



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

“APLICACION DEL METODO DE PALETA SOBRE DISCO PARA ESTUDIAR LA LIBERACION IN VITRO DE DOS MARCAS COMERCIALES DE UNA FORMULACION TOPICA”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE: QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO P R E S E N T A : AGUIRRE MEDINA ADRIANA

DIRECTOR DE TESIS: Q.F.B. MA. DE LOS ANGELES VIDAL MILLAN



MEXICO, D. F.

1997

LO SUMAMO EJE DE NUESTRA REFLEXION 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).

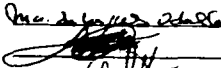
El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición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

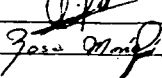
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE	Q.F.B. MAURO ARRIETA SANCHEZ
VOCAL	Q.F.B. MA. DE LOS ANGELES VIDAL MILLAN
SECRETARIO	DR. ANDRES NAVARRETE CASTRO
SUPLENTE	Q.F.B. CESAR ESCAMILLA FLORES
SUPLENTE	Q.F.B. ROSA MA. CRUZ HERNANDEZ



Ma. de los Angeles Vidal Millan




SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA:

CINVESTAV en el departamento de SECAEC.

JEFE DEL DEPARTAMENTO:

Q.F.B. EUGENIA LAGARDE Y ABURTO

DIRECTOR DEL TEMA:

Q.F.B. MA. DE LOS ANGELES VIDAL MILLÁN

CON EL APOYO DE:

ADVANCED INSTRUMENTS DE MÉXICO

Marzo - 1997.

A DIOS

Por permitirme realizar una de las metas más grandes e importantes de mi vida.

A MIS PADRES

Héctor y Esperanza, con admiración, respeto y cariño les dedico este trabajo agradeciendo todo su apoyo y comprensión, ya que siempre me impulsan y guían para salir adelante.

LOS QUIERO

A MIS HERMANOS

Ebbiana, Héctor y Claudia, por estar siempre conmigo alentándome y brindándome apoyo y cariño.

GRACIAS.

A MIS SOBRINOS Y PRIMOS

Julio, Janet, Héctor, Alberto y María Elena, porque siempre que se propongan una meta luchan hasta alcanzarla.

A MIS ABUELITOS Y TÍOS

Por su cariño y apoyo incondicional

A ANTONIO, LAURA Y RAFAEL

Por formar parte de esta familia tan unida.

A TODOS MIS AMIGOS

Porque sé que siempre puedo contar con ustedes.

A MI ASESOR

Q.F.B. MA. DE LOS ÁNGELES VIDAL M.

Con admiración y respecto agradezco todo su empeño, dedicación y disposición para la realización de este trabajo y sobre todo por su invaluable apoyo, confianza y amistad.

DR. ANDRÉS NAVARRETE C.

Por su recomendación y comentarios para la realización de este trabajo.

Gracias.

Q.F.B. RAMÓN SOTO
Q.F.B. PATRICIA PARRA

Por brindarme su maravillosa e invaluable amistad.

Q.F.B. ANTONIO HERNÁNDEZ

Por tu amistad, apoyo y colaboración.

Q.F.B. EUGENIA LAGARDE

Por su apoyo y amistad

Gracias.

A MIS SINODALES

Por sus valiosos comentarios, los cuales enriquecieron este trabajo.

Gracias.

Q.F.B. CESAR ESCAMILLA

Por su apoyo y amistad.

Gracias.

TABLA DE CONTENIDO

CONTENIDO	PAGINA
1. INTRODUCCION	2
2. FUNDAMENTO DEL TEMA	3
2.1. Ungüentos	3
2.2. Estudios de Liberación <u>In vitro</u>	4
2.2.1. Modelos de liberación	6
2.2.2. Modelos de absorción	12
2.2.3. Análisis de datos.	14
2.2.3.1. Area bajo la curva	14
2.2.3.2. Eficiencia de la disolución	15
2.2.3.3. Tiempo Medio de Disolución	15
2.2.3.4. Tiempo Medio de residencia	15
2.2.4. Aspectos Regulatorios de Medicamentos Tópicos	17
2.4.1. Método de Paleta sobre Disco	18
2.4.2. Modificación de la FDA al método de Paleta sobre Disco	19
2.2.5. Modificaciones al método de Paleta sobre Disco	20
2.5.1. Celda Mejorada	21
2.2.6. Factores que afectan el perfil de liberación de medicamentos tópicos.	22
2.3. Cromatografía de gases	24
2.3.1. Eficiencia de la columna	26
2.3.2. Eficiencia de la Fase estacionaria	28
2.3.3. Instrumentación	29
2.3.4. Análisis Cuantitativo	31
2.7.6. Análisis Cualitativo	32
2.4. Validación de métodos analíticos	32
2.5. Propiedades Físicas, Químicas y Farmacológicas de los aceites esenciales (trementina, alcanfor y mentol).	35
2.5.1. Esencia de Trementina	37
2.5.2. Alcanfor	38
2.5.3. Mentol	40

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	42
4. OBJETIVOS	44
4.1. Objetivo General	44
4.2. Objetivos Específicos	44
5. HIPOTESIS	45
6. PARTE EXPERIMENTAL	46
6.1. Equipo y material	46
6.2. Reactivos	48
6.3. Metodología	49
6.3.1. Validación del método analítico	49
6.3.2. Ensayos de las muestras	52
6.3.3. Pruebas de liberación de aceites esenciales	52
6.3.4. Determinación de Calor de Fusión de las formulaciones	56
7. RESULTADOS Y DISCUSION DE RESULTADOS	57
7.1. Validación del método analítico	57
7.2. Ensayo de las muestras	61
7.3. Pruebas de liberación	62
7.4. Determinación de Calor de Fusión de las formulaciones	94
9. CONCLUSIONES	101
10. ANEXOS	104
11. BIBLIOGRAFIA.	109

INDICE DE FIGURAS

FIGURAS	PAGINA
FUNDAMENTO DEL TEMA	
FIG 1. Modelos de evaluación de formulaciones dermatológicas.	6
FIG 2. Celdas de difusión	7
Fig 3. Celdas de difusión	8
Fig 3a. Celdas de difusión vertical	8
Fig 3b. Celdas de difusión verticales	9
Fig 3c. Celdas de difusión horizontales	10
Fig 4. Eficiencia de la disolución	15
Fig 5. Método de paleta sobre disco de la USP	18
Fig 6. Modificación de la FDA al método de paleta sobre disco.	19
Fig 7. Método de paleta sobre disco "Celda Mejorada"	21
Fig 8. Instrumentación de un Cromatografo de gases	25
Fig 9. Cromatograma hipotético donde se muestra Tr	27
Fig 10. Cromatograma hipotético donde se muestra la resolución	29
Fig 11. Estructura química de los componentes del aceite de trementina	38
Fig 12. Estructura química Alcanfor	40
Fig 13. Estructura química Mentol	41
PARTE EXPERIMENTAL	
Fig 14. "Celda modificada" para parches transdérmicos de la USP	46
Fig 15. "Celda mejorada" para pruebas de liberación de ungüentos con disco como medio de separación	47

RESULTADOS Y DISCUSION DE RESULTADOS

Fig 1R. Cromatograma de una muestra de unguento al 100% de concentración.	76
Fig 2Ra. Perfiles de liberación de las formulaciones MJ	87
Fig 2Rb. Perfiles de liberación de las formulaciones MB	88
Fig 2Rc. Perfiles de liberación de las formulaciones MM	89
Fig 3Ra. Correlación de Calor de fusión y TMD (Turpentina, Alcañafior y Mentol)	97
Fig 4Ra. Termograma de la muestra MM	98
Fig 4Rb. Termograma de la muestra MJ	99
Fig 4Rc. Termograma de la muestra MB	100

INDICE DE TABLAS

TABLA	PAGINA
FUNDAMENTO DEL TEMA	
Tabla I. Modo de acción y proceso de formulaciones tópicas.	5
Tabla II. Estudio de liberación en formulaciones tópicas.	13
Tabla III. Conclusiones de la teoría de Deemter	28
Tabla IV. Detectores utilizados en Cromatografía de gases.	31
Tabla V. Características requeridas en una validación.	35
PARTE EXPERIMENTAL	
Tabla VI. Variables a evaluar	54
Tabla VII. Matriz de Hadamard	54
RESULTADOS Y DISCUSION DE RESULTADOS	
Tabla VIII. Precisión del sistema	57
Tabla IX. Precisión del método	58
Tabla X. Exactitud del método	58
Tabla XI. Linealidad del sistema	59
Tabla XII. Linealidad del método	59
Tabla XIII. Ensayo de las muestras	61
Tabla XIV. Matriz de Hadamard Experimento 1	63
Tabla XV. Matriz de Hadamard Experimento 2	64
Tabla XVI. Matriz de Hadamard Experimento 3	65
Tabla XVII. Matriz de Hadamard Experimento 4	66
Tabla XVIII. Matriz de Hadamard Experimento 5	67
Tabla XIX. Matriz de Hadamard Experimento 6	68
Tabla XX. Matriz de Hadamard Experimento 7	69
Tabla XXI. Matriz de Hadamard Experimento 8	70
Tabla XXII. TMD de la matriz de Hadamard	71
Tabla XXIII. Efectos principales de la matriz de Hadamard (CV).	73
Tabla XXIV. Efectos principales de la matriz de Hadamard (TMD).	73
Tabla XXV. ANADEV A matriz de Hadamard (Turpentina).	74
Tabla XXVI. ANADEV A matriz de Hadamard (Aicanfor).	74

Tabla XXVII. ANADEV A matriz de Hadamard (Mentol).	74
Tabla XXVIII. Liberación de aceites esenciales MJL1	78
Tabla XXIX. Liberación de aceites esenciales MJL2	79
Tabla XXX. Liberación de aceites esenciales MJL3	80
Tabla XXXI. Liberación de aceites esenciales MML1	81
Tabla XXXII. Liberación de aceites esenciales MML2	82
Tabla XXXIII. Liberación de aceites esenciales MML3	83
Tabla XXXIV. Liberación de aceites esenciales MBL1	84
Tabla XXXV. Liberación de aceites esenciales MBL2	85
Tabla XXXVI. Liberación de aceites esenciales MBL3	86
Tabla XXXVII. TMD de los ungüentos	90
Tabla XXXVIII. Resultados promedio (TMD) de las formulaciones (Aicánfor).	91
Tabla XXXIX. ANADEV A (TMD) de las formulaciones Aicánfor.	91
Tabla XL. Comparación de Rango Múltiple (Tuckey) Aicánfor.	91
Tabla XLI. Resultados promedio (TMD) de las formulaciones (Mentol).	92
Tabla XLII. ANADEV A (TMD) de las formulaciones Mentol.	92
Tabla XLIII. Comparación de Rango Múltiple (Tuckey) Mentol.	92
Tabla XLIV. Resultados promedio (TMD) de las formulaciones (Turpentina).	93
Tabla XLV. ANADEV A (TMD) de las formulaciones Turpentina.	93
Tabla XLVI. Comparación de Rango Múltiple (Tuckey) Turpentina.	93
Tabla XLVII. Calor y rango de fusión de las formulaciones.	95
Tabla XLVIII. Calor de fusión y TMD de los Ungüentos.	96
ANEXOS	
Tabla AI. Precisión del sistema.	104
Tabla AII. Precisión del método.	104
Tabla AIII. Exactitud del método.	106
Tabla AIV. Linealidad del sistema.	106
Tabla AV. Linealidad del método.	107

INDICE DE ABREVIATURAS

ABC	Area Bajo la Curva
ABCm	Area Bajo la Curva de la muestra
Ar	Argón
BHA	Butilhidroxianisol
CINVESTAV	Centro de Investigación y de Estudios Avanzados
CFR	Codex Federal Register
CG	Cromatografía de Gases
CGS	Cromatografía gas - sólido
CGL	Cromatografía gas - líquido
CO ₂	Dióxido de carbono
CV	Coefficiente de variación
ED	Eficiencia de Disolución
FDA	Food and Drug Administration
H ₂	Hidrógeno
He	Helio
HEPT	Altura equivalente a un plato teórico
IPN	Instituto Politécnico Nacional
L	Longitud
min	minutos
ml	mililitros
N	Numero de platos teóricos
PTD	Parches Transdérmicos
R	Resolución
rpm	Revoluciones por minuto
TMD	Tiempo Medio de Disolución
TMR	Tiempo Medio de Residencia
Tr	Tiempo de retención
USP	United States Pharmacopeia
Vr	Volumén de retención
WA	Anchura del pico A
WB	Anchura del pico B

1. INTRODUCCIÓN

Para que un medicamento ejerza su efecto terapéutico, lo primero que debe suceder es que el principio activo sea liberado de la forma farmacéutica llámese tabletas, cápsulas, suspensiones, emulsiones, ungüento, etc. Debido a esto es necesario contar con una prueba sencilla, económica, confiable y reproducible que nos permita medir la liberación del fármaco de la forma farmacéutica in vitro, ya que éste tiene la ventaja sobre los procedimientos in vivo, de ser más económicos y reproducibles al eliminar la variabilidad biológica. Esta prueba está perfectamente establecida en compendios oficiales (Farmacopeas) para formas farmacéuticas sólidas orales, pero no para otras formas farmacéuticas, entre las que se encuentran los medicamentos tópicos como son cremas, ungüentos y geles

Existen varios estudios in vitro para medir la liberación del principio activo en medicamentos tópicos, en los cuales no hay un acuerdo en las condiciones en las que se debe efectuar la prueba, así se tiene, el uso de celdas de difusión las cuales consisten en general de dos compartimentos separados por una membrana, en donde en una se coloca la muestra (llamado donador) y en el otro el medio de disolución (llamado aceptor), las cuales varían en forma y tamaño, así como en las condiciones de la prueba, como son tipo y velocidad de agitación, tipo y volumen del medio de disolución, temperatura (25, 32 y 37°C), etc.

La United States Pharmacopeia (USP) 22 introdujo una prueba para estudiar la liberación del fármaco en medicamentos transdérmicos, y lo llamó aparato 3 (en USP 23 es el 5) "Paleta sobre Disco", el cual utiliza el mismo equipo que el aparato 2 para formas farmacéuticas sólidas orales como prueba oficial, donde la muestra se coloca en un disco que contiene una malla de acero inoxidable. Posteriormente la Food and Drug Administration (FDA) hizo una modificación al método 5 de la USP haciéndolo más general y aplicable a todos los parches transdérmicos de nitroglicerina existentes en el mercado

Se han propuesto otras modificaciones al método de la USP entre las que se tienen el uso de una celda "mejorada" específica para ungüentos con la que también se usa el aparato 2 de la USP, sólo que en este caso se usan vasos más pequeños de 200 ml y por lo tanto las paletas también son más pequeñas. La idea de usar el método de paleta sobre disco con sus modificaciones es, la de utilizar el equipo de disolución ya existente en los laboratorios, disminuyendo costos y simplificando entrenamientos especializados, ya que el manejo y automatización del equipo sería similar al de las tabletas.

Debido a las ventajas que presenta el método de paleta sobre disco de la USP se utilizó para comparar los perfiles de liberación de tres formulaciones tópicas de un ungüento consideradas equivalentes químicas, las cuales contienen tres aceites esenciales y a la misma concentración que son: aceite de trementina, alcanfor sintético y mentol sintético, usando la celda "mejorada" y una celda que se diseñó en el Centro de Investigación y de Estudios Avanzados (CINVESTAV) del IPN¹ modificando la malla de acero inoxidable para parches transdérmicos de la USP. Se obtuvieron los perfiles de liberación de tres lotes de cada producto, la evaluación de los resultados se hizo calculando el Tiempo Medio de Disolución (TMD), el cual reduce los resultados del perfil de disolución a un solo resultado simplificando el análisis y la comparación entre formulaciones. Los resultados obtenidos mostraron diferencias estadísticamente significativa entre las tres formulaciones estudiadas para los tres principios activos con un 95 % de confianza utilizando la prueba de rango múltiple de Tukey.

La idea es establecer una prueba que mida la liberación del principio activo (s) en formulaciones tópicas, que pueda ser usada para: comparar formulaciones, proponerla como una prueba de control de calidad para estudiar variaciones en el proceso y en el producto terminado (variaciones entre lote y lote), para utilizarla en estudios de reformulación y formulación del producto y comparación de productos equivalentes químicos.

¹ El diseño de la modificación se hizo en el Dto. de SECAEC en el CINVESTAV-IPN por Ma. de los Angeles Vidal Millán y Adriana Aguirre.

2 FUNDAMENTO DEL TEMA

2.1 UNGÜENTOS

En las preparaciones farmacéuticas semisólidas se incluyen: ungüentos, pastas, cremas y geles. Los ungüentos en general son preparaciones semisólidas grasosas, constituidas de hidrocarburos los cuales contienen porciones fluidas y cristalinas conteniendo al medicamento disuelto o disperso en el vehículo. Si el ungüento es preparado por fusión y es enfriado lentamente tiende a ser mas fluido que cuando es enfriado rápidamente (1,2). Esto es importante porque modifica las características fisicoquímicas del medicamento, entre ellas la velocidad de liberación del medicamento de la forma farmacéutica.

La composición del ungüento debe ser tal que cuando se apliquen sobre la piel se ablanden pero no se fundan. En terapéutica los ungüentos funcionan como protectores y emolientes para la piel, pero también se utilizan como vehículos o bases para la aplicación tópica de sustancias medicinales (2).

Lo ideal es que una base para ungüento sea compatible con la piel, estable, permanente, suave, no irritante, no sensibilizante, inerte y capaz de liberar con facilidad el principio(s) activo(s) que tienen incorporado (2).

Los excipientes más utilizados en formulaciones de ungüentos son (1,2):

- Vehículo hidrofílico o lipofílico como: petrolatos, parafinas, polietilenglicoles, ácidos carboxílicos, etc.
- Cosolvente como: propilenglicol, sorbitol, etc.
- Agentes Viscosantes como: veegunns, alginatos, derivados de la celulosa.
- Agentes Emulsificantes como: laurilsulfatos, lanolina, etc.
- Conservadores como: parabenos.

- Sustancias Amortiguadoras como: ácido cítrico y sus sales, etc.
- Humectantes como: glicerina.
- Antioxidantes como: butilhidroxitolueno, butilhidroxianisol (BHA).
- Secuestrante como: etilendiamino tetracetato disódico.

2.2 ESTUDIOS DE LIBERACIÓN IN VITRO

Es ampliamente conocido que para que un fármaco ejerza su actividad terapéutica es necesario que éste sea liberado de la forma farmacéutica (tabletas, cápsulas, suspensión, ungüento, crema, gel, etc.). Una manera de medir la liberación del fármaco de los medicamentos es a través de pruebas in vitro, estas deben estar estandarizadas para ser utilizadas y poder evaluar la velocidad de liberación del fármaco de la forma farmacéutica. El contar con métodos in vitro nos permiten economizar, ya que los experimentos in vivo son costosos y no son fáciles de controlar, por esta razón estos métodos han sido ampliamente estudiados y están perfectamente estandarizados, reconocidos y disponibles sólo para formas farmacéuticas sólidas orales, y se encuentran en los compendios oficiales de cada país (3, 72, 73).

Sin embargo existe la necesidad de contar con un sistema simple, universal que pueda medir la disponibilidad farmacéutica en otras formas de dosificación, y en nuestro caso particular, que puedan ser aplicados a todos los tipos de medicamentos dermatológicos que es el tema que nos ocupa.

En la última década se han dirigido esfuerzos, para el desarrollo de métodos que permitan la evaluación de la disponibilidad farmacéutica y biofarmacéutica de formulaciones dermatológicas, el modelo a aplicar dependerá:

a) del modo de acción , si es a nivel de la superficie de la piel, o se desea que penetre a capas más profundas.

b)del proceso involucrado para que el medicamento ejerza su acción, si sólo depende de la liberación del vehículo o si involucra penetración y/o absorción a través de la piel

La tabla I (5) muestra las diferentes clases de medicamentos dermatológicos que están directamente relacionados con el modo de acción y el proceso involucrado, así como el parámetro a medir, se tiene que cuando la acción del medicamento tópico es local, el proceso a estudiar será la disponibilidad farmacéutica ya que se medirá la liberación del fármaco del vehículo, los demás tipos de formulaciones dermatológicas (percutáneas y transdérmicas) deben ser absorbidos hacia las capas más profundas de la piel o atravesarlas, para acción sistémica donde se tendrá como parámetro de evaluación la biodisponibilidad

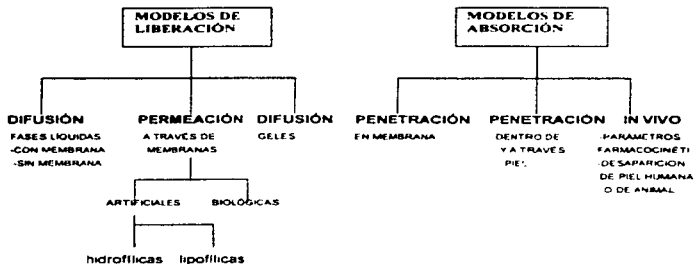
TABLA I. MODO DE ACCIÓN Y PROCESO DE FORMULACIONES DERMATOLÓGICAS

CLASE	EJEMPLO	ACCIÓN	PROCESO	PARÁMETRO
Agentes dermatológicos locales	Ungentos, lociones, cremas, geles	Tópica	Liberación del vehículo	disponibilidad farmacéutica
Preparaciones percutáneas	Preparaciones dermatológicas	Sistémica o bajo el tejido de la piel	Penetración o Absorción	Biodisponibilidad (sitio de acción)
Sistemas Terapéuticos Transdérmicos	Parches Transdérmicos	Sistémico	Absorción Percutánea	Biodisponibilidad (circulación sistémica)

Los parámetros de disponibilidad y biodisponibilidad de fármacos se han usado, como una medida para evaluar la liberación del fármaco del vehículo y de éste a la piel, y su paso a la circulación sistémica.

La clasificación de los modelos para la evaluación biofarmacéutica de formulaciones dermatológicas se muestran en la figura 1, de acuerdo a su modo de acción (5) donde observamos que se dividen en modelos de liberación y de absorción

FIG 1. MODELOS DE EVALUACIÓN DE FORMULACIONES DERMATOLÓGICAS.



2.2.1 MODELOS DE LIBERACIÓN.

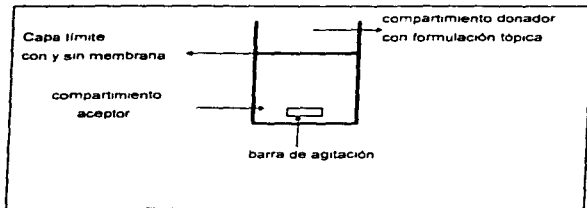
Los modelos de liberación del fármaco del vehículo fueron los primeros en desarrollarse para la evaluación biofarmacéutica de medicamentos dermatológicos (5). El equipo más usado para efectuar este tipo de estudios es la celda de difusión (ver fig. 2), la cual consiste en general de:

- un compartimiento donador, el cual contiene la formulación tópica
- un aceptor donde se encuentra una solución a la que pasa el fármaco llamada fase aceptora.
- una membrana (no siempre está presente, depende del tipo de estudios).
- un sistema de agitación.

- toma de muestra y
- de un sistema que pueda regular la temperatura.

El uso de membrana en estos modelos de liberación es para asegurar la separación entre la formulación y la fase aceptora y en algunas ocasiones no se usa nada. Existen varios diseños de celdas de difusión, las cuales pueden ser verticales como la celda de Franz que es la más popular y horizontales como la de Valia-Chien (5,6,7,8)

FIG. 2 . CELDA DE DIFUSIÓN

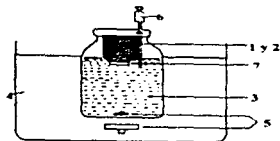


En la Fig. 3 se muestran varios diseños de este tipo de celdas. En la fig 3a (9,10, 11) y 3b (7 y 12) tenemos las celdas de tipo vertical, y en la 3c (7 y 13) las de tipo horizontal.

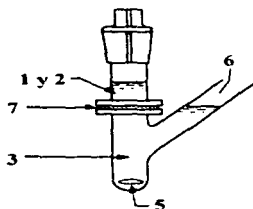
Fig. 3 CELDAS DE DIFUSIÓN.

3a. Celda de difusión vertical. 1 donador, 2 muestra, 3 aceptor, 4 regulador de temperatura, 5 agitador, 6 toma de muestra y 7 membrana.

