

18  
29°



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO**

---

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
CUAUTITLAN**

**ESTUDIOS DE LA INTERACCION MUCOADHESIVA  
DEL CARBOPOL 934P A MUCOSA VAGINAL  
DE CERDO**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE  
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO  
P R E S E N T A  
SERGIO ARTURO GALINDO RODRIGUEZ**

**DIRECTORES: OFB DAVID QUINTANAR GUERRERO  
OFB EDGAR AGUILERA CERON  
COASESOR: M. en C. ELIZABETH TORIZ GARCIA**

**CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. DE MEX.**

**1996**

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AVENIDA DE  
MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN  
UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR  
DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES

U. N. A. M.  
FACULTAD DE ESTUDIOS  
SUPERIORES CUAUTITLAN



Departamento de  
Exámenes Profesionales

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

DR. JAIME KELLER TORRES  
DIRECTOR DE LA FES-CUAUTITLAN  
P R E S E N T E .

AT'N: Ing. Rafael Rodríguez Ceballos  
Jefe del Departamento de Exámenes  
Profesionales de la F.E.S. - C.

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la TESIS TITULADA:  
Estudios de la interacción mucoadhesiva Carbopol 934P a mucosa vaginal de cerdo.

que presenta el pasante: Sergio Arturo Galindo Rodríguez  
con número de cuenta: 8606521-0 para obtener el TITULO de:  
Químico Farmacéutico Biólogo.

Considerando que dicha tesis reúne los requisitos necesarios para ser discutida en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

A T E N T A M E N T E .  
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"  
Cuautitlán Izcalli, Edo. de Méx., a 12 de septiembre de 1996

PRESIDENTE	<u>M.V.Z. Gerardo Cruz Jiménez</u>	
VOCAL	<u>Q.F.B. Edgar Aguilera Cerón</u>	
SECRETARIO	<u>D.E.S.S. Rodolfo Cruz Rodríguez</u>	
PRIMER SUPLENTE	<u>Q.F.B. Ma. Eugenia R. Posada Galarza</u>	
SEGUNDO SUPLENTE	<u>Q.F.B. Lidia Rangel Trujano</u>	

## DEDICATORIAS

*A Mamá Elia y Mamá Mari :*

Por ser el ejemplo más fiel de fuerza, decisión y convicción.  
Por enseñarme a valorar y amar cada momento.  
Por haberme dado la vida.  
Esto es una pequeña muestra de lo que son capaces de hacer.

*Leti :*

Por brindarme esa desmedida comprensión  
Por toda la confianza, amor y cariño  
que sólo una hermana ejemplar podría darme.

*A Ana :*

Por haber compartido tantos recuerdos inborrables.  
Sólo nosotros conocemos el alcance de las cosas

## AGRADECIMIENTOS

A la *Sección de Microscopía Electrónica*

y al *Téc. Rodolfo Robles*

por su asistencia en el estudio

de Microscopía Electrónica de Barrido.

A la *QFB Rosa Ma. Cabrera Cabello*

del Laboratorio Central de Hacienda

por la asesoría y participación en el estudio

de Calorimetría Diferencial de Barrido

*A David Quintanar y Edgar Aguilera :*

Gracias, por la confianza y las enseñanzas invaluables que me dieron.  
Gracias, por haberme dado la oportunidad  
de ver culminado el más grande de mis anhelos  
hasta el momento.

*A la M. en C. Elizabeth Toriz :*

Por la confianza y el apoyo desinteresado que me ha tenido.

*A la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán :*

Gracias, por haberme abierto sus puertas para  
realizarme como profesionista;  
siempre estaré en deuda con ella.

*A Claudia Amezcua, Abelardo Chávez y Rafael Villalobos :*

Por dejarme participar en el  
excelente grupo de trabajo y amistad que hemos formado.

A mis amigos con quien compartí  
momentos de gozo y tristeza  
y que han dejado una profunda huella en mi corazón:  
*Nora, Hilda, Tere, Vero, Eva, Toto, Alex, Beto, Nacho y Enrique.*

# INDICE

INDICE DE FIGURAS.....	I
INDICE DE TABLAS.....	III
LISTA DE ABREVIATURAS.....	IV
RESUMEN.....	1
INTRODUCCION.....	2
CAPITULO I. MARCO TEORICO.....	4
1. Conceptos.....	4
2. Importancia de los sistemas mucoadhesivos.....	4
2.1 Administración bucal.....	5
2.2 Administración rectal.....	5
2.3 Administración vaginal.....	6
2.4 Administración nasal.....	6
2.5 Administración ocular.....	6
2.6 Administración oral.....	7
3. Capa de moco.....	8
4. Mecanismo de mucoadhesión.....	10
4.1 Contacto íntimo mucosa-bioadhesivo.....	11
4.1.1 Teoría de humectación.....	12
4.1.2 Hinchamiento.....	13
4.2 Interpenetración : teoría de difusión.....	13
4.3 Interacciones químicas.....	15
4.4 Interacciones físicas.....	15
4.5 Separación superficial después de la bioadhesión: teoría de fractura.....	15
4.6 Teoría de fractura -interpenetración.....	16
5. Métodos para el estudio de la bioadhesión.....	16
5.1 Propiedades bioadhesivas.....	18
5.1.1 Fuerza de adhesión.....	18
5.1.2 Número de adhesiones.....	18

5.1.3 Durabilidad.....	18
5.2 Estudios de bioadhesión.....	19
5.2.1 Métodos <i>in vivo</i> .....	20
5.2.2 Métodos <i>ex vivo</i> .....	20
5.2.3 Métodos <i>in vitro</i> .....	22
5.2.3.1 Medición de la fuerza de bioadhesión.....	22
5.2.3.2 Análisis por fluorescencia.....	22
5.2.3.3 Método del conjugado coloidal oro-mucina.....	22
5.2.3.4 Método del canal con flujo.....	23
5.2.3.5 Análisis reológico.....	23
5.2.3.6 Visualización de la interfase mucoadhesiva.....	25
5.2.3.7 Análisis por espectroscopía de infrarrojo.....	25
6. Polímeros bioadhesivos.....	25
6.1 Características importantes del polímero en la bioadhesión.....	25
6.1.1 Peso molecular, longitud de la cadena y densidad de entrecruzamiento.....	26
6.1.2 Ionización y cargas.....	26
6.1.3 Hidratación y grupos funcionales hidrofílicos.....	27
6.1.4 Movilidad de la cadena y naturaleza expansiva de la red.....	27
6.2 Clasificación.....	27
6.3 Factores que afectan la bioadhesión.....	28
6.3.1 Factores relacionados con el polímero.....	29
6.3.2 Factores del medio.....	29
7. Sistemas vaginales de entrega de fármacos.....	32
7.1 Aspectos históricos.....	33
7.1.1 Beneficios de la administración intravaginal de fármacos.....	33
7.2 Estructura y dinámica de la vagina.....	33
7.2.1 Anatomía.....	33
7.2.1.1 Consideraciones generales.....	33
7.2.1.2 Conformación exterior e interior y relaciones.....	34
7.2.1.3 Constitución anatómica.....	35
7.2.1.4 Vasos y nervios.....	35
7.2.2 Fisiología.....	35
7.2.2.1 pH.....	35
7.2.2.2 Relación entre pH e infecciones vaginales.....	36
7.2.2.3 Microflora vaginal.....	36
7.2.2.4 Fluido vaginal.....	37
7.2.2.5 Volumen basal no estimulado.....	37
7.3 Aplicaciones de las formas de dosificación bioadhesivas.....	37
7.3.1 Vagina seca.....	38
7.3.2 Vaginosis bacteriana.....	39
7.3.3 Espermaticida y antiviral.....	40

7.3.4 Absorción de péptidos y proteínas.....	40
<b>CAPITULO II. OBJETIVOS.....</b>	<b>41</b>
<b>CAPITULO III. MATERIALES Y METODOS.....</b>	<b>42</b>
1. Compuestos y reactivos.....	42
1.1 Tejido biológico.....	42
2. Fuerza de bioadhesión.....	42
3. Tiempo de residencia del C934P en mucosa vaginal de cerdo.....	42
4. Estudio de Microscopía Electrónica de Barrido.....	43
5. Purificación del moco vaginal.....	43
6. Contenido de proteínas y carbohidratos en el.mvp.....	43
7. Análisis electroforético.....	43
8. Análisis térmico.....	44
<b>CAPITULO IV. RESULTADOS .....</b>	<b>45</b>
1. Fuerza de bioadhesión.....	45
2. Tiempo de residencia del C934P en mucosa vaginal de cerdo.....	45
3. Estudio de Microscopía Electrónica de Barrido.....	46
4. Purificación del moco vaginal.....	47
5. Análisis térmico.....	47
<b>CAPITULO V. ANALISIS DE RESULTADOS Y DISCUSION.....</b>	<b>53</b>
<b>CAPITULO VI. CONCLUSIONES.....</b>	<b>58</b>
<b>REFERENCIAS.....</b>	<b>59</b>

## INDICE DE FIGURAS

<i>Figura 1. Representación esquemática del moco</i> <sup>34</sup> .....	9
<i>Figura 2. Estructura entrecruzada en la red de moco intestinal</i> <sup>42, 51</sup> .....	10
<i>Figura 3. Rugosidad superficial en un tejido</i> <sup>42, 51</sup> .....	11
<i>Figura 4. Distribución de una formulación líquida mucoadhesiva sobre tejido mucoso</i> <sup>51</sup> .....	13
<i>Figura 5. Interpenetración de cadenas durante la bioadhesión de un polímero A con el moco B</i> <sup>42, 51</sup> .....	14
<i>Figura 6. Interacciones entre el estrato mucoso y los hidrogeles</i> <sup>48</sup> .....	17
<i>Figura 7. Medición de la fuerza de adhesión por evaluaciones de tensión (A), corte (B) y desprendimiento (C y D)</i> <sup>49</sup> .....	19
<i>Figura 8. Aparatos para la determinación de bioadhesión ex vivo. a) Nagai</i> <sup>19</sup> , <i>b) Robinson</i> <sup>43</sup> , <i>c) Ponchel y Touchard</i> <sup>23,49</sup> , <i>d) y e) Marvoka</i> <sup>39, 40</sup> .....	21
<i>Figura 9. Aparatos para la determinación in vitro de la bioadhesión. a) Smart y Kellaway</i> <sup>64</sup> , <i>b) Nagai</i> <sup>22</sup> , <i>c) Peppas y Mikos</i> <sup>49</sup> <i>y d) Gurny</i> <sup>12</sup> .....	24
<i>Figura 10. Equilibrio de hinchamiento del policarbofil a varios pHs</i> <sup>48</sup> .....	31
<i>Figura 11. Efecto del pH sobre la bioadhesión in vitro del policarbofil a mucosa estomacal de conejo</i> <sup>48</sup> .....	31

<i>Figura 12. Perfiles plasmáticos comparativos de acetato de medroxiprogesterona por vía oral (tabletas de 10 mg) y por vía intravaginal (anillo con 100 mg)<sup>6</sup></i> .....	34
<i>Figura 13. Influencia del pH sobre la fuerza de adhesión del Carbopol 934P a mucosa vaginal de cerdo</i> .....	45
<i>Figura 14. Tiempo de residencia del Carbopol 934P a mucosa vaginal de cerdo</i> .....	46
<i>Figura 15. Microfotografías de la interacción física entre la mucosa vaginal de cerdo y el Carbopol 934P después de la separación en la evaluación de fuerza de adhesión a pH = 6.0</i> .....	48
<i>Figura 16. Microfotografías de la distribución de gránulos de C934P sobre mucosa vaginal de cerdo después de la prueba de retención</i> .....	49
<i>Figura 17. Curva de marcadores de peso molecular</i> .....	50
<i>Figura 18. Termogramas de muestras resuspendidas y liofilizadas de moco vaginal purificado (a), Carbopol 934P (b) y mezclas de moco vaginal purificado:Carbopol 934P en proporciones 25:75, 50:50 y 75:25 (c, d y e, respectivamente)</i> .....	51
<i>Figura 19. Termograma del segundo barrido térmico del moco vaginal purificado después del enfriamiento de la primera corrida (a). Termogravígrama del moco vaginal purificado (b)</i> .....	52

## INDICE DE TABLAS

<i>Tabla I. Comportamiento bioadhesivo de algunos compuestos</i> <sup>34, 63</sup> .....	28
<i>Tabla II. Fuerza de adhesión de algunos polimeros a mucosa vaginal de cerdo</i> <sup>14</sup> .....	29
<i>Tabla III. Prevalencia de la resequedad vaginal: aumento con la edad</i> <sup>39</sup> .....	39
<i>Tabla IV Constantes de velocidad de eliminación de gránulos de Carbopol 934P mucosa vaginal de cerdo in situ</i> .....	46
<i>Tabla V. Características del moco vaginal purificado</i> .....	50

## LISTA DE ABREVIATURAS

Acido poliacrilico	paa
Carbopol 934P	C934P
Carboximetilcelulosa sódica	CMC
Hidroxiopropilmetilcelulosa	HPMC
Hidroxiopropilcelulosa	HPC
Lisofosfatidilcolina	LPC

## RESUMEN

*Los polimeros bioadhesivos han recibido considerable atención como plataformas para la entrega de fármacos, principalmente, por su capacidad para prolongar el tiempo de estancia de las formas de dosificación y versatilidad para localizarlas en regiones específicas del organismo, originando un aumento en la biodisponibilidad. Con la finalidad de emplear al Carbopol 934P (C934P) en formulaciones bioadhesivas vaginales, se valoró el comportamiento bioadhesivo del polimero en diferentes condiciones sobre mucosa vaginal de cerdo y fueron analizadas las interacciones presentes durante la mucoadhesión. Inicialmente, se evaluó la influencia del pH (2-12) en la fuerza de adhesión del C934P sobre la mucosa vaginal, posteriormente, fué determinado el efecto del tamaño de partícula de gránulos del polimero (631, 335 y 214  $\mu\text{m}$ ) sobre el tiempo de residencia en la mucosa. En ambos estudios se tomaron muestras del tejido y fueron observadas por Microscopía Electrónica de Barrido. En la segunda fase, se purificó moco vaginal de cerdo (mvp), identificándose por electroforesis dos proteínas (PM de 28.5 y 26.2 KD). Finalmente, mezclas en diferentes proporciones de mvp-C934P fueron analizadas por Calorimetría Diferencial de Barrido de 50 a 300°C. Los resultados mostraron que, el comportamiento bioadhesivo del C934P sobre la mucosa vaginal de cerdo fué óptimo en un intervalo de pH= 4.5-6.0, mientras que, las partículas con diámetro de 335  $\mu\text{m}$  tuvieron la mejor retención. En el análisis calorimétrico, la pérdida en la transición de fase proteica del mvp en las mezclas mvp-C934P, puede ser indicativa de la formación de una asociación entre las proteínas aisladas y las cadenas poliméricas. Concluyendo, el C934P presentó buenas propiedades para ser usado como excipiente en formas farmacéuticas bioadhesivas vaginales, además, la posible asociación polimero-proteínas pueden ser un factor que contribuya en la mucoadhesión.*

## INTRODUCCION

La bioadhesión es definida como la unión de macromoléculas sintéticas o biológicas a un tejido biológico<sup>1</sup>. Cuando el bioadhesivo es aplicado a un epitelio mucoso, las interacciones bioadhesivas ocurren inicialmente con la capa de moco, por lo que, el fenómeno es referido como mucoadhesión. En la última década, los polímeros bioadhesivos han recibido considerable atención como plataformas para la entrega de fármacos, principalmente, debido a su capacidad para prolongar el tiempo de estancia de las formas de dosificación en sitios de administración cubiertos por tejido mucoso y por su versatilidad para localizarlas en regiones específicas del organismo, originando un aumento en la biodisponibilidad del fármaco.

Las formas farmacéuticas bioadhesivas forman parte de un nuevo tipo de preparaciones que pueden hacer a los tratamientos más efectivos y seguros, no únicamente, para aplicaciones tópicas, sino también sistémicas. La adhesión a la mucosa, una bioadhesión, es un fenómeno interfacial que no debería ser muy diferente de la adhesión convencional, sino fuera por las propiedades especiales y características de los tejidos biológicos. Los fundamentos bioadhesivos han sido explicados por varios grupos de investigadores e incluyen desde los aspectos superficiales e interfaciales hasta los moleculares que involucran los tipos de enlaces que pudieran participar en el fenómeno.

La bioadhesión puede orientarse a la solución de problemas de biodisponibilidad, resultado de una muy corta estancia de la forma de dosificación a nivel de absorción del principio activo. Podemos citar algunos ejemplos: en el caso de la administración sublingual, que es de gran interés porque provee una posibilidad de evitar la destrucción por líquidos gastrointestinales (pH y enzimas) o inactivación por el primer paso hepático, presenta la frecuente dificultad de mantener a la tableta en un sitio adecuado, incluyendo el no ser deglutida. Por la vía oral, el vaciamiento gástrico en conjunto con el peristaltismo, desafortunadamente, pueden deslocalizar al ingrediente activo de su sitio de absorción. En la administración rectal, con intentos de actividad sistémica, es importante mantener la forma de dosificación farmacéutica en la parte baja del recto, donde las venas hemorroidales escapan del metabolismo hepático. Para la administración vaginal, es altamente deseable que la forma de dosificación no sea eliminada muy rápido de su sitio de acción. En la vía nasal es necesario evitar el desplazamiento del principio activo por el movimiento ciliar. Y por último, pero no menos importante, en la administración ocular, la garantía de mantener ubicada la forma de dosificación por un tiempo suficientemente largo es una condición para su actividad.

Particularmente, se ha comprobado que la vía intravaginal puede ser muy útil para la administración de fármacos con fines de actividad sistémica. El principal inconveniente para la entrega de fármacos por esta vía es el tiempo tan corto que permanece la forma de dosificación farmacéutica en la vagina, lo cual, se debe a que es removida por la misma acción de limpieza del tracto vaginal. La capacidad de los polímeros bioadhesivos para adherirse a las mucosas, los hace candidatos privilegiados para solucionar este problema, además, de su excelente funcionamiento como plataformas de liberación.

En estudios previos medimos la fuerza de adhesión de varios polímeros a la mucosa vaginal de cerdo, los resultados mostraron que el Carbopol 934P (C934P) tenía excelentes propiedades bioadhesivas. Partiendo de este hecho y con la finalidad de emplear al C934P en formulaciones bioadhesivas vaginales para entrega de fármacos, decidimos plantear el presente estudio en dos direcciones: 1o) evaluar el comportamiento bioadhesivo del C934P en diferentes condiciones y 2o) aportar evidencias que nos permitieran indagar sobre el mecanismo mucoadhesivo entre el C934P y la mucosa vaginal de cerdo.

La primera fase del trabajo consistió en evaluar la fuerza de adhesión del C934P en función del pH sobre mucosa vaginal de cerdo y determinar si el tamaño de los gránulos del polímero podría influir en su tiempo de residencia vaginal. Ambos estudios, en conjunto, nos determinaron si era conveniente el empleo del polímero en formas farmacéuticas bioadhesivas para aplicación vaginal.

Teóricamente, conocer y entender los eventos que suceden durante la bioadhesión traería consigo el desarrollo racional de polímeros con propiedades superficiales adecuadas para la mucoadhesión. La peculiar interacción moco vaginal- polímero bioadhesivo es semejante a aquella que se forma entre un fármaco con su receptor, es decir, las características fisicoquímicas de las macromoléculas que componen al moco y al polímero se acoplan para formar enlaces bioadhesivos. Algunos investigadores han analizado las propiedades de los polímeros necesarias para la mucoadhesión, sin embargo, hay pocos estudios con respecto a los componentes biológicos del sustrato.

En la segunda fase de nuestro estudio se planteó purificar moco vaginal de cerdo, realizarle una caracterización básica y enfrentarlo al polímero bioadhesivo C934P para analizar su interacción por medio de Calorimetría Diferencial de Barrido y Microscopía Electrónica de Barrido. Es claro que, la finalidad en esta etapa del trabajo fué encaminada al aporte de evidencias para esclarecer el mecanismo de mucoadhesión.

Sintetizando, la importancia del presente trabajo radica en estudiar la factibilidad de usar a un polímero bioadhesivo (C934P) para su posible formulación en formas farmacéuticas bioadhesivas intravaginales. Además, aportar evidencias que permitan plantear un modelo del mecanismo de mucoadhesión, para que en un futuro, se tenga una aplicación racionalizada de los polímeros bioadhesivos en los sistemas para entrega de fármacos.

## 1. CONCEPTOS

La adhesión, en su concepción más simple, puede ser definida como el enlace producido por el contacto entre un adhesivo preso-sensitivo y una superficie. Hace algunos años, la "American Society for Testing and Materials" extendió el concepto, definiéndola como el estado en que dos superficies son mantenidas unidas por fuerzas interfaciales, las cuales, pueden consistir en enlaces de valencia, ensambles o ambas.<sup>25</sup>

La bioadhesión es la capacidad de un material (sintético o biológico) para adherirse a un tejido biológico por un período extenso de tiempo. Partiendo de este hecho, un bioadhesivo es definido como una sustancia capaz de interactuar con materiales biológicos y ser retenido sobre ellos por períodos prolongados de tiempo.<sup>34, 51</sup>

Hay una gran variedad de fenómenos bioadhesivos que satisfacen las anteriores definiciones. Por conveniencia, bioadhesión y bioadhesivo son clasificados en tres tipos, basándose en observaciones biológicas, más que en mecanismos bioadhesivos. La bioadhesión Tipo I es caracterizada por la adhesión que ocurre entre objetos biológicos sin participación de materiales artificiales, la fusión celular y la agregación celular son buenos ejemplos de ella. La Tipo II se refiere a la adhesión de materiales biológicos a sustratos artificiales, ésta puede ser representada por la adhesión celular sobre platos de cultivo o la adhesión de crustáceos a varias sustancias incluyendo metales y otros materiales sintéticos. Finalmente, la Tipo III involucra la adhesión de sustancias artificiales a sustratos biológicos, tales como, la adhesión de polímeros a la piel o a otros tejidos.<sup>49</sup>

Los tres tipos de bioadhesión son igualmente importantes, aunque, la Tipo III es de primordial interés en el diseño de nuevos sistemas bioadhesivos de entrega de fármacos para efecto local o sistémico. Relacionado a ello, el término bioadhesión implica la adherencia de un sistema acarreador de fármaco a un sitio biológico específico. La superficie biológica puede ser tejido epitelial, o la cubierta mucosa en la superficie de un tejido; en éste último, las interacciones iniciales ocurren con la capa de moco, por lo que, el fenómeno es llamado mucoadhesión.<sup>49, 51</sup>

## 2. IMPORTANCIA DE LOS SISTEMAS MUCOADHESIVOS

Actualmente, existe un creciente interés orientado a la entrega de agentes biológicamente activos, local o sistemáticamente, a través de las membranas mucosas. Las vías de administración mucosales son útiles para la administración de fármacos que son susceptibles de una extensiva degradación gastrointestinal y/o en el primer paso del metabolismo, o simplemente, para aquellos agentes que presentan problema de biodisponibilidad debido a sus propiedades fisicoquímicas.

