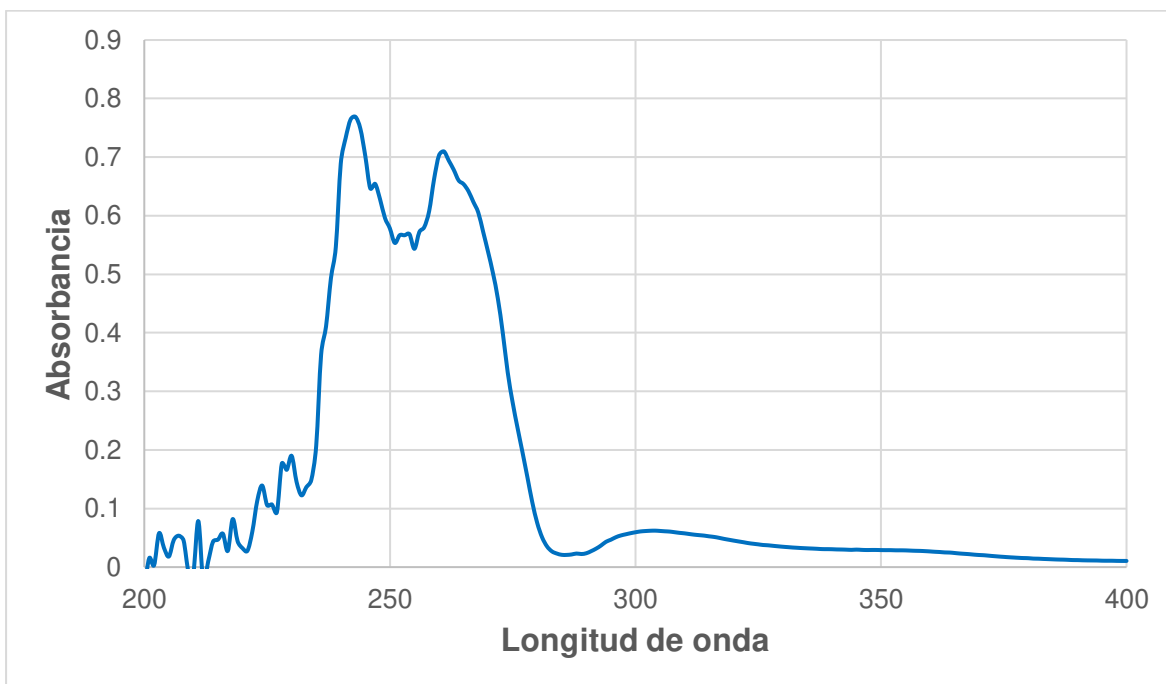
- Vallejo BM. y Perilla JE. Elementos conceptuales para estudiar el comportamiento bioadhesivo en polímeros. Revista Colombiana de Ciencias Químico Farmacéuticas. 2008; 37, 33-61
- Vandamme T. Microemulsions as ocular drug delivery systems: recent developments and future challenges. Progress in Retinal and Eye Research. 2002; 21: 15-34
- Washington C. Drug release from microdisperse systems: a critical review. International Journal of Pharmaceutics. 1990; 58: 1 - 12
- Wei G. y Gao P. Handbook of Non-Invasive Drug Delivery Systems: Microemulsions for Topical and Transdermal Drug Delivery. Elsevier Inc. 2010; Chapter 3: 59 - 91
- Woertz C., Preis M., Breitzkreutz J. y Kleinebudde p. Assessment of test methods evaluating mucoadhesive polymers and dosage forms: An overview. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics. 2013; 85:843-853
- Woolfson AD., Malcolm RK. y Gallagher R. Drug delivery by the intravaginal route. Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems. 2000; 17: 509–555

ANEXO 1. Espectros de absorción

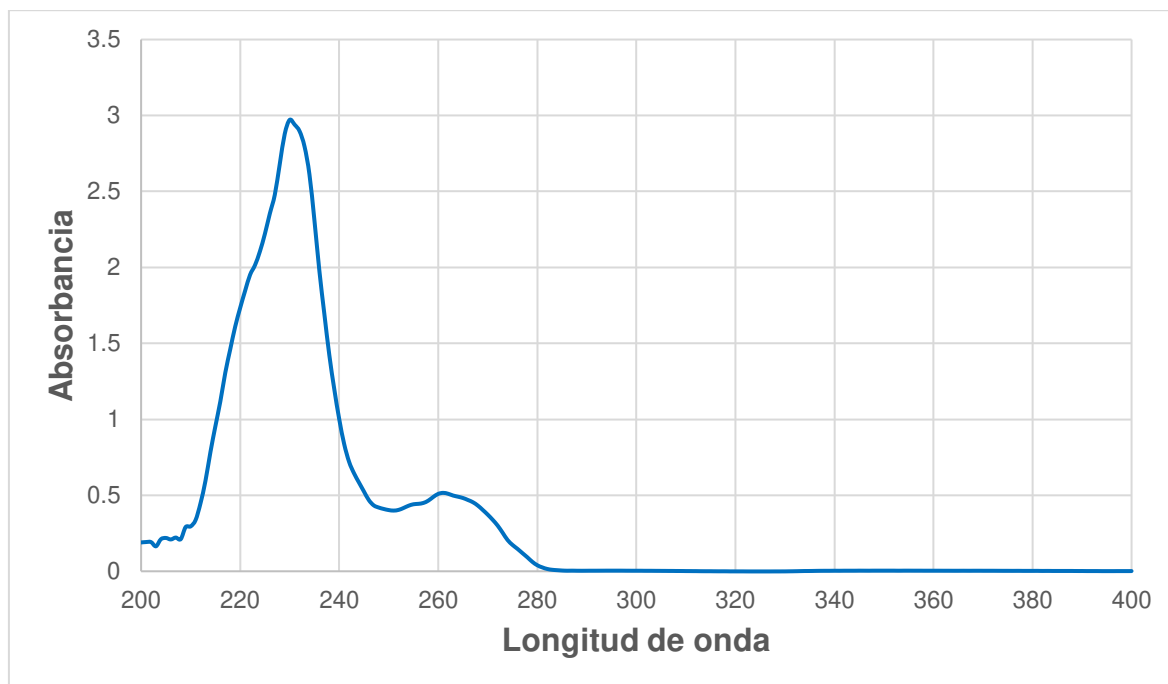
- a) Barrido de CTZ en FVS con Tween® 20 al 3 % pH = 4.2 utilizando como blanco el medio de disolución.



- b) Barrido de CTZ en FVS con Tween® 20 al 3 % pH = 4.2 en contacto con la cara interna de la vagina de cerda utilizando como blanco el medio de disolución.



- c) Barrido de CTZ en metanol en contacto con trozos de vagina de cerda utilizando como blanco el medio de disolución.



ANEXO 2. Resultado de la titulación de los diagramas ternarios**a) Palmitato de isopropilo como aceite y como T-CT Tween® 20 / etanol 1:1**

Aceite (mL)	T-CT (mL)	Agua (mL)	Total (mL)	% Aceite	% T-CT	% Agua
9	1	1.45	11.45	8.73	78.60	12.66
8	2	0.50	10.50	19.05	76.19	4.76
7	3	0.47	10.47	28.65	66.86	4.49
6	4	0.45	10.45	38.28	57.42	4.31
5	5	0.00	10.00	0.50	0.40	0.00
4	6	0.00	10.00	0.60	0.40	0.00
3	7	0.00	10.00	0.70	0.30	0.00
2	8	0.00	10.00	0.80	0.20	0.00
1	9	0.00	10.00	0.90	0.10	0.00

b) Palmitato de isopropilo como aceite y como T-CT Tween® 20 / etanol 2:1

Aceite (mL)	T-CT (mL)	Agua (mL)	Total (mL)	% Aceite	% T-CT	% Agua
9	1	4.00	14.00	7.14	64.29	28.57
8	2	1.50	11.50	17.39	69.57	13.04
7	3	1.00	11.00	27.27	63.64	9.09
6	4	0.50	10.50	38.10	57.14	4.76
5	5	0.20	10.20	49.02	49.02	1.96
4	6	0.00	10.00	0.60	0.40	0.00
3	7	0.00	10.00	0.70	0.30	0.00
2	8	0.00	10.00	0.80	0.20	0.00
1	9	0.00	10.00	0.90	0.10	0.00

c) Palmitato de isopropilo como aceite y como T-CT Tween® 20 / etanol 3:1

Aceite (mL)	T-CT (mL)	Agua (mL)	Total (mL)	% Aceite	% T-CT	% Agua
9	1	5.00	15.00	6.67	60.00	33.33
8	2	2.05	12.05	16.60	66.39	17.01
7	3	0.05	10.05	29.85	69.65	0.50
6	4	0.00	10.00	0.40	0.60	0.00
5	5	0.00	10.00	0.50	0.40	0.00
4	6	0.00	10.00	0.60	0.40	0.00
3	7	0.00	10.00	0.70	0.30	0.00
2	8	0.00	10.00	0.80	0.20	0.00
1	9	0.00	10.00	0.90	0.10	0.00

d) Palmitato de isopropilo como aceite y como T-CT Tween® 80 / etanol 1:1

Aceite (mL)	T-CT (mL)	Agua (mL)	Total (mL)	% Aceite	% T-CT	% Agua
9	1	8.45	11.45	8.73	78.60	12.66
8	2	2.05	10.50	19.05	76.19	4.76
7	3	0.75	10.47	28.65	66.86	4.49
6	4	0.65	10.45	38.28	57.42	4.31
5	5	0.55	10.40	48.08	48.08	3.85
4	6	0.00	10.00	0.60	0.40	0.00
3	7	0.00	10.00	0.70	0.30	0.00
2	8	0.00	10.00	0.80	0.20	0.00
1	9	0.00	10.00	0.90	0.10	0.00

e) Palmitato de isopropilo como aceite y como T-CT Tween® 80 / etanol 2:1

Aceite (mL)	T-CT (mL)	Agua (mL)	Total (mL)	% Aceite	% T-CT	% Agua
9	1	13.00	23.00	4.35	39.13	56.52
8	2	4.50	14.50	13.79	55.17	31.03
7	3	1.40	11.40	26.32	61.40	12.28
6	4	1.10	11.10	36.04	54.05	9.91
5	5	0.45	10.45	45.05	45.05	9.91
4	6	0.15	10.15	59.41	39.60	0.99
3	7	0.00	10.00	0.70	0.30	0.00
2	8	0.00	10.00	0.80	0.20	0.00
1	9	0.00	10.00	0.90	0.10	0.00

f) Palmitato de isopropilo como aceite y como T-CT Tween® 80 / etanol 3:1

Aceite (mL)	T-CT (mL)	Agua (mL)	Total (mL)	% Aceite	% T-CT	% Agua
9	1	210.00	220.00	0.45	4.09	95.45
8	2	8.65	18.65	10.72	42.90	46.38
7	3	3.25	13.25	22.64	52.83	24.53
6	4	1.85	11.85	33.77	50.65	15.58
5	5	1.10	11.10	45.05	45.05	9.91
4	6	0.10	10.10	59.41	39.60	0.99
3	7	0.00	10.00	0.70	0.30	0.00
2	8	0.00	10.00	0.80	0.20	0.00
1	9	0.00	10.00	0.90	0.10	0.00

g) Miristato de isopropilo como aceite y como T-CT Tween® 20 / etanol 2:1

Aceite (mL)	T-CT (mL)	Agua (mL)	Total (mL)	% Aceite	% T-CT	% Agua
9	1	9.35	19.35	5.17	46.51	48.32
8	2	2.15	12.15	16.46	65.84	17.70
7	3	0.45	10.45	28.71	66.99	4.31
6	4	0.15	10.15	39.41	59.11	1.48
5	5	0.00	10.00	0.50	0.40	0.00
4	6	0.00	10.00	0.60	0.40	0.00
3	7	0.00	10.00	0.70	0.30	0.00
2	8	0.00	10.00	0.80	0.20	0.00
1	9	0.00	10.00	0.90	0.10	0.00

h) Miristato de isopropilo como aceite y como T-CT Tween® 80 / etanol 2:1

Aceite (mL)	T-CT (mL)	Agua (mL)	Total (mL)	% Aceite	% T-CT	% Agua
9	1	230.00	240.00	0.42	3.75	95.83
8	2	9.74	19.74	10.13	40.51	49.37
7	3	3.35	13.35	22.47	52.43	25.09
6	4	1.55	11.55	34.63	51.95	13.42
5	5	1.05	11.05	45.25	45.25	9.50
4	6	0.35	10.35	57.97	38.65	3.38
3	7	0.00	10.00	0.70	0.30	0.00
2	8	0.00	10.00	0.80	0.20	0.00
1	9	0.00	10.00	0.90	0.10	0.00

ANEXO 3. Preparación de los medios de disolución para los métodos analíticos.

a) Medio de disolución para el Método 1.