Celda de difusión
(9)



Celda de difusión
(10)



Celda de difusión
(11)

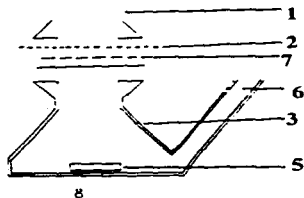
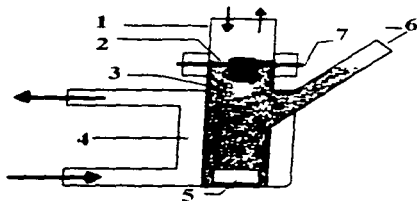


FIG 3B. CELDAS DE DIFUSIÓN VERTICALES. 1 donador, 2 muestra, 3 aceptor, 4 regulador de temperatura, 5 agitador, 6 toma de muestra, 7 membrana.

Celda tipo Franz
(7)



Celda de flujo
(12)

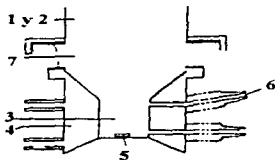
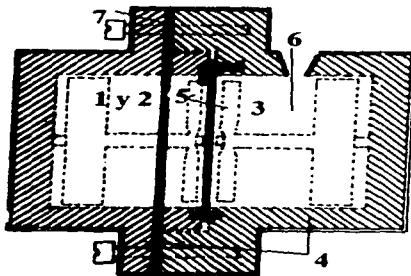
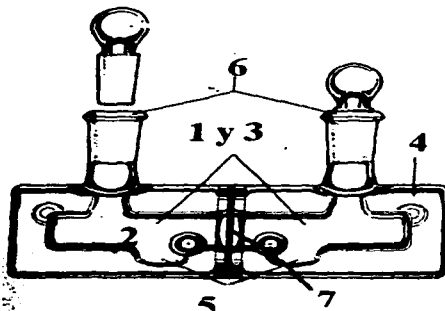


FIG 3c. CELDAS DE DIFUSIÓN HORIZONTALES. 1 donador, 2 muestra, 3 aceptor, 4 regulador de temperatura, 5 agitador, 6 toma de muestra, 7 membrana.

Celda de difusión
(13)



Celda Valia-Chien
(7)



Cuando se desea estudiar sólo la liberación del fármaco del vehículo se debe considerar lo siguiente:

- La elección de una solución aceptora adecuada para el fármaco aplicado tópicamente, la cual depende de las propiedades físicas y químicas del fármaco
- El uso de una membrana adecuada la cual permita la separación óptima de la base del unguento y la solución aceptora, sin influir en la velocidad de liberación del fármaco de la base del unguento (5)

Modelos de liberación sin membrana -En la revisión presentada por Reinhard (5) menciona lo siguiente de los modelos de liberación sin membrana, el primer resultado descrito fue en 1926 Unna estudio unguentos conteniendo fenoftaleina colocados en un soxlet sumergidos en una solución de Cloruro de Sodio Dempksi uso cajas de petri, Poulsen fue el primero en usar miristato de isopropilo como fase aceptora no acuosa por la solubilidad de fluorcinolona en este liquido

Modelos de liberación con membrana -Referente a los modelos de liberación con membrana (usada en estos casos para separar el donador del aceptor) Reinhard (5) en su revisión indica lo siguiente Wood usó una celda de difusión equipada con un aceptor acuoso y membranas de celofán, derivados de celulosa y polímeros de vinil fluoruro Las fasesceptoras no acuosas fueron introducidas con membranas porosas. Franke - Augst describió un aparato de vidrio y utilizó celulosa como membrana y metanol o n-butanol como fase aceptora Turakka y colaboradores, desarrollaron un modelo con propilén glicol como fase aceptora y membranas de policarbonato para separar la fase aceptora y la formulación También en la referencia (5) Reinhard menciona que fasesceptoras no acuosas han sido utilizadas por Ash Walkow y Mc Ginity quienes usaron agua: propilenglicol; Smith y Haigh usaron miristato de isopropilo como fase aceptora. Investigaciones recientes indican que membranas de policarbonato que tienen un diámetro de poro exactamente definido son óptimas para separar el aceptor de la

formulación. Membranas lipídicas artificiales también se desarrollaron, así tenemos que Nakano y Patal en sus estudios de liberación de ácido salicílico de bases de ungüentos fueron los primeros en usar membranas no porosas de dimetil polisiloxano. Sistemas con dos membranas fueron desarrollados por Loth los cuales consistían en una capa hidrofílica como acetato de celulosa impregnada con etilén glicol y una lipofílica como politetrafluoroetileno impregnada con dodecanol. Martín uso un sistema con n-octanol como fase aceptora y membrana de silicona para asegurar la separación adecuada entre la solución aceptora y la formulación. Shah (6) efectuó estudios de velocidad de liberación de ungüentos conteniendo corticosteroides, utilizó una mezcla de miristato de isopropilo:agua:etanol en proporción 10:5:85 como fase aceptora y una membrana de polisulfona impregnada de miristato de isopropilo. El estudio de la liberación de corticosteroides de la base del ungüento represento un reto ya que no fue fácil encontrar la fase aceptora y la membrana sintética adecuada, que permitieron estudiar la liberación del fármaco.

2.2.2 MODELOS DE ABSORCIÓN.

Modelos para estudios de absorción percutánea in vitro usan el mismo tipo de celdas de difusión, sólo que estos llevan una membrana, cuya función no es separar formulación de aceptor como en el caso de los estudios de liberación, sino para medir la penetración y/o permeación del fármaco a través de ésta. Se pueden dividir en:

- sistemas con membranas sintéticas y
- sistemas con membranas biológicas

Dentro de los sistemas con membranas sintéticas (14-21) tenemos con una sola membrana ya sea lipofílica como dimetilpolisiloxano o hidrofílica como derivados de la celulosa (porosa) y los sistemas multimembranas (15, 18, 21) que pretenden simular las diferentes capas de la piel.

Referente a las membranas biológicas se han utilizado de diferentes fuentes animales como de rata, cerdo, serpiente y humana (28-39).

Las membranas sintéticas tienen ventaja sobre las biológicas ya que son reproducibles, fáciles de fabricar, de composición controlada, de mantenimiento sencillo y se han encontrado resultados que reflejan un comportamiento similar al de la piel, sobre todo en multimembranas.

En la tabla II, se muestran algunos ejemplos de estudios de liberación en formulaciones tópicas, donde se observa el uso de diferentes medios de disolución, tipo de celda y tipo de membrana.

TABLA 2. ESTUDIO DE LIBERACIÓN EN FORMULACIONES TÓPICAS.

FÁRMACO	MEDIO DE DISOLUCIÓN	EQUIPO	MEMBRANA	REFERENCIA
NB-818	ISOPROSPANOL - AGUA 50%	CELDA DE FRANZ	PIEL	40
corticosteroides.	miristato de isopropilo-etanol	CELDA DE FRANZ	membrana de polisulfona	6
naproxen	ACUOSO	CELDA DE FRANZ	MEMBRANA SINTÉTICA	15
VARIOS	ACUOSO	CELDA DE FRANZ	MEMBRANA SINTÉTICA	17
VARIOS	ACUOSO	CELDA DE FRANZ	MEMBRANA SINTÉTICA	19
NIFEDIPINA	ACUOSO	CELDA DE FRANZ	PIEL	41
CLONAZEPA	ACUOSO	CELDA DE FRANZ	MEMBRANA SINTÉTICA	20
NIFEDIPINA	ETANOL - AGUA 40%	CELDA DE FRANZ	CELDA DE FRANZ SINTÉTICA	42
VARIOS	ACUOSO	CELDA DE DIFUSIÓN	PIEL	43
ANTIHEMÉTICO - COS	ETANOL - AGUA 70 %	CELDA DE FRANZ	PIEL	31
PIROXICAM	PEG-AGUA 20%	CELDA DE FRANZ	PIEL	34
VARIOS	ACUOSO	CELDA DE DIFUSIÓN	MULTIMEMBRANAS	22
SALICILATO	AGUA PEG 50%	CELDA DE FRANZ	PIEL	39
VARIOS	ETANOL - AGUA 50 %	CELDA DE DIFUSIÓN	PIEL	44

2.2.3 ANÁLISIS DE DATOS.

El análisis de los datos se enfoca en estudios de liberación, a la evaluación de la disponibilidad farmacéutica, y en estudios de absorción al transporte de fármacos a través de la membrana a la evaluación biofarmacéutica.

Los estándares de las Farmacopeas de cada país establecen para la prueba de disolución aplicada a formas farmacéuticas orales sólidas usualmente el % disuelto a un tiempo fijo, bajo condiciones preestablecidas (3, 72, 73) en el Codex Federal Register (CFR) (45) se describe un procedimiento general para realizar la prueba de disolución cuando al producto al que se le desea aplicar no es oficial, pero también se evalúa el % disuelto a un tiempo fijo. Otros autores usan la evaluación del tiempo para alcanzar el 50% o el 90 % disuelto (5). Estas aproximaciones son determinaciones a un solo punto y no caracterizan adecuadamente el proceso completo de disolución, por lo que es mejor hacer la determinación a varios tiempos (perfil de liberación), ya que reflejan mejor el comportamiento del producto

Entre los métodos de análisis de datos de perfiles de disolución tenemos los siguientes:

ÁREA BAJO LA CURVA (ABC). En la revisión de Reinhard (5) indica que el principio de la correspondencia de el área bajo la curva para la determinación de biodisponibilidad siguiendo una administración sistémica fue aplicado a los perfiles de disolución, y este principio se ha aplicado para la evaluación de la penetración en la piel en estudios de absorción. En un estudio de liberación de ditranol por Neubert (21) usan el **ABC** como parámetro de medida del perfil de liberación, la ventaja es que reduce a un solo resultado los perfiles, facilitando su análisis e interpretación, errores en el método de medir el **ABC** dará resultados erróneos.

EFICIENCIA DE LA DISOLUCIÓN (ED): el término **ED** se define como el **ABC** del perfil de disolución expresado como el % del área de un rectángulo descrito como el 100% (46), ver figura 4

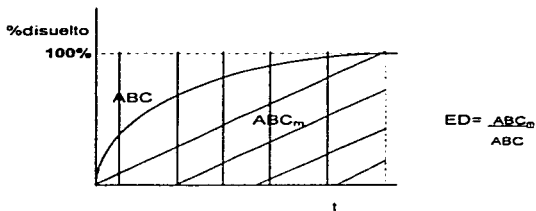


Fig 4 . Eficiencia de la disolución

donde **ABC_m** es el área bajo la curva de la muestra y **ABC** es el área bajo la curva del rectángulo formado por 100% disuelto al tiempo t.

El análisis de resultados de perfiles de disolución utilizando este método tiene ciertas ventajas, una de las cuales es que resume los datos de liberación en un solo número para poder hacer comparaciones entre formulaciones

TIEMPO MEDIO DE DISOLUCIÓN (TMD) Y TIEMPO MEDIO DE RESIDENCIA (TMR): el área bajo la curva obtenida en un perfil de liberación puede ser tratada como una distribución estadística (5) de tiempos de liberación (disolución del fármaco en el medio de disolución) o de residencia del fármaco en la forma farmacéutica. Cada función de distribución puede ser descrita matemáticamente por medidas de tendencia central y de dispersión, las cuales se basan en los momentos estadísticos de primero y segundo grado. Para una distribución normal, el primer momento es igual a la media aritmética y el segundo a la varianza. La media aritmética de cualquier perfil de disolución (% liberado) es llamado **TMD**, pero si el contenido del fármaco que permanece en la forma

farmacéutica se grafica en función del tiempo, la media aritmética es llamada **TMR**. Para calcular el **TMR** y **TMD** se usan las siguientes ecuaciones:

$$\mathbf{TMR} = \mathbf{ABC}_m / \mathbf{ABC}$$

$$\mathbf{TMD} = \mathbf{ABC}_m / \mathbf{ABC} \quad \text{o} \quad \mathbf{TMD} = \int_0^{\infty} t(Q_{\infty} - Q) dt / Q$$

Donde **ABC_m** es el área bajo la curva en el primer momento estadístico y **ABC** el área bajo la curva de lo que permanece en la formulación para el caso de **TMR** y lo que se disuelve en el caso de **TMD** (47, 48)

Una importante fuente de error en la determinación de **TMR** y **TMD** es el hecho de que no siempre se alcanza el 100% de liberación, el cálculo en tales casos se basa en el máximo del fármaco disuelto. Para sistemas los cuales tienen una liberación completa del fármaco, el error depende del número de puntos medidos y de la forma de la curva, la cual es una expresión de la cinética de liberación.

TMD y **TMR** se ha usado para calcular la correlación in vitro - in vivo de perfiles de disolución, como modelos de absorción de fármacos, como prueba de equivalencia entre perfiles de disolución o para comparar estadísticamente diferentes perfiles de disolución (47)

Todo lo anterior juega un papel importante en el desarrollo de formas farmacéuticas, un método de prueba estadístico basado en datos originales, es una característica importante para hacer comparaciones.

El método usado para el cálculo de **TMD** y **TMR** debe cubrir los siguientes criterios:

- 1.- En la determinación de **ABC** el error debe ser el mínimo.
- 2.- El cálculo debe aplicarse a varios tipos de cinética de disolución.
- 3.- Los valores deben ser capaces de diferenciar entre curvas de diferente forma y grado de liberación.

4.- Si no se obtiene el 100% de liberación los valores obtenidos deben ser similares a los que se tienen calculados con el perfil completo.

Hay varios métodos para calcular TMR y TMD, de los cuales los que cubren los criterios arriba mencionados es el del plano geométrico y el de integración parabólica.

ASPECTOS REGULATORIOS DE MEDICAMENTOS TÓPICOS.

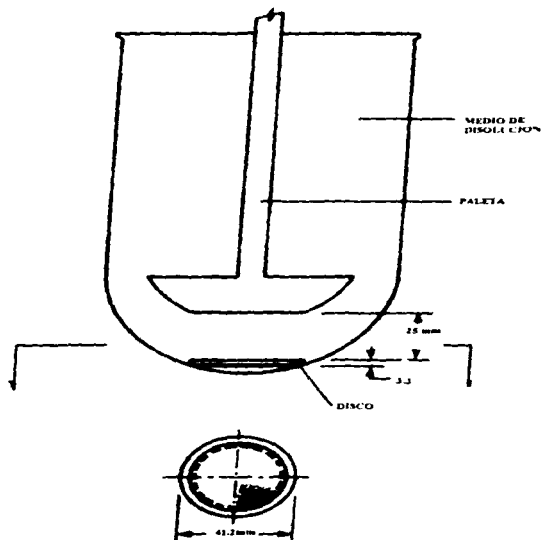
La USP (3) propone el uso del aparato 5 aplicado para la prueba de liberación del fármaco en parches transdérmicos, el cual utiliza el equipo de disolución convencional, sólo que la muestra (parche) se coloca en un disco con una malla de acero inoxidable y ésta se coloca en el fondo del vaso de disolución y se agita con la paleta colocada 2.5 cm arriba del disco (ver fig. 5), el cual ha sido llamado método de "paleta sobre disco". Este método ha sido sujeto a investigación por parte de la FDA, y ha tenido como objetivo primordial el desarrollo de un método in vitro, simple, reproducible y confiable para asegurar la liberación del fármaco del parche transdérmico y específicamente para nitroglicena, para llegar a tener una prueba con valor regulatorio comparable a la prueba de disolución para formas farmacéuticas sólidas orales (49)

FDA da los siguientes requerimientos para medicamentos transdérmicos (50) específicamente para Parches Transdérmicos (PTD).

Requerimientos in vitro. FDA requiere que cada nuevo PTD debe demostrar exhibir características de liberación in vitro consistentes, confiables y reproducibles. Por lo cual propuso el método de Paleta sobre Disco y la obtención de perfiles de disolución y no la prueba a un tiempo fijo (50).

Los productos farmacéuticos son considerados equivalentes terapéuticos si contienen el mismo ingrediente activo(s), la misma forma de dosificación, son idénticos en concentración y vía de administración. Un producto genérico debe ser **equivalente y bioequivalente** al producto innovador (50).

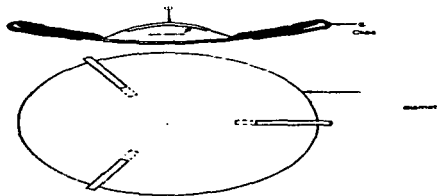
FIG 5. MÉTODO DE PALETA SOBRE DISCO DE LA USP (3)



Se añade además de los requerimientos de manufactura y control de calidad del producto terminado, el estudio de liberación del fármaco de la forma farmacéutica y además usarlo como un monitoreo de la estabilidad del producto efectuando la prueba a diferentes tiempos.

En base a esto la FDA desarrollo un método similar al 5 de la USP de paleta sobre disco (7, 49, 50, 51) sólo que en vez del disco hace la siguiente modificación: sujeta el parche en un vidrio de reloj con clips y sobre de él coloca una malla PTFE (ver fig. 6), en un medio adecuado a 32 ± 0.5 °C, colocando la paleta a 2.5 cm arriba de la malla. Este método se comparó con el 5, 6 y 7 de la USP, resultando ser más general y simple (el de la FDA). Aunque estos requerimientos regulatorios se proponen para parches transdérmicos, es importante considerarlos para ungüentos y para otras formas farmacéuticas tópicas.

Fig 6. Modificación de la FDA al método de paleta sobre disco (7).



2.2.5 MODIFICACIONES AL MÉTODO DE PALETA SOBRE DISCO.

Usando el principio de "paleta sobre disco" el cual es propuesto para parches transdérmicos, en un estudio Lippold reporta (52) el uso de una celda mejorada para la prueba de liberación de parches transdérmicos, la cual se usa en lugar del disco de acero inoxidable de la USP y del vidrio de reloj cubierto por una malla de PTFE de la FDA. En este estudio se compara esta celda mejorada usando el sistema de paleta sobre disco contra la celda de Franz, la cual es reconocida como la más popular para hacer estudios de difusión de medicamentos tópicos a través de una membrana, concluyendo que esta nueva celda mejorada da mejores resultados y con algunas ventajas adicionales.

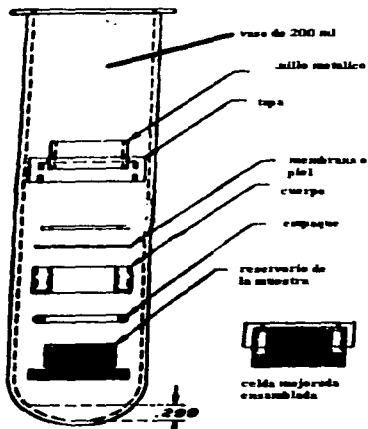
Esta celda mejorada utiliza también el principio del método de paleta sobre disco, excepto que en lugar de la malla de acero inoxidable usada en la USP o la malla PTFE sobre el vidrio de reloj de FDA, usa una celda de teflón la cual se muestra en la fig 7, utiliza vasos más pequeños (de 200 ml de capacidad) y por lo tanto la dimensión de la paleta también cambia.

La celda mejorada presenta las siguientes ventajas:

- El tamaño, forma y superficie expuesta de la muestra puede ser controlada por un sistema de tornillo
- Puede usarse con o sin membrana en los casos en que se requiera realizar estudios de liberación o absorción lo cual no permite el de la USP y FDA.
- Utiliza el mismo equipo de disolución existente en los laboratorios y por lo tanto el manejo, toma de la muestra y automatización es similar al método convencional

Otra modificación al método para PTD de la USP se propone en este trabajo de tesis y se hizo en el CINVSTAV-IPN por Ma. de los Angeles Vidal y Adriana Aguirre, se construyó una celda a la que se llamara "celda modificada" de la USP, para poder ser usada en estudios de liberación de principios activos de ungüentos. La descripción de esta celda se dará más adelante.

FIG 7.METODO DE PALETA SOBRE DISCO "CELDA MEJORADA"



Por lo tanto se propone el uso de la "celda mejorada" y la "celda modificada para PTD de la USP" en la realización de este trabajo de tesis.

2.2.6 FACTORES QUE AFECTAN EL PERFIL DE LIBERACIÓN DE MEDICAMENTOS TÓPICOS.

Los factores que pueden influir en la velocidad de liberación del fármaco en formas farmacéuticas tópicas en los estudios in vitro pueden ser :

a) Las relacionadas con la formulación las cuales son:

- Tipo de vehículo utilizado en la formulación (hidrofílico, lipofílico)(53, 54).
- Tipo de formulación tópica (gel, emulsión, suspensión, microemulsión, liposomas) (55, 56).
- Estado del fármaco en la formulación (suspendido, micronizado, disuelto)(58).
- Solubilidad del principio activo en el vehículo , entre más soluble sea el fármaco en el vehículo se liberara con mayor dificultad y visceversa entre menos soluble sea se liberará más rápido (53, 57).
- Viscosidad de la formulación, a mayor viscosidad menor velocidad de liberación del principio activo (57).
- Adición de mejoradores (excipientes usados para aumentar la absorción), los cuales tienen como finalidad aumentar la velocidad de permeación del fármaco a través de la piel (59-63).

- Procedimiento de fabricación, ya que dependiendo del método de preparación serán las características del producto final (53, 58).

- Concentración del fármaco dentro del vehículo, a mayor concentración mayor será la liberación, por lo que para aumentar la velocidad de liberación se recomienda preparar a la concentración de saturación (53,54, 58).

-Temperatura de fusión y Calor de fusión del fármaco la cual se relaciona con su actividad termodinámica (22,59 ,60).

-Grado de cristalinidad del fármaco y del vehículo (74), entre más cristalino es un material es menos soluble y por lo tanto se liberará con mayor dificultad. Una manera de medir el grado de cristalinidad de un material es a través de la determinación del calor de fusión, ya que éste es una medida de la energía necesaria para romper la red cristalina. Un método para determinar el calor de fusión de materiales es por calorimetría de barrido diferencial (75).

b) Las relacionadas con el procedimiento de la prueba de liberación las cuales incluyen (7):

- La composición y volumen del medio de liberación.

- Tipo y velocidad de agitación.

- Temperatura.

-Tamaño y superficie de la muestra expuesta (la cual se puede relacionar con el tipo de celda usada).

-Tipo de membrana (si se desea hacer estudios de absorción)

Modificaciones tanto en los factores relacionados con la muestra como con la prueba provocan cambios en los perfiles de liberación, así como cambios en el proceso de fabricación y de excipientes usados en la formulación pueden conducir a diferencias en el comportamiento de liberación del principio activo.

En base a lo anterior se propone aplicar el método de Paleta sobre Disco a tres productos considerados equivalentes farmacéuticos de un ungüento cuyo principio activo son tres aceites esenciales con la siguiente formulación para:

Mentol.....2.8 g

Alcanfor.....5.3 g

Aceite de trementina.....4.7 g

Excipiente cbp.....100 g

2.3 CROMATOGRFÍA DE GASES (CG)

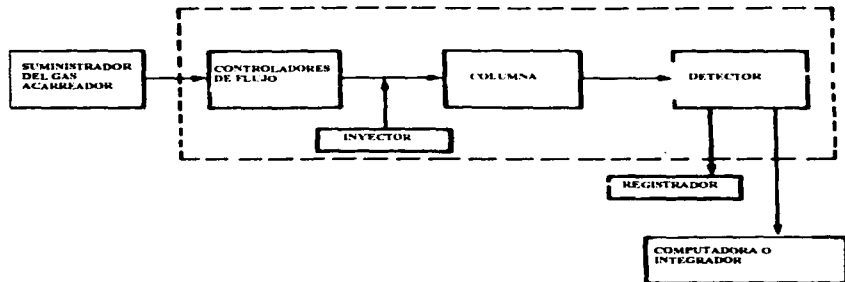
La cromatografía de gases (CG) es un método de separación, el cual con el detector adecuado puede ser usado para separar, cuantificar e identificar compuestos.

La Cromatografía de gases separa componentes de bajo peso molecular, volátiles por percolación del flujo de un gas sobre una fase estacionaria. Si la fase estacionaria es un sólido, la técnica es conocida como cromatografía gas - sólido (CGS) y la separación se basa en las propiedades adsorptivas de la columna. Cuando la fase estacionaria es un líquido la técnica es cromatografía gas - líquido (CGL), la base para la separación en este tipo de cromatografía es la partición de la muestra dentro y fuera de la película fina del líquido extendida sobre el soporte inerte. Este tipo de cromatografía (CGL) es probablemente la forma más selectiva

y versátil de la CG, ya que existe una amplia gama de fases líquidas que se pueden usar arriba de 450°C .

La instrumentación de un cromatografo de gases se muestra en un diagrama de bloques en la Fig 8. Los componentes básicos de un cromatografo de gases son: un suministro de gas, controlador de flujo, inyector, columna, horno programador de temperatura, detector, registrador, computadora o integrador.