La mucoadhesión podría resolver varios problemas de los sistemas convencionales y de liberación controlada: a) localiza a los fármacos en una región particular y de este modo incrementa su

biodisponibilidad, b) la fuerte interacción entre el polímero y el moco que recubre al tejido ayuda a prolongar el tiempo de contacto y permite la localización, un factor esencial cuando la modificación de la permeabilidad del tejido es importante para la entrega y c) bloquean el metabolismo de enzimas en un área determinada.<sup>23</sup>

### **2.1 Administración bucal**

Es de gran interés porque provee la posibilidad de evitar la destrucción por líquidos gastrointestinales o la inactivación por el metabolismo hepático, tal efecto, se debe a que una vez absorbido el fármaco entra a la circulación sistémica sin que pase a través de la circulación portal. Además, la absorción de moléculas liposolubles a través de la mucosa bucal es rápida y los efectos del fármaco por esta vía pueden aparecer en dos minutos. No obstante, es frecuente que en la vía bucal se presente la dificultad de mantener a la forma farmacéutica en un lugar apropiado de la boca o incluso evitar su deglución. Localmente, los fármacos usados en la boca incluyen antimicrobianos, antiinflamatorios y anestésicos locales.<sup>4,26</sup>

Las formulaciones farmacéuticas convencionales para dichos fármacos abarcan comprimidos, enjuages, geles y pastas. La liberación de estas preparaciones contienen una dosis de carga alta que proporciona el efecto terapéutico inmediato, sin embargo, ésta declina rápidamente a niveles subterapéuticos. La formulación de un comprimido bucal convencional produce, localmente, niveles efectivos de fármaco por un periodo de menos de una hora y la administración repetida es normalmente limitada a menos de 10 aplicaciones por día a causa de la toxicidad sistémica por la gran cantidad de fármaco deglutido. Aparte de los problemas involucrados con la frecuente administración, los productos son poco adecuados para una terapia nocturna efectiva. Además, los comprimidos bucales convencionales tienden a incrementar el flujo salivar cuando son chupados, reduciendo la concentración local del fármaco y su residencia en la boca. Los enjuages bucales tienen incluso más efecto transitorio que los comprimidos, mientras que los geles y las pastas son difíciles de retenerse en la boca y tienen pobre aceptabilidad del paciente.<sup>8</sup>

Los polímeros mucoadhesivos como el Carbopol 934P (C934P), carboximetilcelulosa sódica (CMC) e hidroxipropilcelulosa (HPC) son de uso conveniente en preparaciones diseñadas para el tratamiento bucal local a causa de su adhesividad y capacidad para la liberación sostenida de fármacos. Cuando se hidratan con agua pueden adherirse a la mucosa oral y oponer resistencia a la salivación, movimientos de lengua y deglución por un periodo significativo de tiempo. Las formas de dosificación mucoadhesivas bucales han sido investigadas por Nagai y col. para la administración sistémica de insulina y nifédipina y para la entrega local de lidocaina, acetónido de triamcinolona y prostaglandinas. Investigaciones similares fueron realizadas por Collins y Deasy a un comprimido bucal mucoadhesivo con cloruro de cetilpiridinio, basándose en estudios *in vivo* e *in vitro*, mostraron que el comprimido bioadhesivo proveía niveles más efectivos de fármaco con una adecuada aceptación, sabor y poca irritación por un tiempo superior a las tres horas.<sup>8, 21, 45</sup>

### **2.2 Administración rectal**

Para propósitos de actividad sistémica, es importante mantener la forma de dosificación farmacéutica en la parte baja del recto, donde la venas hemorroidales alcanzan la vena cava sin entrar a la circulación portal hepática, por lo tanto, los fármacos absorbidos a través de la mucosa rectal no son sujetos al primer paso

de eliminación en el hígado. Normalmente, los agentes terapéuticos comúnmente dados por vía sublingual puede ser formulados también en supositorios para administración rectal. Otros fármacos que pueden administrarse por esta vía son aminofilina, paraldehído y tiopentona.<sup>4, 25, 26</sup>

### **2.3 Administración vaginal**

Es un requerimiento indispensable que la forma farmacéutica no sea eliminada prematuramente de su sitio de actividad. Por lo general, los fármacos formulados en óvulos vaginales son para acción local en el tratamiento de infecciones o como agentes espermaticidas, no obstante, la absorción puede ocurrir por el mismo mecanismo que a través de otras membranas mucosas.<sup>4, 25</sup>

### **2.4 Administración nasal**

En años recientes, la posibilidad de usar la vía intranasal para la administración de agentes activos, que no son absorbidos oralmente, ha cobrado gran interés. Varias investigaciones concluyen que un sistema de entrega nasal pudiera ser extremadamente útil para la administración sistémica. Los estudios incluyen el diseño de formas farmacéuticas de liberación sostenida como en el caso del paladar bioadhesivo propuesto por Hussain y col., el análisis del comportamiento de microesferas bioadhesivas dentro de la cavidad nasal usando marcadores radioactivos trabajado por Vidgren, o incluso, el desarrollo de modelos matemáticos como el de Gonda y Gipps que permiten describir el comportamiento de un fármaco en un sistema de entrega colocado en la cavidad nasal.<sup>15, 19, 25, 68</sup>

### **2.5 Administración ocular**

Una condición necesaria para la actividad de formas de dosificación es la garantía de mantenerse en un lugar por un tiempo suficientemente largo. La entrega tópica de fármacos en el ojo es, significativamente, contrarrestada por el lagrimeo, goteo de soluciones drenadoras y la absorción en otros sitios blanco. De todas ellas, la pérdida del fármaco a través de las soluciones drenadoras y del flujo lagrimal son las que contribuyen en mayor medida. Por lo general, una pequeña fracción (1-3%) del fármaco aplicado penetra la córnea y se extiende a los tejidos intraoculares.<sup>20, 25, 67</sup>

Normalmente, para ciertos fármacos, la administración frecuente de gotas oculares es necesaria para mantener un nivel adecuado en el ojo. Por esta razón, han sido reportados un número considerable tanto de formas farmacéuticas como de vehículos destinados a prolongar el tiempo de residencia ocular de medicamentos aplicados tópicamente, entre ellos se encuentran suspensiones, ungüentos y geles acuosos. Estos sistemas de entrega ocular de fármacos ofrecen ciertas mejoras sobre las formas de dosificación líquidas convencionales, pero a causa de problemas como "la visión borrosa" en o la falta de comodidad del paciente, no son universalmente aceptados. En realidad, una buena biodisponibilidad ocular después de la entrega tópica del fármaco en el ojo se mantiene como un desafío que todavía no está satisfactoriamente resuelto.<sup>67</sup>

Desde el punto de vista de la aceptabilidad del paciente, una forma de dosificación líquida es preferible. Idealmente, el líquido debería poder sostener la liberación del fármaco y mantenerse en contacto con el frente del ojo por periodos extensos de tiempo. Retener al fármaco en este sitio a través del uso de mucoadhesivos, los cuales se unen al moco conjuntival, es una estrategia prometedora que incrementaría sustancialmente la biodisponibilidad de los fármacos oculares. Existen estudios que han mostrado mejoras en la biodisponibilidad de fármacos poco solubles como la progesterona, pilocarpina y fluorometolona.<sup>10, 13, 20, 30, 67</sup>

## **2.6 Administración oral**

Una limitación significativa sobre los sistemas de entrega de fármacos es el tránsito gastrointestinal. Desafortunadamente, el vaciamiento del estómago y el peristaltismo intestinal pueden deslocalizar a la forma de dosificación sólida o líquida del sitio de absorción de principio activo. Ambos fenómenos hacen imposible mantener constante el nivel plasmático del activo, como sucede con aquellos que se absorben en la porción superior del intestino delgado.<sup>23</sup>

El tiempo de tránsito en humanos es relativamente muy corto, se estima más o menos de 8 a 10 h desde la boca hasta el colon, con considerables fluctuaciones en los tiempos individuales. Esto es un gran obstáculo incluso en preparaciones de formas de dosificación una vez al día. Sería deseable tener un tiempo de tránsito de 24 h para minimizar los problemas de aceptación del paciente y maximizar la terapia farmacológica con sistemas de liberación controlada o quizás tener un tiempo de tránsito de 3 a 4 h para condiciones específicas. El control de la localización con un sistema de entrega en una región específica del tracto gastrointestinal daría numerosas y potenciales ventajas. Naturalmente, para fármacos con una ventana de absorción o tal vez por razones de estabilidad, la capacidad para localizar ofrece un intento para mejorar la efectividad del activo. Igualmente, el contacto íntimo del sistema de entrega con la membrana de absorción, no únicamente mejora la absorción total, sino que también influye sobre la velocidad de absorción.<sup>7, 26</sup>

Varios intentos han sido reportados como vías para prolongar el tránsito gastrointestinal, algunos han propuesto modificar la densidad o el tamaño de la partícula y el uso de materiales fibrosos. Sin embargo, algunos de estos intentos además de ser controversiales, generalmente, derivan en resultados variables y no proveen un contacto íntimo con la membrana de absorción.<sup>7</sup>

Un esfuerzo importante para disminuir la velocidad de tránsito intestinal de un fármaco está basado en el empleo de polímeros mucoadhesivos que se enlazan a la mucina gastrointestinal o superficies epiteliales. Estos agentes son útiles en la entrega de activos para los propósitos de a) retención de la forma de dosificación en el tracto gastrointestinal e b) incremento en la intimidad y duración del contacto con la membrana de absorción. Experimentalmente, se ha comprobado que partículas mucoadhesivas pueden prolongar su estancia en el estómago por más de un día e incluso se ha mejorado la biodisponibilidad de fármacos poco biodisponibles, como la clorotiazida, al emplear una forma de dosificación oral mucoadhesiva.<sup>7, 33</sup>

En resumen, los polímeros bioadhesivos han recibido considerable atención como plataformas para la entrega controlada de fármacos debido a su capacidad para prolongar el tiempo de residencia de las

formas de dosificación y por su habilidad de localización en regiones específicas para aumentar la biodisponibilidad del principio activo. Los sistemas mucoadhesivos de entrega de fármacos han sido desarrollados para aplicaciones oculares, vaginales, bucales y nasales, algunos ya se encuentran disponibles en el mercado y otros están bajo desarrollo.

### 3. CAPA DE MOCO

Para una completa comprensión de los eventos que ocurren en la bioadhesión se requiere de un conocimiento de los sustratos involucrados. Las membranas mucosas de la boca, ojos, nariz, vagina y tracto gastrointestinal son los sustratos biológicos donde se aplican los sistemas bioadhesivos de entrega de fármacos. El bioadhesivo debe interactuar y/o penetrar la capa superior de moco de estos tejidos antes que alcance la superficie celular, tal evento es necesario que suceda. El moco es un bioadhesivo natural que presenta propiedades bioadhesivas debidas a la gran variedad de moléculas y enlaces que lo unen firmemente a la superficie celular. La interacción moco-superficie celular sirve como modelo descriptivo de un sistema bioadhesivo.<sup>34</sup> Algunas características relacionadas con la capa de moco serán discutidas con el fin de ilustrar su comportamiento.

Generalmente, el término moco es usado para referirse a la secreción total de la membrana mucosa. El fluido mucoso se adhiere al epitelio adyacente y lo protege de ataques mecánicos, bacterianos, virales y químicos. Su composición varía ampliamente dependiendo de la especie animal, localización anatómica y si el organismo está en un estado normal o patológico. El moco contiene agua (más del 95.0 % por peso), glucoproteínas (0.5-5.0 %), bajas proporciones de lípidos, sales minerales (1.0 %) y proteínas libres (0.5-1.0 %).<sup>12</sup>

Las glucoproteínas, con pesos moleculares entre  $2 \times 10^6$  y  $15 \times 10^6$  daltons, son los componentes más importantes, ya que, imparten al moco las características de gel y las propiedades adhesivas y cohesivas. Básicamente, estas macromoléculas consisten de una proteína central sobre la cual se unen cadenas de oligosacáridos (Figura 1a). Las cadenas glucosídicas contienen en promedio de 8-10 residuos de monosacáridos de cinco tipos diferentes: L-fucosa (6-deoxi-L-galactosa), D-galactosa, N-acetil-D-glucosamina (2-acetamida-2-deoxi-D-glucosa), N-acetil-D-galactosamina (2-acetamida-2-deoxi-D-galactosa) y ácido siálico. En humanos el único ácido siálico importante es el ácido N-acetilneurámico (ácido 5-acetamida-3,5-dideoxi-D-glicero-D-galacto-nonulosónico). Los aminoácidos son principalmente, serina, treonina y prolina. Las uniones con la proteína central son del tipo O-glucosídico, entre N-acetilgalactosamina y serina o treonina. Muchos de los residuos terminales en las cadenas laterales de oligosacáridos son ácidos siálicos que se cargan negativamente a valores de pH mayores a 2.8 y hacen de la proteína un polielectrolito aniónico. De igual manera, la presencia de residuos sulfato contribuye a la carga negativa del moco.<sup>12, 23, 25, 34, 51</sup>

La estructura gelosa del moco es consecuencia de una asociación intermolecular de glucoproteínas en una red polimérica. Inicialmente, se pensó que era un tetrámero (Figura 1b), ahora se cree que es una cadena terminal eslabonada con numerosos entrecruzamientos. Ha sido propuesto que entre las cadenas resultan uniones disulfuro (intracadenas) y asociaciones macromoleculares debidas a enlaces físicos estabilizados por interacciones electrostáticas (enlaces hidrógeno, enlaces salinos) u otros contactos no covalentes entre las cadenas de oligosacáridos o entre cadenas y la proteína central de la molécula (Figura 2).<sup>12, 33, 51</sup>

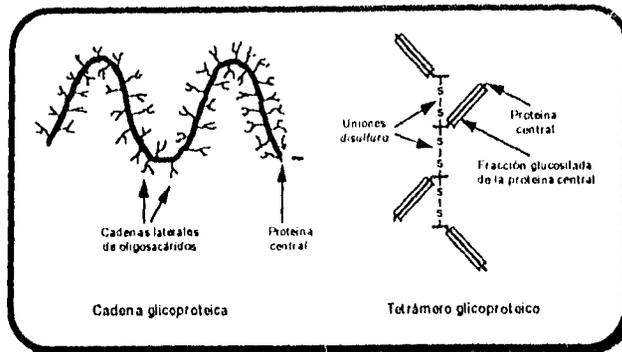


Figura 1. Representación esquemática del moco<sup>34</sup>

La cubierta de moco en la superficie epitelial tiene un grosor heterogéneo que varía de 5 a 200  $\mu\text{m}$  con un promedio de 80  $\mu\text{m}$  y tiene entre otras funciones:

*a) Protectora:* este papel del moco se hace evidente a nivel del estómago, donde, debido a su hidrofobicidad, es capaz de proteger a la mucosa de la difusión del ácido clorhídrico desde el lumen a la superficie epitelial. La mucosa gástrica puede actuar como una capa de agua inmóvil, en la cual, los iones hidrógeno que difunden desde el lumen son neutralizados por el bicarbonato proveniente de la secreción en la superficie del epitelio.<sup>12</sup>

*b) Adhesiva:* el moco tiene fuertes propiedades cohesivas y firmes enlaces a la superficie celular epitelial, hecho que se pone de manifiesto al formar una capa continua de gel. Para poder describir el mecanismo de bioadhesión a este nivel se deben considerar la estructura y densidad de las cadenas laterales de oligosacáridos de la superficie celular, sus interacciones con lípidos y proteínas y la cubierta vellosa del glucocáliz.<sup>25</sup>

*c) Barrera difusional:* el moco constituye, generalmente hablando, una barrera de difusión para moléculas, y especialmente, en la absorción de fármacos. La difusión a través de la capa de moco depende en su mayoría de las características fisicoquímicas del principio activo como son: carga de la molécula, hidratación, capacidad para formar puentes de hidrógeno y peso molecular. La naturaleza misma del moco interfiere con el nivel de difusión del fenómeno, especialmente, debido a la concentración de glucoproteínas y por el grado de entrecruzamiento.

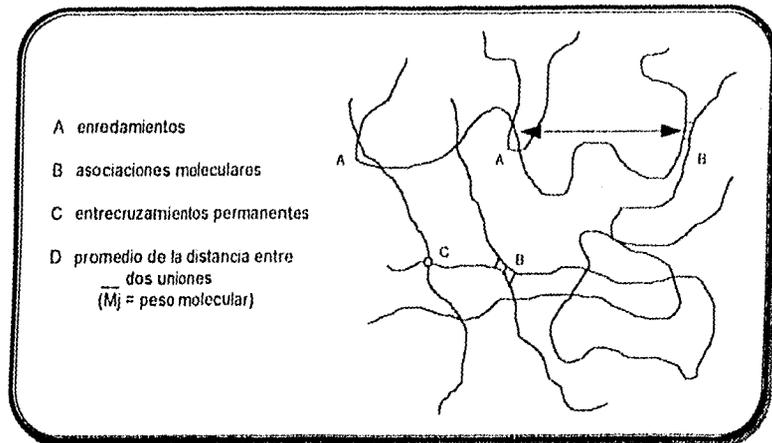


Figura 2. Estructura entrecruzada en la red de moco intestinal<sup>42,51</sup>

#### 4. MECANISMO DE MUCOADHESION

Varios modelos han sido propuestos para explicar el proceso de mucoadhesión, en su mayoría derivan de aquellos propuestos para describir la adhesión de interfases polímero-polímero e incluyen las teorías de adsorción, difusión, electrostática y mecánica. De las primeras adoptadas para entender el mecanismo bioadhesivo tenemos:

- 1) La *teoría electrónica* propuesta por Derjaguin y Smilga establece la probabilidad de que exista una transferencia de electrones en la superficie de contacto del polímero bioadhesivo y la red glucoproteica por efecto de sus diferencias electrónicas. El resultado es la formación de una doble capa eléctrica en la interfase bioadhesiva, en la cual, estarán presentes fuerzas atractivas responsables de la adhesión.<sup>41</sup>
- 2) Kemball y Huntsberger definieron la *teoría de adsorción*. De acuerdo con ella, después de un contacto inicial entre el sistema bioadhesivo y el tejido, la adhesión ocurrirá a causa de fuerzas superficiales que actúan entre los átomos de las dos superficies. Tanto enlaces químicos primarios como secundarios son establecidos.<sup>41</sup>

Una vez conocidas ambas teorías, se hace evidente que el fenómeno de bioadhesión no puede ser explicado por modelos tan simples, sobre todo porque la naturaleza biológica de uno de sus componentes le confiere características particulares que deben tomarse en cuenta. Por lo tanto, es necesario un análisis que involucre más detalladamente al sustrato biológico que participa en la bioadhesión.

Para que la bioadhesión ocurra se requieren una sucesión de fenómenos, cuya función depende de la naturaleza adhesiva. Las fases de la bioadhesión pueden resumirse como sigue: inicialmente, debe existir un contacto íntimo entre el bioadhesivo y el tejido receptor, ello depende de la buena humectación de la superficie bioadhesiva o de su hinchamiento; en una segunda fase, se desarrolla la penetración del bioadhesivo a los pliegues en la superficie del tejido, o bien, la interpenetración de las cadenas del bioadhesivo con las del moco; por último, se establecen enlaces químicos débiles para fijar la asociación de cadenas.<sup>12</sup>

#### 4.1 Contacto íntimo mucosa-bioadhesivo

Una vez que el bioadhesivo y el sustrato biológico son puestos en contacto, el polímero penetra los pliegues del tejido sobre el cual es aplicado, a este nivel, la rugosidad de la superficie del tejido se considera un factor importante para la bioadhesión.<sup>12, 23</sup>

Cuando un líquido viscoso se distribuye sobre una superficie sólida aparentemente se aprecia que la ha cubierto completamente, sin embargo, existen muchas bolsas de aire en los pequeños poros de la superficie y en los pliegues donde el líquido adhesivo ha formado un manto cobertor sobre picos vecinos. Es decir, un adhesivo que se distribuye espontáneamente sobre un sólido, no presenta en su totalidad un íntimo contacto en la interfase líquido-sólido. Experimentalmente, Griffith mostró que las uniones adhesivas pueden decaer un poco en su fuerza cuando se presentan hendiduras, grietas, burbujas de aire, espacios vacíos u otros defectos superficiales. Por lo tanto, el gran número de irregularidades y pliegues en la superficie de un tejido deben ser tomados en cuenta para efectos de fuerza, durabilidad y adhesividad en un sistemas bioadhesivo.<sup>25</sup>

Una superficie rugosa puede ser definida por la relación entre la máxima profundidad ( $d$ ) y la máxima amplitud ( $h$ ) (Figura 3). Una rugosidad insignificante para propósitos adhesivos ocurre cuando el cociente  $d/h$  toma valores menores a  $1/20$ . En el caso de valores mayores a esta razón, es indicativo que, únicamente, materiales con gran fluidez pueden penetrar a los tejidos, y por lo tanto, su viscosidad y capacidad de mojado son los factores de mayor relevancia para una bioadhesión adecuada.<sup>51</sup>

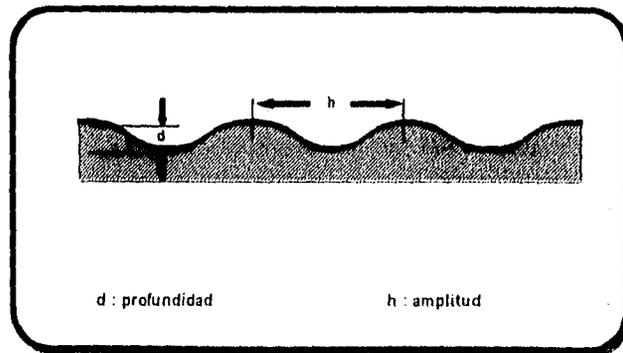


Figura 3. Rugosidad superficial en un tejido<sup>42, 51</sup>

Cuando el material bioadhesivo es sólido, su hinchamiento por efecto de la humedad es indispensable para poder impartir suficiente libertad a las cadenas que lo constituyen.<sup>51</sup>

#### 4.1.1 Teoría de humectación

Un contacto molecular íntimo es un prerequisite para desarrollar enlaces bioadhesivos fuertes, para entender este punto es necesario un análisis detallado del equilibrio de humectación y el comportamiento dinámico del material bioadhesivo con el moco.