Fluido vaginal simulado pH = 4.2 (FVS) con Tween® 20 al 3 %, el FVS se obtuvo a partir de la formulación propuesta por Owen D. and Katz D. (1999).

Tabla 2. Formulación para un litro de FVS

Ingredientes	Gramos (g)
NaCl	3.510
KOH	1.400
Ca(OH) ₂	0.222
Ácido láctico	2.000
Ácido acético glacial	1.000
Urea	0.400
Glucosa	5.000
Glicerina	0.160

Procedimiento para la preparación del FVS con Tween® 20 al 3 % (p / v):

1. Se pesan todos los ingredientes de la formulación en la balanza analítica VELAB VE-204 y se mezclan en 900 mL de agua desionizada hasta su total disolución. A esta solución se le midió el pH mediante un potenciómetro HANNA INSTRUMENTS® y se ajustó el pH a 4.2 ± 1 con gotas de HCL 0.1 N.
2. La solución se trasvasó a un matraz volumétrico de un litro y se aforó con agua desionizada (FVS).
3. Se pesó la cantidad necesaria de Tween® 20 para obtener una concentración de 3 % (p / v) y se disuelve en FVS, agitando hasta su total disolución.
4. Por último. se lleva al volumen final requerido con FVS.

b) Medio de disolución para el método 2.**Método A**

Buffer de fosfatos pH = 7.4 (Fosfato monobásico de potasio – hidróxido de sodio).

1. En un matraz volumétrico de 1000 mL, mezclar 250 mL de solución de fosfato monobásico de potasio 0.2 M con 197.5 mL de solución 0.2 M de hidróxido de sodio y llevar al aforo con agua desionizada.

Buffer de fosfatos pH = 7.4 con Tween® 20 al 3 %

2. A esta solución se le midió el pH mediante un potenciómetro HANNA INSTRUMENTS®.
3. Se pesó la cantidad necesaria de Tween® 20 para obtener una concentración de 3 % (p / v) y se disuelve con la solución amortiguadora de fosfatos, agitando hasta su total disolución.
4. Por último, se lleva al volumen final requerido con la solución amortiguadora de fosfatos.

Método B

FVS pH = 4.2 ± 0.1 con Tween® 20 al 3 % (ver método 1) en contacto con la cara interna de la vagina de cerda. La cara interna de la vagina se mantuvo en contacto con la solución amortiguadora de fosfatos durante 24 h con agitación constante. posteriormente se filtró a través de una membrana de 0.45 µm.

c) Medio de disolución para el método 3.

Metanol en contacto con porciones de vagina. Se colocan trozos de vagina de cerda en metanol durante 24 horas con agitación constante y posteriormente se filtró a través de una membrana de 0.45 µm.

ANEXO 4. Resultados de los perfiles de liberación *in vitro* de las ME's.

a) Liberación del CTZ (1 %) en la ME 2.

Sistema 1							
t (h)	Abs	Conc. (µg / mL)	µg de CTZ	Cant. retenida µg	Cant. acumulada	Cant. corregida µg	% liberado
0.25	0.014	4.695	469.565	14.086	14.086	483.652	4.836
0.5	0.018	6.434	643.478	19.304	33.391	676.869	6.768
0.75	0.020	7.304	730.434	21.913	55.304	785.739	7.857
1	0.022	8.173	817.391	24.521	79.826	897.217	8.972
2	0.024	9.043	904.347	27.130	106.956	1011.304	10.113
4	0.027	10.347	1034.782	31.043	166.434	1201.217	12.012
6	0.032	12.521	1252.173	37.565	204.000	1456.173	14.561
8	0.034	13.391	1339.130	40.173	244.173	1583.304	15.833
24	0.044	17.739	1773.913	53.217	297.391	2071.304	20.713
48	0.058	23.826	2382.608	71.478	536.347	2918.956	29.189
72	0.065	26.869	2686.956	80.608	691.043	3378.000	33.780
Sistema 2							
t (h)	Abs	Conc. (µg / mL)	µg de CTZ	Cant. retenida µg	Cant. acumulada	Cant. corregida µg	% liberado
0.25	0.018	6.434	643.478	19.304	19.304	662.782	6.627
0.5	0.02	7.304	730.434	21.913	41.217	771.652	7.716
0.75	0.023	8.608	860.869	25.826	67.043	927.913	9.279
1	0.024	9.043	904.347	27.130	94.173	998.521	9.985
2	0.026	9.913	991.304	29.739	123.913	1115.217	11.152
4	0.028	10.782	1078.260	32.347	187.304	1265.565	12.655
6	0.032	12.521	1252.173	37.565	224.869	1477.043	14.770
8	0.035	13.826	1382.608	41.478	266.347	1648.956	16.489
24	0.045	18.173	1817.391	54.521	320.869	2138.260	21.382
48	0.058	23.826	2382.608	71.478	562.434	2945.043	29.450
72	0.067	27.739	2773.913	83.217	722.347	3496.260	34.962
Sistema 3							
t (h)	Abs	Conc. (µg / mL)	µg de CTZ	Cant. retenida µg	Cant. acumulada	Cant. corregida µg	% liberado
0.25	0.016	5.565	556.521	16.695	16.695	573.217	5.732
0.5	0.018	6.434	643.478	19.304	36.000	679.478	6.794
0.75	0.02	7.304	730.434	21.913	57.913	788.347	7.883
2	0.024	9.043	904.347	27.130	110.869	1015.217	10.151
4	0.026	9.913	991.304	29.739	169.043	1160.347	11.603
6	0.03	11.652	1165.217	34.956	204.000	1369.217	13.692
8	0.036	14.260	1426.086	42.782	246.782	1672.869	16.728
24	0.048	19.478	1947.826	58.434	305.217	2253.043	22.530
48	0.057	23.391	2339.130	70.173	553.304	2892.434	28.924
72	0.065	26.869	2686.956	80.608	709.304	3396.260	33.962

Sistema 4							
t (h)	Abs	Conc. (µg / mL)	µg de CTZ	Cant. retenida µg	Cant. acumulada	Cant. corregida µg	% liberado
0.25	0.015	5.130	513.043	15.391	15.391	528.435	5.284
0.5	0.017	6.000	600.000	18.000	33.391	633.391	6.334
0.75	0.018	6.435	643.478	19.304	52.696	696.174	6.962
1	0.020	7.304	730.435	21.913	74.609	805.043	8.050
2	0.022	8.174	817.391	24.522	99.130	916.522	9.165
4	0.025	9.478	947.826	28.435	153.391	1101.217	11.012
6	0.028	10.783	1078.261	32.348	185.739	1264.000	12.640
8	0.030	11.652	1165.217	34.957	220.696	1385.913	13.859
24	0.048	19.478	1947.826	58.435	279.130	2226.957	22.270
48	0.065	26.870	2686.957	80.609	681.913	3368.870	33.689
72	0.069	28.609	2860.870	85.826	848.348	3709.217	37.092

Sistema 5							
t (h)	Abs	Conc. (µg / mL)	µg de CTZ	Cant. retenida µg	Cant. acumulada	Cant. corregida µg	% liberado
0.25	0.018	6.435	643.478	19.304	19.304	662.783	6.628
0.5	0.020	7.304	730.435	21.913	41.217	771.652	7.717
0.75	0.023	8.609	860.870	25.826	67.043	927.913	9.279
1	0.026	9.913	991.304	29.739	96.783	1088.087	10.881
2	0.029	11.217	1121.739	33.652	130.435	1252.174	12.522
4	0.031	12.087	1208.696	36.261	201.652	1410.348	14.103
6	0.036	14.261	1426.087	42.783	244.435	1670.522	16.705
8	0.036	14.261	1426.087	42.783	287.217	1713.304	17.133
24	0.049	19.913	1991.304	59.739	346.957	2338.261	23.383
48	0.061	25.130	2513.043	75.391	605.478	3118.522	31.185
72	0.069	28.609	2860.870	85.826	770.609	3631.478	36.315

Sistema 6							
t (h)	Abs	Conc. (µg / mL)	µg de CTZ	Cant. retenida µg	Cant. acumulada	Cant. corregida µg	% liberado
0.25	0.016	5.565	556.522	16.696	16.696	573.217	5.732
0.5	0.018	6.435	643.478	19.304	36.000	679.478	6.795
0.75	0.020	7.304	730.435	21.913	57.913	788.348	7.883
1	0.022	8.174	817.391	24.522	82.435	899.826	8.998
2	0.023	8.609	860.870	25.826	108.261	969.130	9.691
4	0.025	9.478	947.826	28.435	163.826	1111.652	11.117
6	0.028	10.783	1078.261	32.348	196.174	1274.435	12.744
8	0.030	11.652	1165.217	34.957	231.130	1396.348	13.963
24	0.045	18.174	1817.391	54.522	285.652	2103.043	21.030
48	0.055	22.522	2252.174	67.565	523.304	2775.478	27.755
72	0.069	28.609	2860.870	85.826	683.217	3544.087	35.441

b) Liberación del CTZ (1 %) en la ME 4.