Fig. 8. Instrumentación de un cromatografo de gases



Observamos que un gas inerte contenido en un cilindro pasa a un controlador de flujo cuyo propósito es mantener un flujo constante a través de la columna. El gas

pasa enseguida a la columna, donde al inicio de ésta se encuentra el inyector, aquí la muestra es introducida, el gas acarreador mueve la muestra a través de la columna hasta el final de ésta donde el detector se encuentra localizado.

2.3.1 EFICIENCIA DE LA COLUMNA

La separación de dos sustancias depende de la calidad y resolución de la columna (su eficiencia), y de la retención relativa o la eficiencia de la fase estacionaria (selectividad).

La eficiencia de la fase estacionaria resulta de su interacción con la muestra (solute) y determina la posición relativa de las bandas de soluto en un cromatograma. La separación entre componentes en la columna está determinada por los valores de los coeficientes de partición (es la razón de la concentración de soluto en la fase gaseosa) a mayor diferencia entre estos mayor separación.

El concepto de plato teórico se utiliza en procesos de destilación y es empleado para evaluar el funcionamiento de la columna en CG. Los platos teóricos son empleados para comparar columnas, para fijar técnicas estándar de empaqueo de columnas , así como para checar las columnas.

El intervalo de tiempo que transcurre entre la inyección de la muestra y el cambio de la zona o pico es llamado tiempo de retención (T_r) (ver Fig. 10), el producto del flujo y tiempo de retención es el volumen de retención (V_r), por lo que el número de platos teóricos (N) es definido como:

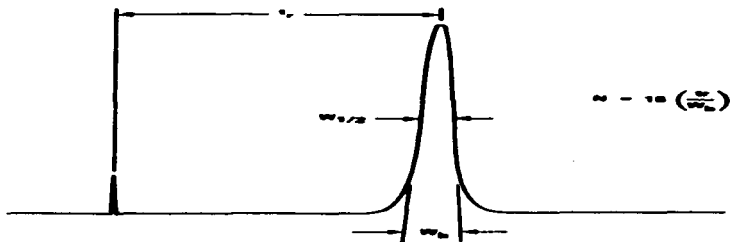
$$N = 16 (T_r / W_b)$$

donde W_b es la anchura del pico.

Entre más grande sea el valor de N más eficiente es la columna, las columnas con alta eficiencia permiten que muestras pequeñas puedan ser inyectadas sobre

columnas cortas a bajas temperaturas, y consecuentemente se obtienen grandes separaciones en menos tiempo sin el peligro de descomposición térmica.

FIG. 9. Cromatograma hipotético, donde se muestra t_r .



Para comparar la eficiencia de una columna sobre condiciones distintas o para comparar columnas diferentes, la altura equivalente a un plato teórico (HEPT), es el parámetro usado para este fin y es obtenida de la siguiente manera:

$$\text{HEPT} = L / N$$

donde L es la longitud de la columna en cm y N el número de platos teóricos

Usando la teoría de Van Deemter, también se puede calcular HEPT la cual dice: que es directamente proporcional a A el cual es un término de difusión, de B que es un término de difusión molecular, y C que refleja la resistencia a la transferencia de masa en la fase líquida y el flujo del gas acarreador. Varias conclusiones se pueden obtener de la teoría de Deemter que son de valor práctico para mejorar la eficiencia de la columna se dan en la tabla III y son las siguientes:

Tabla III. Conclusiones de la teoría de Deemter

VARIABLE	MÉTODO PARA OPTIMIZAR LA EFICIENCIA DE LA COLUMNA
Soporte Sólido:	Uso de partículas pequeñas o uniformes, malla 80/100 o 80/120 más común.
Fase líquida:	Capa delgada (de 1 a 5%). Debe ser de baja viscosidad y debe tener baja presión de vapor.
Gas Acarreador:	Alto peso molecular, flujo de gas óptimo, para obtener el mínimo valor de HEPT.
Temperatura:	Disminuyendo la temperatura se mejora la separación, con el consecuente aumento del tiempo de análisis

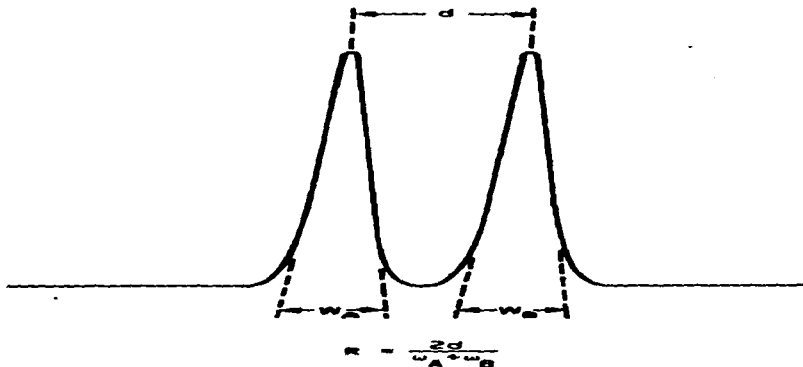
La eficiencia de la fase estacionaria (α) resulta de la interacción soluto disolvente y determina la posición de las bandas de soluto en el cromatograma. A mayor diferencia en coeficientes de partición, mayor separación y mayor eficiencia, α es la razón de coeficientes de partición y depende de la temperatura: a mayor temperatura, el soluto gasta menos tiempo en la fase estacionaria y más tiempo con el gas acarreador.

Para evaluar la separación de dos picos consecutivos, se debe de considerar el parámetro resolución (R), el cual debe ser de 1.5 o mayor para lograr una separación completa de picos, ver fig. 11

$$R = 2d / W_A + W_B$$

donde W_A y W_B son los anchos de pico de cada uno de los componentes y d la distancia de separación entre ellos.

Fig 11. Cromatograma hipotético, donde se muestra la resolución.



2.3 INSTRUMENTACIÓN:

Gas acarreador: los más utilizados son el Nitrógeno y el Helio y se eligen de acuerdo al detector y su función es la de acarrear la muestra a través de la columna.

Controlador de flujo: los más usados son los rotametros, su función es la de mantener un flujo constante de gas acarreador.

Inyector: la muestra es introducida con una microjeringa a través de un septum conectado a un tubo metálico o de vidrio, el cual debe estar aproximadamente 50°C arriba de la temperatura de la columna o directamente a la cabeza de la columna. El tamaño de la inyección varía desde 1 μ L hasta 25 μ L, entre más muestra se inyecte menos eficiencia se tendrá. La función del inyector es servir para introducir la muestra.

Columna: la fase estacionaria, soporte sólido, tipo de tubo, forma y diámetro interno del tubo, por ciento de fase líquida cargada y temperatura entre otros factores determinan la adecuabilidad de la columna para un uso particular.

Las columnas pueden ser:

- a) Preparativas
- b) Analíticas (empacadas) y
- c) Capilares (no empacadas).

Las columnas preparativas se usan para separar grandes cantidades de muestra y colectar las fracciones, las analíticas empacadas y las capilares para análisis cualitativos y cuantitativos, siendo las últimas de alta resolución.

Los soportes se usan para mantener la fase líquida en su superficie, el soporte óptimo debe:

- 1) Tener gran área superficial (tamaño pequeño).
- 2) No ser friable

3) Tener un tamaño uniforme de partícula y de poro

4) Ser inerte

La función de la columna es que en ella se lleva a cabo la separación.

Detector: indica y mide la cantidad de cada componente separado. Existe una amplia variedad de detectores los cuales varían en el principio de operación. En la tabla IV, se presentan los detectores usados y el principio de operación

TABLA IV. Detectores utilizados en Cromatografía de gases.

Detector	Principio de Operación	Selectividad	Cantidad mínima detectable	Estabilidad	GAS Acarreador
Conductividad Térmica	Mide la conductividad térmica de los gases	Universal responde a todos los compuestos	10^{-5} de CH ₄ por mL	buena	He, H ₂ , N ₂
Balace de densidad del gas	Diferencia de peso molecular	Universal responde a todos los compuestos de PM diferentes al gas acarreador	2×10^{-11} para alcanos	buena	N ₂ , CO ₂ , Ar
Ionización de Flama.	Flama H ₂ - O ₂	Responde a todos los compuestos orgánicos pero no con mezclas de gases y aire	10^{-13}	buena	He, N ₂
Captura de electrones	N ₂ + β e + muestra pérdida de uno	Responde adsorbiendo electrones de compuestos como: alogenos nitratos	10^{-20}	alta	He

2.3.4 ANÁLISIS CUANTITATIVO

El método más simple para cuantificar es por normalización de áreas, el área de cada pico es medida y el por ciento de composición es calculado dividiendo las áreas individuales por el área total. Si las muestras pertenecen a una serie homóloga este método funciona bien, pero si son muy diferentes, se obtendrán resultados erróneos, ya que alguno de los componentes puede no eluir o tener diferente factor de respuesta ante el detector (64, 76).

Un método más seguro, pero que también consume más tiempo es el uso de estándar interno. Muestra y estándar de la muestra son diluidos al mismo volumen con una solución que contiene el estándar interno, el cual debe cubrir ciertos requisitos: el primero es que debe eluir razonablemente cerca del compuesto a ser medido, debe ser estable en la solución de la que forma parte, debe ser completamente resuelto de los otros componentes de la muestra, debe ser de preferencia de la misma serie homóloga. Se calcula la razón del área del compuesto, estándares y muestras de la sustancia a analizar, y se divide entre el área del estándar interno, si se hizo a diferentes concentraciones de estándar del compuesto, se gráfica esta razón de áreas contra la concentración del estándar del compuesto a analizar, y la concentración de la muestra se determina por la interpolación de la razón de áreas de la muestra/estándar interno en la gráfica del estándar. De esta manera fluctuaciones debidas a la inyección, temperatura y flujo del gas se compensan.

2.3.5 ANALISIS CUALITATIVO

La Cromatografía de gases se puede usar para identificar compuestos, esto sería por medio del T_r , aunque no es una prueba concluyente, también se puede usar T_r relativo a algún otro compuesto. En la actualidad los cromatografos de gases se acoplan a espectrometros de masas y de esta manera si se puede usar como método de identidad con mayor seguridad.

2.4 VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS (68-71).

La eficiencia y seguridad de una forma farmacéutica puede ser evaluada frecuentemente sólo por el monitoreo de su calidad.

La identidad, pureza, potencia y calidad de un medicamento deben ser evaluados minuciosamente para asegurar su almacenamiento, distribución y uso. Este objetivo puede ser alcanzado si las especificaciones pertinentes están basadas en procedimientos validados.

Una parte integral del desarrollo de un método analítico es la validación del mismo. Por esta razón es importante para un activo o forma farmacéutica que sus métodos analíticos sean evaluados sistemáticamente para demostrar que la capacidad del método satisface los requisitos para las aplicaciones analíticas deseadas, es decir el método debe evaluarse para determinar su efectividad, asegurar que cumple con los objetivos de aplicación y proporciona resultados reproducibles.

La validación generalmente incluye una evaluación de la linealidad, precisión, exactitud, límite de detección, límite de cuantificación, estabilidad, especificidad y tolerancia. Dependiendo de la aplicación que tenga el método analítico serán los parámetros a evaluar.

Linealidad del Sistema: es su habilidad para asegurar que los resultados analíticos, son proporcionales a la concentración de la sustancia dentro de un intervalo determinado. Se determina construyendo una curva de calibración (concentración vs respuesta medida) utilizando cuando menos cinco diluciones preparadas a partir de una misma solución patrón haciendo el análisis mínimo por duplicado para cada dilución.

Linealidad del método: se determina con placebos adicionados del principio activo (placebos cargados), cada uno de manera independiente, a tres concentraciones

diferentes como mínimo incluyendo el 100%. haciendo los análisis por triplicado de cada concentración.

Precisión: es el grado de concordancia entre resultados analíticos individuales cuando el procedimiento se aplica repetidamente a diferentes muestreos de una muestra homogénea del producto. Usualmente se expresa en términos de desviación estándar o del coeficiente de variación. Es una medida del grado de reproducibilidad y repetibilidad del método analítico bajo las condiciones normales de aplicación.

Repetibilidad: es la precisión de un método analítico expresado como la concordancia entre determinaciones independientes realizadas bajo las mismas condiciones (analista, tiempo, aparato, etc.)

Reproducibilidad: es la precisión de un método analítico expresada como la concordancia entre determinaciones independientes realizadas bajo condiciones diferentes (diferente analista, día, en el mismo o diferentes laboratorios, etc.)

Exactitud: es la concordancia entre un valor obtenido experimentalmente y el valor de referencia. Se expresa como el por ciento de recobro obtenido del análisis de muestras a las que se les ha adicionado cantidades conocidas de la sustancia. Se determina mínimo a seis placebos cargados de manera independiente con la cantidad necesaria de la sustancia de interés para obtener la concentración del 100%, utilizando el método propuesto, haciendo el análisis en las mismas condiciones de operación y por el mismo analista.

En el manual de validación de métodos analítico elaborado por el Colegio de Farmacéuticos (68) se dan los criterios de evaluación en la validación de métodos

analíticos, pero también se remarca que ante todo debe predominar el criterio del químico.

Es claro que no todas las características requeridas en una validación es necesario considerarlas en todos los casos, los métodos usados para la examinación de materiales farmacéuticos pueden ser clasificadas como sigue (69 70):

Clase A: Pruebas diseñadas para establecer la identidad de sustancias farmacéuticas o para establecer la presencia de un ingrediente activo en particular en una forma farmacéutica

Clase B: Métodos diseñados para detectar y cuantificar impurezas en una sustancia farmacéutica o una forma farmacéutica

Clase C: Métodos usados para evaluar cuantitativamente una sustancia activa o fármaco, o una concentración de un ingrediente activo en una forma farmacéutica.

Clase D: Métodos para evaluar las características de formas farmacéuticas como producto terminado tales como: perfiles de disolución, uniformidad de contenido, etc.

Tabla V. Características requeridas en una validación dependiendo del tipo de clase.

	CLASE A	CLASE B	CLASE C	CLASE D
PRECISIÓN		x	x	x
EXACTITUD		x	x	x
LINEARIDAD		x	x	x
SELECTIVIDAD	x	x	x	
LÍMITE DE DETECCIÓN	x	x		
LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN	x	x	x	x

2.5 PROPIEDADES FÍSICAS, QUÍMICAS Y FARMACOLÓGICAS DE ACEITES ESENCIALES (trementina, alcanfor y mentol).

A) ORIGEN Y QUÍMICA. (65, 66)

Las esencias o aceites esenciales que dan su aroma característico a las plantas son líquidos oleosos, volátiles, que están formados por una mezcla de hidrocarburos alicíclicos denominados terpenos y sus productos de oxidación (alcoholes, aldehídos y cetonas), los cuales se extraen de algunos vegetales.

B) APLICACIÓN:

La aplicación más importante de los aceites esenciales y los bálsamos es su empleo en forma de inhalaciones, mejor dicho vaporizaciones de los mismos, mediante agua caliente por lo que ejercen su acción sobre las vías aéreas superiores (traquea y bronquios); en los casos de bronquitis, laringitis y bronquitis aguda su acción es expectorante .

C) ACCIÓN LOCAL(67)

Las esencias son irritantes para la piel y las mucosas; en la primera producen vasodilatación local (rubefacientes) y se han utilizado como revulsivos (especialmente la esencia de Trementina) con el fin de aliviar el dolor en las estructuras profundas, actualmente este uso está prácticamente abandonado, como lo es para todos los revulsivos. A nivel del tracto digestivo dicha irritación puede dar lugar a vómitos y diarrea.

Los aceites esenciales son antisépticos, se eliminan por el tracto respiratorio, donde debe esperarse efecto en los procesos infecciosos de las vías aéreas (79-82).

D) ACCIÓN FARMACOLÓGICA (67)

Los aceites esenciales o esencias ingeridos, inyectados o por inhalación son principios activos expectorantes, que producen un aumento manifiesto de la secreción traqueobronquial, se ha demostrado experimentalmente y se ha observado que la actividad es en orden decreciente: la esencia de Eucalipto, la de Trementina, la de Pino y el hidrato de terpina

Los aceites esenciales son en general, expectorantes poderosos. En lo que se refiere al modo de acción, se trata de una acción directa sobre las células secretoras del tracto respiratorio, lo que obedece a que las esencias se eliminan por dicho tracto, y es fácil comprobar por el olor del aliento de un sujeto al que se le administren dichos fármacos por cualquier vía (67)

E) ABSORCIÓN, DESTINO Y EXCRECIÓN

Las esencias se absorben por la piel, tracto intestinal, y por las vías subcutáneas, intramuscular y pulmonar (inhalación). Se excretan por vía pulmonar y por el riñón, en general estos principios activos se combinan con el ácido glucurónico, lo que constituye un proceso de desintoxicación (67)

Al excretarse en la orina, la esencia de Trementina y la de Eucalipto le imparten un olor a violetas

2.5.1 ACEITE DE TREMENTINA (65, 66)

Es obtenida por la destilación de la oleoresina proveniente de diversos tipos de *Pinus*, especialmente de *Pinus palustris*. Sus componentes principales son los terpenos α -pineno (60%) y de β -pineno (30%) (fig. 11), de la esencia de

Trementina deriva (por hidratación mediante alcohol y ácido nítrico) el hidrato de Terpina.

El aceite esencial de trementina es un líquido claro, un poco amarillento, opaco, pegajoso y con un olor característico.

Insoluble en agua.

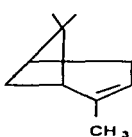
Soluble en: alcohol, cloroformo, éter, ácido acético glacial., insoluble en agua.

Toxicidad irritante para la piel, membranas mucosas, puede causar una severa irritación en el riñón.

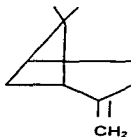
Usos: industrialmente como un insecticida, como solvente para grasas, en la producción de Alcanfor sintético, rubefaciente, expectorante, etc.

Almacenar: a una temperatura que no exceda los 25°C, en un recipiente herméticamente cerrado y protegido de la luz.

Fig 11. Estructura química de los componentes del aceite de trementina



α - Pineno



β - Pineno

2.5.2 ALCANFOR (65, 66).

Son cristales transparentes, incoloros, o masas cristalinas translúcidas, cristales romboédricos de alcohol, cristales cúbicos por calentamiento y enfriamiento, olor fragante, penetrante y característico, sabor aromático.

Peso molecular: 152.24

Solubilidad: soluble en anilina, nitrobenzeno, disulfuro de carbono, éter de petróleo, en alcoholes, en mezclas de aceites volátiles, cloroformo, diclorometano, amoniaco, ligeramente soluble en agua.

Punto de ebullición: 204°C

Punto de fusión: 179.75°C.

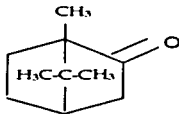
Es un analéptico natural que se obtiene de la madera, cortezas, y hojas de Cinnamomum camphora, árbol que crece especialmente en China y Japón, también se obtiene por síntesis, y el producto sintético no se diferencia farmacológicamente del natural, de manera que ambos pueden utilizarse en forma indistinta. El Alcanfor pertenece al grupo de sustancias denominadas estereaptenos, compuestos que se depositan cuando su acción es analéptica; la acción de estos fármacos en los centros bulbares es estimular el centro respiratorio en dosis que tienen muy poca acción sobre las otras partes del sistema nervioso (acción selectiva). Por esta razón los movimientos respiratorios aumentan de frecuencia y amplitud con aumento de la ventilación pulmonar tanto en el hombre como en los animales.

ACCIÓN LOCAL. El alcanfor produce efectos irritantes locales, en forma similar a los aceites esenciales, sobre la piel es rubefaciente, y posee una acción revulsiva, utilizado para calmar el dolor en estructuras profundas. Además es un antiséptico muy débil y un ligero anestésico local, por lo que puede usarse como antipruriginoso. A nivel de las mucosas el Alcanfor es irritante e ingerido a dosis

elevadas produce náuseas y vómitos. Inyectado por vía subcutánea en solución oleosa es muy irritante provoca dolor y estimulación respiratoria refleja (65)

ABSORCIÓN, DESTINO Y EXCRECIÓN. Los anolépticos se absorben muy fácilmente por cualquier vía de administración y pasan a todos los tejidos. El alcanfor se oxida rápidamente en el organismo formando 5-hidroxicanfor que se excreta en la orina conjugado con ácido glucurónico, mientras que parte del alcanfor se elimina con el aire aspirado(65).

Fig. 12. Estructura química del alcanfor.



2.5.3 MENTOL (65, 66).

Cristales o granulos, con sabor y olor a menta.

Peso molecular: 156.26

Punto de ebullición: 212°C.

Punto de Fusión: 41 - 43.

Solubilidad: muy soluble en alcohol, cloroformo, éter, éter de petróleo, ácido acético glacial, petrolato líquido, ligeramente soluble en agua.

Es un alcohol secundario terpenico obtenido de los aceites esenciales de varias especies de la *Mentha*, en especial de la esencia de menta la cual lo contiene en una concentración del 60%. es extraido principalmente de la *Mentha piperita* (sobre todo de las hojas), también es obtenido por síntesis.

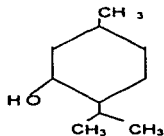
Desde el punto de vista químico, el mentol es un alcohol alicíclico, que posee tres carbonos asimétricos y tiene actividad óptica, el mentol natural (alcanfor de menta) es levógiro, mientras que el sintético es racémico

ACCIÓN FARMACOLÓGICA. Aplicado localmente a la piel y mucosas, el mentol produce una sensación de frío, por estimulación específica de los receptores de la sensación del frío, y luego ligera anestesia , por esas acciones tiene efectos pruriginosos. En altas concentraciones este activo se comporta como irritante. Administrado a dosis altas, produce en los animales convulsiones y muerte por parálisis respiratoria.

ABSORCIÓN, DESTINO Y EXCRECIÓN. El mentol se absorbe por todas las vías de administración, incluida la inhalatoria y la digestiva. En el organismo se combina con el ácido glucorónico y así se excreta en la orina.

Usos: licores, confitería, perfumería, cigarros, pastillas para la tos, y en inhalaciones.

Fig. 13. Estructura química del mentol.



3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Es necesario el establecimiento de métodos in vitro bien conocidos y estandarizados para ser utilizados en la evaluación Biofarmacéutica (equivalencia química, terapéutica y Bioequivalencia) de las diferentes formas farmacéuticas, con la finalidad de economizar con experimentos in vivo.

Tales métodos son ampliamente documentados, y están perfectamente definidas las condiciones de la prueba en los compendios oficiales de cada país para formas farmacéuticas sólidas orales, como son tabletas y cápsulas. Poco hay sobre estudios de liberación para fármacos de formulaciones tópicas, solo para parches transdérmicos y, nada para ungüentos, estudios que son importantes para caracterizar su funcionamiento, tal como:

- El conocer de qué manera se libera el principio activo del ungüento.
- Como una prueba de control de calidad para ver si hay variación entre lote y lote durante la producción.
- Para monitorear la calidad del proceso de manufactura.
- Comparación entre productos de formulación similar, en estudios de mercado.
- Durante reformulación o el desarrollo del producto, etc.

Se han propuesto varios sistemas para evaluación de la liberación de principios activos in vitro de medicamentos dermatológicos, pero sin que haya un acuerdo, uno de ellos es el Sistema de Paleta sobre Disco el cual utiliza prácticamente el equipo de disolución convencional que se tiene generalmente en todos los laboratorios, con algunas modificaciones, lo cual disminuye costos y adiestramiento especial del personal, la automatización es muy fácil al utilizarse prácticamente el mismo equipo.

Por lo anterior es necesario contar con un sistema de evaluación in vitro simple, confiable, reproducible, económico y de fácil automatización, que permita medir la liberación del activo de la base del ungüento; por lo que en este trabajo se usará el principio de funcionamiento del método de paleta sobre disco utilizando la "celda mejorada" y la "celda modificada" para PTD de la USP, las cuales se describirán con detalle en la sección 6, para obtener y comparar los perfiles de liberación de 3 formulaciones de un ungüento que contiene aceite de trementina, alcanfor sintético y mentol sintético.

4.OBJETIVOS.

4.1 GENERAL

Implementar un método que permita hacer estudios de liberación in vitro de una formulación tópica y utilizarlo para comparar tres formulaciones de un ungüento que contiene: aceite de trementina, alcanfor y mentol.

4.2 ESPECÍFICO.

1. Desarrollar y validar un método analítico que permita cuantificar aceites esenciales en un ungüento por Cromatografía de gases para aplicarlo en una prueba de liberación de estos ingredientes activos de una formulación tópica.
2. Hacer pruebas preliminares para establecer las condiciones para realizar el estudio de Liberación In vitro
3. Trabajar con tres formulaciones de un ungüento que contiene aceite de trementina, mentol y alcanfor obtener los perfiles de liberación de estos para compararlos.