Algunas características importantes para materiales bioadhesivos líquidos incluyen: 1) un ángulo de contacto de cero o cercano a cero, 2) una viscosidad relativamente baja y 3) un contacto íntimo que excluya el aire atrapado.<sup>41</sup>

*Dispersión de un líquido sobre un sólido:* Young aportó el primer acercamiento para describir la humectabilidad y dispersión de un líquido sobre un sólido. El consideró el ángulo de contacto de un líquido y el equilibrio de una gota descansando sobre una superficie sólida plana bajo la acción de tres tensiones superficiales: a) tensión superficial de la interfase líquido-vapor ( $\gamma_L$ ), b) tensión superficial de la interfase sólido-vapor ( $\gamma_S$ ) y c) la tensión superficial en la interfase sólido-líquido ( $\gamma_{SL}$ ). Al equilibrio tenemos:<sup>36</sup>

$$\gamma_S = \gamma_{SL} + \gamma_L \cos \theta$$

La humectación total sucede si el ángulo de contacto entre un líquido y un sólido es  $0^\circ$ , si el ángulo se acerca a  $180^\circ$  implica una pobre humectación.

El tipo de humectación para un líquido que se distribuye sobre la superficie de un sólido se le llama dispersión por humectación. La tendencia para distribuirse puede ser cuantificada en términos del coeficiente de dispersión (S):

$$S = \gamma_L (\cos \theta - 1)$$

Si el ángulo de contacto es mayor a  $0^\circ$ , el término  $(\cos \theta - 1)$  sería negativo, como el valor de S. La condición para completar una humectación espontánea, es por tanto, un valor de cero para el ángulo de contacto.<sup>36</sup>

Aplicando la teoría anterior en un sistema bioadhesivo tenemos que: el coeficiente de dispersión de un líquido ( $S_b$ ) con el tejido sustrato (t) en el área gástrica (g), bajo condiciones estáticas, esta dado por la siguiente ecuación (Figura 4):

$$S_{bg} = \gamma_{gt} - \gamma_{bt} - \gamma_{bg}$$

donde,  $\gamma_{gt}$  = tensión interfacial entre el contenido gástrico y el tejido,

$\gamma_{bt}$  = tensión interfacial entre el bioadhesivo y el tejido,

$\gamma_{bg}$  = tensión interfacial entre el bioadhesivo y el contenido gástrico.

Para que un material bioadhesivo desplace el contenido gástrico y se adhiera espontáneamente sobre el tejido, el coeficiente de expansión debe ser positivo.<sup>51</sup>

#### 4.1.2 Hinchamiento

El papel del agua en el mecanismo de bioadhesión, para un material sólido, es de primordial importancia. Algunos investigadores han encontrado que existe un contenido de agua óptimo para la máxima bioadhesión. Eso puede comprenderse partiendo del hecho que, la hidratación de un coloide resulta en la relajación de moléculas, enredadas o torcidas, las cuales son capaces de liberar sus sitios adhesivos para darles la posibilidad de crear enlaces. Es decir, la hidratación de un coloide causa la disociación de los enlaces hidrógeno en el polímero. Las interacciones polímero-agua pueden disminuir las correspondientes interacciones polímero-polímero favoreciendo la interdifusión de cadenas. Así, las moléculas de agua forman una doble capa protegiendo cualquier posible interacción de un grupo funcional. La ruptura de cualquier asociación intercadena e intracadena aumenta la movilidad de la macromoléculas y facilita su interpenetración en los pliegues superficiales.<sup>12</sup>

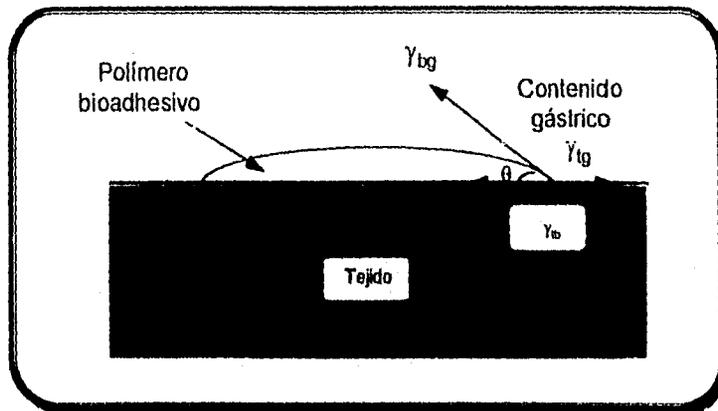


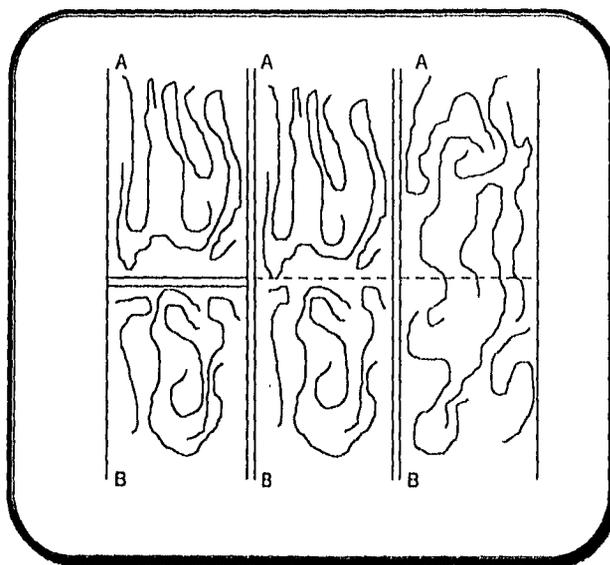
Figura 4. Distribución de una formulación líquida mucoadhesiva sobre tejido mucoso<sup>51</sup>

#### 4.2 Interpenetración: teoría de difusión

La teoría de difusión establece que la interpenetración de las cadenas de polímero y el moco pueden dar lugar a la formación de enlaces semipermanentes en estratos profundos de la red formada. Inicialmente, el mecanismo de difusión lo propuso Voyutskii para interfaces polímero-polímero. Mas tarde, el modelo fue extendido a la interfase polímero-moco por Mikos y Ponchel.<sup>51, 52, 54</sup>

Durante la interpenetración de cadenas (Figura 5), las moléculas del bioadhesivo y las cadenas suspendidas de la red glucoproteica entran en íntimo contacto. Debido a un gradiente de concentración, las cadenas poliméricas del bioadhesivo penetran a velocidades que son dependientes del coeficiente de difusión de una macromolécula a través de una red entrecruzada y de un gradiente de potencial químico. Valores comunes del coeficiente de difusión del polímero a través de la red glucoproteica del moco pueden estar en el rango de  $10^{-10}$  y  $10^{-16}$  cm<sup>2</sup>/s. En efecto, el mecanismo se visualiza como un transporte de largas cadenas de polímero a través de la interfase bioadhesiva por una difusión regular o por un arrastre dentro de la red de glucoproteínas entrecruzadas.<sup>41, 51</sup>

En los polímeros entrecruzados, la interpenetración de cadenas largas ocurre con mayor dificultad. Sin embargo, cadenas pequeñas y cadenas terminales pueden contribuir a la interdifusión.<sup>12</sup>



*Figura 5. Interpenetración de cadenas durante la bioadhesión de un polímero A con el moco B.<sup>42, 51</sup>*

Si la teoría de difusión es aceptada, la flexibilidad molecular es otro parámetro que debe tomarse en cuenta en el proceso de adhesión.<sup>25</sup>

Finalmente, además de las características topológicas, debe considerarse la buena solubilidad del medio bioadhesivo en el moco a fin de lograr una buena bioadhesión. Es decir, la diferencia de los parámetros de solubilidad del medio bioadhesivo y la glucoproteína debe ser tan cercana a cero como sea posible, lo que

implicaría, que el medio bioadhesivo tendría que ser de una estructura química similar a las glucoproteínas.<sup>41</sup>

#### **4.3 Interacciones químicas**

Los enlaces químicos adhesivos son de tipo primario y secundario. Los primeros tienen una naturaleza covalente y son el resultado de la reacción de un grupo funcional del material adhesivo con uno del sustrato; su gran fuerza resulta en enlaces permanentes indeseables en la bioadhesión. Los enlaces químicos secundarios comprenden un grupo de muchas diferentes fuerzas de atracción, incluyendo fuerzas electrostáticas, fuerzas de Van der Waals y enlaces hidrógeno e hidrofóbicos. Las atracciones electrostáticas son debido a las fuerzas de Coulomb entre moléculas de carga contraria. Las fuerzas de Van der Waals son todas las interacciones entre moléculas no cargadas. Ellas pueden ser atribuidas a tres tipos de efecto: fuerzas polares (o Keesom) debidas a interacciones dipolo permanente-dipolo permanente, fuerzas de inducción (o Debye) resultantes de la interacción de un dipolo permanente-dipolo inducido y fuerzas de dispersión (o London) se originan de cambios instantáneos en la distribución de carga alrededor de moléculas no polares y son interacciones dipolo inducido-dipolo inducido. Los enlaces hidrógeno ocurren cuando un átomo de hidrógeno específico de una molécula es asociada con otro átomo de una segunda molécula. Los grupos funcionales hidrofílicos formadores de enlaces hidrógeno son los grupos hidroxilo (-OH), carboxilo (-COOH), sulfato (-SO<sub>4</sub>H), amino (-NH<sub>2</sub>), entre otros. Los enlaces hidrofóbicos ocurren cuando grupos no polares se asocian unos con otros en solución acuosa, debido a la tendencia de las moléculas del agua a excluir moléculas no polares. Este último tipo de fuerza es de poca importancia en la bioadhesión.<sup>12, 34, 41, 42</sup>

#### **4.4 Interacciones físicas**

Los enlaces físicos o mecánicos son obtenidos por la inclusión del material bioadhesivo en los pliegues del tejido. En este caso, la superficie rugosa del sustrato se convierte en un factor importante para la bioadhesión. Únicamente materiales muy fluidos o suspensiones que puedan ser incorporadas en los pliegues irregulares del tejido pueden ser considerados como buenos sistemas adhesivos. Por lo tanto, la viscosidad de un líquido en formulaciones de liberación controlada bioadhesivas debe ser considerada como un factor de relevancia.<sup>41</sup>

#### **4.5 Separación superficial después de la bioadhesión: teoría de fractura**

La teoría de fractura en la bioadhesión intenta explicar la resistencia a la separación de dos superficies después de adherirse. La fuerza de fractura ( $\sigma$ ), equivalente a la fuerza enlazante bioadhesiva, puede ser calculada por la siguiente ecuación:

$$\sigma = \sqrt{E \epsilon / L}$$

donde,

- E = módulo de elasticidad de Young,
- $\epsilon$  = energía de fractura,
- L = longitud crítica de rompimiento sobre la separación de las dos superficies,

La rigidez del material, estimada en el módulo de Young, puede ser usada como una medida de bioadhesión. La teoría asume que, en un experimento de separación, la ruptura del enlace bioadhesivo ocurre exactamente en la interfase. No obstante, esto casi nunca sucede.<sup>12, 42, 51</sup>

#### **4.6 Teoría de fractura-interpenetración**

Peppas y Ponchel propusieron que la bioadhesión podría explicarse asociando tanto la teoría de interacción química (teoría de adsorción) entre grupos funcionales del polímero y el moco en su interfase, como la teoría de interpenetración de cadenas poliméricas en el moco. En sus estudios, también encontraron que el tiempo de relajación de las cadenas poliméricas, determinado por un análisis dinámico, era un buen indicador del comportamiento bioadhesivo del polímero.<sup>54</sup>

En esta teoría, la ruptura en la asociación adhesiva polímero-moco no ocurría en la interfase, sino por el contrario, en el interior del moco (Figura 6). El hecho coincidió con anteriores experiencias de Chang al realizar pruebas de adhesión *in vitro*. El observó que la ruptura, al separar ácido poliacrílico de mucosa gástrica de conejo, sucedía dentro de la red de moco. En resumen, puede deducirse que, la fuerza de interacción entre el polímero (ácido poliacrílico) y el moco fué mayor que la fuerza cohesiva moco-moco.<sup>7, 48, 54</sup>

### **5. METODOS PARA EL ESTUDIO DE LA BIOADHESION**

Los objetivos en el desarrollo de bioadhesivos son duplicar, simular o mejorar la adhesividad biológica, incluyendo la incorporación de ciertas propiedades de durabilidad, degradabilidad y nula toxicidad del producto. El desarrollo de un nuevo bioadhesivo y su aplicación para un uso en particular, requiere de la elucidación del mecanismo de bioadhesión. La comprensión de dicho mecanismo inicia con la evaluación del comportamiento bioadhesivo de varios materiales candidatos.

Existen diferentes métodos que son usados para medir la misma propiedad de un bioadhesivo. Hay una tendencia de cada investigador para usar su propio método de ensayo. En parte, se debe a que no hay métodos estándares de ensayo diseñados especialmente para medir una cierta propiedad de bioadhesividad. La falta de un método estándar crea confusión entre los investigadores, debido a que, datos generados en diferentes laboratorios no pueden ser comparados, por lo cual, el significado real de los valores reportados no es transferible. La estandarización de métodos de ensayo mejoraría la comunicación entre investigadores y les permitiría hablar un lenguaje común cuando comparan los datos y resultados de un ensayo. La investigación sobre bioadhesión esta aún en su etapa temprana, por lo tanto, lo que se requiere por el momento es el aporte de datos experimentales con el fin de mejorar el entendimiento del fenómeno de bioadhesión.

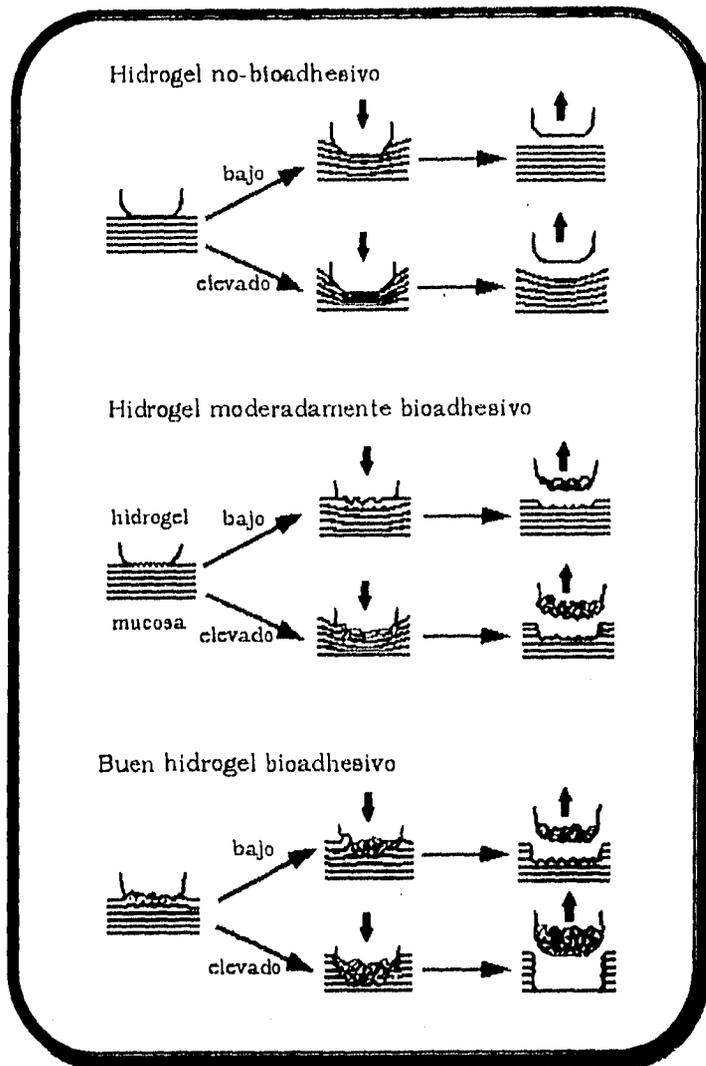


Figura 6. Interacciones entre el estrato mucoso y los hidrogeles<sup>48</sup>

En seguida, describiremos los métodos para evaluación de la bioadhesión y los parámetros que son importantes para probar y diseñar nuevos bioadhesivos.

### **5.1 Propiedades bioadhesivas**

El desempeño de un bioadhesivo puede ser evaluado por varios parámetros, tales como fuerza de adhesión, número de adhesiones o duración de la adhesión. Cabe recordar que para la medición de cualquier propiedad bioadhesiva dada, un pequeño cambio en las variables experimentales, tales como la presión de contacto inicial, el tiempo de contacto inicial o la velocidad de remoción del adhesivo, puede resultar en valores significativamente diferentes. De esta manera, aún los datos cuantitativos pueden considerarse un tanto subjetivos. Bajo esta idea, los valores numéricos pueden tomarse como una base comparativa para establecer las propiedades adhesivas medidas por un procedimiento específico bajo condiciones determinadas.

#### **5.1.1 Fuerza de adhesión**

La medición de las propiedades mecánicas de un bioadhesivo puede ser el camino más directo para cuantificar la capacidad bioadhesiva. Hay tres tipos básicos de pruebas comúnmente usadas para medir la fuerza de uniones adhesivas. Ellas son las fuerzas de tensión, corte y desprendimiento o pelado (Figura 7). Las pruebas son relativamente rápidas y simples de realizar, además, permiten seleccionar a candidatos para buenos bioadhesivos. La fuerza de tensión involucra la aplicación de fuerzas perpendiculares al plano de la unión, mientras que, en la fuerza de corte el esfuerzo es paralelo al plano de la unión; en ambos casos, la fuerza es distribuida uniformemente sobre la unión. Finalmente, la fuerza de desprendimiento limita la aplicación de la fuerza a una línea final sobre el borde de la unión; la prueba mide la capacidad para resistir fuerzas de desprendimiento, más que propiedades mecánicas de la adhesión.<sup>49</sup>

#### **5.1.2 Número de adhesiones**

La medición de la fuerza de adhesión usando las pruebas de tensión, corte o pelado sería muy difícil si un bioadhesivo se encuentra en forma de pequeñas partículas. En tal caso, el número de adhesiones puede ser usado para medir las propiedades adhesivas. El número de adhesiones ( $N_a$ ) está definido como la proporción entre el número de partículas ( $N$ ) mantenidas después de la aplicación de una cierta fuerza de despegue y el número de partículas al inicio de la prueba ( $N_0$ ). Frecuentemente, el número de adhesiones es expresado como un porcentaje:<sup>49</sup>

$$N_a = (N/N_0) 100$$

#### **5.1.3 Durabilidad**

Probablemente, la propiedad más importante de un bioadhesivo es mantenerse satisfactoriamente en el lugar indicado por un periodo deseado de tiempo. Por lo tanto, la durabilidad bioadhesiva puede ser el

último parámetro que debe ser usado para comparar varios bioadhesivos. La durabilidad no sólo depende de la fuerza del bioadhesivo, sino de otros factores que la afectan, los cuales deben ser identificados y examinados. La durabilidad de uniones adhesivas puede ser evaluada por varios métodos, tales como métodos de carga sostenida, método del límite de resistencia, prueba de fuerza cíclica o pruebas de fractura mecánica.<sup>49</sup>

### 5.2 Estudios de bioadhesión

El primer paso en la selección de un bioadhesivo para una aplicación en particular es determinar si sus propiedades son apropiadas para la aplicación que se intenta. Las evaluaciones de bioadhesión son esenciales para el desarrollo, calificación, manejo y uso apropiado de bioadhesivos. Existen un gran número de bioadhesivos en diferentes formas físicas y sustratos biológicos de diferente naturaleza, por lo tanto, la evaluación de las propiedades bioadhesivas resulta ser muy diversa y compleja. Tanto los bioadhesivos, como los no bioadhesivos, son normalmente evaluados como el componente en un sistema de muchas partes. Esto significa que un ensayo de bioadhesividad, realmente, prueba las propiedades de muchos componentes incluyendo al bioadhesivo mismo, el sustrato biológico y otras condiciones experimentales. La evaluación y comparación de las propiedades de varios bioadhesivos puede obtenerse, únicamente, si todas las condiciones del ensayo y el procedimiento experimental se mantienen constantes.

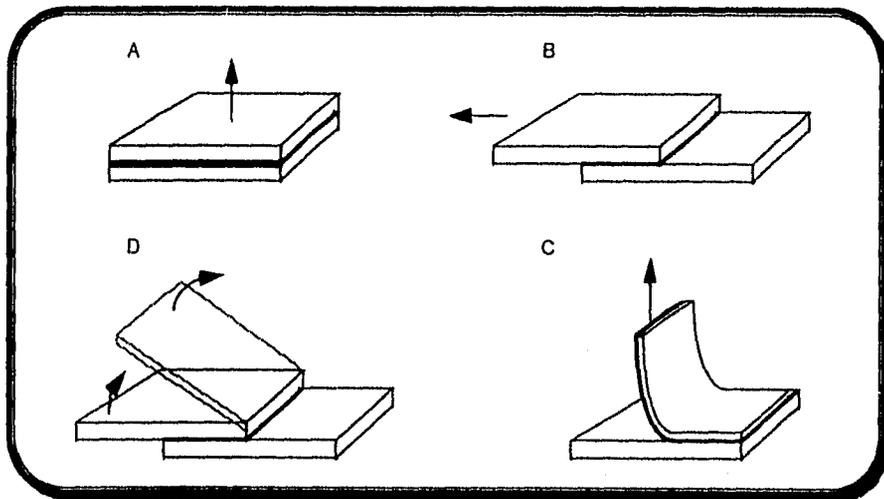


Figura 7. Medición de la fuerza de adhesión por evaluaciones de tensión (A), corte (B) y desprendimiento (C y D)<sup>49</sup>.