Sistema 1							
t (h)	Abs	Conc. (µg / mL)	µg de CTZ	Cant. retenida µg	Cant. acumulada	Cant. corregida µg	% liberado
0.25	0.018	6.435	643.478	19.304	19.304	662.783	6.628
0.5	0.020	7.304	730.435	21.913	41.217	771.652	7.717
0.75	0.021	7.739	773.913	23.217	64.435	838.348	8.383
1	0.022	8.174	817.391	24.522	88.957	906.348	9.063
2	0.023	8.609	860.870	25.826	114.783	975.652	9.757
4	0.027	10.348	1034.783	31.043	172.957	1207.739	12.077
6	0.030	11.652	1165.217	34.957	207.913	1373.130	13.731
8	0.032	12.522	1252.174	37.565	245.478	1497.652	14.977
24	0.042	16.870	1686.957	50.609	296.087	1983.043	19.830
48	0.052	21.217	2121.739	63.652	359.739	2481.478	24.815
72	0.056	22.957	2295.652	68.870	428.609	2724.261	27.243
Sistema 2							
t (h)	Abs	Conc. (µg / mL)	µg de CTZ	Cant. retenida µg	Cant. acumulada	Cant. corregida µg	% liberado
0.25	0.014	4.696	469.565	14.087	14.087	483.652	4.837
0.5	0.016	5.565	556.522	16.696	30.783	587.304	5.873
0.75	0.018	6.435	643.478	19.304	50.087	693.565	6.936
1	0.022	8.174	817.391	24.522	74.609	892.000	8.920
2	0.025	9.478	947.826	28.435	103.043	1050.870	10.509
4	0.027	10.348	1034.783	31.043	165.130	1199.913	11.999
6	0.034	13.391	1339.130	40.174	205.304	1544.435	15.444
8	0.036	14.261	1426.087	42.783	647.217	2073.304	20.733
24	0.041	16.435	1643.478	49.304	696.522	2340.000	23.400
48	0.060	24.696	2469.565	74.087	770.609	3240.174	32.402
72	0.065	26.870	2686.957	80.609	851.217	3538.174	35.382
Sistema 3							
t (h)	Abs	Conc. (µg / mL)	µg de CTZ	Cant. retenida µg	Cant. acumulada	Cant. corregida µg	% liberado
0.25	0.014	4.696	469.565	14.087	14.087	483.652	4.837
0.5	0.015	5.130	513.043	15.391	29.478	542.522	5.425
0.75	0.019	6.870	686.957	20.609	50.087	737.043	7.370
1	0.021	7.739	773.913	23.217	73.304	847.217	8.472
2	0.023	8.609	860.870	25.826	99.130	960.000	9.600
4	0.025	9.478	947.826	28.435	154.696	1102.522	11.025
6	0.037	14.696	1469.565	44.087	198.783	1668.348	16.683
8	0.038	15.130	1513.043	45.391	244.174	1757.217	17.572
24	0.039	15.565	1556.522	46.696	290.870	1847.391	18.474
48	0.054	22.087	2208.696	66.261	357.130	2565.826	25.658
72	0.062	25.565	2556.522	76.696	433.826	2990.348	29.903

Sistema 4							
t (h)	Abs	Conc. (µg / mL)	µg de CTZ	Cant. retenida µg	Cant. acumulada	Cant. corregida µg	% liberado
0.25	0.015	5.130	513.043	15.391	15.391	528.435	5.284
0.5	0.016	5.565	556.522	16.696	32.087	588.609	5.886
0.75	0.018	6.435	643.478	19.304	51.391	694.870	6.949
1	0.020	7.304	730.435	21.913	73.304	803.739	8.037
2	0.021	7.739	773.913	23.217	96.522	870.435	8.704
4	0.024	9.043	904.348	27.130	149.478	1053.826	10.538
6	0.028	10.783	1078.261	32.348	181.826	1260.087	12.601
8	0.032	12.522	1252.174	37.565	219.391	1471.565	14.716
24	0.038	15.130	1513.043	45.391	264.783	1777.826	17.778
48	0.054	22.087	2208.696	66.261	331.043	2539.739	25.397
72	0.060	24.696	2469.565	74.087	405.130	2874.696	28.747
Sistema 5							
t (h)	Abs	Conc. (µg / mL)	µg de CTZ	Cant. retenida µg	Cant. acumulada	Cant. corregida µg	% liberado
0.25	0.015	5.130	513.043	15.391	15.391	528.435	5.284
0.5	0.017	6.000	600.000	18.000	33.391	633.391	6.334
0.75	0.019	6.870	686.957	20.609	54.000	740.957	7.410
1	0.020	7.304	730.435	21.913	75.913	806.348	8.063
2	0.023	8.609	860.870	25.826	101.739	962.609	9.626
4	0.031	12.087	1208.696	36.261	166.435	1375.130	13.751
6	0.034	13.391	1339.130	40.174	206.609	1545.739	15.457
8	0.036	14.261	1426.087	42.783	249.391	1675.478	16.755
24	0.044	17.739	1773.913	53.217	302.609	2076.522	20.765
48	0.066	27.304	2730.435	81.913	384.522	3114.957	31.150
72	0.070	29.043	2904.348	87.130	471.652	3376.000	33.760
Sistema 6							
t (h)	Abs	Conc. (µg / mL)	µg de CTZ	Cant. retenida µg	Cant. acumulada	Cant. corregida µg	% liberado
0.25	0.014	4.696	469.565	14.087	14.087	483.652	4.837
0.5	0.016	5.565	556.522	16.696	30.783	587.304	5.873
0.75	0.018	6.435	643.478	19.304	50.087	693.565	6.936
1	0.020	7.304	730.435	21.913	72.000	802.435	8.024
2	0.022	8.174	817.391	24.522	96.522	913.913	9.139
4	0.025	9.478	947.826	28.435	152.087	1099.913	10.999
6	0.035	13.826	1382.609	41.478	193.565	1576.174	15.762
8	0.036	14.261	1426.087	42.783	236.348	1662.435	16.624
24	0.038	15.130	1513.043	45.391	281.739	1794.783	17.948
48	0.055	22.522	2252.174	67.565	349.304	2601.478	26.015
72	0.061	25.130	2513.043	75.391	424.696	2937.739	29.377

c) Liberación del CTZ (2 %) en la ME 4.

Sistema 1							
t (h)	Abs	Conc. (µg / mL)	µg de CTZ	Cant. retenida µg	Cant. acumulada	Cant. corregida µg	% liberado
0.25	0.007	1.652	330.435	4.957	8.609	339.043	1.695
0.5	0.011	3.391	678.261	10.174	18.783	697.043	3.485
0.75	0.015	5.130	1026.087	15.391	34.174	1060.261	5.301
1	0.018	6.435	1286.957	19.304	53.478	1340.435	6.702
2	0.023	8.609	1721.739	25.826	79.304	1801.043	9.005
4	0.029	11.217	2243.478	33.652	144.000	2387.478	11.937
6	0.030	11.652	2330.435	34.957	178.957	2509.391	12.547
8	0.032	12.522	2504.348	37.565	216.522	2720.870	13.604
24	0.044	17.739	3547.826	53.217	269.739	3817.565	19.088
48	0.058	23.826	4765.217	71.478	341.217	5106.435	25.532
72	0.068	28.174	5634.783	84.522	425.739	6060.522	30.303
Sistema 2							
t (h)	Abs	Conc. (µg / mL)	µg de CTZ	Cant. retenida µg	Cant. acumulada	Cant. corregida µg	% liberado
0.25	0.008	2.087	417.391	6.261	11.217	428.609	2.143
0.5	0.011	3.391	678.261	10.174	21.391	699.652	3.498
0.75	0.013	4.261	852.174	12.783	34.174	886.348	4.432
1	0.015	5.130	1026.087	15.391	49.565	1075.652	5.378
2	0.018	6.435	1286.957	19.304	68.870	1355.826	6.779
4	0.023	8.609	1721.739	25.826	117.913	1839.652	9.198
6	0.025	9.478	1895.652	28.435	146.348	2042.000	10.210
8	0.027	10.348	2069.565	31.043	177.391	2246.957	11.235
24	0.035	13.826	2765.217	41.478	218.870	2984.087	14.920
48	0.045	18.174	3634.783	54.522	273.391	3908.174	19.541
72	0.058	23.826	4765.217	71.478	344.870	5110.087	25.550
Sistema 3							
t (h)	Abs	Conc. (µg / mL)	µg de CTZ	Cant. retenida µg	Cant. acumulada	Cant. corregida µg	% liberado
0.25	0.009	2.522	504.348	7.565	11.217	515.565	2.578
0.5	0.010	2.957	591.304	8.870	20.087	611.391	3.057
0.75	0.013	4.261	852.174	12.783	32.870	885.043	4.425
1	0.015	5.130	1026.087	15.391	48.261	1074.348	5.372
2	0.017	6.000	1200.000	18.000	66.261	1266.261	6.331
4	0.022	8.174	1634.783	24.522	111.391	1746.174	8.731
6	0.026	9.913	1982.609	29.739	141.130	2123.739	10.619
8	0.028	10.783	2156.522	32.348	173.478	2330.000	11.650
24	0.035	13.826	2765.217	41.478	214.957	2980.174	14.901
48	0.044	17.739	3547.826	53.217	268.174	3816.000	19.080
72	0.057	23.391	4678.261	70.174	338.348	5016.609	25.083

Sistema 4							
t (h)	Abs	Conc. (µg / mL)	µg de CTZ	Cant. retenida µg	Cant. acumulada	Cant. corregida µg	% liberado
0.25	0.01	2.96	591.30	8.87	16.43	607.74	3.04
0.5	0.01	4.70	939.13	14.09	30.52	969.65	4.85
0.75	0.02	6.00	1200.00	18.00	48.52	1248.52	6.24
1	0.02	6.43	1286.96	19.30	67.83	1354.78	6.77
2	0.02	9.04	1808.70	27.13	94.96	1903.65	9.52
4	0.03	10.35	2069.57	31.04	155.74	2225.30	11.13
6	0.03	11.22	2243.48	33.65	189.39	2432.87	12.16
8	0.03	11.65	2330.43	34.96	224.35	2554.78	12.77
24	0.04	16.00	3200.00	48.00	272.35	3472.35	17.36
48	0.05	18.17	3634.78	54.52	326.87	3961.65	19.81
72	0.06	24.26	4852.17	72.78	399.65	5251.83	26.26

Sistema 5							
t (h)	Abs	Conc. (µg / mL)	µg de CTZ	Cant. retenida µg	Cant. acumulada	Cant. corregida µg	% liberado
0.25	0.009	2.522	504.348	7.565	13.826	518.174	2.591
0.5	0.013	4.261	852.174	12.783	26.609	878.783	4.394
0.75	0.014	4.696	939.130	14.087	40.696	979.826	4.899
1	0.016	5.565	1113.043	16.696	57.391	1170.435	5.852
2	0.020	7.304	1460.870	21.913	79.304	1540.174	7.701
4	0.026	9.913	1982.609	29.739	133.565	2116.174	10.581
6	0.028	10.783	2156.522	32.348	165.913	2322.435	11.612
8	0.030	11.652	2330.435	34.957	200.870	2531.304	12.657
24	0.037	14.696	2939.130	44.087	244.957	3184.087	15.920
48	0.045	18.174	3634.783	54.522	299.478	3934.261	19.671
72	0.056	22.957	4591.304	68.870	368.348	4959.652	24.798

Sistema 6							
t (h)	Abs	Conc. (µg / mL)	µg de CTZ	Cant. retenida µg	Cant. acumulada	Cant. corregida µg	% liberado
0.25	0.009	2.522	504.348	7.565	13.826	518.174	2.591
0.5	0.011	3.391	678.261	10.174	24.000	702.261	3.511
0.75	0.014	4.696	939.130	14.087	38.087	977.217	4.886
1	0.015	5.130	1026.087	15.391	53.478	1079.565	5.398
2	0.017	6.000	1200.000	18.000	71.478	1271.478	6.357
4	0.022	8.174	1634.783	24.522	119.217	1754.000	8.770
6	0.024	9.043	1808.696	27.130	146.348	1955.043	9.775
8	0.027	10.348	2069.565	31.043	177.391	2246.957	11.235
24	0.034	13.391	2678.261	40.174	217.565	2895.826	14.479
48	0.044	17.739	3547.826	53.217	270.783	3818.609	19.093
72	0.060	24.696	4939.130	74.087	344.870	5284.000	26.420

ANEXO 5. Modelos matemáticos aplicados a los perfiles de liberación *in vitro*.

a) Liberación del CTZ (1 %) en la ME 2.