5. HIPÓTESIS

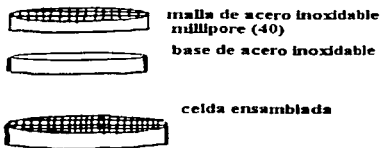
El perfil de liberación de fármacos de formulaciones tópicas depende directamente de las propiedades físicas y químicas del vehículo y del principio activo, así como del proceso de manufactura, por lo que con la elección adecuada de las condiciones de prueba como son: medio de disolución, velocidad de agitación, tamaño de muestra y temperatura, se podrá obtener el perfil de liberación del principio activo, donde los cambios en el vehículo y proceso de fabricación se reflejaran en cambios en los perfiles de liberación, lo que permitirá poder usarlo como un método de control de calidad del producto, para la comparación de formulaciones, utilizando el equipo de disolución convencional para la prueba de disolución de tabletas, con algunas modificaciones.

6. PARTE EXPERIMENTAL.

6.1 EQUIPO Y MATERIAL

- Disolutor Easy-Lift Hanson Research.
 - 6 "celdas modificadas"¹ para parches transdérmicos de la USP.
- 1 Estas celdas fueron diseñadas en el Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN en el Departamento de SECAEC por la QFB Ma. de los Angeles Vidal y Adriana Aguirre. El diseño de estas celdas consistió en una modificación al disco usado en el método para parches transdérmicos propuesto por la USP, para poder ser usado en estudios de liberación de ungüentos; la modificación consistió en hacerle (al disco) una base de acero inoxidable de tal modo que cierra herméticamente como lo muestra la fig. 14, formando una caja circular en cuyo interior se puede colocar la muestra de ungüento y puede mantenerse dentro durante la prueba de liberación.

Fig. 14 "Celda modificada" para parches transdérmicos de la USP



- 6 "celdas mejoradas" de teflón para prueba de disolución de ungüentos (VANDEL)
 - 6 discos² (anillos de acero inoxidable) con malla 40 de acero inoxidable
diámetro interno de 25 mm y externo de 30 mm.
- 2 Estos discos (anillos de acero inoxidable) se diseñaron y se hicieron en el CINVESTAV-IPN en el Dto de SECAEC por la QFB Ma de los Angeles Vidal Millán y Adriana Aguirre con la finalidad de servir como medio de separación entre el ungüento y el medio de disolución. El diámetro interior de los discos se adapta al diámetro interior de las "celdas mejoradas" como lo muestra la fig. 15

Fig. 15 "Celda mejorada" para pruebas de liberación de ungüentos con disco como medio de separación (se ensamblan todas las piezas y todas forman la celda)



- 6 Vasos para disolución de 200 ml (VANKEL).
- 6 Vasos para el disolutor de 1000 ml.
- 6 Adaptadores y tapas para los vasos de disolución de 200 ml (VANKEL).
- 6 Paletas para vasos de 200 ml (VANKEL).
- Colector de fracciones automático. (VANKEL)
- Balanza Analítica (Sartorius).
- Espectrofotómetro Lamda 2 PE.
- Cromatógrafo de Gases (PERKIN ELMER 900) con detector de ionización de flama.
- Integrador (Hewlett Packard modelo 3390 A).
- Calorímetro DSC 7 Perkin Elmer
- Columna empacada de Se-30 de acero inoxidable , gas chrom Wh mds al 3 %.
- Microjeringa 10 μ L.
- Tabletas de ácido salicílico (lote L) y prednisona (lote K) USP para calibración del disolutor.
- 3 Formulaciones y 3 lotes de cada formulación del ungüento de aceites esenciales (Aceite de trementina, alcanfor y mentol).

REACTIVOS

- Mentol sintético grado USP.
- Aceite de Eucalipto grado USP.
- Alcanfor sintético grado USP.
- Eugenol R.A. T.J. Baker.

- Diclorometano R.A. Merck.
- Metanol R.A. Merck.

- Etanol R.A. Merck.
- Agua destilada.

6.3 METODOLOGÍA

6.3.1 VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO.

a) Precisión del sistema.

- Preparación del estándar interno: se tomarán 4 ml perfectamente medidos de eugenol R.A., transferirlos a un matraz volumétrico de 100 ml y aforar al volumen con diclorometano. De esta solución tomar 2 ml, transferir a un matraz volumétrico de 100 ml, y aforar al volumen con diclorometano.

Preparación de la solución estándar 100%: se pesarán las siguientes cantidades de aceites esenciales: 0.280 g de mentol, 0.530 g de alcanfor, 0.470 g de trementina y 0.130 g; transferirlos a un matraz volumétrico de 200 ml y aforar al volumen con diclorometano, sonicar tres minutos. De esta solución tomar 25 ml y transferirlos a un matraz volumétrico de 100 ml y aforar al volumen con diclorometano, de esta solución tomar 5 ml y transferirlos a un matraz volumétrico de 50 ml, aforar al volumen con diclorometano.

De esta última solución se tomarán 2 ml y adicionar 1 ml de solución de estándar interno. Se inyectó 1 μ l al cromatógrafo de gases por lo menos seis veces en el mismo día, analista y equipo bajo las siguientes condiciones instrumentales (se evaluó con el coeficiente de variación CV).

Las condiciones instrumentales fueron:

- Columna de Se - 30 Chrom Wh mds al 3% de acero inoxidable.
- Temperatura del detector 230°C
- Temperatura del inyector 170°C
- Temperatura de la columna 64°C mantener 4 min y someter a un programa de calentamiento hasta 140 °C a 12°C/min y mantener a esta temperatura por 4 min.
- Gas acarreador: Nitrógeno a un flujo de 100 ml/min.
- Integrador: Hewlett Packard 3390 A
 - Condiciones del Integrador:
 - Pw = 16
 - Atenuación: 0
 - Velocidad de la carta 0.5
 - Modo de integración: 2
 - Tiempo de Análisis: 14 min.

NOTA: de aquí en adelante la preparación del estándar interno se omitirá, es la misma en todas las pruebas así como las condiciones instrumentales del cromatógrafo.

b) Precisión del método

Preparación de la solución estándar como se indica en 1a.

Preparación de los placebos: se prepararon 12 placebos de manera independiente, cargados al 100%, repartidos en dos días diferentes, por dos analistas, haciendo triplicados cada analista/día, se pesaron:

Mentol	0.280 g
Aicanfor	0.530 g
Trementina	0.470 g
Eucalipto	0.170 g
Placebo cbp	10 g

Se transfirieron a un matraz volumétrico de 200 ml y se aforó al volumen con diclorometano, se homogenizó en el ultrasonido 5 min. de esta solución se tomaron 25 ml y se transfirieron a un matraz volumétrico de 100 ml, de esta solución se tomaron 5 ml y se transfirió a un matraz volumétrico 50 ml y se aforó al volumen con diclorometano. De esta solución se tomaron 2 ml y se adicionó 1 ml de solución de estándar interno (Se evaluó como el coeficiente de variación total, CV_{total}). Se inyectar al cromatógrafo de gases de manera alternada la solución estándar y la de placebo cargado, bajo las condiciones cromatográficas de 1a .

c) Exactitud

Preparación de la solución estándar, preparar según 1a
Preparación de placebos cargados al 100% : se prepararon por lo menos seis placebos de manera independiente cargados al 100% por el mismo analista y día, como se indicó en 1b Se inyectó cada muestra alternada al cromatógrafo de gases con la solución estándar bajo las condiciones cromatográficas antes mencionadas. Se evaluó como el % de recobro.

d) Linealidad del sistema

Se prepararon soluciones estándar a diferentes concentraciones de aceites esenciales (mentol, eucalipto, alcanfor y trementina) de 12.5 , 25, 50, 75 y 100%, por triplicado cada concentración, se mezclan 2 ml de cada concentración y se adicionó 1 ml de estándar interno, se inyectó al cromatógrafo de gases bajo las condiciones instrumentales que se mencionaron en 1a. Se evaluó por el coeficiente de determinación (R^2).

c) Linealidad del método

Preparación de la solución estándar como se indicó en 1a.

Preparación de la solución de Placebos: se prepararon placebos cargados con el 12.5, 25, 50, 75 y 100% de manera independiente, por triplicado. A 2 ml de la solución final se le adicionó 1 ml de solución de estándar interno y se inyectó al cromatógrafo de gases de manera alternada la solución estándar y de placebos cargados a las diferentes concentraciones, bajo las condiciones cromatográficas de 1a. Se evaluó con el R^2 .

6.3.2 ENSAYOS DE LAS MUESTRAS .

Preparación de la solución estándar como se indica en 1a.

Preparación de las muestras: Se pesó 1g de cada una de las muestras (por triplicado) y se transfirió a un matraz volumétrico de 100 ml y se aforó al volumen con diclorometano, se homogenizó en el ultrasonido por 5 min, de esta solución se tomaron 15 ml y se transfirieron a un matraz volumétrico de 100 ml y se aforó al volumen con diclorometano. A dos mililitros de esta solución se le adicionó 1 ml de solución de estándar interno y se inyectó de manera alternada al cromatógrafo de gases solución estándar y solución muestra bajo las mismas condiciones instrumentales señaladas en 1a

6.3.3 PRUEBAS DE LIBERACIÓN DE ACEITES ESENCIALES.

a) Calibración del disolutor.

- Calibrar el disolutor con tabletas de prednisona (desintegrantes) bajo las siguientes condiciones:

-Medio de disolución: Agua destilada y degasificada

-Temperatura: 37 °C.

-Volúmen: 900 ml

-Velocidad de agitación: 50 rpm

-Tipo de flecha: paleta

-Tiempo: 30 min.

Transcurrido el tiempo se filtrarán las muestras y se leyeron en el espectrofotómetro preparando una solución estandar de prednisona a una concentración adecuada.

- Se calibró el disolutor con tabletas de ácido salicílico (no desintegrables) bajo las siguientes condiciones:

-Medio de disolución: Solución amortiguadora de fosfatos pH 7.4 0.05M.

-Temperatura: 37 °C.

-Velocidad de agitación: 50 rpm.

-Volúmen: 900 ml

-Tipo de flecha: Paleta

-Tiempo: 30 min.

Transcurrido el tiempo de la prueba, se filtrarán las muestras y leyeron en el espectrofotómetro preparando una solución estandar de ácido salicílico a una concentración adecuada.

Nota: Se calibró el disolutor por el único método reconocido por la USP (3) .

b) Selección de las condiciones de prueba.

Se propone hacer un diseño de experimentos factorial fraccional conocido como matriz de Hadamard³ (76), el cual tendrá 5 factores a dos niveles (alto y bajo,

señalados como + y - respectivamente) y se harán 8 experimentos. Las variables y la matriz se muestran en las tablas VI y VII.

Tabla VI. Variables a evaluar

VARIABLE	NIVEL BAJO	NIVEL ALTO
X1- Tipo de Celda	Mejorada	Modificada para PTD
X2- Medio de liberación	Diclorometano	Diclorometano-metanol(75:25)
X3- Velocidad de agitación	100 rpm	150 rpm
X4- Temperatura	25°C	30°C
X5- Cantidad de muestra	0.250 g	0.500 g

Nota: X6 y X7 son variables falsas.

Se realizarón los experimentos según la siguiente matriz

Tabla VII. Matriz de Hadamard

EXPERIMENT	X1	X2	X3	X4	X5
1	+	+	+	+	+
2	-	+	-	+	-
3	+	-	-	+	+
4	-	-	+	+	-
5	+	+	+	-	-
6	-	+	-	-	+
7	+	-	-	-	-
8	-	-	+	-	+

- 3 Es un diseño factorial fraccional (71, 77) a dos niveles, este tipo de diseño se usa en las primeras etapas de investigación como un método de selección de variables. La ventaja de este diseño es que reduce de manera significativa el número de experimentos con respecto a un diseño factorial completo a dos niveles, lo que permite evaluar un gran número de variables con un número reducido de experimentos, pero con la desventaja de que no permite ver si existen interacciones ni efectos cuadráticos.

Para cada experimento se utilizó la misma muestra de acuerdo al siguiente procedimiento:

- Se sclocarón los vasos del disolutor verificando:

Centrado de vasos

Centrado de flechas.

Altura de flechas.

- Se pesó la cantidad de muestra en la celda especificada en cada experimento seis veces (para los seis vasos del disolutor).
- Se programó el colector de fracciones para que tome muestras de 2 ml de cada vaso, cada 15 min con reposición del volúmen, durante 120 min
- Se fijó en el tacómetro del disolutor la velocidad de agitación especificada para cada experimento.
- Se colocaron las celdas conteniendo la muestra en cada uno de los vasos del disolutor, los cuales contenían 200 ml del medio de liberación equilibrado previamente a la temperatura que se especifica en cada experimento.
- Inmediatamente después de colocar la muestra se arrancó el sistema (agitación y toma de muestras del colector de fracciones).
- A cada muestra tomada (2ml) se le adicionaron 1 ml de solución de estandar interno el cual se preparó según se indicó en 1a y se analizó por cromatografía de gases como se indicó en 1a, inyectando cada dos muestras la mezcla de estandares la cual se preparó como se indicó en 1b.

El objetivo de este diseño experimental fue encontrar aquel conjunto de condiciones con los que se obtenga por un lado el 100 % de liberación (el menor TMD) de los ingredientes activos y el menor CV.

c) Comparación de perfiles de liberación.

Se cuenta con tres productos los cuales contienen los mismos principios activos en la misma cantidad los cuales son identificados como M, J y B. De cada uno de

ellos se tienen tres lotes los cuales se numeran al azar como M L1, M L2 y M L3; J L1, J L2 y J L3; y B L1, B L2 y B L3

Se sometieron a la prueba de liberación los productos a comparar. En cada disolución se colocaron duplicados de cada producto-lote, de tal manera que en cada corrida (seis vasos por corrida) se obtuvo un duplicado de cada producto-lote, así tenemos que en los vasos 1 y 2 se coloca M L1, en el 3 y 4 J L1 y en el 5 y 6 B L1. Este procedimiento se repitió tres veces y al final se obtuvieron seis resultados de cada producto-lote.

Se comenzó con el lote 1 de cada producto, así que en las primeras tres corridas se obtuvieron los seis datos del lote uno de cada producto, y este procedimiento se repitió con el resto de los lotes (2 y 3), bajo las condiciones encontradas a ser las mejores en 3b, siguiendo el procedimiento descrito en 3b.

6.3.4 DETERMINACIÓN DE CALOR DE FUSIÓN DE LAS FORMULACIONES.

- Se calibró el calorímetro en la escala de temperatura y flujo de calor utilizando un estándar de indio que tiene una temperatura de fusión de 156.7 °C y un calor de fusión de 28.45 J/g
- Se pesaron entre 8 y 15 mg de cada una de las formulaciones en crisoles de aluminio
- Se obtuvieron las conductas térmicas de cada una de las formulaciones en el calorímetro bajo las siguientes condiciones experimentales:

-velocidad de calentamiento	10°C/min
-flujo de nitrógeno	25 ml/min
-rango de barrido	25 a 100 °C
-crisol	aluminio para muestras no volátiles

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

7.1 VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO.

Los resultados de la validación del método analítico se presentan a continuación:

a) Precisión del sistema

Tabla VIII.

ACEITE ESENCIAL	PROMEDIO Astd/Astd int	COEFICIENTE DE VARIACIÓN %
Trementina	0.6451	2.00
Alcanfor	0.6679	2.24
Mentol	0.3603	3.77

Los resultados individuales están en el anexo Tabla AI.
donde $Astd/Astd\ int$ es el area del estandar de cada aceite esencial entre el area del eugenol (estandar interno).

b) Precisión del Método

Tabla IX.

ACEITE ESENCIAL	CV ^{total} %	EFEECTO DEL ANALISTA	EFEECTO día / analista
Trementina	2.35	NO	NO
Alcanfor	2.16	NO	NO
Mentol	3.05	NO	NO

Los resultados individuales están en el anexo Tabla A II (a,b,c), y el análisis estadístico en el anexo tablas AIII a AV.

a) Exactitud del método.

Tabla X.

ACEITE ESENCIAL	IC % DE RECOBRO	X	CV %
Trementina	93.94 a 107.57	101.59	5.38
Alcanfor	100.1 a 111.83	105.95	2.28
Mentol	94.82 a 103.20	99.01	3.99

Los resultados individuales están en el anexo tabla AVI.

donde IC es el intervalo de confianza.

d) Linealidad del sistema.

Tabla XI.

ACEITE ESENCIAL	PENDIENTE	ORDENADA	R ²
Trementina	0.0070	-0.0065	0.9955
Alcanfor	0.0072	0.0251	0.9948
Mentol	0.0042	-0.0099	0.9921

Los resultados individuales están en el anexo tabla A VII.

e) Linealidad del método.

Tabla XII.

ACEITE ESENCIAL	INTERVALO DE CONFIANZA PENDIENTE	ORDENADA	CV	R ²
Trementina	0.8629 - 1.0083	4.0540 - 12.99	7.23	0.9835
Alcanfor	0.9380 - 1.1354	-3.5981 - 8.5363	9.95	0.9754
Mentol	0.8950 - 1.0437	-5.410 - 3.730	8.52	0.9839

Los resultados individuales están en el anexo tabla A VIII.

En resumen de la validación del método analítico podemos decir que:

Precisión del sistema. - se obtuvieron coeficientes de variación entre 2.0 y 3.77% para los diferentes aceites esenciales, como lo muestra la tabla VIII.

Linealidad del sistema -la R^2 obtenida para los tres aceites esenciales es mayor a 0.98, una ordenada al origen cercana a cero, los coeficientes de variación oscilaron entre 4.4 y 6.1%, por lo que el sistema presenta una relación lineal entre la concentración y la relación del área bajo la curva de la muestra entre la del estándar interno, para cada uno de los aceites esenciales como lo muestra la tabla XI

Linealidad del método - como lo muestra la tabla XII, en la linealidad del método se obtuvo una R^2 mayor a 0.98 para la trementina y el mentol y de 0.9754 para el alcanfor, el intervalo de confianza (IC) para la pendiente incluye el uno y el de la ordenada al origen incluye cero, con CV entre 7.23 y 9.95 %, por lo que el sistema presenta una relación lineal entre la cantidad adicionada y la cantidad recuperada con ordenada al origen de cero y pendiente de uno

Precisión del método -en la precisión del método se obtuvo un CV total de 2.16 a 3.05%, y se encontró que no hay efecto del analista ni del día - analista

- Exactitud del método -en la exactitud los intervalos de confianza para el porcentaje de recobro se incluyó el 100 % excepto para alcanfor que es de 100 a 111 % , con CV de 5.38 % , como lo muestra la tabla X.

El método analítico se validó y fue utilizado para monitorear la liberación de aceite de trementina, mentol y alcanfor de un unguento en diclorometano. Algunos de estos valores están fuera de los lineamientos que se recomiendan en el manual de validación para métodos analíticos (68), sin embargo dada la complejidad de la muestra, la cual contiene varios principios activos, los cuales son volátiles tanto los componentes de la muestra como el medio de disolución y además el rango de concentración en que se trabajó es bajo se procedió a utilizarlo para evaluar el % liberado de cada uno de estos aceites esenciales en las muestras.

7.2 ENSAYO DE LAS MUESTRAS

Los resultados del ensayo de las muestras se presenta en la tabla XIII.

Tabla XIII.

Muestra	Aceite esencial %		
	trementina	alcanfor	mentol
ML1	95 06	77 41	85 70
ML2	98 32	96 75	105 01
ML3	99 07	80 14	88 90
JL1	127 77	82 29	92 70
JL2	122 70	80 16	90 99
JL3	117 16	87 03	94 87
BL1	53 38	71 49	85 84
BL2	8 17	42 08	70 91
BL3	68 86	61 86	74 31

El resultado es promedio de tres determinaciones. Los resultados individuales están en el anexo A IX.

Los resultados del ensayo de las muestras muestran que:

- En la formulación M el L1 contiene un 77% de alcanfor y 85.7% de mentol, los demás lotes (L2 y L3) contienen arriba del 95 % los tres aceites esenciales.
- En la formulación J la turpentina se encuentra alrededor del 120%, el alcanfor en el 80% y el mentol en el 90% en los tres lotes.

- En la formulación B todos los aceites esenciales están a una concentración menor al 75% y en el L2 la de la turpentina es menor al 10% y del alcanfor menor al 50%.

7.3 PRUEBAS DE LIBERACIÓN.

b) Selección de condiciones de la prueba.

Los resultados de las pruebas de liberación derivados de los ocho experimentos que nos indica la matriz de Hadamard se presentan en las tablas XIV a la XXI. Los TMD derivados de los resultados de estas tablas se presentan en la tabla XXII.

La magnitud de los efectos principales considerando CV y TMD como variables de respuesta derivados de la resolución de la matriz de Hadamard se presentan en la tabla XXIII y XXIV respectivamente.

Las tablas del Análisis de Varianza (ANADEVA) de la matriz para los principios activos turpentina, alcanfor y mentol se presentan en las tablas XXV a XXVII respectivamente.

Los resultados de la matriz de Hadamard muestran que

- El CV más pequeño se tiene en el experimento 4 para alcanfor y mentol y en el experimento 2 para la turpentina.
- Al resolver la matriz y calcular los efectos principales considerando el TMD como variable de respuesta se tiene que:

-La ANADEVA nos muestra que todos los factores tienen efecto estadísticamente significativa sobre la variable de respuesta en los niveles estudiados para los tres aceites esenciales.