### 5.2.1 Métodos *in vivo*

Robinson y su grupo, con la finalidad de investigar el tránsito gastrointestinal de soportes bioadhesivos, establecieron un método *in vivo* usando ratas como modelo. Una cápsula que contenía el material bioadhesivo marcado con  $Cr^{51}$  fue insertada quirúrgicamente dentro del estómago de ratas anestesiadas. Se les permitió despertar a los animales y a un tiempo conveniente fueron sacrificados, extirpando el estómago y el intestino delgado. La radiactividad se midió en el estómago y en las 20 secciones en que fue dividido el intestino.<sup>7</sup>

Khosla y Davis con un método de *centelleo gamma*, siguieron el tránsito gastrointestinal de una forma bioadhesiva. Ellos apreciaron ciertas irregularidades en la bioadhesión a consecuencia de una inadecuada localización del sistema bioadhesivo.<sup>28</sup>

### 5.2.2 Métodos *ex vivo*

Nagai fue, probablemente, el primero en diseñar un aparato con el propósito de medir adhesividad de una forma de dosificación sólida de insulina para mucosa oral. El aparato (Figura 8a) requiere el uso de una membrana peritoneal de ratón donde la forma de dosificación es fijada y arrancada con una balanza de torsión.<sup>21</sup>

Robinson usó el mismo tipo de sistema con mucosa estomacal de conejo inmersa en una solución prueba (Figura 8b). La mucosa se aseguraba sobre un soporte fijo (al fondo) y un soporte móvil (en la parte superior). La superficie era cubierta con polímero hidratado y puesta en contacto con la mucosa del soporte superior. Después de un minuto de contacto, el soporte superior (conectado a un tensiómetro modificado) se elevaba con una fuerza a velocidad constante hasta que el polímero era separado del inoco.<sup>47</sup>

Técnicas similares fueron realizadas por Ishida usando membrana peritoneal de ratón y por Ponchel (Figura 8c) empleando mucosa sublingual bovina.<sup>25, 54</sup>

Aguilera y col. diseñaron otro método *ex vivo* que consistía en un tensiómetro de DuNouy modificado. El aparato se usó para medir la fuerza de adhesión de diferentes sustancias poliméricas a mucosa vaginal de cerdo.<sup>1</sup>

Por último, es necesario mencionar dos sistemas desarrollados por Marvola (Figuras 8d y 8e) con el fin de medir la adhesión de formas de dosificación al esófago. Cabe señalar que, en estos casos el análisis no era sobre sistemas bioadhesivos. En los métodos usó un segmento de esófago de cerdo mantenido a 37°C en solución tiroidea oxigenada. La forma de dosificación sólida (tableta o cápsula de gelatina dura) bajo estudio era pegada en un extremo del brazo de una balanza e insertada en el esófago; en seguida, se separaba progresivamente por aumento de la carga en el plato opuesto de la balanza.<sup>39, 40</sup>

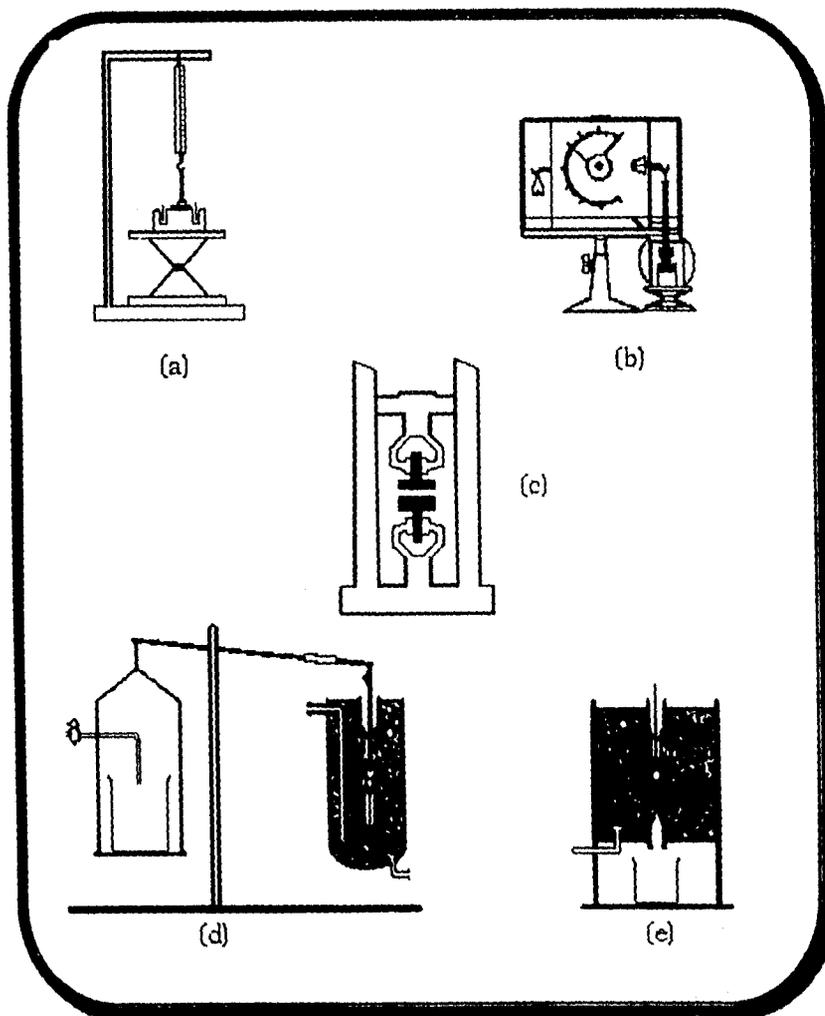


Figura 8. Aparatos para la determinación de bioadhesión ex vivo. a) Nagai<sup>21</sup>, b) Robinson<sup>37</sup>, c) Pouchel y Touchard<sup>23, 54</sup>, d) y e) Marvola<sup>39, 40</sup>

### 5.2.3 Métodos *in vitro*

#### 5.2.3.1 Medición de la fuerza de bioadhesión

Smart y col. desarrollaron un método *in vitro* para medir la bioadhesión tipo II. El aparato se basaba en el método de plato de Wilhelmy para determinar tensión superficial. El sistema consistía de un plato de vidrio recubierto con el polímero prueba y suspendido de una microbalanza; el plato era sumergido en una solución de moco y se determinaba la fuerza necesaria para separar al plato del gel (Figura 9a).<sup>63</sup>

Un método similar fué usado por Nagai para medir la adhesividad de ungüentos a la mucosa oral (Figura 9b). En el estudio, un plato de vidrio era cubierto con ungüento y se medía la fuerza necesaria para separar otro plato de vidrio movable sobre el ungüento a una velocidad constante.<sup>22</sup>

Gurny y col. emplearon tensiómetro (Instron, Mod. 1114) equipado con una celda acoplada para medir fuerza de adhesión (Figura 9d).<sup>12</sup>

Recientemente, un sistema más novedoso fué diseñado por Woolfson y col. El aparato se basó en el uso de un transformador diferencial de variables lineales y fué empleado para evaluar las propiedades de películas bioadhesivas a tejido cervical.<sup>69</sup>

#### 5.2.3.2 Análisis por fluorescencia

El primer método para estudiar bioadhesión, desarrollado por Park y Robinson, fué una técnica de sondeo con fluorescencia que consistió en una investigación de modificaciones en cultivos de células epiteliales debido a la interpenetración por moléculas de polímero. En el método, la bicapa lipídica de la membrana celular contenía un pireno fluorescente, que al momento de enlazarse con el polímero provocaba una condensación de la bicapa lipídica, dando como resultado un cambio en la fluorescencia proporcional grado de enlazamiento del polímero a la membrana celular.<sup>30</sup>

#### 5.2.3.3 Método del conjugado coloidal oro-mucina

Park propuso un método llamado "tinción oro coloidal-mucina" usado para la comparación cuantitativa de las propiedades mucoadhesivas de varios hidrogeles. La técnica empleó partículas de oro coloidal rojizas, las cuales eran estabilizadas por las moléculas de mucina adsorbidas (conjugados oro-mucina). Después de la interacción con los conjugados, los hidrogeles mucoadhesivos desarrollaron un color rojo sobre la superficie. La interacción adhesiva podía ser fácilmente cuantificada midiendo la intensidad del color rojo sobre el hidrogel o por medición de la disminución en la concentración de los conjugados debida al cambio de absorbancia a 525 nm. Park apuntó las siguientes ventajas sobre el uso de tejidos animales: 1) la técnica de tinción de oro coloidal era de desarrollo simple, 2) el costo experimental era mucho menor, 3) la técnica permitía el estudio de interacciones que suceden entre moléculas de mucina y cadenas de polímero a nivel molecular, 4) las condiciones experimentales podían mantenerse y los resultados eran altamente reproducibles y 5) fué posible hacer al conjugado oro-mucina en suficiente

cantidad para que las propiedades de un gran número de diferentes polímeros pudieran ser comparadas al mismo tiempo bajo las mismas condiciones.<sup>49</sup>

#### 5.2.3.4 Método del canal con flujo

Un método interesante fue el desarrollado por Mikos y Peppas porque permitía simular el comportamiento real de un sistema bioadhesivo gastrointestinal sobre el moco. El aparato consistía de un conducto delgado, llenado con gel de moco o solución de moco natural, que estaba conectado a través de una válvula a una fuente de fluido que podía ser un gas o un líquido viscoelástico. El conducto se adaptó sobre un microscopio óptico. Para el experimento, una partícula esférica de polímero fue colocada sobre la superficie de mucina, una vez ajustada la velocidad de flujo del fluido a condiciones fisiológicas, se abrió la válvula y el movimiento de la partícula fue seguido con una cámara. La distancia recorrida por la partícula fue medida, así como, el tiempo de separación y el tipo de movimiento (rodamiento, salto o arrastre).<sup>49</sup>

De manera similar, Ranga y Buri propusieron un método *in situ*. En su técnica, esferas de vidrio o cristales de fármaco eran cubiertos con el polímero a probar; en seguida, cantidades conocidas de las partículas recubiertas se colocaron sobre yeyuno o estómago de rata, bajo condiciones ambientales de humedad. El tejido era lavado con amortiguador de fosfatos para yeyuno o ácido clorhídrico para estómago a velocidad constante. El porcentaje de partículas retenidas sobre el tejido se estimaba como un índice de bioadhesión.<sup>36</sup>

#### 5.2.3.5 Análisis reológico

Uno de los primeros trabajos sobre el comportamiento reológico de un sistema mucina-polímero bioadhesivo fue el realizado por Hassan y Gallo. En su trabajo utilizaron un método con un viscosímetro simple para medir la fuerza del enlace bioadhesivo mucina-polímero.<sup>18</sup>

Recientemente, con la idea de obtener información sobre la segunda fase del mecanismo mucoadhesivo, la interpenetración, Mortazavi y col. investigaron el efecto que tendría el C934P sobre las propiedades reológicas y la naturaleza cohesiva del moco y los factores que podrían afectar dicha asociación. En su estudio, emplearon una técnica de espectroscopía mecánica para analizar el comportamiento reológico y determinaron que el módulo  $G'$  (una medida de resistencia a la deformación elástica) se incrementaba en una mezcla de moco-C934P, en comparación con las mediciones a geles de moco y polímero solos. Ellos atribuyeron el comportamiento al gran número de asociaciones que se forman al entrar en contacto las cadenas del moco y el polímero. El fortalecimiento del gel fue claramente afectado por el pH, sus valores mínimos se obtuvieron a pHs mayores de 8 y menores de 4.5. Finalmente, concluyeron que la teoría de interpenetración molecular era la adecuada para describir el fortalecimiento en la interfase mucoadhesivo-mucosa.<sup>41</sup>

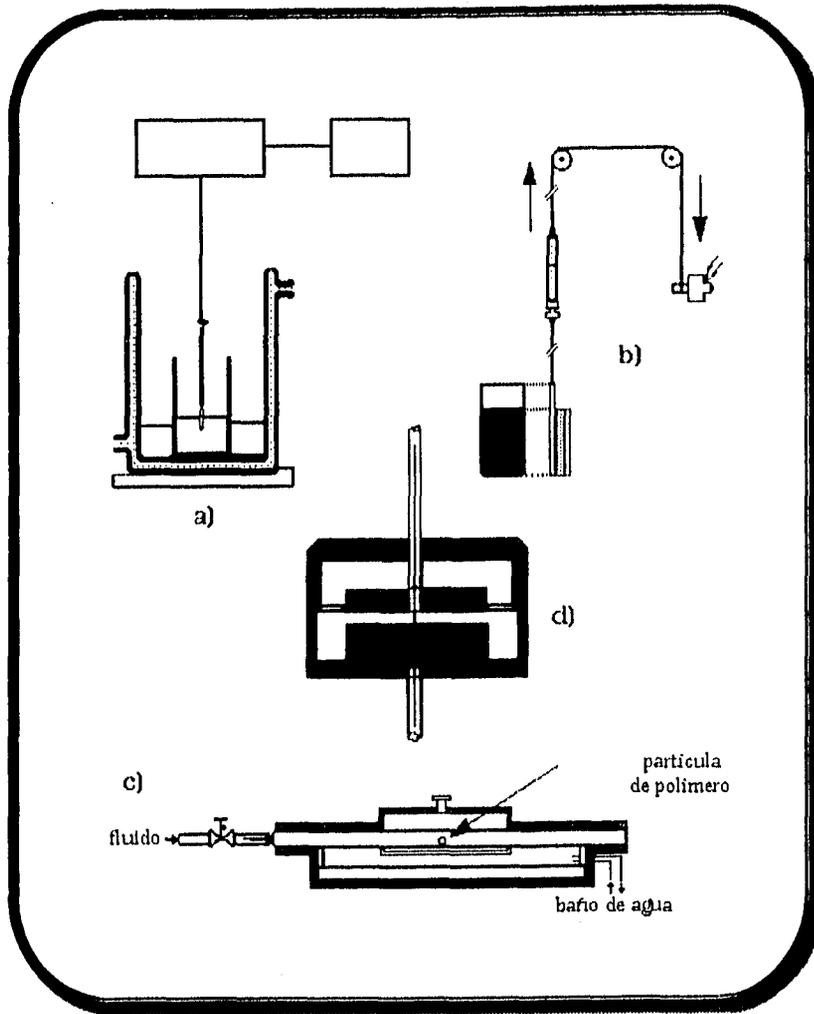


Figura 9. Aparatos para la determinación in vitro de la bioadhesión. a) Smart y Kellaway<sup>63</sup>, b) Nagai<sup>32</sup>, c) Peppas y Mikos<sup>49</sup> y d) Gurny<sup>12</sup>.

### 5.2.3.6 Visualización de la interfase mucoadhesiva

Lehr y col. usaron Microscopía Electrónica de Barrido y Transmisión para examinar visualmente la interfase cuando entran en contacto el ácido poliacrílico (paa) entrecruzado y la mucina. En el estudio, fue imposible observar la interpenetración de cadenas de la biointerfase debido a la falta de contraste a bajo niveles de irradiación y daño a la interfase por alta irradiación. Con sus resultados, Lehr y col. pusieron en entredicho el mecanismo de interpenetración.<sup>31</sup>

### 5.2.3.7 Análisis por espectroscopia de infrarrojo

Peppas y su grupo utilizaron espectroscopia de infrarrojo para analizar la interpenetración de cadenas en la interfase paa- mucina. Los resultados experimentales indicaron que el rango de pH entre 5 y 7 es el de mayor compatibilidad entre la mucina y el paa. Además, apoyados en la importancia del hinchamiento del paa para que se lleve a cabo la mucoadhesión, concluyeron que el grado de interpenetración de cadenas a través de la biointerfase es el mecanismo que limita la adhesión.<sup>23</sup>

## 6. POLIMEROS BIOADHESIVOS

Los bioadhesivos son materiales que pueden enlazarse a membranas biológicas y que son capaces de ser retenidos sobre ellas por períodos extensos de tiempo. El enlazamiento, que normalmente se debe a fuerzas interfaciales entre dos superficies, pueden ser directamente a la membrana de las capas celulares o al recubrimiento sobre la superficie membranal, como por ejemplo la capa de mucina. Los materiales bioadhesivos pueden ser de naturaleza biológica o no biológica, sin embargo, en un contexto de entrega de fármaco, normalmente es una macromolécula no biológica o un material hidrocoloide. El término "mucoadhesivo" es comúnmente usado para materiales que se enlazan a la capa de mucina de las membranas biológicas, sin embargo, en ocasiones utilizaremos el término bioadhesivo por ser más general.<sup>34, 48</sup>

### 6.1 Características del polímero importantes en la bioadhesión

Un bioadhesivo para ser usado en un sistema de entrega de fármacos, con el fin de prolongar el tiempo de tránsito y aumentar la absorción del agente activo, debería idealmente: no ser tóxico, no absorberse, preferentemente formar enlaces no covalentes con la mucina de superficies epiteliales, adherirse rápidamente al tejido húmedo, permitir una fácil incorporación de fármacos y no ofrecer impedimentos para su liberación, poseer sitios específicos de unión y ser económico. Sin duda, estas propiedades están estrechamente relacionadas a la estructura química del polímero.<sup>7</sup>

Peppas y Buri, en base a datos experimentales y análisis de las teorías de bioadhesión existentes, definieron ciertas características necesarias en un polímero para poder lograr una adecuada mucoadhesión, éstos deberían presentar: 1) grupos formadores de enlaces hidrógeno (-OH, -COOH y -NH<sub>2</sub>), 2) fuertes cargas aniónicas, 3) alto peso molecular, 4) suficiente flexibilidad en la cadena y 5)

propiedades de energía superficial favorables para expandirse sobre el moco. Las últimas tres características parecen ser más plausibles en dirección a las teorías más recientes acerca de la mucoadhesión.<sup>51</sup>

Los polímeros mucoadhesivos están divididos dentro de dos categorías: 1) compuestos que son solubles en agua y presentan cadenas lineales y 2) compuestos insolubles en agua, hinchables y que tienen una red unida por agentes entrecruzantes. Algunas de las propiedades poliméricas importantes para la bioadhesión son las siguientes:<sup>16</sup>

### *6.1.1 Peso molecular, longitud de la cadena y densidad de entrecruzamiento*

Chen y Cyr sugirieron que la fuerza bioadhesiva se incrementaba en la medida que el peso molecular del polímero aumentaba hacia 100 000, el cual pareció ser el peso molecular crítico requerido para una buena bioadhesión. En otro estudio se encontró que el peso molecular de la carboximetilcelulosa sódica debería exceder 78,600 con la finalidad de tener una adecuada bioadhesión. Ambos, peso molecular y longitud de la cadena son parámetros importantes de la macromolécula en el proceso de bioadhesión.<sup>16, 65</sup>

Para todos los polímeros insolubles hinchables en agua, las cadenas lineales están conectadas por agentes entrecruzantes, como en el caso del policarbofil, un mucoadhesivo bien conocido, el cual es ácido poliacrílico entrecruzado con divinil glicol. La densidad de entrecruzamiento del polímero tiene influencia sobre dos aspectos importantes para la bioadhesión, el número efectivo de cadenas de ácido poliacrílico en un volumen dado y el segmento móvil de la cadena. Se ha visto que la fuerza de mucoadhesión disminuye al aumentar la concentración de agente entrecruzante, una explicación parcial en la cual puede descansar este hecho es que, al incrementar la densidad disminuye el coeficiente de difusión, así como, la flexibilidad y movilidad de las cadenas, el resultado final es una reducción de la interpenetración.<sup>16, 35</sup>

Con el propósito de adquirir un mejor entendimiento de la relación entre la estructura del polímero y el potencial bioadhesivo, Robinson y su equipo sintetizaron una serie de polímeros aniónicos entrecruzados con características hinchables para medirles su fuerza de bioadhesión *ex vivo*. Los polímeros eran derivados de monómeros de ácido acrílico y metacrílico con diferentes agentes entrecruzantes y diferían en cuanto a densidad de carga e hidrofobicidad. Los polímeros de ácido acrílico ligeramente entrecruzados (0.3 %, p/p) con tres diferentes agentes, divinilglicol, 2,5-dimetil-1,5-hexadieno y divinilbenceno, mostraron el mismo grado de bioadhesión, mientras que el ácido polimetacrílico-divinilbenceno presentó una pobre bioadhesión. Los polímeros de referencia amberlita 200 y gelatina tuvieron pobres o nulas cualidades bioadhesivas. Ellos concluyeron que, el pequeño porcentaje de agente entrecruzante, independientemente de las propiedades fisicoquímicas, no contribuía de manera sustancial a la bioadhesión; sino que, en realidad, el monómero iniciador es el de mayor efecto sobre ésta.<sup>7</sup>

### *6.1.2 Ionización y cargas*

En un estudio con polímeros aniónicos, catiónicos y neutros, aplicando la técnica de fluorescencia a cultivos celulares, Robinson y col. encontraron que la carga y la densidad de carga son elementos importantes para la bioadhesión. Como resultado de su trabajo determinaron que:

1. Los polímeros aniónicos son mejores que los polímeros neutros o catiónicos, en términos de fuerza de enlace y potencial toxicidad.
2. La insolubilidad de los polímeros en agua da mayor flexibilidad en el diseño de formas farmacéuticas comparada con la rápida o lenta disolución de polímeros solubles en agua.
3. Los polianiones con grupos carboxilo parecían ser mejores candidatos que aquellos con grupos sulfato.<sup>50</sup>

### *6.1.3 Hidratación y grupos funcionales hidrofílicos*

Los polímeros bioadhesivos son normalmente macromoléculas con numerosos grupos funcionales hidrofílicos (carboxilo, hidroxilo, amida y grupos sulfato) que pueden formar enlaces hidrógeno. La presencia de sus cargas fijas en la red macromolecular establece una fuerza o presión de hinchamiento, originada por una presión osmótica, que es la fuerza direccional que transporta el disolvente al interior del gel polimérico desde la zona más diluida del seno de la solución. Cuando una cantidad de iones es adicionada al medio hidratante, se enlazan a alguno de los grupos con carga fija, resultando en un efecto de pantalla. Es decir, la fuerza iónica y la cantidad de iones en solución son parámetros importantes que tienen que ser considerados en estudios bioadhesivos.<sup>16</sup>

### *6.1.4 Movilidad de la cadena y naturaleza expansiva de la red*

La capacidad de las cadenas de polímero y mucina para interpenetrar pueden ser explicadas por su capacidad de difusión. En un rango restringido de temperatura, el coeficiente de difusión experimental,  $D$ , muestra una dependencia exponencial de la temperatura del tipo Arrhenius:

$$D = D_0 \exp(-E/RT)$$

donde,  $D_0$  es una constante independiente de la temperatura en un rango dado y  $E$  es la energía de activación por difusión o por la movilidad de las cadenas. El movimiento de las cadenas puede incrementarse por un aumento en el grado de hidratación, naturaleza de expansión de la red y reducción del entrecruzamiento.

El efecto de la naturaleza expansiva de la mucina y de la red adhesiva sobre la mucoadhesión han mostrado ser algunos de los factores que controlan la fuerza de adhesión.<sup>16</sup>

## **6.2 Clasificación**

Con los primeros estudios de bioadhesión la necesidad por conocer la capacidad bioadhesiva de muchos materiales poliméricos, se requirió seleccionar a los polímeros mucoadhesivos. Como es de suponerse, la

fuerza de adhesión es una de las propiedades más representativas y fáciles de medir, así pues, la clasificación de polímeros mucoadhesivos tomo a ésta como parámetro de comparación.

Smart y col. con un método *in vitro* midieron la fuerza de bioadhesión de diferentes polímeros y corroboraron una clasificación cualitativa hecha por Chen y Cyr para polímeros bioadhesivos en estudios *in vivo* (Tabla I).<sup>34, 63</sup>

Quintanar y col. realizaron evaluaciones con un método *ex vivo* para determinar la fuerza de adhesión de diferentes polímeros (Tabla II). Aunque sus resultados tuvieron ligeras variaciones con respecto a los de Smart, en general, el comportamiento bioadhesivo de los polímeros pudo considerarse consistente con las experiencias anteriores. Las variaciones fortalecen la idea de que un polímero puede comportarse de manera distinta según el medio que lo rodea, en este caso, debido a la diferencias experimentales entre las condiciones intestinales y vaginales establecidas por cada investigador. Esto es importante porque un mismo polímero puede emplearse en diferentes sitios blancos y cumplir funciones distintas.<sup>14</sup>

La clasificación de los polímeros trajo como resultado la elección de los compuestos con mejores características bioadhesivas para ser probados en estudios mucoadhesivos más particulares.