Sistema 1								
t (h)	$t^{1/2}$	ln t	Mt	ln Mt	(Mt / Ma) * 100	ln(Mt / Ma)	Mt / Ma	Mt ^{1/3}
0.25	0.500	-1.386	483.652	6.181	4.837	-3.029	0.048	7.850
0.5	0.707	-0.693	676.870	6.517	6.769	-2.693	0.068	8.780
0.75	0.866	-0.288	785.739	6.667	7.857	-2.544	0.079	9.228
1	1.000	0.000	897.217	6.799	8.972	-2.411	0.090	9.645
2	1.414	0.693	1011.304	6.919	10.113	-2.291	0.101	10.038
4	2.000	1.386	1201.217	7.091	12.012	-2.119	0.120	10.630
6	2.449	1.792	1456.174	7.284	14.562	-1.927	0.146	11.335
8	2.828	2.079	1583.304	7.367	15.833	-1.843	0.158	11.655
24	4.899	3.178	2071.304	7.636	20.713	-1.574	0.207	12.747
48	6.928	3.871	2918.957	7.979	29.190	-1.231	0.292	14.291
72	8.485	4.277	3378.000	8.125	33.780	-1.085	0.338	15.004

Sistema 2								
t (h)	$t^{1/2}$	ln t	Mt	ln Mt	(Mt / Ma) * 100	ln(Mt / Ma)	Mt / Ma	Mt ^{1/3}
0.25	0.500	-1.386	662.783	6.496	6.628	-2.714	0.066	8.719
0.5	0.707	-0.693	771.652	6.649	7.717	-2.562	0.077	9.172
0.75	0.866	-0.288	927.913	6.833	9.279	-2.377	0.093	9.754
1	1.000	0.000	998.522	6.906	9.985	-2.304	0.100	9.995
2	1.414	0.693	1115.217	7.017	11.152	-2.194	0.112	10.370
4	2.000	1.386	1265.565	7.143	12.656	-2.067	0.127	10.817
6	2.449	1.792	1477.043	7.298	14.770	-1.913	0.148	11.388
8	2.828	2.079	1648.957	7.408	16.490	-1.802	0.165	11.814
24	4.899	3.178	2138.261	7.668	21.383	-1.543	0.214	12.883
48	6.928	3.871	2945.043	7.988	29.450	-1.222	0.295	14.334
72	8.485	4.277	3496.261	8.159	34.963	-1.051	0.350	15.178

Sistema 3								
t (h)	$t^{1/2}$	ln t	Mt	ln Mt	(Mt / Ma) * 100	ln(Mt / Ma)	Mt / Ma	Mt ^{1/3}
0.25	0.500	-1.386	573.217	6.351	5.732	-2.859	0.057	8.307
0.5	0.707	-0.693	679.478	6.521	6.795	-2.689	0.068	8.791
0.75	0.866	-0.288	788.348	6.670	7.883	-2.540	0.079	9.238
1	1.000	0.000	944.609	6.851	9.446	-2.360	0.094	9.812
2	1.414	0.693	1015.217	6.923	10.152	-2.287	0.102	10.050
4	2.000	1.386	1160.348	7.056	11.603	-2.154	0.116	10.508
6	2.449	1.792	1369.217	7.222	13.692	-1.988	0.137	11.104
8	2.828	2.079	1672.870	7.422	16.729	-1.788	0.167	11.871
24	4.899	3.178	2253.043	7.720	22.530	-1.490	0.225	13.110
48	6.928	3.871	2892.435	7.970	28.924	-1.240	0.289	14.248
72	8.485	4.277	3396.261	8.130	33.963	-1.080	0.340	15.031

Sistema 4								
t (h)	t ^{1/2}	ln t	Mt	ln Mt	(Mt / Ma) * 100	ln(Mt / Ma)	Mt / Ma	Mt ^{1/3}
0.25	0.500	-1.386	528.435	6.270	5.284	-2.940	0.053	8.085
0.5	0.707	-0.693	633.391	6.451	6.334	-2.759	0.063	8.588
0.75	0.866	-0.288	696.174	6.546	6.962	-2.665	0.070	8.863
1	1.000	0.000	805.043	6.691	8.050	-2.519	0.081	9.303
2	1.414	0.693	916.522	6.821	9.165	-2.390	0.092	9.714
4	2.000	1.386	1101.217	7.004	11.012	-2.206	0.110	10.327
6	2.449	1.792	1264.000	7.142	12.640	-2.068	0.126	10.812
8	2.828	2.079	1385.913	7.234	13.859	-1.976	0.139	11.149
24	4.899	3.178	2226.957	7.708	22.270	-1.502	0.223	13.059
48	6.928	3.871	3368.870	8.122	33.689	-1.088	0.337	14.991
72	8.485	4.277	3709.217	8.219	37.092	-0.992	0.371	15.480

Sistema 5								
t (h)	t ^{1/2}	ln t	Mt	ln Mt	(Mt / Ma) * 100	ln(Mt / Ma)	Mt / Ma	Mt ^{1/3}
0.25	0.500	-1.386	662.783	6.496	6.628	-2.714	0.066	8.719
0.5	0.707	-0.693	771.652	6.649	7.717	-2.562	0.077	9.172
0.75	0.866	-0.288	927.913	6.833	9.279	-2.377	0.093	9.754
1	1.000	0.000	1088.087	6.992	10.881	-2.218	0.109	10.285
2	1.414	0.693	1252.174	7.133	12.522	-2.078	0.125	10.778
4	2.000	1.386	1410.348	7.252	14.103	-1.959	0.141	11.214
6	2.449	1.792	1670.522	7.421	16.705	-1.789	0.167	11.865
8	2.828	2.079	1713.304	7.446	17.133	-1.764	0.171	11.966
24	4.899	3.178	2338.261	7.757	23.383	-1.453	0.234	13.273
48	6.928	3.871	3118.522	8.045	31.185	-1.165	0.312	14.610
72	8.485	4.277	3631.478	8.197	36.315	-1.013	0.363	15.371

Sistema 6								
t (h)	t ^{1/2}	ln t	Mt	ln Mt	(Mt / Ma) * 100	ln(Mt / Ma)	Mt / Ma	Mt ^{1/3}
0.25	0.500	-1.386	573.217	6.351	5.732	-2.859	0.057	8.307
0.5	0.707	-0.693	679.478	6.521	6.795	-2.689	0.068	8.791
0.75	0.866	-0.288	788.348	6.670	7.883	-2.540	0.079	9.238
1	1.000	0.000	899.826	6.802	8.998	-2.408	0.090	9.654
2	1.414	0.693	969.130	6.876	9.691	-2.334	0.097	9.896
4	2.000	1.386	1111.652	7.014	11.117	-2.197	0.111	10.359
6	2.449	1.792	1274.435	7.150	12.744	-2.060	0.127	10.842
8	2.828	2.079	1396.348	7.242	13.963	-1.969	0.140	11.177
24	4.899	3.178	2103.043	7.651	21.030	-1.559	0.210	12.812
48	6.928	3.871	2775.478	7.929	27.755	-1.282	0.278	14.053
72	8.485	4.277	3544.087	8.173	35.441	-1.037	0.354	15.246

b) Liberación del CTZ (1 %) en la ME 4.

Sistema 1								
t (h)	t ^{1/2}	ln t	Mt	ln Mt	(Mt / Ma) * 100	ln(Mt / Ma)	Mt / Ma	Mt ^{1/3}
0.25	0.500	-1.386	662.783	6.496	6.628	-2.714	0.066	8.719
0.5	0.707	-0.693	771.652	6.649	7.717	-2.562	0.077	9.172
0.75	0.866	-0.288	838.348	6.731	8.383	-2.479	0.084	9.429
1	1.000	0.000	906.348	6.809	9.063	-2.401	0.091	9.678
2	1.414	0.693	975.652	6.883	9.757	-2.327	0.098	9.918
4	2.000	1.386	1207.739	7.097	12.077	-2.114	0.121	10.649
6	2.449	1.792	1373.130	7.225	13.731	-1.985	0.137	11.115
8	2.828	2.079	1497.652	7.312	14.977	-1.899	0.150	11.441
24	4.899	3.178	1983.043	7.592	19.830	-1.618	0.198	12.564
48	6.928	3.871	2481.478	7.817	24.815	-1.394	0.248	13.538
72	8.485	4.277	2724.261	7.910	27.243	-1.300	0.272	13.966
Sistema 2								
t (h)	t ^{1/2}	ln t	Mt	ln Mt	(Mt / Ma) * 100	ln(Mt / Ma)	Mt / Ma	Mt ^{1/3}
0.25	0.500	-1.386	483.652	6.181	4.837	-3.029	0.048	7.850
0.5	0.707	-0.693	587.304	6.376	5.873	-2.835	0.059	8.374
0.75	0.866	-0.288	693.565	6.542	6.936	-2.668	0.069	8.852
1	1.000	0.000	892.000	6.793	8.920	-2.417	0.089	9.626
2	1.414	0.693	1050.870	6.957	10.509	-2.253	0.105	10.167
4	2.000	1.386	1199.913	7.090	11.999	-2.120	0.120	10.626
6	2.449	1.792	1544.435	7.342	15.444	-1.868	0.154	11.559
8	2.828	2.079	2073.304	7.637	20.733	-1.573	0.207	12.751
24	4.899	3.178	2340.000	7.758	23.400	-1.452	0.234	13.276
48	6.928	3.871	3240.174	8.083	32.402	-1.127	0.324	14.798
72	8.485	4.277	3538.174	8.171	35.382	-1.039	0.354	15.238
Sistema 3								
t (h)	t ^{1/2}	ln t	Mt	ln Mt	(Mt / Ma) * 100	ln(Mt / Ma)	Mt / Ma	Mt ^{1/3}
0.25	0.500	-1.386	483.652	6.181	4.837	-3.029	0.048	7.850
0.5	0.707	-0.693	542.522	6.296	5.425	-2.914	0.054	8.156
0.75	0.866	-0.288	737.043	6.603	7.370	-2.608	0.074	9.033
1	1.000	0.000	847.217	6.742	8.472	-2.468	0.085	9.462
2	1.414	0.693	960.000	6.867	9.600	-2.343	0.096	9.865
4	2.000	1.386	1102.522	7.005	11.025	-2.205	0.110	10.331
6	2.449	1.792	1668.348	7.420	16.683	-1.791	0.167	11.860
8	2.828	2.079	1757.217	7.471	17.572	-1.739	0.176	12.067
24	4.899	3.178	1847.391	7.522	18.474	-1.689	0.185	12.270
48	6.928	3.871	2565.826	7.850	25.658	-1.360	0.257	13.690
72	8.485	4.277	2990.348	8.003	29.903	-1.207	0.299	14.407