TABLA XIV. MATRIZ DE HADAMARD EXPERIMENTO 1

TIEMPO MIN	PRINCIPIO ACTIVO	% LIBERADO VASO							
		1	2	3	4	5	6	X	CV
15	TURPENTIN	54.36	34.97	37.02	35.55	29.55	44.18	39.28	22.3
	ALCANFOR	96.79	72.75	58.73	55.38	53.5	71.63	68.13	23.8
	MENTOL	81.95	61.23	61.46	58.18	50.36	87.92	66.85	22
30	TURPENTIN	54.44	47.87	61.17	47.63	51.87	63.07	54.44	13.8
	ALCANFOR	65.89	67.18	82.3	86.54	63.86	70.42	72.7	13
	MENTOL	70	70.94	77.98	63.53	67.89	74.92	70.87	7.2
45	TURPENTIN	52.53	61.06	57.47	70.12	66.69	65.41	62.21	10.4
	ALCANFOR	71.35	88.82	91.29	107.7	89.01	93.62	90.29	12.9
	MENTOL	78.36	85.62	72.47	85.78	91.2	85.49	83.15	7.98
60	TURPENTIN	65.46	84.89	72.85	69.47	70.08	75.05	72.96	9.16
	ALCANFOR	87.28	106.48	95.46	98.52	117.7	103.65	100.51	8.61
	MENTOL	87.3	103.1	88.68	85.55	86.01	92.99	90.6	7.37
75	TURPENTIN	80.57	70.24	74.69	84.2	77.46	96.49	80.6	11.3
	ALCANFOR	93.29	110.1	95.53	101.4	89.78	104.8	99.15	7.7
	MENTOL	87.25	85.16	85.52	100.9	89.29	87.25	89.93	6.22
90	TURPENTIN	76.73	81.79	73.42	79.67	80.2	86.04	79.64	5.41
	ALCANFOR	94.94	93.91	97.72	112.3	108.7	96.9	100.74	7.7
	MENTOL	89.75	91.36	82.49	89.29	94.49	94.34	90.28	4.88
105	TURPENTIN	77.42	83.51	81.33	90.93	80.5	85.83	83.25	4.71
	ALCANFOR	100.72	97.28	103.64	96.67	99.96	93.79	98.67	3.52
	MENTOL	90.93	88.5	89.6	85.83	87.93	85.32	88.08	2.45
120	TURPENTIN	79.27	85.3	89.98	88.88	86.23	88.51	86.36	4.5
	ALCANFOR	100.47	95.6	101.65	100.07	89.89	101.79	98.24	4.75
	MENTOL	89.8	84.92	96.59	88.14	91.08	97.88	91.4	5.45

TABLA XV. MATRIZ DE HADAMARD EXPERIMENTO 2

TIEMPO MIN	PRINCIPIO ACTIVO	% LIBERADO VASO							CV
		1	2	3	4	5	6	X	
15	TURPENTIN	26.67	34.75	38.18	31.25	32.3	22.04	30.86	18.68
	ALCANFOR	33.45	54.55	48.49	42.44	44.82	33.73	42.91	19.33
	MENTOL	37.89	47.53	43.91	40.30	44.01	30.97	40.77	14.33
30	TURPENTIN	63.56	51.2	53.75	57.9	60.33	55.91	57.11	7.84
	ALCANFOR	47.16	54.92	57.5	54.4	57.5	61.46	55.48	8.63
	MENTOL	47.69	49.95	57.2	65.3	60.2	67.51	57.97	13.8
45	TURPENTIN	73.77	74.35	73.7	74.4	68.28	66.03	71.76	5.08
	ALCANFOR	62.05	66.05	68.44	64.9	61.71	55.74	63.15	7.0
	MENTOL	68.15	65.79	69.69	78	67.94	57.17	67.8	9.9
60	TURPENTIN	79.47	71.98	82.82	83	71.04	85.91	79.03	7.81
	ALCANFOR	75.43	68.34	83.85	75.4	72.15	72.05	74.54	7.06
	MENTOL	72.58	75.63	82.01	79.2	62.24	70.84	74.24	8.12
75	TURPENTIN	85.18	64.24	87.62	87.3	81.31	75.81	80.16	11.3
	ALCANFOR	77.78	83.27	85.24	69.2	66.65	70.41	75.42	10.35
	MENTOL	82.7	86.05	82.16	76.5	79.34	71.21	79.66	6.58
90	TURPENTIN	71.04	81.25	76.44	76.8	71.72	63.31	73.42	8.45
	ALCANFOR	77.69	71.8	70.94	69.9	70.54	71.93	72.14	3.9
	MENTOL	63.91	79.34	79.73	74.1	68.48	75.28	73.47	8.47
105	TURPENTIN	72.88	70.45	68.21	73.3	72.01	70.35	71.2	2.66
	ALCANFOR	67.84	68.55	69.88	68.3	66.42	64.23	67.54	2.92
	MENTOL	72.68	74.49	75.39	78.7	75.91	71.61	74.8	3.37
120	TURPENTIN	79.74	74.59	68.88	68.2	75.8	68.97	72.7	6.5
	ALCANFOR	74.58	68.99	60.96	67	79.99	71.73	70.54	9.27
	MENTOL	78.97	73.21	79.06	87.7	89.59	88.83	82.88	8.12

TABLA XVI. MATRIZ DE HADAMARD EXPERIMENTO 3

TIEMPO MIN	PRINCIPIO ACTIVO	% LIBERADO							
		1	2	3	4	5	6	X	CV
15	TURPENTINA	46.62	61.7	59.04	53.52	66.45	66.64	58.99	13.2
	ALCANFOR	52.29	63.57	54.38	51.5	70.13	70.53	60.4	14.59
	MENTOL	45.49	58.82	53.99	49.56	63.53	60.3	55.28	12.43
30	TURPENTINA	72.49	77.89	74.06	72.15	73.62	74.68	74.15	2.78
	ALCANFOR	71.85	81.98	79.65	78.81	79.21	75.34	77.47	4.64
	MENTOL	67.2	73.91	71.17	69.95	69.28	71.74	70.54	3.25
45	TURPENTINA	89.8	91.08	79.68	103.46	87.5	125.17	96.11	16.86
	ALCANFOR	96.59	97.88	77.49	74.98	85.1	131.65	93.83	22.25
	MENTOL	88.14	88.57	74.68	77.91	81.34	115.42	87.67	16.72
60	TURPENTINA	91.66	100.47	99.89	92.69	111.28	109.56	100.92	8.3
	ALCANFOR	88.94	101.65	101.79	97.2	114.86	110.35	93.94	22.08
	MENTOL	91.58	100.07	104.62	90.88	107.69	106.69	100.34	16.72
75	TURPENTINA	91.37	103.71	102.66	107.78	100.84	104.9	101.87	5.54
	ALCANFOR	104.4	111.84	110.87	118.59	99.82	109.3	109.13	5.92
	MENTOL	95.58	101.04	100.42	109.11	90.81	99.1	99.34	6.14
90	TURPENTINA	102.77	97.07	123.09	96.01	101.35	107.32	104.6	9.5
	ALCANFOR	98.2	113.24	111.73	110.87	97.85	108.24	106.69	6.47
	MENTOL	98.31	101.33	109.18	104.06	97.54	105.43	102.64	4.43
105	TURPENTINA	92.69	90.04	97.2	90.88	101.35	97.54	94.95	4.67
	ALCANFOR	109.56	95.83	110.35	108.89	104.06	96.01	103.78	6.24
	MENTOL	96.01	101.4	110.87	104.06	101.35	98.13	101.97	5.08
120	TURPENTINA	100.84	96.83	93.82	104.9	99.1	102.26	99.57	4.01
	ALCANFOR	102.66	106.26	104.42	102.23	108.91	101.33	104.3	2.74
	MENTOL	104.91	90.02	109.31	99.1	104.52	106.35	102.36	6.74

TABLA XVII. MATRIZ DE HADAMARD EXPERIMENTO 4

TIEMPO MIN	PRINCIPIO ACTIVO	% LIBERADO							
		VASO							
		1	2	3	4	5	6	X	CV
15	TURPENTINA	31.23	41.05	46.64	36.87	33.65	35.47	37.48	14.84
	ALCANFOR	46.53	50.88	45.16	51.95	54.73	51	50.04	7.11
	MENTOL	45.68	49.72	57.11	53.97	50.57	51.64	51.45	7.55
30	TURPENTINA	50.09	59.44	61.34	53.69	59.69	67.74	58.66	10.5
	ALCANFOR	60.42	61.43	68.77	51.56	61.54	64.61	61.38	9.28
	MENTOL	63.65	73.84	60.36	59.58	65.92	66.98	65.05	8
45	TURPENTINA	70.33	70.31	70.08	73.36	77.91	81.84	73.97	6.61
	ALCANFOR	68.11	67.76	61.72	71.42	65.25	69.28	67.25	5.02
	MENTOL	72.44	79.45	72.99	80.41	72.48	69.65	74.57	5.8
60	TURPENTINA	80.33	80.31	80.08	83.36	77.91	81.84	80.64	2.27
	ALCANFOR	88.11	87.76	81.72	81.42	85.25	79.28	83.92	4.35
	MENTOL	78.58	80.46	78.08	0.52	75.75	76.35	78.29	2.55
75	TURPENTINA	90.01	96.96	90.88	89.16	102.2	89.49	93.11	5.7
	ALCANFOR	82.89	91.13	87.27	88.2	87.07	81.59	86.36	47.08
	MENTOL	86.89	100.9	93.07	85.52	97.61	89.27	92.21	6.64
90	TURPENTINA	105.4	99.91	100.5	96.85	102	82.85	97.9	8.05
	ALCANFOR	89.14	95.64	90.06	90.85	106	91.16	93.81	6.8
	MENTOL	107.7	102.3	101	95.74	105.9	92.95	100.91	5.64
105	TURPENTINA	93.91	107.9	92.41	103.4	89.63	90.59	96.3	7.8
	ALCANFOR	90.08	89.6	91.69	96.9	93.58	90.34	92.03	3.02
	MENTOL	88.43	107.7	101	104.2	87.31	94.55	96.85	9.15
120	TURPENTINA	99.62	90.71	104.3	94.86	104	98.94	98.73	5.33
	ALCANFOR	96.99	95.81	105.6	93.24	92.48	90.57	95.78	5.57
	MENTOL	93.16	94.41	104.5	99.91	109.9	87.49	96.22	8.31

TABLA XVIII. MATRIZ DE HADAMARD EXPERIMENTO 5

TIEMPO MIN	PRINCIPIO ACTIVO	% LIBERADO VASO							
		1	2	3	4	5	6	X	CV
15	TURPENTINA	15.63	32.68	23.66	23.82	9.44	14.65	19.81	42.88
	ALCANFOR	38.94	34.65	37.13	52.28	32.24	45.45	41.3	23.89
	MENTOL	28.6	28.56	39.09	33.65	22.06	27.32	29.54	20.22
30	TURPENTINA	28.81	29.27	37.25	34.22	26.52	26.56	30.43	14.33
	ALCANFOR	55.13	41.49	50.9	51.25	39.32	55.99	49.01	14.29
	MENTOL	43.16	41.49	50.7	44.44	37.78	35.06	42.44	11.93
45	TURPENTINA	41.74	43.45	53.56	54.26	36.34	33.16	43.75	19.87
	ALCANFOR	83.64	63.39	63.5	59.64	44.98	41.98	56.18	17.8
	MENTOL	55.79	57.32	64.56	60.17	45.95	41.15	52.49	17.32
60	TURPENTINA	47.08	53.12	60.12	58.37	45.5	42.28	51.07	14.21
	ALCANFOR	55.42	73.23	73.83	77.47	51.05	67	66.33	16.25
	MENTOL	65.57	46.91	68.5	64.26	52.26	43.72	56.87	18.59
75	TURPENTINA	56.12	71.46	73.13	69.19	48.44	50.02	61.39	18.21
	ALCANFOR	78.39	100	76.92	73.96	73.79	58.5	76.92	19.42
	MENTOL	58.99	84.69	80.87	72.84	53.6	52.67	67.27	20.89
90	TURPENTINA	71.97	81.25	80.32	80.24	63.31	62.68	73.29	11.81
	ALCANFOR	74.93	82.72	85.01	80.76	65.09	66.95	75.91	11.03
	MENTOL	73.61	88.55	80.16	80.49	63.07	61.81	74.61	14.55
105	TURPENTINA	81.8	84.92	79.68	71.38	77.49	74.68	78.32	6.24
	ALCANFOR	77.86	74.98	77.91	74.06	69.65	71.17	74.27	4.57
	MENTOL	77.89	76.93	81.98	73.91	72.5	67.21	75.07	6.76
120	TURPENTINA	87.5	76.37	85.1	72.15	76.81	69.21	77.85	9.19
	ALCANFOR	79.7	82.23	89.3	82.53	83.81	84.39	83.66	3.83
	MENTOL	82.53	80.62	83.81	84.39	97.02	81.07	84.9	7.2

TABLA XIX. MATRIZ DE HADAMARD EXPERIMENTO 6

TIEMPO MIN	PRINCIPIO ACTIVO	% LIBERADO VASO							
		1	2	3	4	5	6	X	CV
15	TURPENTINA								
	ALCANFOR	33.66	38.5	29.24	35.53	35.82	25.98	33.12	14.03
	MENTOL	36.91	39.78	43.33	38.91	46.91	46.33	41.04	14.45
30	TURPENTINA	21.95	30.05	28.42	26.21	24.89	30.9	27.03	12.6
	ALCANFOR	48.88	51.21	46.08	49.75	35.18	58.98	48.34	16.07
	MENTOL	69.97	69.95	44.57	56.71	44.15	66.36	58.62	20.57
45	TURPENTINA	48.86	45.38	33.91	35.92	38.99	31.43	38.95	17.76
	ALCANFOR	51.7	57.99	46.95	50.63	61.87	61.84	55.16	11.39
	MENTOL	60.85	60.39	56.71	50.91	43.73	41.46	52.34	16
60	TURPENTINA	65.47	74.3	63.32	56.51	64.47	66.15	65.03	8.78
	ALCANFOR	69.44	74.96	72.71	80.41	66.13	57.5	70.2	11.2
	MENTOL	76.25	84.54	91.13	78.1	68.88	91.52	81.73	10.95
75	TURPENTINA	85.12	83.08	90.3	79.17	82.23	74.09	82.23	6.64
	ALCANFOR	79.55	96.17	97.25	86.64	85.42	89.57	89.1	7.57
	MENTOL	106.6	101.9	104.8	97.87	83.68	83.97	96.45	10.0
90	TURPENTINA	95.6	93.65	110.5	87.32	106.7	82.22	96	11.36
	ALCANFOR	81.61	104.1	105.8	82.18	92.09	86.47	92.04	11.61
	MENTOL	98.37	107.8	101.9	91.42	103.3	107.5	101.7	6.05
105	TURPENTINA	128.7	122.9	112.6	112.8	108.8	107.9	115.6	7.21
	ALCANFOR	103	118.6	95.36	100	98.4	92.22	101.27	9.17
	MENTOL	111.1	103.4	105.1	107.8	95.63	99.51	103.75	5.37
120	TURPENTINA	124	123.2	125.4	146.9	149.1	113.3	130.3	11.03
	ALCANFOR	111.1	125.4	115	123.9	101.6	104.6	113.57	8.61
	MENTOL	129.9	132.8	122.8	135.3	128.2	109.8	126.44	7.3

TABLA XX. MATRIZ DE HADAMARD EXPERIMENTO 7

TIEMPO MIN	PRINCIPIO ACTIVO	% LIBERADO VASO							
		1	2	3	4	5	6	X	CV
15	TURPENTINA	37.52	55.44	63.24	34.81	58.25	41.09	48.02	24.5
	ALCANFOR	40.39	65.48	67.37	45.52	60.01	43.09	53.14	23.47
	MENTOL	35.55	55.25	60.62	32.93	54.92	40.75	46.67	25.05
30	TURPENTINA	56.2	97.02	82.53	58.53	79.27	61.56	72.47	22.56
	ALCANFOR	62.31	92.21	83.81	56.98	85.3	67.17	74.63	19.19
	MENTOL	55.22	89.59	84.39	57.93	74.89	61.49	70.58	20.06
45	TURPENTINA	71.67	96.19	82.23	61.74	96.67	76.29	80.79	17.13
	ALCANFOR	76.97	96.42	89.3	66.24	101.5	81.56	83.32	15.26
	MENTOL	65.76	94.36	76.7	56.06	96.04	80.19	78.18	20.06
60	TURPENTINA	73.49	93.71	101.8	70.43	92.94	108.3	90.1	16.84
	ALCANFOR	80.65	95.03	104.2	72.71	91.67	107.35	91.93	14.55
	MENTOL	70.89	89.66	99.49	66.09	86.23	102.78	85.85	17.29
75	TURPENTINA	82.05	105.9	99.6	79.7	107.8	103.83	96.47	12.85
	ALCANFOR	80.09	103.3	98.39	81.65	107.1	102.05	95.42	12.18
	MENTOL	80.49	103.1	95.23	74.42	105.4	99.22	92.98	13.66
90	TURPENTINA	77.42	103	103	90.93	100.2	100.72	95.86	10.5
	ALCANFOR	83.51	96.5	96.5	89.6	89.6	103.64	93.22	7.59
	MENTOL	81.33	93.21	93.21	85.83	85.83	96.67	89.34	6.57
105	TURPENTINA	100.7	97.28	103.6	96.67	101.4	97.54	99.53	2.8
	ALCANFOR	91.08	91.72	97.88	97.07	102.9	87.41	94.67	5.94
	MENTOL	92.69	90.04	95.83	88.94	80.01	91.66	89.86	5.98
120	TURPENTINA	97.07	102.9	113.2	101.3	101.7	101.42	103	5.26
	ALCANFOR	96.01	100.8	96.53	93.82	90.81	99.1	96.18	3.74
	MENTOL	98.31	95.83	91.58	88.94	80.04	95.83	91.75	7.25

TABLA XXI. MATRIZ DE HADAMARD EXPERIMENTO 8

TIEMPO MIN	PRICIPIO ACTIVO	% LIBERADO VASO							
		1	2	3	4	5	6	X	CV
15	TURPENTINA								
	ALCANFOR	41.6	31.19	40.26	48.31	43.82	36.43	40.26	14.73
	MENTOL	59.12	45.55	53.95	53.82	53.96	46.78	52.19	9.77
30	TURPENTINA	61.42	49.26	64.46	63.77	60.02	60.76	59.95	9.19
	ALCANFOR	42.9	50.13	68.2	66.5	69.79	50.6	58.02	19.78
	MENTOL	77.1	69.26	87.2	74.7	84.42	61.01	75.61	12.82
45	TURPENTINA	81.18	82.34	80.92	83.8	85.49	73.95	77.94	11.7
	ALCANFOR	74.11	70.9	75.43	77.53	78.04	68.02	74	5.27
	MENTOL	76.76	75.51	79.91	84.49	94.5	75.06	81.03	9.22
60	TURPENTINA	98.22	98.57	102.9	98.66	102.36	93.68	99.07	3.37
	ALCANFOR	83.88	89.41	128.7	83.51	87.41	89.17	90.34	10.31
	MENTOL	95.76	94.53	104.5	93.65	90.94	89.41	94.8	5.6
75	TURPENTINA	108.8	95.07	100.3	110.5	113.12	102.91	105.1	6.52
	ALCANFOR	90.82	87.37	97	96.85	97.7	92.95	93.75	5.44
	MENTOL	105.6	82.47	111.4	115.9	109.05	110.91	105.9	11.27
90	TURPENTINA	120.4	123.25	116	125.9	138.91	130.33	125.8	6.4
	ALCANFOR	98	100.41	97.65	89.39	103.01	105.91	99.06	5.72
	MENTOL	115	120.32	117.4	112.5	118.91	120.91	117.5	2.75
105	TURPENTINA	128	130.48	125.9	119	125.62	130.68	126.6	3.4
	ALCANFOR	107	100.91	109.6	109.3	110.34	109.74	107.8	3.32
	MENTOL	123	125.59	130.9	120.6	118.91	129.1	124.7	3.8
120	TURPENTINA	135	142.85	133.7	128.9	132.68	137.63	135.1	3.5
	ALCANFOR	115	112.63	121.9	117.6	112.91	116.71	116.1	2.96
	MENTOL	137	142.1	130.4	123.1	139.43	120.99	132.2	6.64

TABLA XXII TMD DE LA MATRIZ DE HADAMARD

EXP	PRINCIPIO ACTIVO	TMD min						
		1	2	3	4	5	6	CV
1	ALCANFOR	70.39	70.88	71.84	71.30	72.58	70.95	1.0957
2	ALCANFOR	74.04	70.34	69.79	71.23	71.99	72.39	2.1257
3	ALCANFOR	45.71	45.15	45.94	46.50	44.81	45.03	1.4079
4	ALCANFOR	74.32	73.85	74.07	74.51	74.25	73.17	0.8281
5	ALCANFOR	74.05	75.59	75.19	72.87	75.60	73.83	1.4918
6	ALCANFOR	79.28	79.98	80.28	79.09	78.86	78.58	0.8297
7	ALCANFOR	74.31	70.13	70.45	74.78	70.46	73.51	2.9784
8	ALCANFOR	78.37	77.87	75.37	75.87	75.89	78.42	1.8199
1	MENTOL	69.69	70.30	71.32	71.19	72.05	68.97	1.6207
2	MENTOL	73.35	72.27	72.31	72.56	72.70	74.32	1.0829
3	MENTOL	46.28	45.36	46.10	46.40	45.04	45.48	1.2167
4	MENTOL	74.05	73.64	74.81	74.27	74.63	73.02	0.8384
5	MENTOL	76.89	77.65	74.70	75.82	79.74	78.71	2.3987
6	MENTOL	77.40	77.80	78.53	79.12	80.10	76.97	1.488
7	MENTOL	76.42	71.04	70.95	76.28	69.70	74.10	3.9922
8	MENTOL	75.99	78.15	75.92	75.38	77.83	77.87	1.5889
1	TURPENTIN	72.75	75.38	74.64	75.95	75.50	73.30	1.7331
2	TURPENTIN	73.18	72.98	71.55	72.22	73.00	73.11	0.895
3	TURPENTIN	37.94	36.88	36.90	38.09	37.01	35.64	2.3856
4	TURPENTIN	77.39	75.65	75.11	76.16	75.36	74.33	1.374
5	TURPENTIN	82.48	78.75	78.66	77.40	83.22	82.10	3.041
6	TURPENTIN	87.95	84.94	86.93	85.76	89.68	87.49	1.9057
7	TURPENTIN	75.78	71.15	72.87	78.64	72.07	74.80	3.0863
8	TURPENTIN	78.01	79.27	77.40	77.37	78.31	78.95	1.0039

-La magnitud de los efectos principales nos indica que la temperatura es la que tiene más efecto sobre la variable de respuesta en los tres aceites esenciales y este efecto es negativo, es decir al pasar de 25 a 30 °C el TMD disminuye, por lo tanto la velocidad de liberación se incrementa al aumentar la temperatura.

Los factores del tipo de celda y cantidad de muestra también tienen un efecto negativo, por lo que disminuyen el valor del TMD al pasar de celda mejorada a celda modificada para PTD de la USP y de 250 a 500 mg de muestra, incrementándose nuevamente la velocidad de liberación; este incremento por el tipo de celda se puede deber a que se tiene un diámetro mayor en la celda modificada al aumentar la superficie expuesta de la muestra al medio de disolución

Referente al medio de disolución y la velocidad de agitación tienen un efecto positivo sobre la variable de respuesta (TMD) por lo que su valor aumenta y por lo tanto la velocidad de liberación disminuye al pasar de diclorometano a diclorometano-metanol al 75% v/v, y de 100 a 150 rpm al nivel estudiado.

Resumiendo las condiciones en las que se obtiene menor TMD son: celda modificada, medio de disolución diclorometano, velocidad de agitación 100 rpm, temperatura 30 °C y cantidad de muestra 500 mg.

- Al resolver la matriz y calcular los efectos principales considerando el CV como variable de respuesta se tiene que :

-Para el aceite de trementina el factor que tiene más efecto es el tipo de celda (efecto positivo), el CV aumenta al pasar de la celda mejorada a la celda modificada de la USP para parches transdérmicos, debido posiblemente a que en la celda modificada no se puede controlar la superficie expuesta al medio de disolución como se hace en la mejorada gracias a su mecanismo de tornillo.

TABLA XXIII EFECTOS PRINCIPALES DE LA MATRIZ DE HADAMARD (CV)

EFECTO	PRINCIPIO ACTIVO		
	TURPENTINA	ALCANFOR	MENTOL
a	1.9263	1.5772	1.7788
CELDA	0.8338	0.1713	0.5288
MED DE DIS	-0.0338	-0.1864	-0.1313
VEL DE AGI	-0.1413	-0.2633	-0.1663
TEMPERA	-0.3338	-0.2078	-0.5888
CANT. DE M	-0.1713	-0.2838	-0.2988

TABLA XXIV EFECTOS PRINCIPALES DE LA MATRIZ DE HADAMARD(TMD)

EFECTO	PRINCIPIO ACTIVO		
	TURPENTINA	ALCANFOR	MENTOL
a	72.4589	70.7117	71.1035
CELDA	-5.9589	-4.8013	-4.42940
MED DE DIS	6.2431	3.4767	3.6656
VEL DE AGI	4.7677	3.5354	3.5794
TEMPERA	-7.4581	-5.0646	-5.274
CANT. DE M	-3.2102	-2.4225	-3.2185

TABLA XXV. ANADEV A MATRIZ DE HADAMARD (TURPENTINA)

FV	GL	SC	MC	Fcal	Ftab
CELDA	1	1704.44	1704.44	736.51	4
MED DE DIS	1	1870.88	1870.88	808.43	4
VEL DE AGI	1	1091.09	1091.09	471.47	4
TEMPERA	1	2669.93	2669.93	1153.71	4
CANT DE M	1	494.66	494.66	213.75	4
ERROR	40	92.5689	2.3142		

TABLA XXVI ANADEV A MATRIZ DE HADAMARD (ALCANFOR)

FV	GL	SC	MC	Fcal	Ftab
CELDA	1	1106.5	1106.5	739.05	4
MED DE DIS	1	580.19	580.19	387.52	4
VEL DE AGI	1	599.96	599.96	400.73	4
TEMPERA	1	1231.2	1231.2	822.34	4
CANT DE M	1	281.69	281.69	188.15	4
ERROR	40	59.887	1.4971		

TABLA XXVII ANADEV A MATRIZ DE HADAMARD (MENTOL)

FV	GL	SC	MC	Fcal	Ftab
CELDA	1	941.73	941.73	432.42	4
MED DE DIS	1	644.97	644.97	216.57	4
VEL DE AGI	1	614.97	614.97	206.5	4
TEMPERA	1	1335.1	1335.1	448.28	4
CANT DE M	1	497.23	497.23	166.96	4
ERROR	40	87.113	2.978		

La temperatura presenta un efecto negativo, donde el CV aumenta al pasar de 30 a 25 °C

Le siguen en magnitud de efecto la cantidad de muestra y la velocidad de agitación, las cuales presentan un efecto negativo donde observamos que el CV aumenta al pasar de 500 a 250 mg de muestra y de 150 a 100 rpm. Por último el medio de disolución que tiene muy poco efecto.

-Para el alcanfor el factor que tiene más efecto es la cantidad de muestra y la velocidad de agitación (efecto negativo), donde observamos que el CV disminuye al pasar de 250 a 500 mg de muestra y de 100 a 150 rpm; le sigue la temperatura y el medio de disolución (efecto negativo), donde se tiene una disminución del CV al pasar de 25 a 30 °C y de diclorometano-metanol (75 % v/v) a diclorometano. Por último el tipo de celda (efecto positivo) donde el CV aumenta al pasar de la celda mejorada a la celda modificada de la USP para parches transdérmicos.