### 6.3 Factores que afectan la bioadhesión

Muchos factores pueden afectar el poder bioadhesivo de un polímero, algunos son dependientes de el medio y otros de la naturaleza del polímero.

Tabla I. Comportamiento bioadhesivo de algunos compuestos

Substancia	% fuerza mucoadhesiva <sup>a</sup>	Comportamiento adhesivo <sup>b</sup>
Carboximetilcelulosa	193	excelente
Carbopol 934	185	excelente
Policarbofil	---	excelente
Tragacanto	154	excelente
Alginato de sodio	126	excelente
Hidroxietilcelulosa	---	excelente
Goma karaya	125	bueno
Gelatina	116	aceptable
Pectina	100	pobre
Polivinilpirrolidona	98	pobre
Goma acacia	98	pobre
Polietilenglicol	96	pobre

<sup>a</sup> Porcentaje de un estándar, evaluación *in vitro*<sup>63</sup>

<sup>b</sup> Ensayo *in vivo*<sup>34</sup>

Tabla II. Fuerza de adhesión de algunos polímeros a mucosa vaginal de cerdo<sup>14</sup>

Polímero	Fuerza de adhesión (dinas)*
Carbopol 934P	3790
Carboximetilcelulosa	3686
Metilcelulosa	3169
Polivinilpirrolidona	2698
Goma arábica	2369
Acetato ftalato de celulosa	1390
Acido alginico	1098
Eudragit E	957

\* Determinación con método *ex vivo*

### 6.3.1. Factores relacionados con el polímero

La mayoría de éstos fueron analizados en la sección 6.1.

#### *Concentración del polímero*

Bremecker relacionó una concentración óptima de polímero a la mejor bioadhesión. En sistemas muy concentrados, la fuerza adhesiva cae significativamente, debido a que las moléculas enrolladas pasan a ser poco solubles y las cadenas disponibles para interpenetración no son numerosas. El comportamiento parecen ser importante únicamente para formas bioadhesivas más o menos líquidas<sup>10</sup>. Duchene y Peppas, mostraron que para formas de dosificación sólidas tales como tabletas, a un mayor concentración de polímero, mayor fuerza de bioadhesión.<sup>54, 55</sup>

#### *Hinchamiento*

El hinchamiento está relacionado a el polímero mismo y con el medio en que se encuentra. Como se ha mencionado, la interpenetración de cadenas es más fácil cuando las cadenas del polímero están desentredadas y libres de interacciones, lo cual puede darse por el hinchamiento del polímero. Este comportamiento depende de dos factores: la concentración del polímero y la presencia de agua. Debe tenerse presente que, si el hinchamiento es excesivo puede haber una disminución en la bioadhesión.

### 6.3.2 Factores del medio

### *pH y fuerza iónica*

La absorción de agua por el polímero, en esencia su hinchamiento, depende en gran medida del pH (Figura 10). En consecuencia, la bioadhesividad es también dependiente de este factor (Figura 11). En cualquier caso, hay un pH óptimo para la adhesión del polímero.

Algunos polímeros como los derivados del paa (policarbofil y C934P) son capaces de hinchar para formar geles; por debajo de su  $pK_a$  (4.5) absorben hasta 20 veces su peso en agua, mientras que por encima el peso puede aumentar hasta 100. Lo anterior sugiere que la bioadhesión es mayor a valores de pH por debajo del  $pK_a$ , donde, el polímero está menos hidratado y no ionizado.<sup>48</sup>

El efecto del pH sobre la bioadhesión del paa-divinilbenceno fué estudiado a condiciones definidas de temperatura, fuerza iónica y osmolaridad. El polímero mostró una máxima adhesión a valores de pH de 5 y 6 y una mínima a  $pH=7$ .<sup>7</sup>

Duchene y col. estudiaron la influencia en la composición del medio sobre la bioadhesión. Para ello diseñaron una tableta bioadhesiva de metronidazol que consistía de una mezcla de C934P e HPMC, los factores a estudiar fueron pH y fuerza iónica utilizando mucosa vaginal y sublingual bovina. Ellos determinaron que el pH del medio es un factor que influye muy poco sobre la adhesión cuando el material bioadhesivo se encuentra en baja proporción dentro de la formulación. En cuanto al efecto de la fuerza iónica concluyeron que los parámetros bioadhesivos trabajo y fuerza estuvieron significativamente disminuidos al incrementarse la concentración de cloruro de sodio, lo cual fué atribuido a la pérdida de adhesividad del C934P. El comportamiento se debió a que el C934P en solución tiende a desenredar sus cadenas debido a la acción de sus grupos carboxilo parcialmente ionizados, sin embargo, la adición de cationes a la solución oculta esas cargas y provoca el enrollamiento de las macromoléculas sobre sí mismas; de esta forma, las moléculas de C934P no pueden difundir fácilmente ni penetrar al interior de otro hidrogel. Además, la cantidad de grupos libres capaces de dar enlaces secundarios con los grupos del tejido biológico disminuye significativamente.<sup>55</sup>

Al comparar el comportamiento bioadhesivo en las mucosas sublingual y vaginal se obtuvieron mayores fuerzas de adhesión en la segunda. También pudo apreciarse que, al modificar la concentración de cationes divalentes del medio  $Ca^{2+}$ , la caída de fuerza en la mucosa sublingual fué muy drástica mientras que en la vaginal poco significativa. La conducta se atribuyó a dos factores: 1) debido a que la mucosa vaginal presenta una mayor cantidad de moco, es mayor la interacción con el polímero bioadhesivo y 2) la abundancia de moco en la vagina permite que la capa de moco recubra la entidad bioadhesivo-mucosa en su capa hinchada de la tableta bioadhesiva, actuando como una barrera de difusión y protegiendo a la interfase bioadhesiva de los efectos del medio. Finalmente, se concluyó que la sensibilidad en la adhesividad del C934P a los ambientes iónicos impide su uso en sistemas bioadhesivos que contengan ingredientes activos ricos en iones.<sup>7</sup>

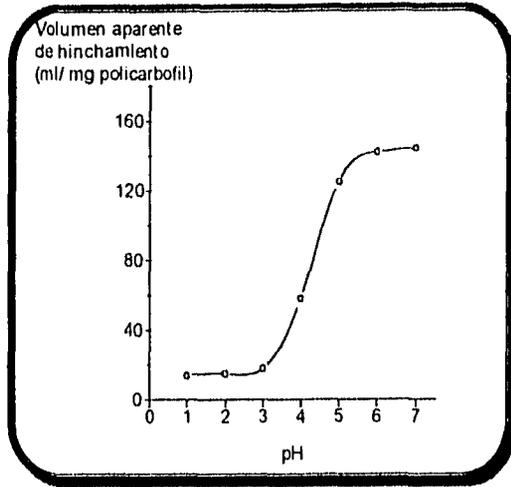


Figura 10. Equilibrio de hinchamiento del polycarbofil a varias pHs<sup>48</sup>

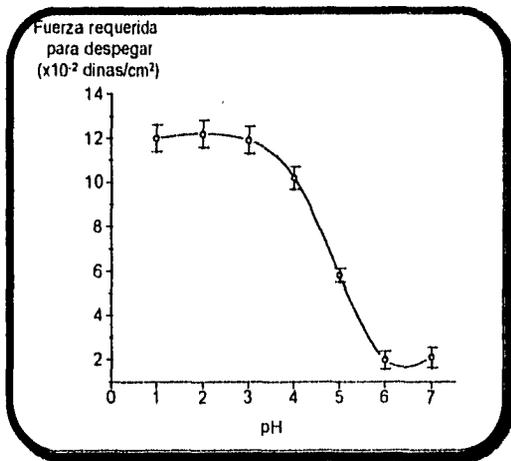


Figura 11 Efecto del pH sobre la bioadhesión in vitro del polycarbofil a mucosa estomacal de conejo<sup>48</sup>

### ***Movimiento del agua y deshidratación del moco***

La función del agua en el mecanismo de bioadhesión es de primordial importancia. Chen y Cyr observaron que la fuerza adhesiva con máxima humectabilidad se obtenía cuando se combinaban los sitios activos con una cantidad óptima de agua en o cerca de la interfase. Además, determinaron que si se usa una cantidad insuficiente de agua para hidratar al hidrocoloide seco, algunos sitios adhesivos activos no son completamente liberados y expuestos para la interacción, mientras que, una excesiva cantidad de agua causa una sobre-extensión y ruptura de enlaces de hidrógeno y otras fuerzas adhesivas, llevando a un debilitamiento de la adhesividad.<sup>25</sup>

Por su parte, Smart y col. llegaron a resultados muy semejantes a los de Chen y Cyr. Ellos obtuvieron que la fuerza mucoadhesiva se incrementaba en un sistema polímero-mucosa a medida que el polímero absorbía agua, hasta llegar a un punto en el cual se lograba una sobrehidratación del polímero, conduciendo a la formación de una capa de mucilago resbaladizo con la subsecuente pérdida en la fuerza de mucoadhesión. Cabe señalar que, el último fenómeno es difícil que ocurra porque la disponibilidad de agua en el moco es limitada.<sup>63</sup>

La investigación de Leung y Robinson reforzó los resultados anteriores, sin embargo, no aportó nada novedoso. En su estudio con una serie de copolímeros entrecruzados con ácido acrílico-metil metacrilato, mostraron que la fuerza de adhesión polímero-mucina aumenta con el grado de hidratación.<sup>32</sup>

Recientemente, Mortazavi y Smart analizaron el efecto que tenía la transferencia de agua del moco a una formulación mucoadhesiva. La absorción de agua por discos compactos de C934P fueron medidos en términos de ganancia en peso y evaluados en mucosa gástrica de cerdo. Ellos observaron que al disminuir la concentración del C934P, la absorción de agua decrecía. El efecto de la deshidratación sobre las propiedades físicas del gel de moco fué evaluada con un tensiómetro modificado. Se observó que la naturaleza cohesiva y adhesiva del moco era incrementada cuando el contenido de agua disminuía, lo cual, es el resultado del reforzamiento de los componentes más débiles en la unión mucoadhesiva. Concluyeron que, la transferencia de agua es un factor significativo en la mucoadhesión para formas de dosificación secas o parcialmente hidratadas.<sup>44</sup>

## **7. SISTEMAS VAGINALES DE ENTREGA DE FARMACOS**

Desde hace algunas décadas, se sabe que varios agentes farmacológicamente activos, como los esteroides, pueden ser absorbidos adecuadamente a través de la mucosa vaginal. La factibilidad de la absorción vaginal fué demostrada experimentalmente por la administración intravaginal de un supositorio impregnado de progesterona; el fármaco, inactivo oralmente, pudo presentar una buena actividad al administrarse intravaginalmente.

La vía de administración intravaginal fué una realidad, en 1970, con el desarrollo de un anillo vaginal elástico. El dispositivo fué fabricado de un elastómero de silicón biocompatible que contenía acetato de medroxiprogesterona para anticoncepción. Un estudio clínico fué iniciado para determinar si una dosis

### *Movimiento del agua y deshidratación del moco*

La función del agua en el mecanismo de bioadhesión es de primordial importancia. Chen y Cyr observaron que la fuerza adhesiva con máxima humectabilidad se obtenía cuando se combinaban los sitios activos con una cantidad óptima de agua en o cerca de la interfase. Además, determinaron que si se usa una cantidad insuficiente de agua para hidratar al hidrocoloide seco, algunos sitios adhesivos activos no son completamente liberados y expuestos para la interacción, mientras que, una excesiva cantidad de agua causa una sobre-extensión y ruptura de enlaces de hidrógeno y otras fuerzas adhesivas, llevando a un debilitamiento de la adhesividad.<sup>25</sup>

Por su parte, Smart y col. llegaron a resultados muy semejantes a los de Chen y Cyr. Ellos obtuvieron que la fuerza mucoadhesiva se incrementaba en un sistema polímero-mucosa a medida que el polímero absorbía agua, hasta llegar a un punto en el cual se lograba una sobrehidratación del polímero, conduciendo a la formación de una capa de mucilago resbaladizo con la subsecuente pérdida en la fuerza de mucoadhesión. Cabe señalar que, el último fenómeno es difícil que ocurra porque la disponibilidad de agua en el moco es limitada.<sup>63</sup>

La investigación de Leung y Robinson reforzó los resultados anteriores, sin embargo, no aportó nada novedoso. En su estudio con una serie de copolímeros entrecruzados con ácido acrílico-metil metacrilato, mostraron que la fuerza de adhesión polímero-mucina aumenta con el grado de hidratación.<sup>32</sup>

Recientemente, Mortazavi y Smart analizaron el efecto que tenía la transferencia de agua del moco a una formulación mucoadhesiva. La absorción de agua por discos compactos de C934P fueron medidos en términos de ganancia en peso y evaluados en mucosa gástrica de cerdo. Ellos observaron que al disminuir la concentración del C934P, la absorción de agua decrecía. El efecto de la deshidratación sobre las propiedades físicas del gel de moco fué evaluada con un tensiómetro modificado. Se observó que la naturaleza cohesiva y adhesiva del moco era incrementada cuando el contenido de agua disminuía, lo cual, es el resultado del reforzamiento de los componentes más débiles en la unión mucoadhesiva. Concluyeron que, la transferencia de agua es un factor significativo en la mucoadhesión para formas de dosificación secas o parcialmente hidratadas.<sup>44</sup>

## **7. SISTEMAS VAGINALES DE ENTREGA DE FARMACOS**

Desde hace algunas décadas, se sabe que varios agentes farmacológicamente activos, como los esteroides, pueden ser absorbidos adecuadamente a través de la mucosa vaginal. La factibilidad de la absorción vaginal fué demostrada experimentalmente por la administración intravaginal de un supositorio impregnado de progesterona; el fármaco, inactivo oralmente, pudo presentar una buena actividad al administrarse intravaginalmente.

La vía de administración intravaginal fué una realidad, en 1970, con el desarrollo de un anillo vaginal elástico. El dispositivo fué fabricado de un elastómero de silicón biocompatible que contenía acetato de medroxiprogesterona para anticoncepción. Un estudio clínico fué iniciado para determinar si una dosis

contraceptiva efectiva del acetato de medroxiprogesterona podría ser administrada de manera continua y segura en mujeres de ovulación normal. Los resultados mostraron que los niveles de fármaco en suero, por la absorción del agente activo a través de la mucosa vaginal, eran suficientemente altos para inhibir la ovulación, así como para elevar la temperatura basal y alterar el patrón histológico del endometrio. Después de la remoción del anillo vaginal la absorción de progestina cesó, apareció sangrado y la ovulación se regeneró.<sup>6</sup>

### ***7.1 Beneficios de la administración intravaginal controlada de fármacos***

Un sistema de liberación controlada es un intento efectivo para lograr una entrega continua de agentes terapéuticos, no únicamente de fármacos activos sistemáticamente, como los anticonceptivos esteroides, sino también de fármacos activos localmente, como el metronidazol. La administración continua de fármacos a través de la mucosa vaginal puede prevenir el primer paso del metabolismo hepatogastrointestinal y evitar la ineficiente actividad terapéutica de fármacos que son inactivados al administrarse vía oral. Lo anterior, se debe a que las venas del plexo hipogástrico que drenan al tejido vaginal y el recto, fluyen hacia las venas pudendal y cava; la última, libra al hígado sobre su primer paso. Esto es un marcado contraste con respecto a la circulación de sangre gastrointestinal, la cual, drena dentro de la vena portal y pasa directamente a través del hígado antes de entrar a circulación general.

Por otro lado, la administración intravaginal podría corregir las irregulares concentraciones plasmáticas originadas por la ingestión de dosis discontinuas y discretas de fármaco por vía oral. Las ventajas de la administración intravaginal controlada de fármacos sobre las administraciones orales convencionales ha sido probada con principios activos como la medroxiprogesterona (Figura 12), donde, se obtuvieron concentraciones plasmáticas homogéneas por más tiempo.<sup>6</sup>

### ***7.2 Estructura y dinámica de la vagina***

#### ***7.2.1 Anatomía***

La vagina humana es un canal tubular de paredes delgadas y músculos distendibles. Su función, es recibir al pene durante el coito y transportar óvulos no fecundados y productos de la menstruación hacia el exterior. También, funciona como conducto del parto durante el nacimiento.<sup>24, 65</sup>

***7.2.1.1 Consideraciones generales.*** Órgano impar y medio situado, en parte, en la excavación pélvica, y otra parte, en el propio espesor de la vulva.<sup>65</sup>

***a) Medios de fijación:*** está mantenida en posición por su continuidad con el cuello uterino y por conexiones, más o menos íntimas, con las formaciones u órganos vecinos (perineo, vulva, vejiga y recto).<sup>65</sup>

**b) Dirección:** se orienta oblicuamente hacia abajo y adelante, formando con la horizontal un ángulo de 65° a 75°. No es exactamente rectilínea sino ligeramente curva, de concavidad posterior (la cuerda del arco correspondiente es sólo de 4 a 6 milímetros).<sup>24,65</sup>

**c) Forma:** tiene la forma de un cilindro aplanado de adelante hacia atrás. En las condiciones fisiológicas ordinarias sus paredes anterior y posterior están directamente aplicadas una con otra; en un corte transversal, la cavidad vaginal se halla representada por una hendidura transversal, algo cóncava por el lado recto y que termina a veces hacia los lados por una nueva hendidura de dirección anteroposterior (en forma de H). Note que: por arriba, el conducto vaginal se hace cilíndrico para amoldarse al cuello; por abajo, se aplanan en el sentido sagital.<sup>24,65</sup>

**d) Dimensiones:** la longitud de la vagina es, por término medio, de 6 a 7 centímetros. Hay vaginas largas (de 12 a 24 cm) y vaginas cortas (de 4 a 5 cm). Su anchura, relativamente pequeña a nivel de la vulva, aumenta de abajo arriba; en la parte media del conducto es de 24 a 25 milímetros.<sup>65</sup>

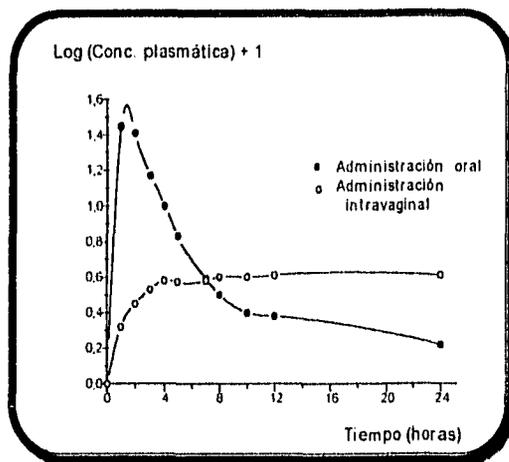


Figura 12. Perfiles plasmáticos comparativos de acetato de medroxiprogesterona por vía oral (tabletas de 10 mg) y por vía intravaginal (anillo con 100 mg)<sup>6</sup>

**7.2.1.2 Conformación exterior e interior y relaciones.** La vagina ofrece a nuestra consideración : una superficie exterior, una superficie interior y dos extremidades (superior e inferior).

**A. Superficie exterior.** Tiene una cara anterior, una cara posterior y dos bordes laterales

**B. Conformación interior.** La superficie interior de la vagina presenta, en ambas paredes, un sistema de pliegues transversales que constituyen las arrugas de la vagina. Los pliegues son más gruesos en la parte media y se escalonan de abajo hacia arriba, formando en la línea media dos prominencias longitudinales, redondas y romas, conocidas con el nombre de columnas de la vagina, la que ocupa la

pared anterior termina, del lado de la vulva, formando el llamado tubérculo vaginal. Nótese que las arrugas de la vagina, como también las columnas, presentan su máxima desarrollo por el lado de la vulva y van luego disminuyendo de abajo hacia arriba. Es de notar también que las dos columnas no ocupan exactamente la línea media, sino que están situadas algo fuera de esta línea, una a la derecha y otra a la izquierda, de tal manera que en estado de oclusión de la vagina las dos prominencias están yuxtapuestas y no superpuestas.

**C. Extremidad superior.** La extremidad superior de la vagina es un orificio circular que abraza al cuello uterino, en la unión de su tercio inferior con sus dos tercios superiores se adhiere a él íntimamente.