Sistema 4								
t (h)	t ^{1/2}	ln t	Mt	ln Mt	(Mt / Ma) * 100	ln(Mt / Ma)	Mt / Ma	Mt ^{1/3}
0.25	0.500	-1.386	528.435	6.270	5.284	-2.940	0.053	8.085
0.5	0.707	-0.693	588.609	6.378	5.886	-2.833	0.059	8.381
0.75	0.866	-0.288	694.870	6.544	6.949	-2.667	0.069	8.857
1	1.000	0.000	803.739	6.689	8.037	-2.521	0.080	9.298
2	1.414	0.693	870.435	6.769	8.704	-2.441	0.087	9.548
4	2.000	1.386	1053.826	6.960	10.538	-2.250	0.105	10.176
6	2.449	1.792	1260.087	7.139	12.601	-2.071	0.126	10.801
8	2.828	2.079	1471.565	7.294	14.716	-1.916	0.147	11.374
24	4.899	3.178	1777.826	7.483	17.778	-1.727	0.178	12.114
48	6.928	3.871	2539.739	7.840	25.397	-1.371	0.254	13.644
72	8.485	4.277	2874.696	7.964	28.747	-1.247	0.287	14.219

Sistema 5								
t (h)	t ^{1/2}	ln t	Mt	ln Mt	(Mt / Ma) * 100	ln(Mt / Ma)	Mt / Ma	Mt ^{1/3}
0.25	0.500	-1.386	528.435	6.270	5.284	-2.940	0.053	8.085
0.5	0.707	-0.693	633.391	6.451	6.334	-2.759	0.063	8.588
0.75	0.866	-0.288	740.957	6.608	7.410	-2.602	0.074	9.049
1	1.000	0.000	806.348	6.693	8.063	-2.518	0.081	9.308
2	1.414	0.693	962.609	6.870	9.626	-2.341	0.096	9.874
4	2.000	1.386	1375.130	7.226	13.751	-1.984	0.138	11.120
6	2.449	1.792	1545.739	7.343	15.457	-1.867	0.155	11.562
8	2.828	2.079	1675.478	7.424	16.755	-1.786	0.168	11.877
24	4.899	3.178	2076.522	7.638	20.765	-1.572	0.208	12.758
48	6.928	3.871	3114.957	8.044	31.150	-1.166	0.311	14.604
72	8.485	4.277	3376.000	8.124	33.760	-1.086	0.338	15.001

Sistema 6								
t (h)	t ^{1/2}	ln t	Mt	ln Mt	(Mt / Ma) * 100	ln(Mt / Ma)	Mt / Ma	Mt ^{1/3}
0.25	0.500	-1.386	483.652	6.181	4.837	-3.029	0.048	7.850
0.5	0.707	-0.693	587.304	6.376	5.873	-2.835	0.059	8.374
0.75	0.866	-0.288	693.565	6.542	6.936	-2.668	0.069	8.852
1	1.000	0.000	802.435	6.688	8.024	-2.523	0.080	9.293
2	1.414	0.693	913.913	6.818	9.139	-2.393	0.091	9.704
4	2.000	1.386	1099.913	7.003	10.999	-2.207	0.110	10.323
6	2.449	1.792	1576.174	7.363	15.762	-1.848	0.158	11.638
8	2.828	2.079	1662.435	7.416	16.624	-1.794	0.166	11.846
24	4.899	3.178	1794.783	7.493	17.948	-1.718	0.179	12.153
48	6.928	3.871	2601.478	7.864	26.015	-1.347	0.260	13.753
72	8.485	4.277	2937.739	7.985	29.377	-1.225	0.294	14.322

c) Liberación del CTZ (2 %) en la ME 4.

Sistema 1								
t (h)	t ^{1/2}	ln t	Mt	ln Mt	(Mt / Ma) * 100	ln(Mt / Ma)	Mt / Ma	Mt ^{1/3}
0.25	0.500	-1.386	428.609	6.061	4.286	-3.150	0.043	7.540
0.5	0.707	-0.693	699.652	6.551	6.997	-2.660	0.070	8.878
0.75	0.866	-0.288	886.348	6.787	8.863	-2.423	0.089	9.606
1	1.000	0.000	1075.652	6.981	10.757	-2.230	0.108	10.246
2	1.414	0.693	1355.826	7.212	13.558	-1.998	0.136	11.068
4	2.000	1.386	1839.652	7.517	18.397	-1.693	0.184	12.253
6	2.449	1.792	2042.000	7.622	20.420	-1.589	0.204	12.687
8	2.828	2.079	2246.957	7.717	22.470	-1.493	0.225	13.098
24	4.899	3.178	2984.087	8.001	29.841	-1.209	0.298	14.397
48	6.928	3.871	3908.174	8.271	39.082	-0.940	0.391	15.752
72	8.485	4.277	5110.087	8.539	51.101	-0.671	0.511	17.224
Sistema 2								
t (h)	t ^{1/2}	ln t	Mt	ln Mt	(Mt / Ma) * 100	ln(Mt / Ma)	Mt / Ma	Mt ^{1/3}
0.25	0.500	-1.386	515.565	6.245	5.156	-2.965	0.052	8.019
0.5	0.707	-0.693	611.391	6.416	6.114	-2.795	0.061	8.487
0.75	0.866	-0.288	885.043	6.786	8.850	-2.425	0.089	9.601
1	1.000	0.000	1074.348	6.979	10.743	-2.231	0.107	10.242
2	1.414	0.693	1266.261	7.144	12.663	-2.067	0.127	10.819
4	2.000	1.386	1746.174	7.465	17.462	-1.745	0.175	12.042
6	2.449	1.792	2123.739	7.661	21.237	-1.549	0.212	12.854
8	2.828	2.079	2330.000	7.754	23.300	-1.457	0.233	13.257
24	4.899	3.178	2980.174	8.000	29.802	-1.211	0.298	14.391
48	6.928	3.871	3816.000	8.247	38.160	-0.963	0.382	15.627
72	8.485	4.277	5016.609	8.521	50.166	-0.690	0.502	17.119
Sistema 3								
t (h)	t ^{1/2}	ln t	Mt	ln Mt	(Mt / Ma) * 100	ln(Mt / Ma)	Mt / Ma	Mt ^{1/3}
0.25	0.500	-1.386	607.739	6.410	6.077	-2.801	0.061	8.470
0.5	0.707	-0.693	969.652	6.877	9.697	-2.333	0.097	9.898
0.75	0.866	-0.288	1248.522	7.130	12.485	-2.081	0.125	10.768
1	1.000	0.000	1354.783	7.211	13.548	-1.999	0.135	11.065
2	1.414	0.693	1903.652	7.552	19.037	-1.659	0.190	12.394
4	2.000	1.386	2225.304	7.708	22.253	-1.503	0.223	13.056
6	2.449	1.792	2432.870	7.797	24.329	-1.414	0.243	13.450
8	2.828	2.079	2554.783	7.846	25.548	-1.365	0.255	13.671
24	4.899	3.178	3472.348	8.153	34.723	-1.058	0.347	15.143
48	6.928	3.871	3961.652	8.284	39.617	-0.926	0.396	15.823
72	8.485	4.277	5251.826	8.566	52.518	-0.644	0.525	17.382

Sistema 4								
t (h)	t ^{1/2}	ln t	Mt	ln Mt	(Mt / Ma) * 100	ln(Mt / Ma)	Mt / Ma	Mt ^{1/3}
0.25	0.500	-1.386	518.174	6.250	5.182	-2.960	0.052	8.032
0.5	0.707	-0.693	878.783	6.779	8.788	-2.432	0.088	9.578
0.75	0.866	-0.288	979.826	6.887	9.798	-2.323	0.098	9.932
1	1.000	0.000	1170.435	7.065	11.704	-2.145	0.117	10.539
2	1.414	0.693	1540.174	7.340	15.402	-1.871	0.154	11.548
4	2.000	1.386	2116.174	7.657	21.162	-1.553	0.212	12.839
6	2.449	1.792	2322.435	7.750	23.224	-1.460	0.232	13.243
8	2.828	2.079	2531.304	7.836	25.313	-1.374	0.253	13.629
24	4.899	3.178	3184.087	8.066	31.841	-1.144	0.318	14.712
48	6.928	3.871	3934.261	8.277	39.343	-0.933	0.393	15.787
72	8.485	4.277	4959.652	8.509	49.597	-0.701	0.496	17.054

Sistema 5								
t (h)	t ^{1/2}	ln t	Mt	ln Mt	(Mt / Ma) * 100	ln(Mt / Ma)	Mt / Ma	Mt ^{1/3}
0.25	0.500	-1.386	518.174	6.250	5.182	-2.960	0.052	8.032
0.5	0.707	-0.693	702.261	6.554	7.023	-2.656	0.070	8.889
0.75	0.866	-0.288	977.217	6.885	9.772	-2.326	0.098	9.923
1	1.000	0.000	1079.565	6.984	10.796	-2.226	0.108	10.258
2	1.414	0.693	1271.478	7.148	12.715	-2.062	0.127	10.834
4	2.000	1.386	1754.000	7.470	17.540	-1.741	0.175	12.060
6	2.449	1.792	1955.043	7.578	19.550	-1.632	0.196	12.504
8	2.828	2.079	2246.957	7.717	22.470	-1.493	0.225	13.098
24	4.899	3.178	2895.826	7.971	28.958	-1.239	0.290	14.254
48	6.928	3.871	3818.609	8.248	38.186	-0.963	0.382	15.630
72	8.485	4.277	5284.000	8.572	52.840	-0.638	0.528	17.418

Sistema 6								
t (h)	t ^{1/2}	ln t	Mt	ln Mt	(Mt / Ma) * 100	ln(Mt / Ma)	Mt / Ma	Mt ^{1/3}
0.25	0.500	-1.386	339.043	5.826	3.390	-3.384	0.034	6.973
0.5	0.707	-0.693	697.043	6.547	6.970	-2.663	0.070	8.867
0.75	0.866	-0.288	1060.261	6.966	10.603	-2.244	0.106	10.197
1	1.000	0.000	1340.435	7.201	13.404	-2.010	0.134	11.026
2	1.414	0.693	1801.043	7.496	18.010	-1.714	0.180	12.167
4	2.000	1.386	2387.478	7.778	23.875	-1.432	0.239	13.365
6	2.449	1.792	2509.391	7.828	25.094	-1.383	0.251	13.589
8	2.828	2.079	2720.870	7.909	27.209	-1.302	0.272	13.961
24	4.899	3.178	3817.565	8.247	38.176	-0.963	0.382	15.629
48	6.928	3.871	5106.435	8.538	51.064	-0.672	0.511	17.220
72	8.485	4.277	6060.522	8.710	60.605	-0.501	0.606	18.232
0.5	0.707	-0.693	679.478	6.521	6.795	-2.689	0.068	8.791

d) Liberación del CTZ a partir de una solución.