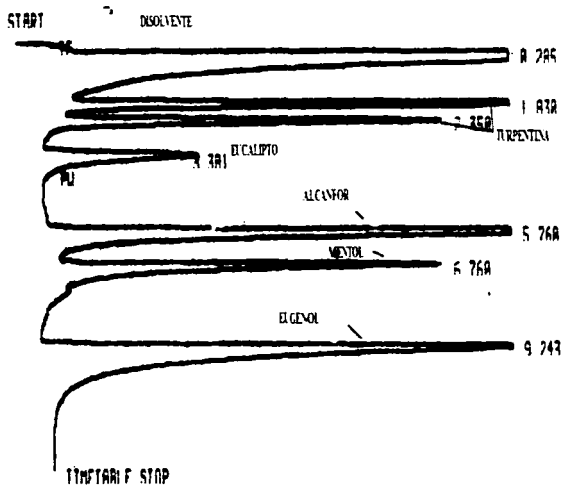
-Para el mentol el factor que tiene más efecto es la temperatura (efecto negativo) y el tipo de celda (efecto positivo) donde observamos que el CV disminuye al pasar de 25 a 30 °C y de la celda mejorada a la celda modificada de la USP para parches transdérmicos. Le sigue la cantidad de muestra (efecto negativo), velocidad de agitación (efecto negativo) y medio de disolución (efecto negativo) donde se tiene que el CV disminuye al pasar de 250 a 500 mg de muestra, de 100 a 150 rpm y de diclorometano-metanol (75 % v/v) a diclorometano respectivamente.

-Resumiendo las condiciones en las que se obtiene menor CV son: - celda mejorada, medio de disolución diclorometano, velocidad de agitación 150 rpm, temperatura 30 °C y cantidad de muestra 500 mg, por lo tanto se eligieron estas condiciones para efectuar la prueba de comparación de los perfiles de liberación de los aceites esenciales de las tres formulaciones de ungüento, ya que al ser el CV una medida de variabilidad es más importante que los resultados de TMD

c) Comparación de los perfiles de liberación.

El cromatograma de una de las muestras (M4) se presenta en la fig 1R

Fig 1R .Cromatograma de una muestra de ungüento al 100 % de concentración.



Los resultados de liberación de los aceites esenciales turpentina, alcanfor y mentol de las tres formulaciones-lotes se muestran en las tablas XXVIII a XXXVI, estos resultados se obtienen corrigiendo por los resultados del ensayo, se obtuvieron los perfiles de liberación derivados de estos resultados los cuales se presentan en las figuras 2R a) para la muestra M, 2 b) para la J y 2 c) para la B con sus tres lotes cada una Con los datos de estas tablas (XXVIII a XXXVI) se determinaron los TMD usando un programa en excel los cuales se presentan en la tabla XXXVII.

Los promedios de cada formulación (incluyendo los tres lotes), las ANADEVAS de la comparación entre formulaciones y las pruebas de rango múltiple (Tukey) para cada uno de los principios activos (aceite de trementina, alcanfor y mentol) se presentan en las tablas XXXVIII a XLVI respectivamente.

- De los perfiles de liberación obtenidos con los resultados del análisis de las muestras de tiempo y % liberado que se muestran en las figuras 2Ra, 2Rb y 2Rc podemos decir que:

-Los perfiles de liberación de los tres aceites esenciales en cada producto se comportan de manera similar

-El 100% liberado se alcanza entre 40 y 60 min en los productos MJ y MM y entre 60 y 80 min en las de MB.

- De los resultados de TMD y de las ANADEVAS derivadas de estos observamos que:

-En todos los aceites esenciales trementina, alcanfor y mentol hay un efecto estadísticamente significativo del lote y producto, lo que indica que al menos uno de los lotes y uno de los productos es diferente con un 95 % de confianza.

**TABLA XXVIII. LIBERACIÓN DE ACEITES ESENCIALES
MUESTRA J
LOTE 1**

TIEMPO PRINCIPIO (MIN)	ACTIVO	% LIBERADO VASO						
		1	2	3	4	5	6	X
15	TURPENTINA	70.26	67.78	67.87	62.22	48.58	51.26	61.33
	ALCANFOR	52.99	44.9	57.25	54.07	40.78	49.47	49.91
	MENTOL	57.77	64.31	77.42	68.74	78.76	84.51	71.82
30	TURPENTINA	89	86.75	78.37	78.37	74.44	81.93	81.03
	ALCANFOR	75.35	73.78	72.22	73.48	93.18	89.4	79.57
	MENTOL	74.85	77.24	77.46	72.88	69.49	69.27	73.43
45	TURPENTINA	85.91	82.55	92.04	89.1	89.27	91.68	88.42
	ALCANFOR	89.93	86.22	86.03	77.83	74.07	74.27	81.39
	MENTOL	103.51	101.48	107.38	115.26	94.73	87.07	101.57
60	TURPENTINA	88.57	90.57	88.04	90.38	89.37	92.51	89.87
	ALCANFOR	80.81	80.81	91.83	90.64	85.24	105	89.05
	MENTOL	82.12	100.59	95.96	91.25	90.29	89.82	91.67
75	TURPENTINA	94.31	92.03	87.54	85.08	90.54	93.24	90.45
	ALCANFOR	96.42	98.09	91.2	78.87	98.4	90.36	92.22
	MENTOL	112.56	102.68	95.89	91.79	106.14	99.1	101.36
90	TURPENTINA	91.99	90.35	93	84.57	92.15	84.57	89.44
	ALCANFOR	97.83	97.7	89.68	80.01	93.34	84.82	90.56
	MENTOL	109.41	99.66	95.63	94.75	107.57	95.42	100.4
105	TURPENTINA	84.64	88.62	86.73	83.59	90.01	88.32	86.88
	ALCANFOR	81.33	85.21	86.62	75.34	90.42	80.43	83.22
	MENTOL	92.69	93.33	113.55	87.38	103.67	90.73	96.89
120	TURPENTINA	84.07	76.83	86.61	84.02	90.78	87.87	85.03
	ALCANFOR	74.72	74.06	66.63	78.19	78.89	83.96	76.08
	MENTOL	80.19	84.59	81.62	88.46	87.97	96.38	86.53

**ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

TABLA XXIX. LIBERACIÓN DE ACEITES ESENCIALES

MUESTRA J
LOTE 2

TIEMP (MIN)	PRINCIPIO ACTIVO	% LIBERADO						
		VASO						
		1	2	3	4	5	6	X
15	TURPENTINA	86.47	79.33	68.78	78.8	85.26	75.7	78.72
	ALCANFOR	80.76	77.82	72.03	73.59	89.75	74.8	78.12
	MENTOL	82.62	68.96	73.73	79.55	85.24	72.98	77.18
30	TURPENTINA	92.36	91.37	86.01	82.37	89.73	83.02	87.47
	ALCANFOR	96.71	101.21	97.54	97.08	97.99	96.21	97.79
	MENTOL	104.88	109.41	98.42	89.73	91.06	96.1	98.26
45	TURPENTINA	96.77	101.71	83.87	87.25	99.83	96.37	94.3
	ALCANFOR	110.67	109.66	108.07	103.61	98.8	104.40	105.88
	MENTOL	108.05	110.01	99.88	97.14	107.14	97.99	103.36
60	TURPENTINA	99.89	95.15	90.94	91.77	100.68	97.54	95.99
	ALCANFOR	106.05	99.66	96.86	104.33	106.31	107.85	103.51
	MENTOL	102.17	101	96.44	94.13	111.27	95.72	100.12
75	TURPENTINA	101.92	99.22	97.55	98.86	91.01	95.31	97.31
	ALCANFOR	110.83	103.09	105.77	107.84	106.88	106.91	106.88
	MENTOL	101.75	94.25	91.51	90.87	94.6	94.7	94.61
90	TURPENTINA	99.23	96.96	93.09	91.23	99.23	89.66	94.9
	ALCANFOR	108.95	104.33	101.05	106.87	107.33	103.70	105.37
	MENTOL	109.43	104.50	92.22	105.16	99.33	104.12	102.46
105	TURPENTINA	100.81	96.09	94.7	95.85	96.5	92.6	96.09
	ALCANFOR	102.39	102.37	101.91	88.59	89.34	95.58	96.69
	MENTOL	113.56	99.43	105.10	102.49	92.76	96.37	101.62
120	TURPENTINA	95.63	95.92	88.33	87.73	98.59	89.14	92.55
	ALCANFOR	105.84	110.30	99.62	103.13	102.57	107.16	104.77
	MENTOL	106.44	108.83	109.37	95.48	109.24	92.81	103.69

TABLA XXX. LIBERACION DE ACEITES ESENCIALES.

MUESTRA J
LOTE 3

TIEMPO (MIN)	PRINCIPIO ACTIVO	% LIBERADO VASO							CV
		1	2	3	4	5	6	X	
15	TURPENTINA	78.14	72.97	81.66	79.12	82.06	73.32	77.88	3.95
	ALCANFOR	84.78	79.36	95.17	101.34	81.59	85.25	87.91	8.52
	MENTOL	81.01	81.92	90.11	97.16	77.51	96.19	87.31	8.348
30	TURPENTINA	95.39	92.15	96.24	99.88	94.53	82.95	93.52	5.761
	ALCANFOR	109.75	100.84	109.71	107.87	103.45	89.95	103.59	7.58
	MENTOL	109.29	96.03	105.43	106.9	105.41	102.58	104.27	4.593
45	TURPENTINA	101.41	101.18	94.9	98.19	95.72	96.19	97.93	2.822
	ALCANFOR	107.22	109.87	102.83	105.14	110.76	106.92	107.12	2.938
	MENTOL	102.15	104.65	109.58	103.38	95.92	97.76	102.24	4.919
60	TURPENTINA	95.18	94.63	99.92	99.52	96.97	96.84	97.17	2.174
	ALCANFOR	108.16	104.77	104.75	106.37	105.83	103.82	105.61	1.534
	MENTOL	111.67	110.22	107.67	105.85	96.54	101.31	105.54	5.709
75	TURPENTINA	93.13	91.96	102.1	96.7	87.12	93.71	94.12	5.003
	ALCANFOR	96.98	102.97	105.81	109.77	99.14	103.71	103.06	4.59
	MENTOL	98.2	105.78	104.68	106.75	93.92	105.64	102.49	5.206
90	TURPENTINA	98.69	101.13	98.39	100.59	97.48	96.85	98.52	1.914
	ALCANFOR	105.78	101.41	111.17	100.73	104.18	102.32	104.26	3.858
	MENTOL	102.55	108.07	102.68	102.31	108.73	111.55	105.98	3.976
105	TURPENTINA	94.79	101.13	102.49	102.65	97.41	94.92	98.89	3.657
	ALCANFOR	111.18	105.28	103.92	104.39	110.99	97.94	105.73	5.127
	MENTOL	106.43	106.67	101.65	104.27	104.05	93.2	102.71	5.006
120	TURPENTINA	91.22	90.27	100.36	93.25	94.53	90.23	93.31	3.854
	ALCANFOR	100.5	98.59	100.09	109.06	103.05	103.99	102.46	3.818
	MENTOL	102.61	98.38	108.58	112.66	107.76	97.71	104.61	6.015

TABLA XXXI. LIBERACION DE ACEITES ESENCIALES

MUESTRA M
LOTE 1

TIEMPO (MIN)	PRINCIPIO ACTIVO	% LIBERADO VASO							
		1	2	3	4	5	6	X	C V
15	TURPENTINA	60.34	54.11	57.97	57.96	62.74	69.2	60.38	5.186
	ALCANFOR	73.53	77.61	76.87	61.78	67.54	73.66	71.83	6.073
	MENTOL	76.75	80.23	77.35	65.83	75.27	72.46	74.48	4.95
30	TURPENTINA	80.6	77.43	66.56	74.88	64.51	65.26	71.54	6.951
	ALCANFOR	80.65	99.36	78.68	78.53	99.5	91.2	87.98	10.021
	MENTOL	88.17	87.45	84.71	74.23	94.85	93.88	87.21	7.464
45	TURPENTINA	99.02	106.69	110.61	98.12	107.38	99.1	103.48	5.37
	ALCANFOR	95.22	108.5	105.54	107.85	104.6	106.08	104.63	4.833
	MENTOL	105.02	101.83	108.99	108.68	101.4	105.34	105.21	3.234
60	TURPENTINA	88.53	95.56	105.77	109.17	105.81	102.92	101.29	7.757
	ALCANFOR	98.72	96.58	101.75	105.25	107.96	101.18	101.9	4.168
	MENTOL	95.12	103.68	105.01	108.96	102.44	94.88	101.68	5.62
75	TURPENTINA	91.51	92.69	102.43	112.42	110.1	108.15	102.89	8.976
	ALCANFOR	94.35	100.98	100.02	105.45	107.36	103.52	101.94	4.613
	MENTOL	91.83	104.51	105.79	104.3	99.27	106.12	101.97	5.546
90	TURPENTINA	91.19	90.35	106.66	102.26	105.61	95.98	98.591	7.214
	ALCANFOR	99.42	97.32	101.2	108.94	111.94	93.45	102.04	7.06
	MENTOL	102.82	106.94	105.78	107.34	102	101.03	104.32	2.704
105	TURPENTINA	91.92	109.01	102.43	98.5	107.79	108.69	103.05	6.852
	ALCANFOR	93.82	89.68	95.55	99.58	111.89	105.68	99.36	8.196
	MENTOL	103.77	103.96	103.34	97.74	110.06	110.4	104.87	4.748
120	TURPENTINA	91.21	93.41	107.85	103.18	109.56	107.69	102.25	7.96
	ALCANFOR	104.02	102.9	106.77	108.94	109.93	109.05	106.93	2.907
	MENTOL	98.75	102.73	111.41	105.71	111.48	108.76	106.47	5.077

TABLA XXXII. LIBERACION DE ACEITES ESENCIALES

**MUESTRA M
LOTE 2**

TIEMPO (MIN)	PRINCIPIO ACTIVO	% LIBERADO VASO						
		1	2	3	4	5	6	X
15	TURPENTINA	52.95	48.87	60.13	53.98	48.21	52.7	52.8
	ALCANFOR	48.42	37.36	59.8	43.16	48.22	49.67	46.27
	MENTOL	69.05	67.22	69.27	53.11	66.94	65.26	65.14
30	TURPENTINA	83.3	74.09	95.05	87.95	68.96	76	80.89
	ALCANFOR	70.51	72.77	62.17	69.75	59.41	65.68	66.71
	MENTOL	71.81	67.41	65.19	79.49	60.84	67.61	68.66
45	TURPENTINA	88.62	77.71	80.34	80.45	76.23	84.08	81.23
	ALCANFOR	70.72	57.54	68.12	86.28	78.63	78.12	73.23
	MENTOL	92.25	67.44	77.68	77.84	73.67	65.34	75.7
60	TURPENTINA	79.52	85.39	83.44	78.67	73.92	68.76	78.28
	ALCANFOR	74.75	70.42	72.82	74.42	72.82	74.45	73.28
	MENTOL	75.08	82.86	73.9	73.15	73.39	70.45	74.8
75	TURPENTINA	85.03	78.46	78.32	92.94	76.18	69.35	80.04
	ALCANFOR	77.45	77.78	72.98	72.57	71.77	71.62	74.02
	MENTOL	86.79	74.62	77.48	86.19	80.46	75.27	80.13
90	TURPENTINA	79.27	84.98	91.02	84.66	83.13	76.33	83.23
	ALCANFOR	75.27	82.17	78.04	74.6	71.66	71.66	75.56
	MENTOL	86.42	91.93	94.32	95.88	82.8	88.4	89.95
105	TURPENTINA	103.62	106.1	99.05	95.42	87.05	85.05	96.04
	ALCANFOR	87.67	89.32	91.64	94.21	83.97	80.41	87.87
	MENTOL	103.95	97.58	95.73	106.47	80.57	80.74	94.17
120	TURPENTINA	90.93	101.47	85.64	85.57	92.31	85.05	90.16
	ALCANFOR	85.73	80.56	73.68	74.49	74.62	69.7	76.63
	MENTOL	88.4	85.95	84.42	79.05	79.05	81.1	82.99

TABLA XXXIII. LIBERACION DE ACEITES ESENCIALES.

**MUESTRA M
LOTE 3**

TIEMPO (MIN)	PRINCIPIO ACTIVO	% LIBERADO VASO						
		1	2	3	4	5	6	X
15	TURPENTINA	71.02	64.77	69.2	56.89	76.04	70.51	68.07
	ALCANFOR	78.09	85.4	69.47	68.6	70.97	69.6	73.68
	MENTOL	70.35	67.16	62.15	68.06	62.48	57.33	64.58
30	TURPENTINA	74.79	91.63	70.39	70.11	86.49	69.38	77.13
	ALCANFOR	75.82	87.05	73.34	75.83	99.69	90.31	83
	MENTOL	79.22	92.18	80.04	77.52	96.13	91.04	86.02
45	TURPENTINA	81.32	102.27	75.79	76.68	93.42	92.17	86.94
	ALCANFOR	87.67	102.74	99.1	99.12	101.37	99.62	98.27
	MENTOL	85.05	107.17	91.58	87.15	98.97	91.04	93.49
60	TURPENTINA	91.44	102.61	104.23	86.31	94.06	98.11	96.12
	ALCANFOR	107.43	102.74	108.94	101.2	104.73	106.69	105.28
	MENTOL	92.73	108.11	107.91	92.47	91.98	108.83	100.33
75	TURPENTINA	102.1	96.8	88.31	106.08	98.39	95.68	97.89
	ALCANFOR	100.15	104.99	96.7	100.37	100.37	104.84	101.23
	MENTOL	109.68	101.73	93.3	104.01	107.34	107.61	103.94
90	TURPENTINA	99.64	108.15	91.8	99.26	101.52	88.19	98.09
	ALCANFOR	103.84	109.42	105.41	106.54	108.55	107.88	106.94
	MENTOL	103.68	105.13	96.46	103.25	103.16	92.73	100.73
105	TURPENTINA	87.5	99.33	100.78	91.55	101.46	93.11	95.62
	ALCANFOR	98.95	104.37	104.54	106.09	98.57	99.83	102.05
	MENTOL	110.24	107.15	107.14	109.71	107.07	97.13	106.47
120	TURPENTINA	89.47	90.23	88.33	108.39	106.56	89.3	95.38
	ALCANFOR	93.96	96.71	100.27	104.43	108.51	103	101.14
	MENTOL	88.66	90.35	100.67	109.68	103.57	102.15	99.18

TABLA XXXIV. LIBERACION DE ACEITES ESENCIALES

MUESTRA B
 LOTE 1

TIEMPO (MIN)	PRINCIPIO ACTIVO	% LIBERADO VASO						
		1	2	3	4	5	6	X
15	TURPENTINA							
	ALCANFOR	43.08	38.33	45.12	51.21	45.08	50.1	45.48
	MENTOL	50.63	57.82	51.06	51.91	59.53	60.67	55.27
30	TURPENTINA	56.23	58.67	63.77	78.55	70.93	82.36	68.42
	ALCANFOR	61.86	65.22	53.65	74.57	69.4	78.66	67.22
	MENTOL	62.23	65.42	50.13	66.31	66.33	69.23	64.61
45	TURPENTINA	91.03	83.64	102.27	102.27	103.13	96.46	96.46
	ALCANFOR	79.8	80.36	106.63	106.63	106.64	95.3	95.89
	MENTOL	83.38	71.61	92.4	92.4	87.85	85.53	85.53
60	TURPENTINA	89.84	73.28	79.8	58.6	79.49	83.99	77.5
	ALCANFOR	80.5	75.36	80.86	90.61	85.42	86.7	83.24
	MENTOL	75.84	102.51	98.59	103.53	94.53	107.5	97.08
75	TURPENTINA	96.82	93.4	94.88	83.11	79.89	111.4	93.25
	ALCANFOR	108.42	105.22	88.5	111.77	103.98	110.18	104.68
	MENTOL	78.85	80.61	88.92	86.79	95.92	98.75	88.47
90	TURPENTINA	90.76	88.28	110.56	100.92	103.34	101.5	99.22
	ALCANFOR	102.08	104.65	106.6	109.8	101.34	100.56	104.17
	MENTOL	102.35	96.58	103.51	102.65	98.88	100.94	100.82
105	TURPENTINA	93.19	78.22	105.39	102.29	103.15	83.68	94.32
	ALCANFOR	107.68	101.11	101.7	95.2	105.54	95.23	101.09
	MENTOL	111.4	92.96	99.45	91.58	106.29	106.26	101.32
120	TURPENTINA	85.36	89.63	111.3	94.05	86.28	96.62	93.87
	ALCANFOR	95.62	82.83	97.73	80.96	98.95	92.09	91.36
	MENTOL	105.09	102.71	94.89	84.62	91.88	100.2	96.58

TABLA XXXV. LIBERACION DE ACEITES ESENCIALES

MUESTRA B
LOTE 2

TIEMPO (MIN)	PRINCIPIO ACTIVO	% LIBERADO VASO						
		1	2	3	4	5	6	X
15	TURPENTINA							
	ALCANFOR	53.89	62.09	50.31	50.47	57.7	70.15	57.42
	MENTOL	63.68	62.58	66.11	50.37	56.95	64.38	61.67
30	TURPENTINA							
	ALCANFOR	71.24	50.66	48.59	60.19	75.17	64.26	61.68
	MENTOL	63.13	59.39	790.32	57.04	67.89	57.17	63.99
45	TURPENTINA							
	ALCANFOR	80.27	85.86	73.79	93.13	84.24	73.93	81.87
	MENTOL	62.6	61.34	57.61	53.5	65.27	67.42	61.29
60	TURPENTINA							
	ALCANFOR	106.08	95.91	102.83	87.42	90.83	87.14	95.03
	MENTOL	94.3	96.81	84.33	89.1	82	93.24	89.93
75	TURPENTINA							
	ALCANFOR	107.66	107	108.54	104.57	94.95	108.5	105.2
	MENTOL	101.09	87.44	90.49	82.43	90.36	90.4	90.36
90	TURPENTINA							
	ALCANFOR	92.9	105.4	100.35	87.07	80.16	89.97	92.64
	MENTOL	85.93	89	90.06	79.87	83.95	81.32	85.02
105	TURPENTINA							
	ALCANFOR	105.31	103.21	108.54	110.19	99.07	103.81	105
	MENTOL	95.41	96.63	86.26	89.12	90.31	86.88	90.76
120	TURPENTINA							
	ALCANFOR	102.9	100.83	110.59	108.23	103.09	105	105.1
	MENTOL	95.77	101.61	104.28	95.83	83.42	91.6	95.42

TABLA XXXVI LIBERACION DE ACEITES ESENCIALES

MUESTRA B
LOTE 3

TIEMPO (MIN)	PRINCIPIO ACTIVO	% LIBERADO VASO						
		1	2	3	4	5	6	X
15	TURPENTINA	48.83	55.62	45.06	42.86	45.62	45.68	47.27
	ALCANFOR	64.66	70.25	53.89	60.08	54.14	53.69	59.45
	MENTOL	58.97	62.4	64.9	60.35	49.6	48.7	57.48
30	TURPENTINA	62.07	50.29	48.98	45.43	49.17	51.18	51.18
	ALCANFOR	71.27	60.63	60.15	55.84	54.13	53.69	59.28
	MENTOL	66.78	59.93	64.88	67.22	54.27	54.05	61.18
45	TURPENTINA	58.96	55.66	57.83	62.65	51.93	59.4	57.74
	ALCANFOR	81.56	74.3	75.56	80.1	70.02	73.27	75.8
	MENTOL	82.66	78.03	84.18	82.28	69.33	81.92	79.73
60	TURPENTINA	56.7	60.06	52.59	61.03	60.44	54.77	57.59
	ALCANFOR	85.93	80.11	67.44	78.25	71.68	71.35	75.82
	MENTOL	78.81	69.67	76.04	70.55	74.14	67.61	76.14
75	TURPENTINA	66.31	54.91	60.11	59.63	59.84	53.57	59.09
	ALCANFOR	82.75	84.78	71.93	70.45	71.63	61.35	73.84
	MENTOL	95.27	92.12	81.2	75.72	79.1	85.59	84.83
90	TURPENTINA	78.61	68.77	70.34	77.4	87.42	76.51	76.5
	ALCANFOR	94.06	87.97	88.78	105.76	110.58	101.81	98.16
	MENTOL	96.13	99.4	90.22	95.24	110.8	95.68	98.89
105	TURPENTINA	57.02	69.58	61.48	65.72	65.06	60.16	63.17
	ALCANFOR	79.48	83.18	72.68	92.21	81.43	71.83	80.13
	MENTOL	88.39	95.95	82.85	89.5	85.12	77.11	86.48
120	TURPENTINA	59.14	68.38	77.59	72.43	69.52	70.05	69.52
	ALCANFOR	81.64	82.46	98.13	88.38	84.24	87.12	86.99
	MENTOL	87.39	97.37	80.67	99.51	102.44	90.06	92.9