**D. Extremidad inferior.** Orificio elíptico, cuyo diámetro es anteroposterior y a través del cual la vagina se abre en la vulva.<sup>65</sup>

**7.2.1.3. Constitución anatómica.** La pared vaginal, con 3 a 4 milímetros de grueso, se compone de tres túnicas concéntricas, que de fuera a dentro son: la adventicia del tejido conectivo, la cubierta muscular y la mucosa. La capa más externa (adventicia) está constituida por tejido conectivo denso, sirve para unir a la vagina con los órganos y tejidos que la rodean, contiene terminaciones de fibras nerviosas, algunas neuronas esparcidas y un plexo venoso abundante. En la cubierta muscular los haces de fibras musculares lisos guardan disposición tanto circular como longitudinal; los últimos son muy prominentes en la parte exterior de la capa. Las fibras del músculo bulbocavernoso forman un esfínter de músculo estriado que rodea la abertura de la vagina en el vestíbulo (introito). La mucosa tiene un epitelio plano estratificado y una lámina propia formada por fibras elásticas densas y de otra índole de tejido conectivo. El plexo venoso se localiza en la parte más profunda de la lámina propia.<sup>6, 24, 65</sup>

En la vagina no hay glándulas específicas y está lubricada por secreciones de las glándulas cervicales. Durante la excitación sexual el epitelio vaginal secreta moco. Se desconoce el verdadero origen de esta secreción, pero no proviene del cuello uterino ni de las glándulas de Bartolino.<sup>24</sup>

Los estrógenos ejercen un efecto directo sobre el epitelio vaginal, durante el ciclo menstrual induciendo engrosamiento y cornificación del epitelio plano estratificado que reviste al órgano. La progesterona estimula la secreción de un moco espeso en la fase tardía del ciclo menstrual.<sup>65</sup>

**7.2.1.4 Vasos y nervios.** La porción superior de la vagina está irrigada por la rama vaginal de la arteria uterina, la rama vaginal de la arteria vesical interior abastece la porción media y las arterias hemorroidal media y pudenda interna llevan la sangre que corresponde al tercio inferior. En resumen, la vagina está inervada por fibras del plexo hipogástrico, el cuarto nervio sacro y los pudendos.<sup>24, 65</sup>

## **7.2.2 Fisiología**

**7.2.2.1 pH.** Ha sido conocido desde 1877 que la descarga vaginal es ácida y desde 1892 que esta acidez es debida a la presencia de organismos gram-positivos, los bacilos Doderlein. La acidez está directamente correlacionada con la cantidad de ácido láctico presente, sin embargo, se ha sugerido que tal vez otros ácidos puedan ser causantes en ciertas situaciones. Generalmente, es aceptado que el lumen vaginal

humano tiene una acidez normal entre pH de 4 y 5. El pH vaginal es una reflexión secundaria de la producción activa de hormonas ováricas y se mantiene por la descamación de células maduras en las capas superficiales de la mucosa vaginal. Bajo la influencia de estrógenos las células contienen un alto contenido de glucógeno, que es metabolizado a ácido láctico ( $pK_a = 3.8$ ) en el canal vaginal para mantener el pH vaginal en el lado ácido.<sup>6, 11</sup>

El origen exacto del ácido láctico vaginal es desconocido pero muchas evidencias sugieren que representa un producto de rompimiento del glucógeno. El carbohidrato es depositado en las células del epitelio vaginal por la influencia de estrógenos. La disminución en la cantidad de estrógenos resulta en una desaparición de glucógeno celular. De manera inversa, cuando los niveles de estrógeno son altos, el glucógeno vaginal es abundante. El glucógeno puede ser convertido directamente a ácido láctico por la acción de los bacilos de Doderlein o fermentado a simples carbohidratos por las enzimas vaginales, y después, reducirlos a ácido láctico por bacterias. Hay un gradiente de pH dependiendo del área de la vagina muestreada. Los valores más bajos se encuentran cerca del fórnix anterior, intermedios en la vagina media y los más altos cerca del vestíbulo.<sup>11</sup>

En mujeres postmenopáusicas hay un substancial incremento en el pH vaginal, de aproximadamente entre 4.0 y 4.5, hasta alcanzar valores tan altos como 7, ello se debe a que el crecimiento de lactobacilos es bloqueado por falta de glucógeno celular. La elevación del pH permite una colonización de ciertos patógenos asociados a infecciones locales.<sup>59</sup>

El efecto de las secreciones vaginales sobre el nivel de pH es dependiente de la cantidad y la duración de la producción. Ambas secreción y pH vaginales podrían afectar el perfil de liberación controlada de aquellos fármacos pH sensibles y/o dependientes de la solubilidad del sistema de entrega de fármacos vaginales.<sup>6</sup>

**7.2.2.2 Relación entre pH e infecciones vaginales.** La importancia clínica de mantener la acidez vaginal está enfatizada por el hecho que muchas bacterias patógenas desaparecen cuando el pH está entre 4.1 y 4.9. Varios reportes han sido publicados concernientes a la relación entre levaduras, otras microfloras y sus efectos sobre el pH. Peeters y col. encontraron una elevación de pH en pacientes con signos clínicos o síntomas de candidiasis vaginal, sin embargo, no todos los pacientes confirmaron el diagnóstico por cultivo. Por otro lado, Cohen determinó una disminución de pH en el fórnix posterior en mujeres con vaginitis clínica. Debido a la discrepancia entre los reportes anteriores, Drake y col. decidieron estudiar los cambios de pH en relación con el ciclo menstrual y la infección por levaduras. Ellos no encontraron relación entre el pH vaginal y la morbilidad vaginal debida a infecciones por levaduras. En resumen, el efecto protector de la acidez vaginal no parece ser confinado a un rango crítico por encima o por debajo del cual hay incremento en la susceptibilidad a infecciones vaginales.<sup>11</sup>

**7.2.2.3 Microflora vaginal.** Cada área externa del cuerpo o un área con abertura al exterior tiene una flora única de microorganismos. La flora normal puede ser definida como microorganismos que habitan y se replican en un área, pero no causan daño; incluso pueden servir con un papel beneficioso. El himen vaginal es habitado por una gran variedad de microorganismos, principalmente las especies *Lactobacillus*, *Bacteroides*, y *Staphylococcus epidermidis*, así como, patógenos aerobios potenciales. Las condiciones

fisiológicas, en los dramáticos cambios vaginales a diferentes edades, son causa del cambio de los microorganismos que viven ahí.<sup>6, 11</sup>

Es importante considerar que la presencia de los microorganismos de la flora normal y sus posibles metabolitos pueden tener algún tipo de efecto sobre la estabilidad intravaginal de un sistema de entrega vaginal de fármacos y en el perfil de liberación controlada.<sup>6</sup>

**7.2.2.4 Fluido vaginal.** Los epitelios genitales y glándulas accesorias de hombres y mujeres producen numerosas secreciones. En la mujer no menstruante el fluido vaginal es una mezcla de fluidos de diversas fuentes. Sus principales componentes son fluido cervical, células epiteliales exfoliadas desde la pared vaginal, fluido vaginal *per se* y pequeñas cantidades de secreción proveniente de las glándulas de Bartholin. Algunas secreciones de más arriba del tracto pueden alcanzar la vagina vía fluido uterino, fluido oviductal, fluido folicular por ovulación, e incluso, fluido peritoneal. También, algo de orina pueden entrar y contaminar la vagina. En síntesis, el tejido vaginal recibe aproximadamente 2 mg de moco al día, proveniente de secreciones del cervix, pequeñas cantidades de secreción de las glándulas de Bartholin, y en su mayoría, de la transudación desde la muy extensa cama vascular del tejido.<sup>11, 59</sup>

El cambio en el nivel de estrógenos en estados como la lactancia, menopausia y bloqueo de estrógenos, provoca cambios fisiológicos característicos en la vagina. Por ejemplo, la menopausia, un estado asociado a la edad, ocasiona que el tejido vaginal regrese a un estado similar de prepubertad en términos del grosor y medio ambiente del tejido. El epitelio vaginal en mujeres menopáusicas orienta a un incremento substancial en la permeabilidad del tejido. Un evento fisiológico asociado con una disminución en el nivel de estrógenos es la reducción considerable del flujo de sangre vaginal, con un consecuente secado del tejido.<sup>59</sup>

**7.2.2.5 Volumen basal no estimulado.** Elementos no glandulares han sido alguna vez identificados en la vagina humana normal, nos referimos al epitelio escamoso no estratificado. A pesar de la falta de glándulas, el epitelio está normalmente cubierto con una película superficial de moco. Una de las primeras aproximaciones a cerca del volumen del fluido fué propuesta por Vogue, estimándolo entre 0.5 y 1.0 ml. Mientras que, el peso del fluido obtenido por Stone y Gamble fué de  $0.76 \pm 0.04$  g. Se estableció que, el peso incrementaba 13 ó 16 días antes de la menstruación debido al aumento en la secreción cervical cerca de la ovulación. Cambios en las propiedades físicas y constituyentes químicos del moco cervical han sido intensivamente estudiados durante el curso del ciclo menstrual. Los niveles de glucosa y glucosamina se incrementan a mitad del ciclo, mientras que ácido siálico, fosfatasa alcalina y proteínas solubles disminuyen al mismo tiempo. Ácido láctico, urea y ácido acético tienen las variaciones más significativas en la concentración, aparentemente coinciden con cambios en los niveles de estrógenos/progesterona.<sup>11</sup>

### **7.3 Aplicaciones de las formas de dosificación bioadhesivas**

Actualmente, la liberación de fármacos en la vagina humana está limitada por el tiempo de residencia de la forma de dosificación. Sistemas de entrega típicos como espumas, geles y tabletas son removidos en

períodos relativamente cortos de tiempo por la misma acción de limpieza del tracto vaginal. Es evidente que los polímeros bioadhesivos pueden resolver algunos de los problemas que se presentan con las formas de administración convencionales, sobre todo porque, además de sus características de adhesión, sirven como excelentes plataformas de liberación de fármacos.

Los sistemas bioadhesivos vaginales han sido desarrollados y estudiados para diferentes propósitos. Los primeros trabajos fueron reportados por Nagai y col., quienes estudiaron la liberación de un fármaco anticancerígeno desde una forma de dosificación bioadhesiva tipo disco para entregar un fármaco en el cérvix.<sup>45</sup>

En un estudio más reciente, Gürsoy y su equipo prepararon una tableta bioadhesiva usando paa y CMC como bioadhesivos y sulfato de zinc como fármaco modelo. Ellos midieron el hinchamiento de las tabletas y la fuerza de adhesión a la mucosa vaginal de vaca, determinando que, cada propiedad era influenciada por la cantidad de CMC y paa en la tableta, respectivamente. Los estudios de liberación *in situ* en vagina de vaca mostraron que la liberación se modificaba, haciéndose más lenta en comparación con tabletas convencionales; el comportamiento se atribuyó al efecto protector que se producía al entrar en contacto la mucosa vaginal con todas las caras de la tableta, ello debido a la presencia del paa.<sup>17</sup>

En seguida, describiremos algunas aplicaciones de nuevos sistemas bioadhesivos de entrega de fármacos

**7.3.1 Vagina seca** La resequeza vaginal, como resultado de la edad (Tabla III), es un padecimiento que afecta a muchas mujeres. En el inicio de la menopausia, aproximadamente a la edad de los 50, hay un declive en la circulación de estrógenos, los cuales empeoran en los siguientes 7-8 años (perimenopausia). En la menopausia total, los niveles de estrógenos son muy bajos y se acompaña de una disminución en el grosor de tejido vaginal y su hidratación. Como los estrógenos son magníficos vasodilatadores, en suma a sus otros efectos biológicos, una caída en el nivel de estrógenos origina una vasoconstricción, y en consecuencia, una disminución en la transudación de fluido hacia el tejido vaginal.<sup>59</sup>

Los principales síntomas de la vagina reseca son incomodidad con ropa ajustada, sensación de calor, descargas purulentas, sangrado postcoital, falta de lubricación durante el acto sexual y dispareunia. La magnitud de los cambios en las pacientes varían.<sup>59</sup>

Un gel bioadhesivo fue probado como tratamiento para vagina seca en un estudio doble ciego con 89 mujeres post y perimenopáusicas. Las pacientes fueron dosificadas 2 veces semanalmente, usando un gel convencional como control. El 44 % del grupo de estudio estuvo en terapia reemplazante de estrógenos. Empleando un índice estandarizado de vagina saludable, se encontró que: a) la humectación vulvar ocurrió en todos los sujetos, b) el gel bioadhesivo fue estadísticamente superior al gel convencional en todos los parámetros de prueba a vaginas sanas y c) el pH vaginal fue 7.2 durante 72 h después de la última dosis del gel bioadhesivo.

Pudo determinarse claramente que, el producto se mantuvo en la vagina y demostró una capacidad para hidratar el tejido a partir de una sola aplicación. Estudios subsecuentes con otros grupos de pacientes fueron igualmente exitosos. Es importante aclarar acerca del mecanismo de la hidratación del tejido por el gel bioadhesivo. El agua del gel pudo proveer no más que aproximadamente 1.6 g para hidratar el tejido

en un periodo de 3 a 4 días. Claramente, la mayor cantidad del fluido tuvo que provenir de la red vascular del tejido. Sarrel, utilizando una técnica con un velocímetro laser, encontró que el gel bioadhesivo incrementó el flujo sanguíneo en un 25%, aumentando en consecuencia la transudación del fluido vaginal.<sup>59</sup>

Tabla III. Prevalencia de la resequead vaginal: aumento con la edad<sup>60</sup>

Edad	Mujeres afectadas (%)
50 (723)	52
60 (717)	65
70 (324)	77

**7.3.2 Vaginosis bacteriana.** La vaginosis bacteriana no es una infección verdadera. La flora normal, dominada por lactobacilos, es remplazada por una combinación de flora anaeróbica incluyendo *Gardnerella vaginalis* y *Mycoplasma hominis*. Normalmente, Gardnerella, encontrada en vaginosis bacterianas, es un patógeno no invasivo que coloniza células epiteliales descamadas. Los signos principales de la vaginosis bacteriana incluyen: a) pH vaginal mayor de 4.7, b) incremento en la cantidad de una descarga grisácea, homogénea y fluida y c) prueba olor amina positiva. El olor característico a pescado es aumentado por adición de hidróxido de potasio a la descarga. El pH alcalino libera ciertas aminas incluyendo putrescina, cadaverina y trimetilamina.

De hecho, como el semen es alcalino, la mujer con vaginosis bacteriana frecuentemente se queja de una mayor producción de olor a pescado después del acto sexual. El tratamiento de la vaginosis bacteriana es tratado con metronidazol. Normalmente, el tratamiento origina una colonización por *Candida* después del mismo.

Como es sabido, un gel bioadhesivo puede bajar drásticamente el pH. Es de esperarse que con la aplicación del gel el olor a pescado sea inmediatamente eliminado, debido a que las poliaminas serian convertidas a sus sales no volátiles. Además, el mantener un pH ácido por un periodo extenso de tiempo, promovería el retorno de la flora normal.<sup>59</sup>

Por otra parte, la tendencia actual en el tratamiento de las infecciones es obtener una terapia lo más corta posible pero con una dosis efectiva de la sustancia activa. El primer requisito es importante porque en terapias de larga duración muchos pacientes interrumpen el tratamiento antes de finalizarlo. Loendersloot y col. compararon una terapia de dosis sencilla de una tableta vaginal con el tratamiento de seis días con tabletas vaginales. Para una dosis sencilla usaron una tableta de clotrimazol de 500 mg, mientras que, para el tratamiento de seis días emplearon tabletas de clotrimazol de 100 mg. Una semana después del tratamiento, los resultados fueron ligeramente mejores con la terapia de una dosis sencilla que con la terapia de seis días. Cuatro semanas después de los tratamientos los resultados fueron inversos. La diferencia en los resultados después de una o cuatro semanas pudo ser debida a una mayor tendencia hacia recaer después de la terapia de dosis simple. Puede considerarse que ambos tratamientos dieron

resultados favorables. En relación con el problema de aceptación del paciente, el tratamiento con dosis sencilla de 500 mg de clortrimazol fué preferido.<sup>11</sup>

**7.3.3 Espermaticida y antiviral.** La extensión del efecto de un espermaticida tópico, que además presente una buena actividad antiviral, sería ventajoso en la prevención de la concepción y para evitar la transmisión de enfermedades sexuales.<sup>59</sup>

Nonoxinol-9 (N-9) es un espermaticida aprobado con fuerte actividad antiviral. Uno de sus inconvenientes es su elevada autoasociación en solución acuosa, lo que reduce la concentración de fármaco libre. Sin embargo, tiene buena actividad como espermaticida y es activo contra los virus del herpes y sida, así como, para otras enfermedades de transmisión sexual como clamidiosis y gonorrea.

Los espermaticidas tópicos deben ser aplicados 10 minutos antes de cada acto sexual. Un espermaticida tópico que se mantenga localizado dentro de la cavidad vaginal de 1 a 3 días sería una gran ventaja. Cabe señalar que, los espermaticidas tradicionales contienen entre 100 y 200 mg de N-9, e incluso hasta 1g en esponjas. Un gel bioadhesivo espermaticida con N-9 protegería al cervix y al epitelio vaginal de las altas concentraciones de N-9, sin dejar de ser efectivo como espermaticida.<sup>59</sup>

**7.3.4 Absorción de péptidos y proteínas.** La investigación dentro de las rutas de administración no parenterales, para la entrega sistémica de péptidos y proteínas terapéuticamente activos, ha considerado de gran importancia a las mucosas por no ser género específicas. Particularmente, la ruta vaginal puede ser útil para la administración de fármacos peptídicos y proteicos para el tratamiento de situaciones relacionadas con la mujer. Desde luego, la vagina es permeable a un amplio rango de compuestos, incluyendo algunos péptidos y proteínas. En común con otros sitios mucosos, un incremento en la absorción es necesario para mejorar la biodisponibilidad vaginal de las proteínas, las cuales presentan dificultades a causa de sus altos pesos moleculares y carácter hidrofílico. La absorción vaginal de péptidos y proteínas, así como, los factores que influyen sobre la entrega de fármacos en modelos experimentales y en mujeres, han sido recientemente revisados por Richardson e Illun.<sup>57</sup>

El efecto de varios promotores sobre la absorción vaginal en un modelo peptídico (insulina) ha sido investigado en ratas por Richardson y col. Compuestos anfifílicos, incluyendo taurodihidrofusidato de sodio, lauret-9 y lisofosfatidilcolina (LPC), aumentaron significativamente la respuesta hipoglucémica de insulina administrada vaginalmente, sin embargo, todos los sistemas mejorados modificaron la histología mucosal. LPC se comportó como uno de los mejores promotores, causando daño epitelial sólo en capas celulares superficiales.<sup>58</sup>

En otro estudio, Richardson y su equipo administraron, vaginalmente a ovejas, una solución acuosa y un polvo liofilizado con microesferas bioadhesivas de almidón. Ellos analizaron el efecto de la LPC sobre la absorción vaginal de insulina en ambas formulaciones. Mientras la absorción vaginal de insulina a partir de la solución fué mínima, la adición de LPC resultó en un rápido aumento de la insulina plasmática y una pronunciada caída en los niveles plasmáticos de glucosa. Es decir, la respuesta hipoglucémica de la insulina, administrada vaginalmente, fué mejorada por el uso de un sistema a base de microesferas y por el agente promotor LPC.<sup>57</sup>

### **GENERAL**

- Realizar estudios del comportamiento bioadhesivo del Carbopol 934P (C934P) a mucosa vaginal de cerdo para determinar su uso potencial en formas farmacéuticas bioadhesivas vaginales y aportar evidencias sobre su mecanismo mucoadhesivo.

### **PARTICULARES**

- Determinar el efecto del pH sobre la fuerza de adhesión del C934P a mucosa vaginal de cerdo ex vivo.
- Evaluar la influencia del tamaño de partícula en el tiempo de residencia del C934P sobre mucosa vaginal de cerdo.
- Purificar moco vaginal de cerdo (mvp) y caracterizarlo mediante electroforesis y cuantificación de proteínas y carbohidratos.
- Realizar estudios de Calorimetría Diferencial de Barrido para analizar el comportamiento térmico del sistema bioadhesivo mvp-C934P.
- Observar por medio de Microscopía Electrónica de Barrido la interacción mucosa vaginal de cerdo-C934P.

## 1 Compuestos y reactivos

Carbopol 934P (B. F. Goodrich Co.), amablemente donado por Multiquim S.A. de C.V.

Marcadores de peso molecular SDS, serie MW-SDS-70 de Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, U.S.A.)

El resto de los reactivos fueron grado analítico.

### 1.1 Tejido biológico

Las vaginas se obtuvieron aleatoriamente después del sacrificio de cerdas jóvenes convencionales raza Yorkshire (65-80 Kg).

## 2 Fuerza de bioadhesión

La fuerza de adhesión fué evaluada usando el método desarrollado por Aguilera y col.<sup>1</sup> empleando un tensiómetro de Du Nöuy modificado.

Comprimidos de 500 mg de C934P se prepararon por compresión directa en una prensa hidráulica Carver Press™ aplicando 2 toneladas métricas de presión durante 30 s; sus dimensiones promedio fueron de 1.110 cm de diámetro, 0.390 cm de altura y 0.968 cm<sup>2</sup> de área expuesta en cada una de sus caras. Los comprimidos fueron eyectados 3 mm de la matriz que se adaptaría a la plataforma del tensiómetro y humectados al exponer la cara eyectada en una solución amortiguadora de fosfatos 0.1 M, pH= 2-12 durante 10 min. La cara humectada se puso en contacto por 30 s (sin presionar) con el explante de mucosa vaginal de cerdo (sin tratamiento previo) montada en la platina del tensiómetro. Se giró el disco del tensiómetro a una velocidad constante de 0.5 U/s. La lectura de fuerza de adhesión fué obtenida cuando la tableta se separó de la mucosa; la tableta y el tejido vaginal fueron usados en una sola ocasión. Cada experiencia fué realizada por triplicado para cada pH, desde 2 hasta 12.

## 3 Tiempo de residencia del C934P en mucosa vaginal de cerdo

En el estudio se utilizaron gránulos de C934P obtenidos a partir de una solución al 10% del polímero que fué secada a 60°C/48 hr. La capa de polímero obtenida después del secado se sometió a molienda (molino Arthur H. Thomas™) y el polvo fué tamizado para obtener fracciones de corte de malla 20/40, 40/60 y 60/80 con diámetros promedio de 631, 335 y 214 µm, respectivamente.

En esta fase del experimento se empleó una modificación al método *in situ* propuesto por Ranga y Buri<sup>56</sup> Para determinar el tiempo de residencia se tomaron secciones de vagina de cerdas con un corte transversal

a la altura del cuello cervicouterino. La sección de vagina fué colocada en un soporte de plástico con un ángulo de inclinación de 65°. Fueron espolvoreados sobre ella, de manera uniforme, 500 mg de C934P de un sólo corte de malla y se hizo circular una solución amortiguadora de lactatos pH=4.5/ 0.1 M/ 37°C a una velocidad de 11 ml/min durante 12 hr. En el extremo inferior de la vagina se acondicionó una malla con abertura 150 para retener el polímero eluido. A diferentes tiempos fueron colectados el polímero retenido en la malla y una alícuota de 10 ml del recipiente receptor, ambas muestras se colocaron en un pesafiltro y fueron secados 60°C/96hr. El porcentaje de polímero eluido se determinó por gravimetría. La experiencia fué realizada por sextuplicado para cada corte de malla con su respectivo blanco.

#### **4 Microscopía Electrónica de Barrido**

Después de los estudio de fuerza de bioadhesión y tiempo de elución del C934P fueron tomadas secciones con cortes transversales de mucosa vaginal (1 cm X 1 cm) con presencia y ausencia del polímero para su estudio mediante Microscopía Electrónica de Barrido (Scan Electronic Microscope mod. JEOL-25-SIL).

#### **5 Purificación del moco vaginal**

Se disectaron vaginas de cerdas, inmediatamente, después del sacrificio. Las muestras de moco crudo fueron obtenidas, inicialmente, por perfusión en la vagina de 15 ml de solución amortiguadora Sørensen (pH=6.8, 0.1 M), seguido de un raspado de las paredes vaginales con varilla de vidrio para suspender el moco adherido a la mucosa.

Las células fueron separadas por centrifugación a 514Xg/4°C/30 min. y el sobrenadante se filtró a través de una membrana Millipore<sup>TR</sup> de 0.45 µm. Al filtrado le fueron adicionados 5 volúmenes de etanol al 95.0% y se mantuvo a 4°C/12hr. El precipitado se separó por centrifugación a 3200Xg/4°C/30 min. La pastilla fué resuspendida en 40 ml de solución Sørensen y dializada en una membrana con corte de 10-14000 Da, dos veces en 900 ml de agua destilada durante 12 h/4°C. El dializado se concentró sobre azúcar hasta obtener un volumen final de 2 a 4 ml. El extracto de moco vaginal purificado (mvp) fué lavado 3 veces con acetona y almacenado a -20°C hasta su análisis.

#### **6 Contenido de proteínas y carbohidratos en el mvp**

El contenido de proteínas y carbohidratos en el mvp fueron determinados por los métodos de Bradford<sup>5</sup> y fenol-sulfúrico,<sup>27</sup> respectivamente.