Sistema 1								
t (h)	t ^{1/2}	ln t	Mt	ln Mt	(Mt / M _α) * 100	ln(Mt / M _α)	Mt / M _α	Mt ^{1/3}
0.016	0.126	-4.135	145.826	4.982	1.458	-4.228	0.015	5.264
0.083	0.288	-2.489	174.696	5.163	1.747	-4.047	0.017	5.590
0.16	0.400	-1.833	204.870	5.322	2.049	-3.888	0.020	5.895
0.25	0.500	-1.386	217.652	5.383	2.177	-3.827	0.022	6.015
0.5	0.707	-0.693	249.130	5.518	2.491	-3.692	0.025	6.292
0.75	0.866	-0.288	281.913	5.642	2.819	-3.569	0.028	6.557
1	1.000	0.000	334.696	5.813	3.347	-3.397	0.033	6.943
2	1.414	0.693	371.391	5.917	3.714	-3.293	0.037	7.188
3	1.732	1.099	353.304	5.867	3.533	-3.343	0.035	7.069
4	2.000	1.386	351.304	5.862	3.513	-3.349	0.035	7.056
6	2.449	1.792	348.000	5.852	3.480	-3.358	0.035	7.034
8	2.828	2.079	343.391	5.839	3.434	-3.371	0.034	7.003
24	4.899	3.178	393.565	5.975	3.936	-3.235	0.039	7.328
24.5	4.950	3.199	390.261	5.967	3.903	-3.244	0.039	7.308
Sistema 2								
t (h)	t ^{1/2}	ln t	Mt	ln Mt	(Mt / M _α) * 100	ln(Mt / M _α)	Mt / M _α	Mt ^{1/3}
0.016	0.126	-4.135	89.739	4.497	0.897	-4.713	0.009	4.477
0.083	0.288	-2.489	114.696	4.742	1.147	-4.468	0.011	4.859
0.16	0.400	-1.833	140.957	4.948	1.410	-4.262	0.014	5.204
0.25	0.500	-1.386	168.522	5.127	1.685	-4.083	0.017	5.524
0.5	0.707	-0.693	197.391	5.285	1.974	-3.925	0.020	5.822
0.75	0.866	-0.288	264.957	5.580	2.650	-3.631	0.026	6.423
1	1.000	0.000	280.348	5.636	2.803	-3.574	0.028	6.545
2	1.414	0.693	314.435	5.751	3.144	-3.460	0.031	6.800
3	1.732	1.099	331.130	5.803	3.311	-3.408	0.033	6.918
4	2.000	1.386	366.522	5.904	3.665	-3.306	0.037	7.156
6	2.449	1.792	365.826	5.902	3.658	-3.308	0.037	7.152
8	2.828	2.079	363.826	5.897	3.638	-3.314	0.036	7.139
24	4.899	3.178	341.826	5.834	3.418	-3.376	0.034	6.992
24.5	4.950	3.199	335.913	5.817	3.359	-3.393	0.034	6.951
24	4.899	3.178	356.174	5.875	3.562	-3.335	0.036	7.088
24.5	4.950	3.199	350.261	5.859	3.503	-3.352	0.035	7.049

Sistema 3								
t (h)	t^{1/2}	ln t	Mt	ln Mt	(Mt / Ma) * 100	ln(Mt / Ma)	Mt / Ma	Mt^{1/3}
0.016	0.126	-4.135	145.826	4.982	1.458	-4.228	0.015	5.264
0.083	0.288	-2.489	174.696	5.163	1.747	-4.047	0.017	5.590
0.16	0.400	-1.833	204.870	5.322	2.049	-3.888	0.020	5.895
0.25	0.500	-1.386	217.652	5.383	2.177	-3.827	0.022	6.015
0.5	0.707	-0.693	249.130	5.518	2.491	-3.692	0.025	6.292
0.75	0.866	-0.288	281.913	5.642	2.819	-3.569	0.028	6.557
1	1.000	0.000	334.696	5.813	3.347	-3.397	0.033	6.943
2	1.414	0.693	371.391	5.917	3.714	-3.293	0.037	7.188
3	1.732	1.099	353.304	5.867	3.533	-3.343	0.035	7.069
4	2.000	1.386	351.304	5.862	3.513	-3.349	0.035	7.056
6	2.449	1.792	348.000	5.852	3.480	-3.358	0.035	7.034
8	2.828	2.079	343.391	5.839	3.434	-3.371	0.034	7.003
24	4.899	3.178	356.174	5.875	3.562	-3.335	0.036	7.088
24.5	4.950	3.199	350.261	5.859	3.503	-3.352	0.035	7.049

Sistema 4								
t (h)	t^{1/2}	ln t	Mt	ln Mt	(Mt / Ma) * 100	ln(Mt / Ma)	Mt / Ma	Mt^{1/3}
0.016	0.126	-4.135	145.826	4.982	1.458	-4.228	0.015	5.264
0.083	0.288	-2.489	174.696	5.163	1.747	-4.047	0.017	5.590
0.16	0.400	-1.833	204.870	5.322	2.049	-3.888	0.020	5.895
0.25	0.500	-1.386	217.652	5.383	2.177	-3.827	0.022	6.015
0.5	0.707	-0.693	249.130	5.518	2.491	-3.692	0.025	6.292
0.75	0.866	-0.288	281.913	5.642	2.819	-3.569	0.028	6.557
1	1.000	0.000	334.696	5.813	3.347	-3.397	0.033	6.943
2	1.414	0.693	371.391	5.917	3.714	-3.293	0.037	7.188
3	1.732	1.099	353.304	5.867	3.533	-3.343	0.035	7.069
4	2.000	1.386	351.304	5.862	3.513	-3.349	0.035	7.056
6	2.449	1.792	348.000	5.852	3.480	-3.358	0.035	7.034
8	2.828	2.079	343.391	5.839	3.434	-3.371	0.034	7.003
24	4.899	3.178	337.478	5.822	3.375	-3.389	0.034	6.962
24.5	4.950	3.199	330.261	5.800	3.303	-3.410	0.033	6.912

ANEXO 6. Resultados de los perfiles de liberación *in vitro* de la ME 2 bioadhesiva con 1 % de CTZ.

Sistema 1							
t (h)	Abs	Conc. (µg / mL)	µg de CTZ	Cant. retenida µg	Cant. acumulada	Cant. corregida µg	% liberado
0	0.010	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
0.25	0.018	6.435	643.478	19.304	19.304	662.783	6.627
0.5	0.019	6.870	686.957	20.609	39.913	726.870	7.268
0.75	0.022	8.174	817.391	24.522	64.435	881.826	8.818
1	0.024	9.043	904.348	27.130	91.565	995.913	9.958
2	0.026	9.913	991.304	29.739	121.304	1112.609	11.125
4	0.029	11.217	1121.739	33.652	154.957	1276.696	12.766
6	0.032	12.522	1252.174	37.565	192.522	1444.696	14.446
8	0.036	14.261	1426.087	42.783	235.304	1661.391	16.613
24	0.045	18.174	1817.391	54.522	289.826	2107.217	21.070
48	0.062	25.565	2556.522	76.696	366.522	2923.043	29.228
72	0.066	27.304	2730.435	81.913	448.435	3178.870	31.786

Sistema 2							
t (h)	Abs	Conc. (µg / mL)	µg de CTZ	Cant. retenida µg	Cant. acumulada	Cant. corregida µg	% liberado
0	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
0.25	0.008	2.087	208.696	6.261	6.261	214.957	2.185
0.5	0.015	5.130	513.043	15.391	21.652	534.696	5.436
0.75	0.017	6.000	600.000	18.000	39.652	639.652	6.503
1	0.018	6.435	643.478	19.304	58.957	702.435	7.141
2	0.022	8.174	817.391	24.522	83.478	900.870	9.158
4	0.026	9.913	991.304	29.739	113.217	1104.522	11.228
6	0.030	11.652	1165.217	34.957	148.174	1313.391	13.352
8	0.035	13.826	1382.609	41.478	189.652	1572.261	15.983
24	0.045	18.174	1817.391	54.522	244.174	2061.565	20.958
48	0.065	26.870	2686.957	80.609	324.783	3011.739	30.617
72	0.076	31.652	3165.217	94.957	419.739	3584.957	36.444

Sistema 3							
t (h)	Abs	Conc. (µg / mL)	µg de CTZ	Cant. retenida µg	Cant. acumulada	Cant. corregida µg	% liberado
0	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
0.25	0.011	3.391	339.130	10.174	10.174	349.304	3.544
0.5	0.012	3.826	382.609	11.478	21.652	404.261	4.101
0.75	0.016	5.565	556.522	16.696	38.348	594.870	6.035
1	0.018	6.435	643.478	19.304	57.652	701.130	7.113
2	0.020	7.304	730.435	21.913	79.565	810.000	8.217
4	0.026	9.913	991.304	29.739	109.304	1100.609	11.166
6	0.030	11.652	1165.217	34.957	144.261	1309.478	13.285
8	0.034	13.391	1339.130	40.174	184.435	1523.565	15.457
24	0.041	16.435	1643.478	49.304	233.739	1877.217	19.044
48	0.062	25.565	2556.522	76.696	310.435	2866.957	29.085
72	0.063	26.000	2600.000	78.000	388.435	2988.435	30.318

Sistema 4							
t (h)	Abs	Conc. (µg / mL)	µg de CTZ	Cant. retenida µg	Cant. acumulada	Cant. corregida µg	% liberado
0	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
0.25	0.008	2.087	208.696	6.261	6.261	214.957	2.102
0.5	0.012	3.826	382.609	11.478	17.739	400.348	3.914
0.75	0.014	4.696	469.565	14.087	31.826	501.391	4.902
1	0.017	6.000	600.000	18.000	49.826	649.826	6.354
2	0.019	6.870	686.957	20.609	70.435	757.391	7.405
4	0.023	8.609	860.870	25.826	96.261	957.130	9.358
6	0.031	12.087	1208.696	36.261	132.522	1341.217	13.114
8	0.036	14.261	1426.087	42.783	175.304	1601.391	15.658
24	0.046	18.609	1860.870	55.826	231.130	2092.000	20.455
48	0.067	27.739	2773.913	83.217	314.348	3088.261	30.195
72	0.065	26.870	2686.957	80.609	394.957	3081.913	30.133

Sistema 5							
t (h)	Abs	Conc. (µg / mL)	µg de CTZ	Cant. retenida µg	Cant. acumulada	Cant. corregida µg	% liberado
0	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
0.25	0.008	2.087	208.696	6.261	6.261	214.957	2.174
0.5	0.013	4.261	426.087	12.783	19.043	445.130	4.501
0.75	0.018	6.435	643.478	19.304	38.348	681.826	6.895
1	0.020	7.304	730.435	21.913	60.261	790.696	7.996
2	0.025	9.478	947.826	28.435	88.696	1036.522	10.482
4	0.028	10.783	1078.261	32.348	121.043	1199.304	12.128
6	0.035	13.826	1382.609	41.478	162.522	1545.130	15.625
8	0.040	16.000	1600.000	48.000	210.522	1810.522	18.309
24	0.050	20.348	2034.783	61.043	271.565	2306.348	23.323
48	0.063	26.000	2600.000	78.000	349.565	2949.565	29.827
72	0.071	29.478	2947.826	88.435	438.000	3385.826	34.239

Sistema 6							
t (h)	Abs	Conc. (µg / mL)	µg de CTZ	Cant. retenida µg	Cant. acumulada	Cant. corregida µg	% liberado
0	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
0.25	0.071	29.478	2947.826	88.435	88.435	3036.261	30.001
0.5	0.072	29.913	2991.304	89.739	178.174	3169.478	31.318
0.75	0.074	30.783	3078.261	92.348	270.522	3348.783	33.089
1	0.075	31.217	3121.739	93.652	364.174	3485.913	34.444
2	0.075	31.217	3121.739	93.652	457.826	3579.565	35.370
4	0.079	32.957	3295.652	98.870	556.696	3852.348	38.065
6	0.087	36.435	3643.478	109.304	666.000	4309.478	42.582
8	0.089	37.304	3730.435	111.913	777.913	4508.348	44.547
24	0.093	39.043	3904.348	117.130	895.043	4799.391	47.423
48	0.099	41.652	4165.217	124.957	1020.000	5185.217	51.235
72	0.094	39.478	3947.826	118.435	1138.435	5086.261	50.257

ANEXO 7. Modelo de Peppas y Higuchi aplicado a ME 2 bioadhesiva, 1 % CTZ.