FIG.2R a PERFILES DE LIBERACIÓN DE LAS FORMULACIONES

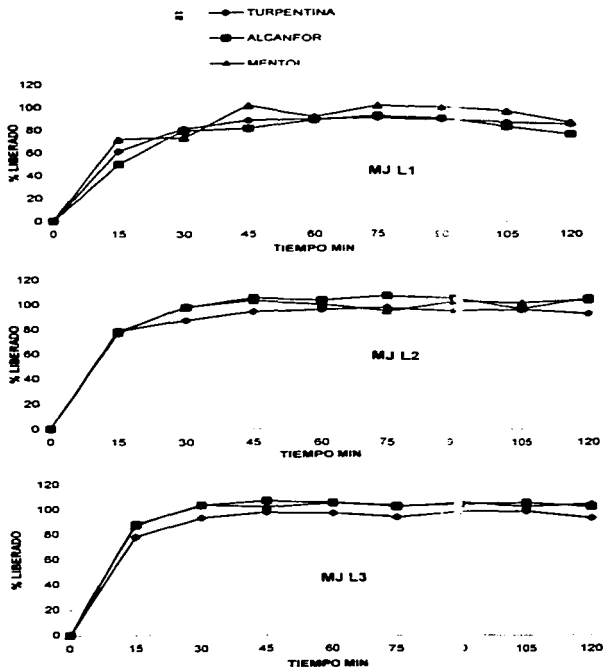


FIG.2R b PERFILES DE LIBERACIÓN DE LAS FORMULACIONES

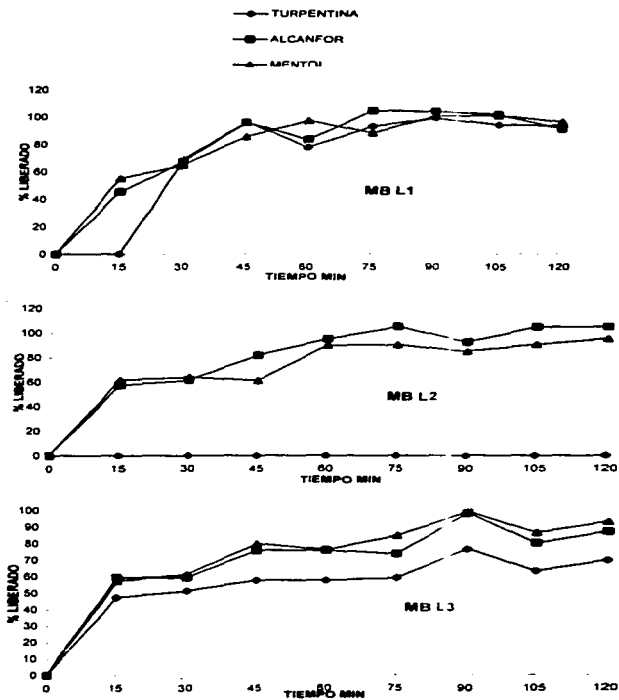


FIG.2R c PERFILES DE LIBERACIÓN DE LAS FORMULACIONES

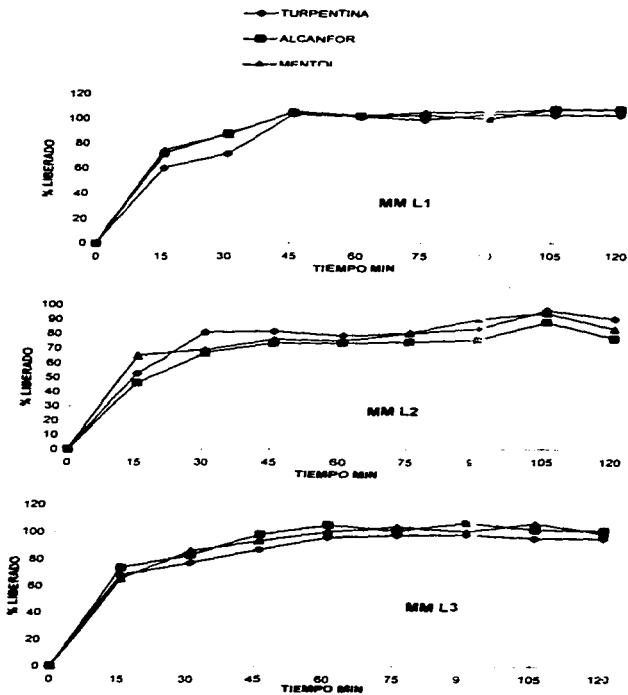


TABLA XXXVII. TMD DE LOS UNGÜENTOS.

LOTE	P.A	TMD MIN							
		VASO							
		1	2	3	4	5	6	X	CV
MJL1	Turpentina	35.44	35.755	38.83	39.14	39.92	39.73	38.105	5.26
	Alcanfor	44.83	45.671	47.5	44.51	46.49	46.23	45.871	2.41
	Mentol	37.63	37.077	38.97	36.21	35.92	34.83	36.772	3.93
MJL2	Turpentina	35.12	35.539	38.43	38.31	38.4	38.78	37.427	4.37
	Alcanfor	35.96	35.813	38.76	38.84	38.33	38.98	37.782	3.92
	Mentol	35.49	36.292	38.4	35.3	34.88	35.76	36.039	3.44
MJL3	Turpentina	35.51	35.885	38.19	38.23	38.16	38.93	37.482	3.78
	Alcanfor	35.02	35.956	37.69	37.76	38.52	38.67	37.269	3.92
	Mentol	35.7	35.902	38.24	37.73	38.05	37.56	37.197	2.98
MML1	Turpentina	39.89	40.991	41.59	40.7	41.29	40.82	40.882	1.42
	Alcanfor	39.48	38.795	39.6	40.85	39.99	39.6	39.718	1.7
	Mentol	38.96	39.249	39.65	40.87	39.22	39.14	39.516	1.77
MML2	Turpentina	59.58	67.178	58.49	59.64	60.46	58.51	60.645	4.94
	Alcanfor	72.21	73.597	72.06	71.44	71.4	70.04	71.791	1.63
	Mentol	69.94	71.687	71.24	71.7	70.28	70.04	70.814	1.16
MML3	Turpentina	52.24	51.914	51.95	53.84	51.09	51.77	52.134	1.78
	Alcanfor	35.94	35.56	37.02	36.31	36.2	36.52	36.257	1.25
	Mentol	44.33	44.435	44.88	44.33	44.22	45.34	44.588	0.97
MBL1	Turpentina	60.03	60.829	60.2	58.59	58.78	59.79	59.704	1.44
	Alcanfor	59.34	63.163	58.5	57.9	57.86	57.39	59.025	3.62
	Mentol	57.49	54.847	58.05	57.41	56.84	57.04	56.945	1.78
MBL2	Turpentina								
	Alcanfor	46.4	46.205	47.82	42.01	44.79	44.61	45.3	4.4
	Mentol	72.03	72.705	71.05	72.83	71.13	71.44	71.865	1.08
MBL3	Turpentina	68.87	70.627	71.47	72.14	72.12	70.75	70.995	1.73
	Alcanfor	69.29	70.228	71.4	72.16	72.53	71.79	71.232	1.73
	Mentol	70.83	72.136	69.87	71.39	73.48	71.6	71.55	1.7

TABLA XXXVIII RESULTADOS PROMEDIO (TMD) DE LAS FORMULACIONES

	FORMULACIÓN (ALCANFOR)		
	MM	MB	MJ
PROMEDIO	49.2549	58.5209	40.3067
N	18	18	18

TABLA XXXI ANADEVA (TMD) DE LAS FORMULACIONES ALCANFOR

FV	GL	SC	MC	FcaI	Ftab
FORMULACIÓN	2	2986.1059	1493.053	7.6648	2.8
LOTE	6	6904.9129	1150.819	5.9078	2.45
ERROR	27	5259.4214	194.7934		

TABLA XL. COMPARACIÓN DE RANGO MULTIPLE (TUKEY). ALCANFOR

COMPARACIÓN	DIFERENCIA	Q(S /N)
MB-MJ	18.2142	11.514
MJ-MM	8.9482	11.514
MM-MB	9.266	11.514

TABLA XLI RESULTADOS PROMEDIO (TMD) DE LAS FORMULACIONES

FORMULACIÓN (MENTOL)			
	MM	MB	MJ
PROMEDIO	51.6388	88.7889	36.6987
N	18	18	18

TABLA XLII ANADEVA (TMD) DE LAS FORMULACIONES MENTOL

FV	GL	SC	MC	Fca1	FTab
FORMULACIÓN	2	8164.0307	4082.015	4821.94	2.8
LOTE	6	4262.1961	710.368	839.13	2.45
ERROR	27	22.8569	0.8465		

TABLA XLIII COMPARACIÓN DE RANGO MULTIPLE (TUKEY). MENTOL

COMPARACIÓN	DIFERENCIA	Q(S / N)
MB-MJ	30.118	0.759
MJ-MM	14.9701	0.759
MM-MB	15.1481	0.759

TABLA XLIV RESULTADOS PROMEDIO (TMD) DE LAS FORMULACIONES

FORMULACIÓN (TURPENTINA)			
	MM	MB	MJ
PROMEDIO	51.22	43.566	37.8714
N	18	18	18

TABLA XLV ANADEVA (TMD) DE LAS FORMULACIONES TURPENTINA

FV	GL	SC	MC	Fcal	Ftab
FORMULACIÓN	2	1661.37	830.69	560.55	2.8
LOTE	6	18645.4	3107.6	2097.03	2.45
ERROR	27	40.011	1.4819		

TABLA XLVI COMPARACIÓN DE RANGO MÚLTIPLE (TUKEY). TURPENTINA

COMPARACIÓN	DIFERENCIA	Q(S / N)
MB-MJ	5.8546	1.004
MJ-MM	13.5486	1.004
MM-MB	7.654	1.004

-Dado que el ANADEVVA sólo nos indica si hay diferencia, pero no nos dice exactamente cuales son diferentes se procedió a aplicar la prueba de rango múltiple de Tukey encontrándose diferencias estadísticamente significativas entre el producto MB y MJ para alcanfor ; entre MB y MJ, MJ y MM, y . MM y MB para mentol y trementina

-El producto que tiene el TMD más pequeño es MJ para los tres aceites esenciales le sigue MM y el que tiene los TMD mas altos es MB, por lo tanto el producto que libera más rapido a la trementina, alcanfor y mentol es el MJ y el que los libera más lentamente es el MB bajo las condiciones en las que se hizo la prueba .

7.4 DETERMINACIÓN DE CALOR DE FUSIÓN DE LAS FORMULACIONES.

Los resultados de la determinación de calor de fusión de las formulaciones de ungüento se presentan en la tabla XLVII y en las figuras 3Ra , 3Rb . y 3Rc la correlación entre calor de fusión y el TMD de estas, las cuales se obtubieron de los datos de la tabla XLVIII Los termogramas de cada uno de los lotes de las tres muestras se presentan en las figs 4Ra, 4Rb y 4Rc De estos resultados podemos decir que:

- El producto MJ es el que tiene el calor y rango de fusión más pequeño, le sigue el MM y el que tiene los valores más altos es MB, lo que significa que al aumentar el calor de fusión de la muestra es más cristalina, disminuyendo la velocidad de liberación de los aceites esenciales estudiados del ungüento.
- En las gráficas de los tres aceites esenciales se muestra una correlación positiva, en todas ellas se observa una tendencia a aumentar el TMD al aumentar el calor de fusión, dando un coeficiente de correlación de 0.8 en turpentina y de 0.6 para el mentol y el eucalipto.
- Los termogramas nos muestran que todas las muestras son diferentes, en composición y grado de cristalinidad.

TABLA XLVII. CALOR Y RANGO DE FUSIÓN DE LAS FORMULACIONES

FORMULA LOTE	Calor de fusión J/g						Promedio	Rango de Fusión °C					
MJL1	15,8	15,8	16,6	14,3	15,1	16,5	15,68	29-61	29-62	29-62	29-62	29-62	29-63
MJL2	14,9	16,2	14,7	15,5	16,1	15,5	15,51	29-62	29-62	29-61	29-62	29-62	29-62
MJL3	16,1	15,6	15,2	14,2	15,3	15,2	15,2	29-61	29-61	29-62	29-62	29-61	29-69
MML1	32,6	28,5	28,3	27,2	33,3	33,5	30,57	28-77	29-77	29-76	29-76	29-78	29-78
MML2	22,1	28,6	27,7	25,9	31,3	30	27,59	29-76	29-78	29-80	30-78	29-78	29-78
MML3	25,2	22,2	26	22,9	25,6	23,4	24,23	29-77	30-78	29-78	30-80	30-79	30,8
MBL1	43,2	41,3	43,9	42	41,9	40,1	42,06	29-77	29-77	28-77	29-77	28-76	29-76
MBL2	30,9	24,9	29,8	30,9	30,6	33,6	30,11	29-76	29-76	28-76	28-77	28-77	28-77
MBL3	40,6	43,2	44,8	44,9	38,7	43,5	42,59	29-75	28-75	28-74	28-75	28-74	29-75

TABLA XLVIII. CALOR DE FUSIÓN Y TMD DE LOS UNGÜENTOS

Formula	TURPENTINA						TMD								
	calor de fusión J/g														
MJL1	15.8	15.8	16.6	14.34	15.1	16.53	35.44	35.76	38.83	39.14	39.92	39.73			
MJL2	14.9	16.2	14.7	15.5	16.1	15.7	35.12	35.54	38.43	38.31	38.4	38.76			
MJL3	16.1	15.6	15.2	14.2	15.3	14.8	35.51	35.89	38.191	38.23	38.16	38.93			
MML1	32.6	28.5	28.3	27.19	33.33	33.53	39.89	40.99	41.593	40.7	41.29	40.82			
MML2	22.1	28.6	27.7	25.9	31.29	29.96	59.58	67.18	58.487	59.64	60.46	58.51			
MML3	25.2	22.21	26	22.87	25.62	23.44	52.24	51.91	51.953	53.84	51.09	51.77			
MBL2	43.2	41.29	43.9	41.96	41.93	40.12	60.03	60.83	60.198	58.59	58.78	59.79			
MBL3	40.6	43.21	44.8	44.85	38.71	43.47	68.87	70.63	71.472	72.14	72.12	70.75			

Formula	ALCANFOR						TMD								
	calor de fusión J/g														
MJL1	15.8	15.8	16.6	14.34	15.1	16.53	44.83	45.67	47.5	44.51	46.49	46.23			
MJL2	14.9	16.2	14.7	15.5	16.1	15.7	35.96	35.81	38.756	38.84	38.33	38.98			
MJL3	16.1	15.6	15.2	14.2	15.3	14.8	35.02	35.96	37.691	37.76	38.52	38.67			
MML1	32.6	28.5	28.3	27.19	33.33	33.53	39.48	38.8	39.601	40.85	39.99	39.6			
MML2	22.1	28.6	27.7	25.9	31.29	29.96	72.21	73.6	72.063	71.44	71.4	70.04			
MML3	25.2	22.21	26	22.87	25.62	23.44	35.64	35.66	37.017	36.31	36.2	36.52			
MBL1	43.2	41.29	43.9	41.96	41.93	40.12	59.34	63.16	58.503	57.9	57.86	57.39			
MBL2	30.9	24.89	29.8	30.93	30.62	33.56	46.4	46.21	47.818	42.01	44.79	44.61			
MBL3	40.6	43.21	44.8	44.85	38.71	43.47	69.29	70.23	71.396	72.16	72.53	71.79			

Formula	MENTOL						TMD								
	calor de fusión														
MJL1	15.8	15.8	16.6	14.34	15.1	16.53	37.6	37.1	38.97	36.2	35.9	34.8			
MJL2	14.9	16.2	14.7	15.5	16.1	15.7	35.5	36.3	38.4	35.3	35	35.8			
MJL3	16.1	15.6	15.2	14.2	15.3	14.8	35.5	36.3	38.4	35.3	35	35.8			
MML1	32.6	28.5	28.3	27.19	33.33	33.53	39	39.2	39.65	40.9	39.2	39.1			
MML2	22.1	28.6	27.7	25.9	31.29	29.96	69.9	71.7	71.24	71.7	70.3	70			
MML3	25.2	22.21	26	22.87	25.62	23.44	44.3	44.4	44.88	44.3	44.2	45.3			
MBL1	43.2	41.29	43.9	41.96	41.93	40.12	57.5	54.8	58.05	57.4	56.8	57			
MBL2	30.9	24.89	29.8	30.93	30.62	33.56	72	72.7	71.05	72.8	71.1	71.4			
MBL3	40.6	43.21	44.8	44.85	38.71	43.47	70.8	72.1	69.87	71.4	73.5	71.6			

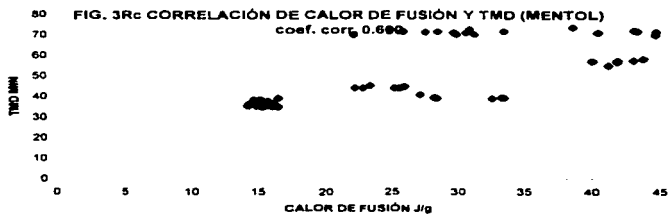
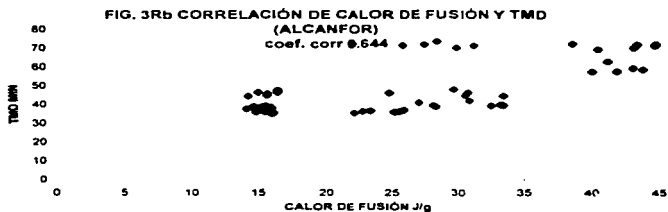
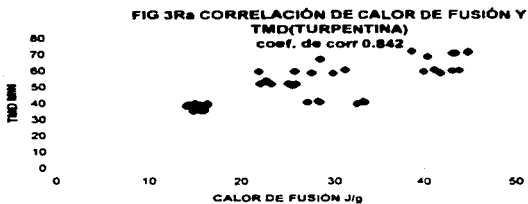
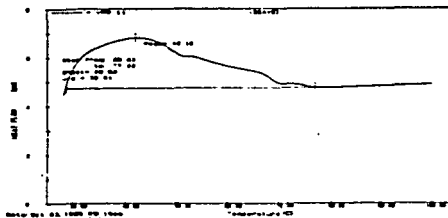
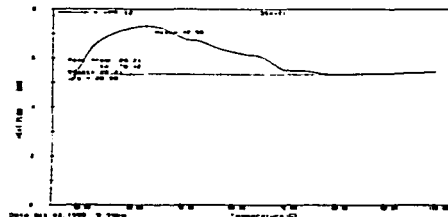


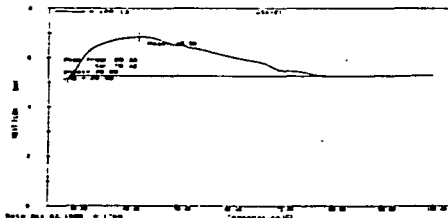
Fig. 4Ra Termograma de la muestra MM.



PERKIN-ELMER DSC7



PERKIN-ELMER DSC7



PERKIN-ELMER DSC7

Fig. 4Rb Termogramas de las muestras MJ.

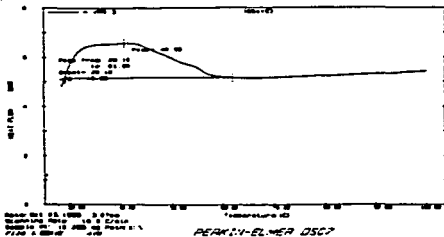
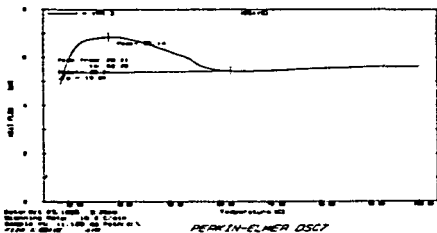
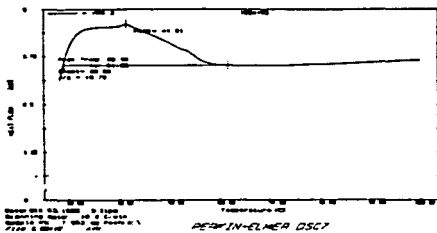
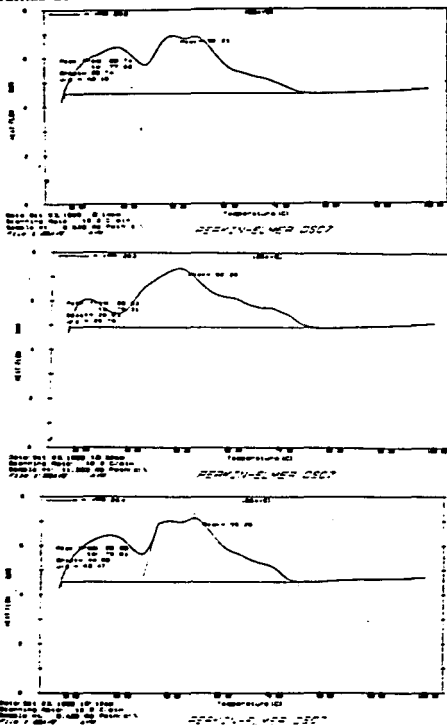


Fig 4Rc Termogramas de las muestras MB.



8. CONCLUSIONES

En base a los resultados obtenidos podemos concluir que:

1.- Se validó el método analítico para la determinación de aceite de trementina, mentol y alcanfor en un ungüento, para aplicarlo en la determinación de estos ingredientes activos en la prueba de liberación en tres formulaciones de un ungüento, evaluando: precisión, exactitud y linealidad obteniendo:

- en repetibilidad y reproducibilidad coeficientes de variación entre 2 y 3.8 %; en exactitud el 100 % de recobro; y en la linealidad del sistema y del método coeficientes de determinación mayores a 0.98

2.-Se analizaron las tres formulaciones a comparar obteniéndose lo siguiente:

En la formulación MB el contenido de aceites esenciales es menor al 75 % y en MJ y MM es mayor a 80 % de lo indicado en el marbete.

3.-En el diseño de experimentos (Matriz de Hadamard) para la selección de las condiciones de prueba se encontró lo siguiente:

- Todos los factores estudiados tienen efecto estadísticamente significativo sobre la variable de respuesta TMD en los niveles estudiados, siendo positivo el medio de disolución y la velocidad de agitación, lo que significa que el valor de TMD aumenta y por lo tanto la velocidad de liberación disminuye al disminuir la concentración de diclorometano en el medio de disolución y al aumentar la velocidad de agitación; y negativo la temperatura, el tipo de celda y la cantidad de muestra, lo que significa una disminución del TMD y por lo tanto un aumento

en la velocidad de liberación al aumentar la temperatura, la cantidad de muestra y al usar la celda modificada.

- **Todos los factores tienen efecto estadísticamente significativo sobre la variable de respuesta coeficiente de variación, siendo positivo para la celda, lo que significa un aumento en la variabilidad al usar la celda modificada ; y, negativo para medio de disolución, velocidad de agitación, temperatura y cantidad de muestra lo que significa una disminución de la variabilidad al usar diclorometano como medio de disolución, 150 rpm como velocidad de agitación, 30 °C como temperatura y 500 mg de muestra.**
- **Las condiciones elegidas para efectuar la prueba por ser las que tienden a disminuir el CV son: celda mejorada, diclorometano como medio de disolución, velocidad de agitación de 150 rpm, temperatura de 30 °C y 500 mg de muestra.**

4.-Se obtuvieron y compararon los perfiles de liberación tres formulaciones de un ungüento conteniendo aceite de trementina, alcanfor y mentol los resultados obtenidos podemos decir que :

- **Los perfiles de liberación del aceite de trementina, mentol y alcanfor en cada producto son similares debido a que estos poseen propiedades fisicoquímicas similares. De manera cualitativa observando estos perfiles de liberación podemos decir que el 100 % de liberación se alcanza entre 40 y 60 min en los productos MJ y MM, y entre 60 y 80 min en MB. Cuantitativamente la formulación MJ es la que tiene los TMD's más bajos para los tres aceites esenciales lo que indica que es la que libera más rápido los aceites esenciales; y la formulación MB es la que tiene los TMD's más altos para los tres aceites esenciales, lo que indica que es la que libera más lentamente los aceites esenciales.**
- **El análisis de varianza para la variable de respuesta TMD reportó diferencia estadísticamente significativa entre formulaciones y entre lotes en los tres aceites esenciales, lo que indica que al menos una de las formulaciones y lotes**

es diferente. Aplicando la prueba de rango múltiple de Tukey para la variable de respuesta TMD se encontró diferencia estadísticamente significativa entre las formulaciones MB-MJ, MJ - MM, MM - MB en mentol y aceite de trementina; y entre MB - MJ en alcanfor.