#### **7 Análisis electroforético**

El corrimiento electroforético del mvp se realizó con el sistema Laemmli<sup>29</sup>, utilizando el gel concentrador al 4.0% en amortiguador Tris-HCl 0.125 M, 0.1% SDS, pH 6.8 y el gel de corrida al 12.5% en amortiguador Tris-HCl 0.375 M, 0.1% SDS, pH 8.8. El amortiguador de corrida fué Tris 0.025 M-glicina 0.192 M, 0.1% SDS, pH 8.3. La corrida se realizó a 35 mA de corriente constante durante 35 min, con

preelectroforesis de 30 min y cambio de amortiguador previo a la iniciación de la corrida. Las bandas fueron reveladas por tinción con nitrato de plata y contratendidas con azul de Coomassie, previa digestión de la muestra. Se utilizaron marcadores de peso molecular miosina (205 KD),  $\beta$ -galactosidasa (116 KD), albúmina bovina (60 KD), ovoalbúmina (45 KD) y anhidrasa carbónica (29 KD).

## 8 Análisis térmico

El estudio del comportamiento térmico se realizó a mezclas de C934P-mvp y a los componentes puros. La preparación de las muestras se realizó de la siguiente manera: mezclas físicas de 20 mg de mvp con C934P en proporciones de 25:75, 50:50 y 75:25, respectivamente, se disolvieron en 0.2 ml de solución amortiguadora de fosfatos pH= 6.0, 0.2 M y fueron liofilizadas. El comportamiento térmico de cada muestra se analizó por Calorimetría Diferencial de Barrido de 50-300°C a una velocidad de 20°C/min (calorímetro Perkin Elmer, mod. DSC-7). Las sustancias puras con el mismo tratamiento también fueron preparadas y analizadas bajo las mismas condiciones.

Debido a que podría existir la probabilidad que durante el análisis térmico ocurriera una fusión con descomposición, las muestras de C934P y mvp se les realizó una segunda corrida. Es decir, después de haber realizado el primer barrido térmico, la muestra fué enfriada y se procedió a hacer un segundo barrido a las mismas condiciones.

Para cerrar el estudio y confirmar si el comportamiento térmico del mvp iba acompañado de una descomposición con desprendimiento de gases, se procedió a realizar un análisis termogravimétrico de 0-1000°C a una velocidad de 20°C en el mismo calorímetro.

### 1 Fuerza de bioadhesión

Los resultados de la relación entre el pH y la fuerza de bioadhesión del C934P se muestran en la Figura 13. Puede apreciarse que el pH del medio tiene una influencia importante sobre la fuerza de bioadhesión del polímero.

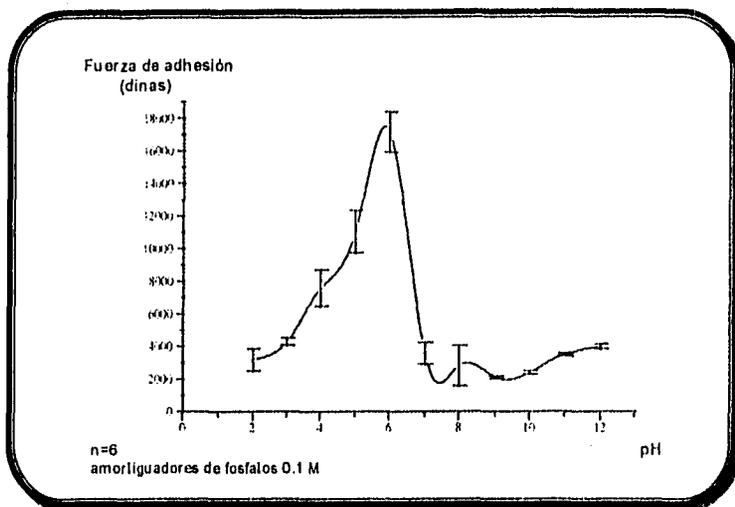


Figura 13. Influencia del pH sobre la fuerza de adhesión del Carbopol 934P a mucosa vaginal de cerdo

### 2 Tiempo de residencia del C934P en mucosa vaginal de cerdo

El comportamiento de elución de los gránulos de C934P sobre mucosa vaginal de cerdo se presenta en la Figura 14; en la gráfica puede apreciarse la influencia que tiene el tamaño de partícula del C934P sobre el tiempo de residencia. La Tabla IV muestra las constantes de velocidad de eliminación para los distintos tamaños de partícula; la determinación se realizó por medio de un análisis de regresión, tomando como constante de eliminación el valor de la pendiente.

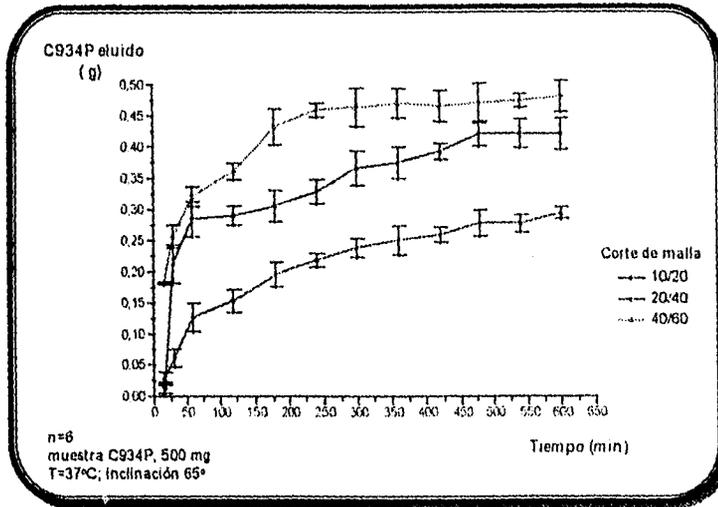


Figura 14. Tiempo de residencia del Carbopol 934P a mucosa vaginal de cerdo

Tabla IV Constantes de velocidad de eliminación de gránulos de Carbopol 934P mucosa vaginal de cerdo in situ

Corte de malla	Constante de velocidad de eliminación ( $\times 10^3$ g/min)	
	0-60 min	60-600 min
10/20	5.02	0.29
20/40	2.19	0.29
40/60	2.93	0.24

### 3 Microscopía Electrónica de Barrido

La exploración de la mucosa vaginal por medio de Microscopía Electrónica de Barrido permitió observar las interacciones físicas entre la mucosa vaginal y el C934P.

Las imágenes tomadas de la mucosa vaginal después de la evaluación de fuerza de adhesión (a pH=6.0) se muestran en las microfotografías de la Figura 15.

En la Figura 16 se observa el estudio a explantes de mucosa después de haber realizado la prueba de tiempo de retención de gránulos de C934P. Las microfotografías 15a y 15b son diferentes acercamientos en la superficie de la mucosa con presencia de C934P, mientras que, las 15c y 15d son tomas de la vagina de referencia (experiencia realizada en ausencia de C934P).

#### **4 Purificación del moco vaginal**

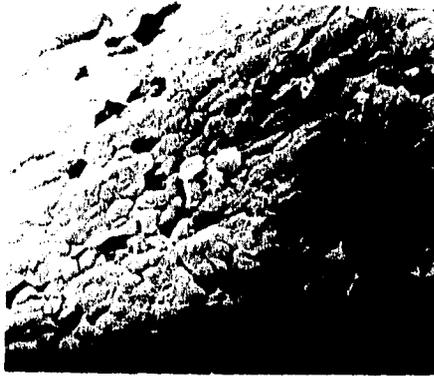
Con la técnica de triple extracción con acetona se obtuvo el moco vaginal purificado para realizar los estudios subsecuentes. Su caracterización puede observarse en la Tabla V.

El análisis electroforético permitió identificar 2 de las proteínas que se encuentran en mayor cantidad en el moco vaginal, sus pesos moleculares correspondieron a 26.2 y 28.5 KD (Figura 17).

#### **5 Análisis térmico**

Los comportamientos térmicos característicos, de las muestras de C934P-mvp, C934P y mvp, obtenidos del estudio de Calorimetría Diferencial de Barrido están mostrados en la Figura 18. El mvp presentó dos picos característicos a 130.40 y 133.04 °C; para el caso del C934P se aprecia un pico exotérmico entre 180 y 200 °C. En las mezclas de C934P-mvp se nota una desaparición de los picos característicos de las sustancias puras.

Los resultados de la segunda corrida al mvp y de su comportamiento en el análisis termogravimétrico pueden apreciarse en la Figura 19.

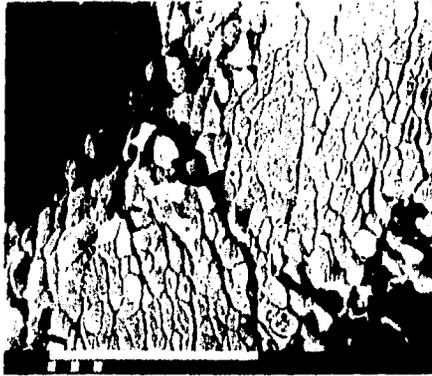


(a)



(b)

*Figura 15. Microfotografías de la interacción física entre la mucosa vaginal de cerdo y el Carbopol 934P después de la separación en la evaluación de fuerza de adhesión a pH = 6.0. Depósitos del polímero sobre la mucosa que demuestran la adherencia del C934P, (a, 450X). Polímero anclado sobre los bordes de los pliegues vaginales dando lugar a enlaces mecánicos mucosa-polímero (b, 3000X).*



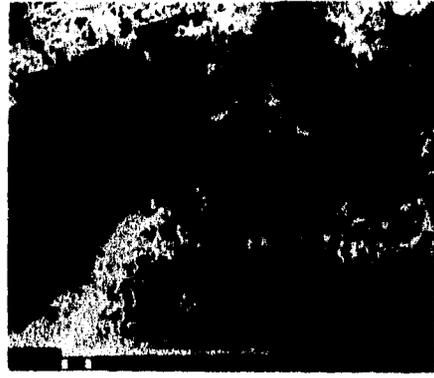
(a)



(b)



(c)



(d)

*Figura 16. Microfotografías de la distribución de gránulos de C934P sobre mucosa vaginal de cerdo después de la prueba de retención. Partículas del polímero atrapadas en los pliegues vaginales (a, 450X; b, 700X). Mucosa vaginal de referencia que muestra cristales de solución amortiguadora en su superficie (c, 700X; d, 2000X).*

Tabla V. Características del moco vaginal purificado

Propiedad	Descripción
Rendimiento	1.5617g/13 vaginas
Apariencia	Polvo blanco
Contenido de proteínas <sup>a</sup>	31.0 %
Contenido de carbohidratos <sup>b</sup>	69.0 %

<sup>a</sup>Método de Bradford<sup>11</sup>; <sup>b</sup>método con fenol-sulfúrico<sup>12</sup>

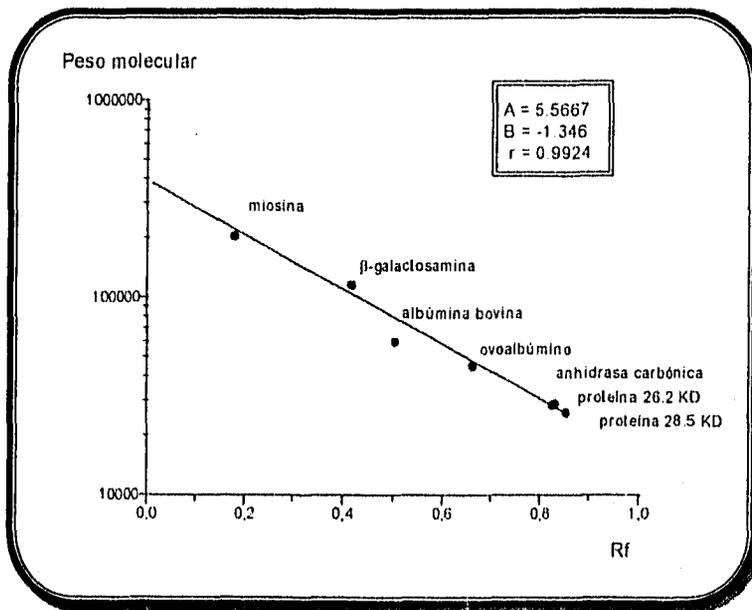
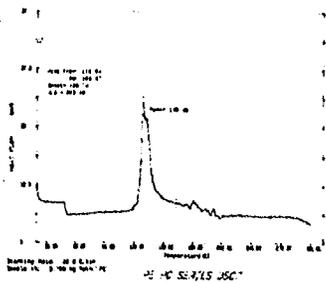
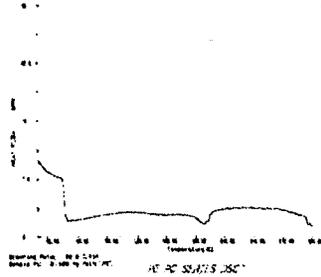


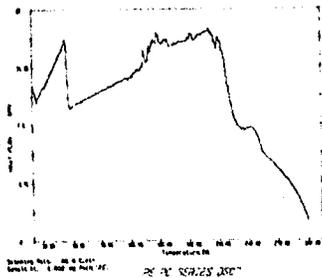
Figura 17. Curva de marcadores de peso molecular



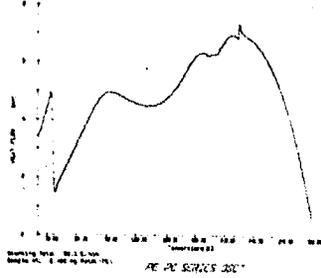
(a)



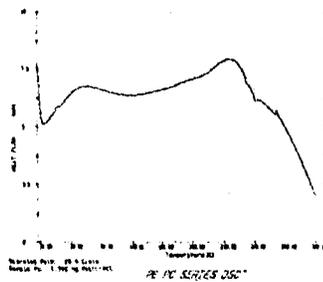
(b)



(c)



(d)

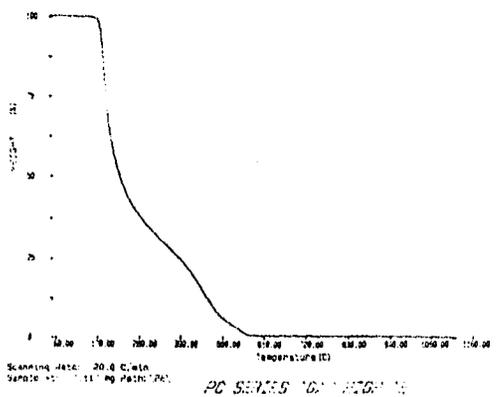


(e)

Figura 18. Termogramas de muestras resuspendidas y liofilizadas de moco vaginal purificado (a), Carbopol 934P (b) y mezclas de moco vaginal purificado:Carbopol 934P en proporciones 25:75, 50:50 y 75:25 (c, d y e, respectivamente).



(a)



(b)

Figura 19. Termograma del segundo barrido tèrmico del moco vaginal purificado despuès del enfriamiento de la primera corrida (a). Termogravígrama del moco vaginal purificado (b).

## CAPITULO V ANALISIS DE RESULTADOS Y DISCUSION

---

---

En la Figura 13 podemos observar la gran influencia que tiene el pH sobre la fuerza de adhesión del C934P. En la región de pH entre 4.5 y 6.0 encontramos las mayores fuerzas de adhesión, con un máximo a pH=5.8; mientras que, a valores de pH alcalinos hay una caída en la adhesión con un mínimo a pH=9. En general, la fuerza de adhesión fué mayor en medio ácido que en alcalino. La explicación del comportamiento anterior se relaciona con varios factores:

Primero, la hidratación de un coloide resulta en la relajación de sus cadenas moleculares, las cuales son capaces de liberar sus sitios adhesivos para darles la posibilidad de crear enlaces; es decir, el hinchamiento del C934P ocasiona una mejor relajación de sus cadenas permitiendo su difusión (interpenetración) a través del moco. Debemos recordar que el hinchamiento es un fenómeno dependiente de la naturaleza de este polímero, el cual, tiende a absorber mayor cantidad de agua por encima de su  $pka^{41}$ . Smart y col. midieron el hinchamiento del ácido poliácrico a diferentes valores de pH, obteniendo que en condiciones ácidas, por encima de pH 4, el hinchamiento del polímero se incrementaba ligeramente y continuaba aumentando hasta valores de pH entre 6 y 7; la disminución fué detectada a valores de pH alcalinos<sup>7</sup>. El proceso de hidratación del polímero se explica por el modelo de equilibrio membranar de Donnan: el C934P esta formado por macromoléculas con numerosos grupos funcionales hidrofílicos (carboxilo) que pueden formar enlaces hidrógeno; la presencia de sus cargas fijas en la red macromolecular establece una fuerza o presión de hinchamiento, originada por una presión osmótica, la cual es la fuerza direccional que transporta el agua al interior del gel polimérico desde la zona más diluida del seno de la solución.<sup>7, 37, 49, 60.</sup>

<sup>61</sup> Partiendo del hecho que, el C934P es ácido poliácrico entrecruzado con alíscarosa ( $pka=4.74$ )<sup>7</sup>, resulta sencillo relacionar los valores de hinchamiento obtenidos por Smart y los datos de fuerza de adhesión de nuestro trabajo. Evidentemente, estamos atribuyendo que el hinchamiento fué uno de los factores que influenciaron de manera definitiva sobre la adhesión del polímero. La relajación en las cadenas del polímero, favorecida a valores de pH por encima del  $pka$ , permitió su difusión a través del moco y el establecimiento de enlaces adhesivos entre los grupos funcionales de ambos hidrocoloides. A pH mayor de 8, existe un marcado hinchamiento del C934P y esperaríamos encontrar aumento en la fuerza de adhesión, sin embargo, los resultados fueron contrarios; lo anterior se debió porque en medios muy alcalinos el polímero presenta una sobrehidratación de sus cadenas y una relajación exagerada que ocasiona la formación de un mucilago resbaladizo que carece de propiedades adhesivas, tal especie ya ha sido identificada en otros estudios por Smart y Chien<sup>61</sup>. No obstante, la sobrehidratación del polímero es un fenómeno que difícilmente puede darse, principalmente, por la poca disponibilidad de agua en la mucosa vaginal.

Segundo, acorde a la teoría de fractura e interpenetración, propuesta por Peppas y Ponchel<sup>54</sup>, es factible la formación de enlaces químicos entre el moco y el polímero. La ionización negativa del moco a un pH mayor de 2.8<sup>23</sup> permite establecer enlaces con los grupos carboxilo del polímero que se encuentran ionizados negativamente a valores de pH por encima de su  $pka$ . En medios ligeramente ácidos las

interacciones químicas favorecen la adhesión del polímero y el moco, mientras que, en medios muy alcalinos ambos se encuentran ionizados negativamente, por lo tanto, este factor no contribuye a la adhesión, resultando en una disminución de la fuerza adhesiva, hecho claramente ilustrado en nuestros resultados.

Tercero, la formación de enlaces mecánicos debidos a la inclusión del material bioadhesivo en los pliegues del tejido, es otro factor que colabora a la fuerza de bioadhesión. La rugosidad de la vagina, originada por los pliegues que forman la mucosa, son sitios ideales para formar este tipo de enlaces<sup>41</sup>. Las microfotografías de la Figura 15 muestran las interacciones físicas que se dan entre la mucosa vaginal y el C934P. En ambas imágenes se aprecia polímero depositado después de la separación del comprimido y la mucosa. Además, es posible observar (Figura 15b) algunas zonas donde el polímero está anclado a la superficie de los pliegues mucosales, lo cual, debió haber sucedido porque la hidratación del C934P permitió un mejor desplazamiento y distribución de las cadenas poliméricas sobre la superficie de la mucosa. Este tipo de interacciones incrementan la fuerza de adhesión.

En resumen, la influencia del pH pudo explicarse por el diferente grado de relajación de las cadenas poliméricas a cada pH y por su capacidad de interpenetración en la red de moco (difusión de las cadenas poliméricas). Otros factores que intervinieron son la formación de enlaces físicos y químicos entre el sustrato biológico y el polímero.

Por último, como la región de pH entre 4.5 y 6.0 fué donde se obtuvieron las mayores fuerzas de adhesión, es de esperarse que, el C934P presente una buena adhesión a la mucosa vaginal (pH=4.5) al ser formulado en formas farmacéuticas vaginales.

El comportamiento de elución del C934P es un parámetro importante para determinar como afecta el tamaño de partícula del polímero en su estancia sobre la mucosa vaginal. Para el análisis partiremos de los datos presentados en la Tabla IV y Figura 14.

De manera general, puede apreciarse que en los primeros 60 minutos se encuentran las diferencias más significativas en la eliminación de los gránulos. En el periodo de 0-60 min fueron eliminados 64.0, 25.2 y 56.0 % de los gránulos para los cortes de 40/60, 20/40 y 10/20, respectivamente. Las constantes de velocidad de eliminación presentaron el siguiente orden  $K_{el}^{10/20} > K_{el}^{20/40} > K_{el}^{40/60}$ , es decir, para el corte 10/20 se eliminó una mayor cantidad de polímero por unidad de tiempo.

Para tiempos posteriores a los 60 min, las  $K_{el}$  presenta valores muy semejantes, lo cual, significa que la cantidad de polímero eliminado a cada tiempo fué muy similar para todos los gránulos de C934P, independientemente de su tamaño de partícula.

Los resultados hacen suponer que el periodo crítico para una mejor interacción y posible permanencia del C934P sobre la mucosa vaginal se esté dando en los primeros 60 min. Para explicar el comportamiento anterior es necesario relacionar dos fenómenos importantes: la velocidad de hinchamiento y el área de exposición de las partículas de C934P.

Los gránulos 40/60 presentan un área de exposición mayor que los gránulos 20/40 y 10/20, ello favorece que su distribución sobre los pliegues de la mucosa vaginal sea más, permitiendo una mejor superficie de

contacto mucosa-polímero. Sin embargo, el tamaño de partícula también influye sobre la velocidad de hidratación del polímero, a menor tamaño hay un aumento en la velocidad<sup>38</sup>. Evidentemente, esto implica que los gránulos 40/60 tuvieron una mayor velocidad de hidratación que originó su solubilización del polímero, lo que contribuyó a la rápida eliminación del polímero.

En síntesis, la fracción de polímero que permaneció en contacto con la mucosa por largo tiempo, fué aquella que interaccionó desde un inicio con el tejido porque tuvo la oportunidad de interpenetrar y establecer enlaces adhesivos químicos y físicos con el moco y la mucosa, respectivamente; el resto del polímero fué eliminado rápidamente debido a su solubilización.

Para las partículas 10/20, debido a su mayor tamaño de partícula, pudo ser factible una pobre distribución y la formación de "puentes" entre los gránulos del C934P y los pliegues de la mucosa vaginal. La falta de interacción mucosa-polímero trajo consigo la fácil eliminación del polímero sobrepuesto; debemos recordar que la hidratación del polímero proviene de la superficie de la mucosa hacia el lumen. Para este caso, la velocidad de hidratación no fué el factor decisivo, sino la escasa interacción polímero-mucosa, aunque la poca hidratación de los gránulos de polímero menos expuestos a la mucosa, en los tiempos iniciales, limitó la cohesión entre las partículas y favoreció su eliminación.