Sistema 1						
t (h)	t^{1/2}	ln t	Mt	(Mt / M_∞) *100	ln(Mt / M_∞)	Mt / M_∞
0.25	0.5	-1.38629436	662.782609	3.31391304	-3.40704051	0.03313913
0.5	0.70710678	-0.69314718	726.869565	3.63434783	-3.31474051	0.03634348
0.75	0.8660254	-0.28768207	881.826087	4.40913043	-3.12149270	0.04409130
1	1	0	995.913043	4.97956522	-2.99982760	0.04979565
2	1.41421356	0.69314718	1112.608700	5.56304348	-2.88902484	0.05563043
4	2	1.38629436	1276.695650	6.38347826	-2.75145706	0.06383478
6	2.44948974	1.79175947	1444.695650	7.22347826	-2.62783360	0.07223478
8	2.82842712	2.07944154	1661.391300	8.30695652	-2.48807689	0.08306957
24	4.89897949	3.17805383	2107.217390	10.536087	-2.25036397	0.10536087
48	6.92820323	3.87120101	2923.043480	14.6152174	-1.92310691	0.14615217
72	8.48528137	4.27666612	3178.869570	15.8943478	-1.83920662	0.15894348
Sistema 2						
t (h)	t^{1/2}	ln t	Mt	(Mt / M_∞) *100	ln(Mt / M_∞)	Mt / M_∞
0.25	0.5	-1.38629436	214.956522	1.07478261	-4.53305177	0.01074783
0.5	0.70710678	-0.69314718	534.695652	2.67347826	-3.62178984	0.02673478
0.75	0.8660254	-0.28768207	639.652174	3.19826087	-3.442563	0.03198261
1	1	0	702.434783	3.51217391	-3.34893499	0.03512174
2	1.41421356	0.69314718	900.869565	4.50434783	-3.10012707	0.04504348
4	2	1.38629436	1104.52174	5.5226087	-2.89631985	0.05522609
6	2.44948974	1.79175947	1313.3913	6.56695652	-2.7231197	0.06566957
8	2.82842712	2.07944154	1572.26087	7.86130435	-2.54321765	0.07861304
24	4.89897949	3.17805383	2061.56522	10.3078261	-2.27226676	0.10307826
48	6.92820323	3.87120101	3011.73913	15.0586957	-1.89321458	0.15058696
72	8.48528137	4.27666612	3584.95652	17.9247826	-1.71898593	0.17924783
Sistema 3						
t (h)	t^{1/2}	ln t	Mt	(Mt / M_∞) *100	ln(Mt / M_∞)	Mt / M_∞
0.25	0.5	-1.38629436	349.304348	1.74652174	-4.04754395	0.01746522
0.5	0.70710678	-0.69314718	404.26087	2.02130435	-3.90142717	0.02021304
0.75	0.8660254	-0.28768207	594.869565	2.97434783	-3.51514539	0.02974348
1	1	0	701.130435	3.50565217	-3.35079361	0.03505652
2	1.41421356	0.69314718	810	4.05	-3.2064533	0.0405
4	2	1.38629436	1100.6087	5.50304348	-2.89986889	0.05503043
6	2.44948974	1.79175947	1309.47826	6.5473913	-2.72610349	0.06547391
8	2.82842712	2.07944154	1523.56522	7.61782609	-2.57467915	0.07617826
24	4.89897949	3.17805383	1877.21739	9.38608696	-2.3659417	0.09386087
48	6.92820323	3.87120101	2866.95652	14.3347826	-1.94248125	0.14334783
72	8.48528137	4.27666612	2988.43478	14.9421739	-1.90098251	0.14942174

Sistema 4						
t (h)	t ^{1/2}	ln t	Mt	(Mt / Ma) *100	ln(Mt / Ma)	Mt / Ma
0.25	0.5	-1.38629436	214.956522	1.07478261	-4.53305177	0.01074783
0.5	0.70710678	-0.69314718	400.347826	2.00173913	-3.91115382	0.02001739
0.75	0.8660254	-0.28768207	501.391304	2.50695652	-3.68610071	0.02506957
1	1	0	649.826087	3.24913043	-3.42678278	0.0324913
2	1.41421356	0.69314718	757.391304	3.78695652	-3.27360752	0.03786957
4	2	1.38629436	957.130435	4.78565217	-3.03954787	0.04785652
6	2.44948974	1.79175947	1341.21739	6.70608696	-2.70215457	0.06706087
8	2.82842712	2.07944154	1601.3913	8.00695652	-2.52485946	0.08006957
24	4.89897949	3.17805383	2092	10.46	-2.25761173	0.1046
48	6.92820323	3.87120101	3088.26087	15.4413043	-1.86812417	0.15441304
72	8.48528137	4.27666612	3081.91304	15.4095652	-1.87018175	0.15409565
72	8.48528137	4.27666612	3178.869570	15.8943478	-1.83920662	0.15894348
Sistema 5						
t (h)	t ^{1/2}	ln t	Mt	(Mt / Ma) *100	ln(Mt / Ma)	Mt / Ma
0.25	0.5	-1.38629436	214.956522	1.07478261	-4.53305177	0.01074783
0.5	0.70710678	-0.69314718	445.130435	2.22565217	-3.8051202	0.02225652
0.75	0.8660254	-0.28768207	681.826087	3.40913043	-3.37871293	0.0340913
1	1	0	790.695652	3.95347826	-3.23057442	0.03953478
2	1.41421356	0.69314718	1036.52174	5.1826087	-2.95986165	0.05182609
4	2	1.38629436	1199.30435	5.99652174	-2.8139906	0.05996522
6	2.44948974	1.79175947	1545.13043	7.72565217	-2.56062394	0.07725652
8	2.82842712	2.07944154	1810.52174	9.0526087	-2.40211722	0.09052609
24	4.89897949	3.17805383	2306.34783	11.5317391	-2.16006703	0.11531739
48	6.92820323	3.87120101	2949.56522	14.7478261	-1.9140745	0.14747826
72	8.48528137	4.27666612	3385.82609	16.9291304	-1.77613435	0.1692913
Sistema 6						
t (h)	t ^{1/2}	ln t	Mt	(Mt / Ma) *100	ln(Mt / Ma)	Mt / Ma
0.25	0.5	-1.38629436	3036.26087	15.1813043	-1.88510549	0.15181304
0.5	0.70710678	-0.69314718	3169.47826	15.8473913	-1.84216529	0.15847391
0.75	0.8660254	-0.28768207	3348.78261	16.743913	-1.78713539	0.16743913
1	1	0	3485.91304	17.4295652	-1.74700227	0.17429565
2	1.41421356	0.69314718	3579.56522	17.8978261	-1.72049093	0.17897826
4	2	1.38629436	3852.34783	19.2617391	-1.64704949	0.19261739
6	2.44948974	1.79175947	4309.47826	21.5473913	-1.53491543	0.21547391
8	2.82842712	2.07944154	4508.34783	22.5417391	-1.48980152	0.22541739
24	4.89897949	3.17805383	4799.3913	23.9969565	-1.42724318	0.23996957
48	6.92820323	3.87120101	5185.21739	25.926087	-1.34992051	0.25926087
72	8.48528137	4.27666612	5086.26087	25.4313043	-1.36918932	0.25431304

ANEXO 8. Resultados de las cinéticas de permeación *in vitro*.

Sistema 1								
in t (h)	Abs	Conc. (µg / mL)	µg de CTZ	Cant. retenida µg	Cant. acumulada	Cant. corregida µg	% liberado	µg /cm ²
0	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
1	0.010	1.304	26.087	3.913	3.913	30.000	0.149	4.873
2	0.046	16.957	339.130	50.870	54.783	393.913	1.960	63.978
4	0.059	22.609	452.174	67.826	122.609	574.783	2.860	93.354
6	0.080	31.739	634.783	95.217	217.826	852.609	4.242	138.478
8	0.102	41.304	826.087	123.913	341.739	1167.826	5.811	189.675
24	0.178	74.348	1486.957	223.043	564.783	2051.739	10.209	333.237
Sistema 2								
t (h)	Abs	Conc. (µg / mL)	µg de CTZ	Cant. retenida µg	Cant. acumulada	Cant. corregida µg	% liberado	µg /cm ²
0	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
1	0.020	5.652	113.043	16.957	16.957	130.000	0.661	21.114
2	0.036	12.609	252.174	37.826	54.783	306.957	1.560	49.855
4	0.060	23.043	460.870	69.130	123.913	584.783	2.972	94.978
6	0.095	38.261	765.217	114.783	238.696	1003.913	5.102	163.052
8	0.110	44.783	895.652	134.348	373.043	1268.696	6.448	206.057
24	0.172	71.739	1434.783	215.217	588.261	2023.043	10.282	328.576
Sistema 3								
t (h)	Abs	Conc. (µg / mL)	µg de CTZ	Cant. retenida µg	Cant. acumulada	Cant. corregida µg	% liberado	µg /cm ²
0	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
1	0.014	3.043	60.870	9.130	9.130	70.000	0.346	11.369
2	0.030	10.000	200.000	30.000	39.130	239.130	1.181	38.839
4	0.072	28.261	565.217	84.783	123.913	689.130	3.402	111.926
6	0.097	39.130	782.609	117.391	241.304	1023.913	5.055	166.301
8	0.106	43.043	860.870	129.130	370.435	1231.304	6.079	199.984
24	0.164	68.261	1365.217	204.783	575.217	1940.435	9.580	315.159
Sistema 4								
t (h)	Abs	Conc. (µg / mL)	µg de CTZ	Cant. retenida µg	Cant. acumulada	Cant. corregida µg	% liberado	µg /cm ²
0	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
1	0.081	32.174	643.478	96.522	96.522	740.000	3.819	120.188
2	0.047	17.391	347.826	52.174	148.696	496.522	2.562	80.643
4	0.057	21.739	434.783	65.217	213.913	648.696	3.348	105.359
6	0.064	24.783	495.652	74.348	288.261	783.913	4.046	127.321
8	0.096	38.696	773.913	116.087	404.348	1178.261	6.081	191.369
24	0.132	54.348	1086.957	163.043	567.391	1654.348	8.538	268.694

Sistema 5								
t (h)	Abs	Conc. (µg / mL)	µg de CTZ	Cant. retenida µg	Cant. acumulada	Cant. corregida µg	% liberado	µg /cm ²
0	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
1	0.009	0.870	17.391	2.609	2.609	20.000	0.101	3.248
2	0.044	16.087	321.739	48.261	50.870	372.609	1.875	60.518
4	0.079	31.304	626.087	93.913	144.783	770.870	3.880	125.202
6	0.098	39.565	791.304	118.696	263.478	1054.783	5.309	171.314
8	0.108	43.913	878.261	131.739	395.217	1273.478	6.409	206.834
24	0.189	79.130	1582.609	237.391	632.609	2215.217	11.149	359.788
Sistema 6								
t (h)	Abs	Conc. (µg / mL)	µg de CTZ	Cant. retenida µg	Cant. acumulada	Cant. corregida µg	% liberado	µg /cm ²
0	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
1	-0.051	-52.609	-1052.174	-157.826	-157.826	-1210.000	-6.530	-196.524
2	-0.043	-49.130	-982.609	-147.391	-305.217	-1287.826	-6.950	-209.165
4	-0.188	-112.174	-2243.478	-336.522	-641.739	-2885.217	-15.570	-468.608
6	-0.286	-154.783	-3095.652	-464.348	-1106.087	-4201.739	-22.675	-682.433
8	-0.326	-172.174	-3443.478	-516.522	-1622.609	-5066.087	-27.340	-822.817
24	-0.142	-92.174	-1843.478	-276.522	-1899.130	-3742.609	-20.197	-607.862

ANEXO 9. Resultados de la extracción del CTZ remanente en la mucosa vaginal porcina.

a) Cálculos para obtener el % de recobro.

Sistema	Abs.	Conc. ($\mu\text{g} / \text{mL}$)	μg de CTZ	% de recobro
1	0.067	25.665	384.979	80.204
2	0.069	26.524	397.854	82.886
3	0.077	29.957	449.356	93.616
4	0.066	25.236	378.541	78.863
5	0.059	22.232	333.476	69.474
6	0.073	28.240	423.605	88.251
Promedio				82.216
d.e.				8.300

b) Extracción del CTZ remanente en la mucosa vaginal porcina a partir de la ME 2 bioadhesiva con 1 % de CTZ.

Sistema	Abs.	Conc. ($\mu\text{g} / \text{mL}$)	μg de CTZ	% CTZ retenido	% de CTZ retenido corregido
1	1.058	450.880	6763.197	33.816	41.139
2	0.588	249.163	3737.446	18.687	22.734
3	1.118	476.631	7149.464	35.747	43.488
4	0.608	257.747	3866.202	19.331	23.517
5	1.888	807.103	12106.545	60.533	73.641
6	0.708	300.665	4509.979	22.550	27.433
Promedio				31.777	38.659
d.e				15.863	19.298

- c) Extracción del CTZ remanente en la mucosa vaginal porcina a partir de una solución de CTZ.

Sistema	Abs.	Conc. (μg / mL)	μg de CTZ	% CTZ retenido	% de CTZ retenido corregido
1	0.011	1.738	26.073	3.621	4.405
2	0.013	2.597	38.948	5.410	6.580
3	0.012	2.167	32.511	4.515	5.492
4	0.014	3.026	45.386	6.304	7.667
5	0.010	1.309	19.635	2.727	3.317
6	0.015	3.455	51.824	7.198	8.755
Promedio				4.962	6.036
d.e				1.673	2.035

ANEXO 10. Curvas de calibración.**a) Método 1: CTZ en FVS con Tween® 20 al 3 %.**

Concentraciones y absorbancias de la curva de calibración.

Concentración (µg / mL)	Absorbancia	Abs. / Conc.
36	0.090	0.002500000
36	0.086	0.002388889
36	0.089	0.002472222
72	0.170	0.002361111
72	0.172	0.002388889
72	0.172	0.002388889
108	0.253	0.002342593
108	0.255	0.002361111
108	0.258	0.002388889
144	0.343	0.002381944
144	0.340	0.002361111
144	0.342	0.002375000
180	0.422	0.002344444
180	0.422	0.002344444
180	0.427	0.002372222
216	0.504	0.002333333
216	0.510	0.002361111
216	0.506	0.002342593
252	0.595	0.002361111
252	0.595	0.002361111
252	0.596	0.002365079
Promedio		0.002376005
D.E.		4.05236E-05
C.V.		1.70553457

Análisis de varianza para evaluar la linealidad del sistema**Prueba de hipótesis**

H₀: No existe una relación lineal entre la concentración del CTZ y su respectiva absorbancia.

H_i: Existe una relación lineal entre la concentración del CTZ su respectiva absorbancia.

Criterio de aceptación

Si F calculada $> F$ crítica se rechaza la H_0 , por lo tanto, existe una relación lineal entre la concentración del CTZ y su respectiva absorbancia.

Si F calculada $< F$ crítica se acepta la H_0 , por lo tanto, no existe una relación lineal entre la concentración del CTZ y su respectiva absorbancia.

Tabla 12. Análisis de varianza para evaluar la linealidad del sistema.

ANOVA						
Modelo		Suma de cuadrados	GI	Media cuadrática	F calculada	F critica
1	Regresión	108844.701	1	108844.701	107155.896	.000
	Residuo	19.299	19	1.016		
	Total	108864.000	20			

Como F calculada $> F$ crítica se rechaza la H_0 , por lo tanto, existe una relación lineal entre la concentración del CTZ y su respectiva absorbancia.

Prueba de intercepto

Prueba de hipótesis

H_0 : La ordenada al origen es igual a cero.

H_i : La ordenada al origen es diferente de cero.

Criterio de aceptación

Si t calculada $> t$ crítica se rechaza la H_0 , por lo tanto, el intercepto es diferente de cero.

Modelo	Coeficientes no estandarizados		Coeficientes estandarizados	t calculada	t critica
	B	Error estándar	Beta		
1	(Constante)	-1.337	.495	-2.698	.014
	abs	427.043	1.305	327.347	.000

Como t calculada $> t$ crítica se rechaza la H_0 , por lo tanto, el intercepto es diferente de cero.

b) Método 2: CTZ en FVS pH = 4.2 ± 0.1 con Tween® 20 al 3 % en contacto con la cara interna de la vagina de cerda.

Concentraciones y absorbancias de la curva de calibración.

Concentración ($\mu\text{g} / \text{mL}$)	Absorbancia	Abs. / Conc.
36	0.089	0.002472222
36	0.086	0.002388889
36	0.09	0.002500000
72	0.178	0.002472222
72	0.177	0.002458333
72	0.174	0.002416667
108	0.255	0.002361111
108	0.254	0.002351852
108	0.251	0.002324074
144	0.357	0.002479167
144	0.358	0.002486111
144	0.355	0.002465278
180	0.422	0.002344444
180	0.424	0.002355556
180	0.426	0.002366667
216	0.509	0.002356481
216	0.512	0.002370370
216	0.504	0.002333333
252	0.595	0.002361111
252	0.597	0.002369048
252	0.591	0.002345238
Promedio		0.002398961
D.E.		5.94183E-05
C.V.		2.47683633

Análisis de varianza para evaluar la linealidad del sistema

Prueba de hipótesis

H₀: No existe una relación lineal entre la concentración del CTZ y su respectiva absorbancia.

H_i: Existe una relación lineal entre la concentración del CTZ su respectiva absorbancia.

Criterio de aceptación

Si F calculada $>$ F crítica se rechaza la H_0 , por lo tanto, existe una relación lineal entre la concentración del CTZ y su respectiva absorbancia.

Si F calculada $<$ F crítica se acepta la H_0 , por lo tanto, no existe una relación lineal entre la concentración del CTZ y su respectiva absorbancia.

Tabla. Análisis de varianza para evaluar la linealidad del sistema.

ANOVA						
Modelo		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F calculada	F critica
1	Regresión	108713.149	1	108713.149	13692.667	.000
	Residuo	150.851	19	7.940		
	Total	108864.000	20			

Como F calculada $>$ F crítica se rechaza la H_0 , por lo tanto, existe una relación lineal entre la concentración del CTZ y su respectiva absorbancia.

Prueba de intercepto

Prueba de hipótesis

H_0 : La ordenada al origen es igual a cero.

H_i : La ordenada al origen es diferente de cero.

Criterio de aceptación

Si t calculada $>$ t crítica se rechaza la H_0 , por lo tanto, el intercepto es diferente de cero.

Modelo	Coeficientes no estandarizados		Coeficientes estandarizados	t calculada	t crítica
	B	Error estándar	Beta		
1	Intercepto	-2.775	1.397	-1.987	.062
	Pendiente	427.856	3.656	.999	.000

Como t calculada $<$ t crítica se acepta la H_0 . por lo tanto, el intercepto es igual a cero.

c) Método 3: CTZ en metanol con tejido vaginal.

Concentraciones y absorbancias de la curva de calibración.

Concentración (μg / mL)	Absorbancia	Abs. / Conc.
24.2	0.052	0.002148760
24.2	0.051	0.002107438
24.2	0.053	0.002190083
48.4	0.105	0.002169421
48.4	0.104	0.002148760
48.4	0.104	0.002148760
96.8	0.213	0.002200413
96.8	0.21	0.002169421
96.8	0.213	0.002200413
145.2	0.312	0.002148760
145.2	0.314	0.002162534
145.2	0.315	0.002169421
193.6	0.42	0.002169421
193.6	0.424	0.002190083
193.6	0.423	0.002184917
Promedio		0.002167241
D.E.		2.46988E-05
C.V.		1.139643068

Análisis de varianza para evaluar la linealidad del sistema

Prueba de hipótesis

H₀: No existe una relación lineal entre la concentración del CTZ y su respectiva absorbancia.

H_i: Existe una relación lineal entre la concentración del CTZ su respectiva absorbancia.

Criterio de aceptación

Si F calculada > F crítica se rechaza la H₀, por lo tanto, existe una relación lineal entre la concentración del CTZ y su respectiva absorbancia.

Si F calculada < F crítica se acepta la H₀, por lo tanto, no existe una relación lineal entre la concentración del CTZ y su respectiva absorbancia.

Tabla. Análisis de varianza para evaluar la linealidad del sistema.**ANOVA**

Modelo	Suma de cuadrados	Gl	Media cuadrática	F calculada	F crítica
1 Regresión	57616.864	1	57616.864	74075.347	.000 ^b
Residuo	10.112	13	.778		
Total	57626.976	14			

Como F calculada $>$ F crítica se rechaza la H_0 , por lo tanto, existe una relación lineal entre la concentración del CTZ y su respectiva absorbancia.

Prueba de intercepto

Prueba de hipótesis

H_0 : La ordenada al origen es igual a cero.

H_i : La ordenada al origen es diferente de cero.

Criterio de aceptación

Si t calculada $>$ t crítica se rechaza la H_0 , por lo tanto, el intercepto es diferente de cero.

Modelo	Coeficientes no estandarizados		Coeficientes estandarizados	t calculada	t crítica
	B	Error estándar	Beta		
1 Intercepto	.386	.436		.885	.392
Pendiente	458.440	1.684	1.000	272.168	.000

Como t calculada $>$ t crítica se rechaza la H_0 , por lo tanto, el intercepto es diferente de cero

ANEXO 11. Constancia y reconocimientos del trabajo presentado en XLIX Congreso Nacional y VII Internacional de Ciencias Farmacéuticas.







**XLIX CONGRESO NACIONAL Y
VII INTERNACIONAL DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS**

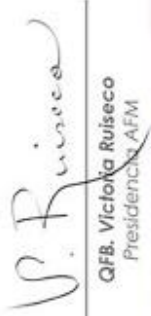
La Asociación Farmacéutica Mexicana, A.C.
otorga el presente

RECONOCIMIENTO

a: Nely García González, Elizabeth Piñón Segundo, Flora
Adriana Ganem Rondero, Luz María Melgoza Contreras

Por haber obtenido el Premio "Santiago Maza" en el área de
Tecnología Farmacéutica
con el trabajo intitulado:

Desarrollo y caracterización de una microemulsión para administración vaginal
durante XLIX Congreso Nacional de Ciencias Farmacéuticas
y VII Congreso Internacional de Ciencias Farmacéuticas
Huatulco - 4 al 7 de septiembre de 2016



QFB. Victoria Ruizeco
Presidencia AFM



Dra. Elizabeth Sánchez González
Dirección de Ciencia y Tecnología