Los gránulos con el corte 20/40 presentaron tamaño y área de exposición intermedios con respecto a los otros cortes, por lo que, los factores que anteriormente desfavorecían la permanencia de los gránulos de C934P se vieron atenuados en sus efectos sobre las partículas de este tamaño. Es decir, la falta de distribución y la gran velocidad de hidratación (para los cortes 10/20 y 40/60, respectivamente) se vieron contrarrestados por el tamaño de partícula, dando lugar a una permanencia más prolongada del C934P corte 20/40 sobre la mucosa vaginal de cerdo.

Un aspecto más que debemos hacer notar es el efecto protector de la mucosa vaginal sobre la velocidad de hidratación del C934P. Aguilera y col.<sup>1</sup> determinaron *in vitro* que la solubilización del C934P se presentaba después de 10 min, lo cual, contrasta totalmente con el comportamiento *in situ* que tuvo el polímero durante nuestra experimentación, ya que, después de 60 min el polímero aún permanecía sobre la vagina. Lo anterior hace suponer que tanto la mucosa como el moco tienen un efecto protector sobre el polímero, lo cual, deriva en el retraso de la solubilidad del mismo.

Resumiendo, los gránulos con diámetro promedio de 335  $\mu\text{m}$  fueron los que tuvieron el tamaño ideal para poder ser formulados en una forma farmacéutica vaginal y permanecer por más tiempo en la vagina.

En lo que refiere al análisis biofísicoquímico del mvp (Tablas V y Figura 17) se obtuvieron características muy importantes que permiten realizar un análisis integral y más completo de la interacción mvp-C934P. Los contenidos de proteínas y carbohidratos en el mvp fueron del 31.0 y 69.0 %, respectivamente. La presencia de estas macromoléculas en el extracto es un dato de gran importancia porque refleja que, con el proceso de purificación realizado, se logró obtener un concentrado con los principales componentes del moco vaginal que interaccionan con el polímero durante la mucoadhesión, las proteínas, dichos compuestos pudieran tener un carácter glucoproteico, puesto que, se han determinado en otros sistemas.<sup>38</sup>

Con respecto a los lípidos, en la Figura 18a se muestra que no existe evidencia de algún pico de fusión en la región de transición lipídica, 70-100°C<sup>9</sup>. Tal hecho confirma que el tipo de purificación fué el adecuado

para nuestros propósitos. Inicialmente, se planeó evitar la presencia de los componentes lipídicos en el mvp con el fin de que la asociación glicoproteínas-cadenas poliméricas, en estudios posteriores, tuvieran una interacción más directa, y así, evitar algún tipo de interferencia por los lípidos presentes, debido a que pueden formar emulsiones estables con el C934P<sup>66</sup>. La eliminación de los componentes lipídicos se efectuó en la etapa de precipitación con etanol.

En el patrón electroforético se obtuvieron dos bandas sencillas que correspondieron a proteínas con pesos moleculares de 26.2 y 28.5·KD (Figura 17). La presencia de, únicamente, estas dos proteínas podría deberse a que eran los componentes más abundantes del moco. La importancia de su caracterización es porque, posiblemente, participen en la mucoadhesión vaginal del C934P.

En el estudio del comportamiento térmico, la Calorimetría Diferencial de Barrido fué usada como una herramienta para probar las interacciones entre los componentes del mvp y el C934P

El barrido térmico del mvp (Figura 18a) presenta dos picos de fusión definidos a 130.4 y 133.0 °C, los cuales se encuentran próximos al intervalo de transición proteica citado por algunos autores<sup>9</sup> (150-170°C), posiblemente, se trate de las proteínas de 26.2 y 28.5 KD, respectivamente. La mejor definición en el pico de la proteína de menor peso molecular se debió a que se encontraba en mayor concentración, como lo mostró la mayor intensidad en la tinción de su banda de separación durante la electroforesis. La proximidad en los picos de fusión de las dos proteínas se relaciona directamente a la cercanía de sus pesos moleculares

En la región que comprende de 180-210 °C se observan varios picos no definidos correspondientes a la transición térmica de los carbohidratos, muy probablemente, mucilagos derivados de ácido siálico.

Para tener un análisis más completo del comportamiento térmico del mvp se realizó una segunda corrida de la muestra después de enfriarla. En el termograma (Figura 19a) desaparecieron los picos característicos antes mencionados, esto hace suponer que la fusión va acompañada por descomposición. Para corroborar este último punto se aplicó un análisis termogravimétrico (Figura 19b), donde, pudimos apreciar que cerca de la zona de transición proteica hay una pérdida considerable en la masa de la muestra, y más adelante, cerca de la zona de transición de carbohidratos, aparece otra caída significativa de la masa. Esto hace suponer que el proceso de fusión-descomposición va acompañado del desprendimiento de gases; cabe agregar que, durante el estudio se detectó un olor característico a caramelo, muestra inequívoca de la hidrólisis de los carbohidratos.

El termograma del C934P (Figura 18b) muestra sólo una pequeña zona transición térmica cerca de los 180-200 °C, el resto de su comportamiento puede considerarse constante. Su *temperatura de transición vítrea* no se aprecia en la corrida, ya que, se encuentra después de los 500 °C.<sup>33</sup>

Con respecto a las muestras de mvp-C934P a diferentes proporciones (Figuras 18c, d y e), se puede apreciar que en todos los casos hay una desaparición de los picos de fusión que aparecían en el termograma de mvp (130.4 y 133.0 °C). Además, la zona de transición de los carbohidratos se va atenuando a medida que la proporción de C934P se incrementa. Esto hace pensar que pudiera darse una interacción en la cual se asocian componentes del mvp y el C934P. La desaparición del pico pudo deberse, entre otras cosas, a que el C934P modificó el arreglo de las proteínas, lo que corrobora que debe

de existir algún tipo de asociación entre glucoproteínas y cadenas poliméricas que hacen que el complejo moco-polímero se comporte como una especie independiente con características propias.

Evidentemente, la interacción glucoproteínas-cadenas poliméricas es el componente que aporta más a las características adhesivas del complejo moco-polímero y es la entidad a partir de la cual se gobierna el comportamiento bioadhesivo de los polímeros. El presente trabajo, presentó evidencias que hacen suponer la existencia de una interacción entre las glucoproteínas del moco y el C934P, sin embargo, la naturaleza de ésta y el nivel al cual se desarrolla no es posible clarificarlos.

La evidencia de asociación mvp-C934P es un buen indicio en el estudio del mecanismo bioadhesivo porque con posteriores aportaciones nos llevará a delimitar las características necesarias de un polímero para una buena bioadhesión, ya sea, en polímeros existentes o de nueva síntesis.

- El comportamiento bioadhesivo del C934P sobre la mucosa vaginal de cerdo fue óptimo en un intervalo de pH entre 4.5 y 6.0, donde, presentó las mayores fuerzas de adhesión; mientras que, las partículas con diámetro promedio de 335  $\mu\text{m}$  tuvieron la mejor retención. Ambos resultados sugieren que el C934P es un buen excipiente para formularse en formas farmacéuticas bioadhesivas con aplicación vaginal.

- La pérdida de la transición de fase proteica en el estudio de Calorimetría Diferencial de Barrido, al ser mezclados nvp y C934P, puede ser un indicativo de la formación de una asociación entre las proteínas aisladas (pesos moleculares de 26.2 y 28.5 KD) y las cadenas poliméricas. A fin de determinar el tipo de interacción existente, en estudios posteriores, será necesario purificar la fracción proteica y analizar su interacción físicoquímica con el C934P.

## REFERENCIAS

- 1.- Aguilera, C. E., Peña, R. A., Cervantes, A. O. R., Villalobos, G. R. and Quintanar, G. D., *Development of a method to measure bioadhesion of polymers*, in Proceedings of 12<sup>th</sup> Pharm. Tech. Conference, 1, 115-131 (1993).
- 2.- Beachey, E. H., *Bacterial adherence: adhesin-receptor interactions mediating the attachment of bacteria to mucosal surfaces*, J. Infect. Dis, 143, 325-345 (1981).
- 3.- Belanger, M., Dubreuil, D., Girard, Ch. and Jacques, M., *Role of lipopolysaccharides in adherence of Actinobacillus pleuropneumoniae by vaccination*, Vet. Microbiol., 39, 71-81 (1990).
- 4.- Howman, W. C. and Rand, M. J., "Absorption, distribution, excretion and metabolism of drugs: biopharmaceutics and pharmacokinetics", in *Textobook of Pharmacology*, 2<sup>nd</sup> ed., Blackwell Scientific Publications, Great Britain, 40.1-40.8 (1980).
- 5.- Bradford, N. M., *A rapid and sensitive method for the quantitation of microquantities of protein*, Anal. Biochem., 248-250 (1976).
- 6.- Chien, W. Y., "Vaginal Drug Delivery and Delivery Systems", in *Novel Drug Delivery Systems*, Chien, W. Y. (Ed.), Marcel Dekker, U.S.A., 529-584 (1992).
- 7.- Ch'ng, S. H., Park, H., Kelly, P. and Robinson, R. J., *Bioadhesive polymers as platforms of oral controlled drug delivery II: synthesis and evaluation of some swelling, water-insoluble bioadhesive polymers*, J. Pharm. Sci., 74, 399-405 (1985).
- 8.- Collins, E. A. and Deasy, B. P., *Bioadhesive lozenge for the improved delivery of cetylpyridinium chloride*, J. Pharm. Sci., 79, 116-119 (1990).
- 9.- Corbo, C. D., Liu, C. J. and Chien, W. Y., *Characterization of the barrier properties of mucosal membranes*, J. Pharm. Sci., 202-206 (1990).
- 10.- Davis, M. N., Farr, J. S., Hadgraft, J. and Kellaway, W. L., *Evaluation of mucoadhesive polymers in ocular drug delivery. II. Polymer-coated vesicles*, Pharm. Res., 9, 1137-1143 (1992).
- 11.- Deshpande, A. A., Rhodes, C. T. and Danish, M., *Intravaginal Drug Delivery*, Drug Dev. Ind. Pharm., 18, 1225-1279 (1992).
- 12.- Duchene, D., Touchard, F. and Peppas, A. N., *Pharmaceutical and medical aspects of bioadhesive systems for drug administration*, Drug Dev. Ind. Pharm., 14, 283-318 (1988).
- 13.- Durrani, A. M., Davies, M. N., Thomas, M. and Kellaway, W. L., *Pilocarpine bioavailability from a mucoadhesive liposomal ophthalmic drug delivery system*, Int. J. Pharm., 88, 409-415 (1992).

- 14.- Ganem, R. A., Galindo, R. S. A., Villalobos, G. R. and Quintanar, G. D., "Evaluation of the bioadhesion properties of some polymers to vaginal mucous *ex vivo*. pH influence on Carbopol 934P mucoadhesion", in Proceedings of 13<sup>th</sup> Pharm. Tech. Conference, I, 487-496 (1994).
- 15.- Gonda, Land and Gipps, E., *Model of disposition of drugs administered into the human nasal cavity*, Pharm. Res, 7, 69-75 (1990).
- 16.- Gupta, K. P., Leung, S. S. H. and Robinson, R. J., "Bioadhesives/mucoadhesives in drug delivery to the gastrointestinal tract", in *Bioadhesive drug delivery systems*, Lenaerts, V. and Gurny, R (Eds.), CRC Press, Boca Raton, Florida, U.S.A., 65-91 (1990).
- 17.- Gürsoy, A., Sohtorik, N. U. and Peppas, A. N., *Bioadhesive controlled release systems for vaginal delivery*, S. T. P. Pharma, 5, 886-892 (1989).
- 18.- Hassan, E. E. and Gallo, J. M., *A simple rheological method for in vitro assessment of mucin-polymer bioadhesive bond strength*, Pharm. Res., 7, 491-195 (1990).
- 19.- Hussain, A. A., Hirai, S. and Bawarsh, R., *Nasal absorption of propranolol in rats*, J Pharm. Sci., 68, 1196 (1979).
- 20.- Hui, H. W. and Robinson, R. J., *Effect of particle dissolution rate on ocular drug bioavailability*, J. Pharm. Sci., 75, 280-287 (1986).
- 21.- Ishida, M., Machida, I., Nambu, N., and Nagai, T., *New mucosal dosage form of insulin*, Chem Pharm. Bull., 29, 810-816 (1981).
- 22.- Ishida, M., Nambu, N. and Nagai, T., *Ointment-type oral mucosal dosage of Carbopol containing prednisolon for treatment of aphta*, Chem. Pharm. Bull., 31, 1010 (1983).
- 23.- Jabbari, E., Wisniewski, N. and Peppas, A. N., *Evidence of mucoadhesion by chain interpenetration at a poly(acrylic acid)-mucin interface using ATR-FTIR spectroscopy*, J. Control. Rel., 26, 99-108 (1993).
- 24.- Jensen, D. "Fisiología endócrina y de la reproducción", en *Fisiología*, Nueva Editorial Interamericana, México, 985-1223 (1979).
- 25.- Jiménez, C. R. M., Hussein, Z. and Rhodes, C. T., *Mucoadhesive drug delivery systems*. Drug Dev. Ind. Pharm., 19, 143-194 (1993).
- 26.- Kalant, H. and Roschlau, H. E. W., "Drug solubility, absorption, and movement across body membranes", in *Principles of Medical Pharmacology*, 5<sup>th</sup> ed., B. C. Decker Inc., Toronto , Canada, 9-25 (1989).
- 27.- Keleti, G. and Laderer, W. H., *Handbook of Micromethods for the Biological Sciences*, Van Nostrand (1974).

- 28.- Khosla, R. and Davis, S. S., *The effect of polycarophil on the gastric emptying of pellets*, J. Pharm. Pharmacol., 39, 47-49 (1987).
- 29.- Laemmli, U. K., *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*, Nature, 680-685 (1970).
- 30.- Lee, V. H. L. and Robinson, R. J., *Mechanistic and quantitative evaluation of precorneal pilocarpine disposition in albino rabbits*, J. Pharm. Sci., 68, 673-684 (1979).
- 31.- Lehr, M. C., Bouwstra, A. J., Spies, F., Onderwater, J., Noordeinde, J., Keers, V. C., Munsteren, J. C. and Junginger, E. H., *Visualization studies of the mucoadhesive interface*, J. Control. Rel., 249-260 (1992).
- 32.- Leung, S. H. and Robinson, R. J., *Contribution of anionic polymer structural features to mucoadhesion*, J. Control. Rel., 5, 223-231 (1988).
- 33.- Longer, A. M., Ch'ng, S. H. and Robinson, R. J., *Bioadhesive polymers as platforms of oral controlled drug delivery III: oral delivery of chlorothiazide using a bioadhesive polymer*, J. Pharm. Sci., 74, 406-411 (1985).
- 34.- Longer, A. M. and Robinson, R. J., *Fundamental aspects of bioadhesion*, Pharm. Int., 7, 114-117 (1986).
- 35.- Marriot, C., *"Mucoadhesion in the gastrointestinal tract"*, in *Proceedings of Capsugel Symposium*, London, England, 18-22 (1989).
- 36.- Martin, A., Swarbrick, J. and Cammarata, A., *"Interfacial phenomena"*, in *Physical Pharmacy Physical Chemical Principles in the Pharmaceutical Sciences*, Lea & Febiger, Philadelphia, U.S.A., 16, 445-468 (1983).
- 37.- Martin, A., Swarbrick, J. and Cammarata, A., *"Colloids"*, in *Physical Pharmacy Physical Chemical Principles in the Pharmaceutical Sciences*, Lea & Febiger, Philadelphia, U.S.A., 17, 469-488 (1983).
- 38.- Martínez G. M. y Jácome L. E., *Extracción y caracterización de ácido hialurónico a partir de fuentes no comunes (deshecho de tiburón)*, Tesis de Licenciatura, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán-UNAM (1993).
- 39.- Marvola, M., Rajaniemi, M., Marttila, E., Vahervuo, K. and Sothmann, A., *Effect of dosage form and formulation factors on adherence of drugs to the esophagus*, J. Pharm. Sci., 72, 1034-1036 (1983).
- 40.- Marvola, M., Vahervuo, K., Sothmann, A., Marttila, E. and Rajaniemi, M., *Development of a method for study of the tendency of drug products to adhere to the esophagus*, J. Pharm. Sci., 71, 975-979 (1982).

- 41.- Mikos, G. A. and Peppas, A. N., "Scaling concepts and molecular theories of adhesion of synthetic polymers to glycoprotein networks", in *Bioadhesive drug delivery systems*, Lenaerts, V. and Gurny, R. (Eds.), CRC Press, Boca Raton, Florida, U.S.A., 25-42 (1990).
- 42.- Mikos, G. A. and Peppas, A. N., *Systems for controlled release of drugs. V. Bioadhesive systems*, S. T. P. Pharma, 2, 705 (1986).
- 43.- Mortazavi, A. S., Carpenter, B. G. and Smart, D. J., *An investigation of the rheological behaviour of the mucoadhesive-mucosal interface*, Int. J. Pharm., 83, 221-225 (1992).
- 44.- Mortazavi, A. S. and Smart, D. J., *An investigation into the role of water movement and mucus gel dehydration in mucoadhesion*, J. Control. Rel., 25, 197-203 (1993).
- 45.- Nagai, T. and Machida, Y., *Mucosal adhesive dosage forms*, Pharm. Int., 6, 196-200 (1985).
- 46.- Ofek, I. and Beachey, E. H., *Bacterial adherence*, Adv. Intern. Med., 25, 503-532 (1980).
- 47.- Park, H. and Robinson, R. J., *Mechanisms of mucoadhesion of poly(acrylic acid) hydrogels*, Pharm. Res., 4, 457-464 (1987).
- 48.- Park, H. and Robinson, R. J., *Physico-chemical properties of water insoluble polymers important to mucin/epithelial adhesion*, J. Control. Rel., 2, 47-57 (1985).
- 49.- Park, K. and Park, H., "Test methods of bioadhesion", in *Bioadhesive drug delivery systems*, Lenaerts, V. and Gurny, R. (Eds.), CRC Press, Boca Raton, Florida, U.S.A., 43-64 (1990).
- 50.- Park, K. and Robinson, R. J., *Bioadhesive polymers as for oral-controlled drug delivery: method to study bioadhesion*, Int. J. Pharm., 19, 107-127 (1984).
- 51.- Peppas, A. N. and Buri, A. P., *Surface interfacial and molecular aspects of polymer bioadhesion on soft tissues*, J. Control. Rel., 2, 257-275 (1985).
- 52.- Peppas, A. N., Ponchel, G., and Duchene, D., *Bioadhesive analysis of controlled-release systems: II. Time-dependent bioadhesive stress in poly(acrylic acid) containing systems*, J. Control. Rel., 5, 143-150 (1987).
- 53.- *Polymer Handbook*, Secc. VI- 215, Brandrup, J. and Immergut, H. (Eds.), John Wiley & Sons, USA, (1989).
- 54.- Ponchel, G., Touchard, F., Duchene, D. and Peppas, A. N., *Bioadhesive analysis of controlled-release systems: I. Fracture and interpenetration analysis in poly(acrylic acid) containing systems*, J. Control. Rel., 5, 129-141 (1987).

- 55.- Pouchel, G., Touchard, D., Wouessidjewe, D., Duchene D. and Peppas, A. N., *Bioadhesive analysis of controlled-release systems. III. Bioadhesive and release behaviour of metronidazole-containing poly(acrylic acid)-hydroxy propyl methyl cellulose systems*, *Int. J. Pharm.*, 38, 65-70 (1987).
- 56.- Ranga, R. K. V. and Buri, P., *A novel in situ method to test polymers and coated microparticles for bioadhesion*, *Int. J. Pharm.*, 52, 265-270 (1989).
- 57.- Richardson, L. J., Farraj, F. N. and Illum, L., *Enhanced vaginal absorption of insulin in sheep using lysophosphatidylcholine and a bioadhesive microsphere delivery system*, *Int. J. Pharm.*, 88, 319-325 (1992).
- 58.- Richardson, J. L., Illum, L. and Thomas, N. W., *Vaginal absorption of insulin in the rat. Effect of penetration enhancers on peptide uptake and mucosal histology*, *Pharm. Res.*, 9, 878-883 (1992).
- 59.- Robinson, R. J. and Bologna, W. J., *Vaginal and reproductive system treatments using a bioadhesive polymer*, *J. Control. Rel.*, 28, 87-94 (1994).
- 60.- Siegel, R. A., "pH sensitive gels: swelling equilibria, kinetics, and applications for drug delivery", in *Pulsed and self regulation drug delivery*, Kost, J. (Ed.), CRC Press, U.S.A., 129-157 (1990).
- 61.- Siegel, R. A. and Firestone, B. A., *pH- Dependent equilibrium swelling properties of hydrofobic polyelectrolyte copolymer gels*, *Macromolecules*, 3254-3259 (1988).
- 62.- Smart, D. J. and Kellaway, W. I., *Pharmaceutical factors influencing the rate of gastrointestinal transit in an animal model*, *Int. J. Pharm.*, 53, 79-83 (1989).
- 63.- Smart, D. J., Kellaway, W. I. and Worthington, E. C., *An in-vitro investigation of mucosa-adhesive materials for use in controlled drug delivery*, *J. Pharm. Pharmacol.*, 36, 295-299 (1984).
- 64.- Su, K. S. E., Campanale, K. M. and Gries, Ch. L., *Nasal drug delivery system of a quaternary ammonium compound: clofilium tosylate*, *J. Pharm. Sci.*, 73, 1251-1254 (1984).
- 65.- Testut, L. y Latarjet, A., "Organos genitales de la mujer", en *Compendio de Anatomia Descriptiva*, Salvat, España, 723-746 (1984).
- 66.- *The Merck Index/ An encyclopedia of chemical and drugs*, 8<sup>th</sup> ed., Stecher G., Paul (Ed.), Merck & Co., Inc., N. J., U.S.A., 210 (1973).
- 67.- Thermes, F., Rozier, A., Plazonnet, B. and Grove, J., *Bioadhesion: The effect of polyacrylic acid on the ocular bioavailability of timolol*, *Int. J. Pharm.*, 81, 59-65 (1992).
- 68.- Vidgren, P., Vidgren, M., Vainio, P., Nuutinen, J. and Paronen, P., *Double-labelling technique in the evaluation of nasal mucoadhesion of disodium cromoglycate microspheres*, *Int. J. Pharm.*, 73, 131-136 (1991).

69.- Woolfsoon, A. D., McCafferty, D. F., Gorman, S. P., McCarron, P. A. and Price H. J., *Design of an apparatus incorporating a linear variable differential transformer for the measurement of type III bioadhesion to cervical tissue.*, Int. J. Pharm., 84, 69-76 (1992).