- El método de paleta sobre disco usando la celda mejorada sirvió como un método de evaluación in vitro, ya que permitió obtener los perfiles de liberación de tres formulaciones de un unguento conteniendo aceite de trementina, alcanfor y mentol en la misma concentración, y así utilizarlos para compararlas usando el equipo de disolución convencional automatizado existente en la mayoría de los laboratorios. Por lo tanto el método de paleta sobre disco con la celda mejorada se propone como un método para evaluar la liberación de principios activos en formulaciones tópicas, para ser usado en:

- Control de calidad para evaluar el proceso de fabricación y la uniformidad entre lote y lote.

- Para comparar productos considerados equivalentes farmacéuticos.

- Con el uso de la membrana adecuada, para estudios de absorción.

- Estudios de formulación y reformulación de ungüentos

5.-Parece haber una correlación positiva entre el TMD y el calor de fusión, lo cual parece lógico ya que se sabe que al incrementarse el calor de fusión y por lo tanto en grado de cristalinidad de un material, se disuelve con mayor dificultad, a pesar de que los coeficiente de correlación obtenidos son del orden de 0.6 para mentol y alcanfor y de 0.8 para trementina.

9. ANEXOS

TABLA AI. Precisión del sistema.

DETERMINACION	TREMÉNTINA AEST/ Δ AEST.int	AL CANFOR AEST/AEST.int	MENTOL AEST/AEST.int
1	0.6533	0.6745	0.3639
2	0.6542	0.6987	0.3897
3	0.6568	0.6622	0.3502
4	0.6474	0.6714	0.3618
5	0.6354	0.6457	0.3424
6	0.6501	0.6630	0.3545
7	0.6186	0.6539	0.3535
8	0.6598	0.6675	0.3699
9	0.6523	0.6748	0.3575
X	0.6451	0.6679	0.3603
CV %	2.00	2.24	3.77

Tabla AII. Precisión del método

a) TREMÉNTINA (en %)

	ANALISTA 1	ANALISTA 2
DIA 1	99.77	103.43
	103.18	101.58
	105.13	105.14
DIA 2	100.00	100.55
	100.20	97.80
	104.10	98.07
CV Total = 4.6407		

b) Alcanfor (en %).

	<i>ANALISTA 1</i>	<i>ANALISTA 2</i>
DIA 1	106.60	109.70
	106.30	110.60
	110.40	111.98
DIA 2	105.30	107.35
	106.20	104.95
	110.00	108.33
CV total =2.1636		

c) Mentol (en %)

	<i>ANALISTA 1</i>	<i>ANALISTA 2</i>
DIA 1	95.71	100.01
	102.77	95.52
	101.97	101.92
DIA 2	96.60	95.64
	100.30	100.10
	103.00	95.91
CV total=3.05		

TABLA AIII. Exactitud del Método. (% RECUPERADO)

DETERMINACION	TREMENTINA	ALCANFOR	MENTOL
1	105 43	109 70	100 01
2	105 58	110 60	95 52
3	108 14	111 98	101 92
4	95 55	103 90	95 64
5	97 80	101 28	105 10
6	92 07	98 33	95 91

Tabla AIV. LINEARIDAD DEL SISTEMA (AEst / AEst int)

CONCENTRACION	TREMENTINA	ALCANFOR	MENTOL
12.5	0 0917	0 1256	0 0592
12.5	0 0860	0 1303	0 0468
12.5	0 0781	0 1074	0 0472
25.0	0 1795	0 2017	0 0892
25.0	0 1916	0 2024	0 1030
25.0	0 1795	0 1995	0 0762
50.0	0 3692	0 3761	0 2047
50.0	0 3984	0 3961	0 2115
50.0	0 3857	0 3940	0 1979
75.0	0 5787	0 5867	0 3015
75.0	0 5386	0 5429	0 2833
75.0	0 5530	0 5538	0 2954
100.0	0 7878	0 7881	0 4354
100.0	0 7563	0 7546	0 4152
100.0	0 7535	0 7216	0 4203
PENDIENTE	0 007	0 0072	0 0042
ORDENADA AL ORIGEN	-0.0065	0 0251	-0 0099
CV	4 487	4 4348	6 1231
R ²	0 9955	0 9948	0 9921

Tabla AV. Linearidad del Método.

% Adicionado	% Recuperado		
	TREMENTINA	ALCANFOR	MENTOL
12 5	20 0	19 69	13 97
12 5	15 46	24 60	11 04
12 5	15 80	16 72	11 14
25 0	38 53	26 35	21 15
25 0	33 23	25 01	24 31
25 0	37 20	23 20	28 77
50 0	61 80	57 44	50 09
50 0	49 52	51 90	45 45
50 0	53 26	52 84	45 56
75 0	75 03	71 55	68 53
75 0	77 54	73 20	64 82
75 0	79 11	77 65	65 51
100 0	99 77	106 60	95 71
100 0	103 18	116 30	102 77
100 0	105 14	110 40	101 92
PENDIENTE	0 9356	1 0367	0 9693
ORDENADA AL ORIGEN	8 5241	2 4691	-0 8399
CV	7 23	9 9530	8 5281
R ²	0 9835	0 9754	0 9839

FALTA PAGINA

No.

108

BIBLIOGRAFIA

- 1.-" **MODERN PHARMACEUTICS**" Edited by Gilbert Banker and Christopher T. Rhodes: vol 40, 2nd edition (1990). New York, Ed. Marcel Dekker, pp 263-323.
2. Barry B.W., et al. "**DERMATOLOGICAL FORMULATIONS. PERCUTANEOUS ABSORPTION**" **VOL 18** (1982); New York, Ed. Marcel Dekker, pp 296-340.
- 3.-"**THE PHARMACOPEIA OF THE UNITED STATES OF AMERICA**" 23th; Mack Publishers Co, USA, Easton (1995); pp 1791-1798.
4. Shah V.P. et al. "**PRINCIPLES AND CRITERIA IN THE DEVELOPMENT AND OPTIMIZATION OF TOPICAL THERAPEUTIC PRODUCTS**" ; *Int J. Pharm.* 82, 21 - 28, (1992).
5. Neubert R. et al. "**IN VITRO METHODS FOR THE BIOPHARMACEUTICAL EVALUATION OF TOPICAL FORMULATIONS**" ; *Acta Pharm Technol.* 36 (4), 197 - 206, (1990).
6. Shah, V. P.; et al. " **IN VITRO RELEASE FROM CORTICOSTEROID OINTMENTS** " ; *J. Pharm. Sci.* 84 (9), 1139 - 1140, (1995).
- 7.Hanson A.W. "**HANDBOOK OF DISSOLUTION TESTING**" 2nd Edition (1991); Published by Aster Publishing Corporation, pp 53-67
- 8.Banakar V. U "**PHARMACEUTICAL DISSOLUTION TESTING**" De Marcel Dekker, New York (1992); vol 49, pp 333-343.
9. Shah, V. P., et al. " **IN VITRO EVALUATION OF TRANSDERMAL DRUG DELIVERY**" *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 41 (3), 163 - 167, (1995).
10. Faucher J.A.; et al. " **INTERACTION OF KERATINOUS SUBSTRATES WITH SODIUM LAURYL SULFATE: II. PERMEATION THROUGH STRATUM CORNEUM** " ; *J. Soc.Cosmet. Chem.* 29, 329 - 352, (1978).
11. Ashton, P., et al. " **EFFECTS OF SURFACTANTS IN PERCUTANEOUS ABSORPTION** " ; *Pharm. Acta Helv.* 61 (8), 228 - 235, (1986).
12. Glummer C.L.; et al. " **THE SKIN PENETRATION CELL: A DESIGN UPDATE** " ; *Int. J. Pharm.* 40, 101 - 104, (1987).
13. Orbe A., et al. " **A NEW IN VITRO MODEL FOR QUANTITATIVE STUDY OF CREAM PERMEABILITY** " ; *Int. J. Pharm.* 41, 49 -53, (1988).
14. Maiani Y., et al. " **PERMEATION OF DICLOFENAC SALTS THROUGH SILICONE MEMBRANE: A MECHANISTIC STUDY OF PERCUTANEOUS ABSORPTION OF IONIZABLE DRUGS** " ; *Chem. Pharm. Bull.*, 42 (6), 1297 - 1301, (1994).
15. Vilchez G.F.; et al. " **IN VITRO PERCUTANEOUS ABSORPTION OF NAPROXEN FROM GELS USING A DOUBLE - LAYER ARTIFICIAL MEMBRANE** " ; *Int. J. Pharm.* 98, 37 - 43, (1993).
16. Nastruzzi C., et al. " **COMPARATIVE STUDY ON THE RELEASE KINETICS OF METHYL - NICOTINATE FROM TOPIC FORMULATIONS** " ; *Int. J. Pharm.* 90, 43 - 50, (1993).
17. Marimoto Y., et al. " **PREDICTION OF SKIN PERMEABILITY OF DRUGS. II. DEVELOPMENT OF COMPOSITE MEMBRANE AS A SKIN ALTERNATIVE** " ; *Int. J. Pharm.* 79, 21 - 28, (1992).

18. Neubert R., Bendas B., Wohlrab, " USE OF MULTILAYER MEMBRANE SYSTEM AND EXCISED HUMAN SKIN FOR STUDYING THE TOPICAL AVAILABILITY OF GLUCOCORTICIDS " , Eur J Pharm Biopharm, 38 (1), 11 - 16, (1992)
19. Wu T S, et al. " IN VITRO RELEASE OF NITROGLYCERIN FROM TOPICAL PRODUCTS BY USE OF ARTIFICIAL MEMBRANES " , J Pharm Sci, 81 (12), 1153 - 1156 (1992)
20. Mura P, et al. " IMPROVEMENT OF CLONAZEPAM RELEASE FROM A CARBOPOL HYDROGEL " , Pharm Acta Helv, 67 (9), 282 - 288, (1992)
21. Neubert R, et al. " A MULTILAYER MEMBRANE SYSTEM FOR MODELLING DRUG PENETRATION INTO SKIN " , Int J Pharm, 75, 89 - 94, (1991)
22. Marimoto Y, et al. " PREDICTION OF SKIN PERMEABILITY OF DRUGS. 1. COMPARISON WITH ARTIFICIAL MEMBRANE " , Chem Pharm Bull, 38 (12), 3452 - 3459, (1990)
23. Plakogiannis M I, et al. " IN VITRO RELEASE STUDIES OF METHYL SALICYLATE FROM THE OINTMENT BASES AND THE COMMERCIAL DERMATOLOGICAL PRODUCTS " , Pharm Acta Helv, 65 (5), 170 - 174 (1990)
24. Jarnoulic C J, et al. " A NEW DIFFUSION CELL - AN AUTOMATED METHOD FOR MEASURING THE PHARMACEUTICAL AVAILABILITY OF TOPICAL DOSAGE FORMS " Int J Pharm, 49, 63 - 68 (1989)
25. Ridout G, et al. " DEVELOPMENT OF MODEL MEMBRANES FOR PERCUTANEOUS ABSORPTION MEASUREMENTS. II. DIPALMITOYL PHOSPHATIDYLCHOLINE, LINOLEIC ACID AND TETRADECANE " , Int J Pharm, 42, 97 - 104, (1988)
26. Ridout G, et al. " DEVELOPMENT OF MODEL MEMBRANES FOR PERCUTANEOUS ABSORPTION MEASUREMENTS. I. ISOPROPYL MYRISTATE " , Int J Pharm, 39, 149 - 156, (1987)
27. McGinty W J, et al. " THE EFFECT OF PHYSICO-CHEMICAL PROPERTIES ON THE IN VITRO DIFFUSION OF DRUG THROUGH SYNTHETIC MEMBRANES AND PIGSKIN. II. SALICYLIC ACID " , Int J Pharm, 35, 103 - 109, (1987)
28. Mrsny J R, et al. " TRANSPORT BIOLOGICALLY ACTIVE INTERFERON - GAMMA ACROSS HUMAN SKIN IN VITRO " , Pharm Research, 12 (8), 1140 - 1145, (1995)
29. Chien W Y, et al. " TRANSFERMAL DELIVERY OF DIDEOXYNUCLEOSIDE-TYPE ANTI-HIV DRUGS. I. STABILITY STUDIES FOR HAIRLESS RAT SKIN PERMEATION " , J Pharm Sci, 84 (9), 1061 - 1111, (1995)
30. Riviere E J, et al. " PIRONICAM: EVIDENCE FOR LOCAL DELIVERY FOLLOWING TOPICAL APPLICATION " , Eur J Pharm Biopharm, 41 (3), 175 - 183, (1995)
31. Domenech J, et al. " A COMPARATIVE IN VITRO STUDY OF TRANSDERMAL ABSORPTION OF ANTIEMETICS " , J Pharm Sci, 83 (1), 29 - 33, (1994)
32. Rytting H J, et al. " TRANSDERMAL DELIVERY OF THE TETRAPEPTIDE HISETAL (MELANOTROPIN (6-9)), I. EFFECT OF VARIOUS PENETRATION ENHANCERS: IN VITRO STUDY ACROSS HAIRLESS MOUS SKIN " , Int J Pharm, 101, 57 - 61, (1994)

33. Roy D. S. et al. " PERMEABILITY OF KETOROLAC ACID AND ITS ESTER ANALOGS (PRODRUG) THROUGH HUMAN CADAVER SKIN ". *J Pharm Sci*, **83** (11), 1548 - 1553, (1994)
34. Tsai H.Y. et al. " PERCUTANEUS ABSORPTION OF PIROXICAM FROM FAPG BASE THROUGH RAT SKIN: EFFECTS OF FATTY ACID ADDED TO FAPG BASE ". *Int J Pharm*, **106**, 1 - 6, (1994)
35. Liu H. CH. et al. " STUDIES ON THE IN - VITRO PERCUTANEUS PENETRATION OF INDOMETHACIN FROM GEL SYSTEMS IN HAIRLESS MICE ". *J Pharm Pharmacol.* **47**, 365 - 372, (1995)
36. Griffin J.R. et al. " PERCUTANEUS ABSORPTION OF AZIDOPROFEN: A MODEL FOR A SOFT ANTI - INFLAMMATORY DRUG FOR TOPICAL APPLICATION ". *Int J Pharm.* **90**, 129 - 140, (1993)
37. Higuchi T.W. et al. " THE EFFECTS OF THE ETHANOL ON THE TRANSPORT OF LIPOPHILIC AND POLAR PERMEANTS ACROSS HAIRLESS MOUSE SKIN: METHODS / VALIDATION OF A NOVEL APPROACH ". *Int J Pharm.* **78**, 137 - 156, (1992)
38. Mohammad S. R. et al. " INVESTIGATION OF THE IN VITRO INTERACTION OF VARIOUS VEHICLES WITH HAIRLESS MOUSE SKIN ". *J. Soc Cosmet Chem.* **43**, 251 - 258, (1992)
39. McGinity W. J. et al. " THE EFFECT OF PHYSICO-CHEMICAL PROPERTIES ON THE IN VITRO DIFFUSION OF DRUG THROUGH SYNTHETIC MEMBRANES AND PIGSKIN. I. METHYL SALICYLATE ". *Int J Pharm.* **35**, 91 - 102, (1987)
40. Mohamed S. R. et al. "SYNERGISTIC EFFECT OF D-LIMONENO AND ETANOL ON THE TRANSDERMAL PERMEATION ON SD-R18" *Drug Dev Ind Pharm.* **21** - 411, (1995)
41. Boltari L. et al. " IN VITRO TRANSDERMAL PERMEATION OF NIFEDIPINE FROM THICKENED MICROEMULSIONS ". *J Pharm Belg.* **49** (4), 315 - 320, (1994)
42. Thacharodi D. et al. "TRANSDERMAL ABSORPTION OF NIFEDIPINE FROM MICROEMULSIONS OF LIPOPHILIC SKIN PENETRATION ENHANCERS" *Int J Pharm.* **111**, 235-240 (1994)
43. Mohamed S. R. et al. " DIFFUSION STUDIES OF ANALGESICS " *Int J Pharm.* **41**, 49, (1988)
44. Elka Toume: "ALTERED SKIN PERMEATION OF A HIGHLY LIPOPHILIC MOLECULE: TETRAHYDROCANNABINOL" *Int J Pharm.* **43**, 17-22 (1988)
45. CFR 21 PARTS 300 TO 499 REVISED AS OF APRIL 1, 1992
46. Khan A. K. et al. " THE CONCEPT OF DISSOLUTION EFFICIENCY ". *J. Pharm Pharmacol.* **27**, 48 - 49, (1975)
47. Podzdeck F. et al. " COMPARISON OF IN VITRO DISSOLUTION PERFILES BY CALCULATING MEAN DISSOLUTION TIME (MDT) OR MEAN RESIDENCE TIME (MRT) ". *Int. J. Pharm.* **97**, 93 - 100, (1993)
48. Ishizaki T. et al. " A THEORETICAL CONSIDERATION OF PERCUTANEUS DRUG ABSORPTION ". *J Pharmacokin Biopharm*, **13** (1), 55 - 72, (1985)
49. Shah V.P. et al. " IN VITRO EVALUATION OF TRANSDERMAL DRUG DELIVERY " *Eur J Pharm Biopharm* **41** (3), 163-167 (1995).

50. Shah P.V.; et al. " NEW AND GENERIC TRANSDERMAL NITROGLYCERIN SYSTEMS: REGULATORY CONSIDERATIONS " ; Eur J Pharm Biopharm. 41 (3), 189 - 193. (1995)
51. Shah P.V.; et al. " IN VITRO RELEASE PROFILE OF ESTRADIOL TRANSDERMAL THERAPEUTIC SYSTEMS " ; J Pharm Sci. 79 (7), 601 - 602. (1990)
52. Collins C. C. et al. " COMPARISON OF DIFFUSION STUDIES OF HYDROCORTISONE BETWEEN THE FRANZ CELL AND THE ENHANCER CELL " . Drug Dev Ind Pharm. 19 (13), 1573 - 1585. (1993)
53. Lippold C.B. et al. " SELECTION OF THE VEHICLE FOR TOPICAL ADMINISTRATION OF DRUGS " . Pharm Acta Helv. 59 (5), 166 - 171 (1984) .
54. Lippold C.B. et al. " HOW OPTIMIZE DRUG PENETRATION THROUGH SKIN " ; Pharm Acta Helv. 67 (11), 294 - 300. (1992)
55. Rao P.K. et al. " TRANSDERMAL ABSORPTION OF NIFEDIPINE FROM MICROEMULSIONS OF LIPOPHILIC SKIN PENETRATION ENHANCERS " . Int J Pharm. 111, 235 - 240. (1994)
56. Foldvari M. " IN VITRO CUTANEOUS AND PERCUTANEOUS DELIVERY AND IN VIVO EFFICACY OF TETRACAINE FROM LIPOSOMAL AND CONVENTIONAL VEHICLES " . Pharm Res. 11 (11), 1593 - 1598 (1994)
57. Weiner N. et al. " FORMULATION FACTORS AFFECTING RELEASE OF DRUG FROM TOPICAL FORMULATIONS. I. EFFECT OF EMULSION TYPE UPON IN VITRO DELIVERY OF ETHYL P-AMINO BENZOATE " . J Pharm Sci. 83 (11), 1525 - 1528. (1994)
58. Weirich G.E. et al. " INFLUENCE OF FORMULATION FACTORS ON THE AVAILABILITY OF DRUGS FROM TOPICAL PREPARATIONS " . Pharm Acta Helv. 60 (8), 232 - 237. (1985)
59. Izumoto T. et al. " RELATIONSHIP BETWEEN THE TRANSFERENCE OF A DRUG FROM A TRANSDERMAL PATCH AND THE PHYSICO-CHEMICAL PROPERTIES " . Chem Pharm Bull 40 (2), 456 - 458. (1992)
60. Toutou E. et al. " CHIRAL B-BLOCKERS FOR TRANSDERMAL DELIVERY " . Int J Pharm. 104, 19 - 28. (1994)
61. Barry B. et al. " ABSORPTION THROUGH HUMAN SKIN OF IBUPROFEN AND FLURBIPROFEN: EFFECT OF DOSE VARIATION, DEPOSITED DRUG FILMS, OCCLUSION AND THE PENETRATION ENHANCER N-METHYL-2-PYRROLIDONE " . J Pharm Pharmacol. 37, 27 - 37. (1985)
62. Ogiso T. et al. " PERCUTANEOUS ABSORPTION OF CLONAZEPAM IN RABBIT " ; Chem. Pharm. Bull; 37, 442 - 445. (1989)
63. Sloan B.K.; et al. " TRANSDERMAL DELIVERY OF 5-FLUOROURACIL (5-FU) BY 1-ALKYL-CARBONYL-5-FU PRODRUGS " ; Int J Pharm. 129, 203 - 210. (1996)
64. Schirmer E. R. " MODERN METHODS OF PHARMACEUTICAL ANALYSIS " . Ed CRC Press Inc. USA, vol 3, (1990) . pp 2-58

65. A. C. Moffat Editor "CLARKE'S INSOLATION AND IDENTIFICATION OF DRUGS" The Pharmaceutical Press London 2nd edition (1986) pp 729-422
66. "THE MERCUR INDEX" , Susan Budavari Editor 12th Edition (1996) pp 1779, 5882, 7599
67. Martindale "THE EXTRAPHARMACOPEIA" 30th Edition, The Pharmaceutical Press, London, 1993, pp 889, 1347, 1368, 1424-1425
- 68 "VALIDACION DE METODOS ANALITICOS" Colegio Nacional de Quimicos Farmaceuticos Biologos, Mexico A.C
69. "FARMACOPEA DE LOS ESTADOS UNIDOS MEXICANOS" 6. Edicion 1994, pp 121
70. Mechkovski A. "THE VALIDATION OF ANALYTICAL PROCEDURES USED IN THE EXAMINATION OF PHARMACEUTICAL MATERIALS" WHO Pharm. 89(2), 1-8 (1990)
71. Sanford Bolton "PHARMACEUTICAL STATISTICS, Practical and Clinical Applications", vol 44 (1990), 2nd Edition, Marcel Dekker, New York, pp 398-335
72. "BRITISH PHARMACOPEIA 1993" vol II, pp A169, Printed for HMSO
73. Burt M.H. et al. "CRYSTAL DEFECTS AND DISSOLUTION" Int. J. Pharm. 9, 137-152, (1981)
74. Hendriksen B.A. "CHARACTERIZATION OF CALCIUM FENOPROFEN. I POWDER DISSOLUTION RATE AND DEGREE OF CRYSTALLINITY" Int. J. Pharm., 60, 243-252 (1990)
76. Ozil P. et al. "EXPERIMENTAL AN EFFICIENT TOOL FOR STUDYING THE STABILITY OF PARENTERAL NUTRITION" Int. J. Pharm. 42, 11-14 (1988)
- 77-Mongomery Douglas C "DESIGN AND ANALYSIS OF EXPERIMENTS" (1984) 2nd edition, John Wiley & Sons pp 325-356
- 78.-Sanford Bolton, "PHARMACEUTICAL STATISTICS, Practical and Clinical Applications" vol 44 (1990) 2nd edition, Marcel Dekker, New York pp 210-261
79. Bonkovsky H. L. et al. "PORPHYROGENIC PROPERTIES OF THE TERPENES CAMPHOR, PINENE, AND THUJONE", Biochem. Pharmacol. 43, 2359 - 2368, (1992)
80. Selifonov S.A. "MICROBIAL OXIDATION OF ADAMANTANONE BY PSEUDOMONAS PUTIDA CARRYING THE CAMPHOR CATABOLIC PLASMID", Biochem. Biophys. Res. Com., 186, pp 1429 - 1436, (1992)
81. Laude E.A. et al. " THE ANTITUSSIVE EFFECTS OF MENTHOL, CAMPHOR AND CINEOLE IN CONSCIOUS GUINEA-PIGS ", Pulmonary Pharmacol. " pp 179 - 184, (1994).
82. Eccles R., "MENTHOL AND RELATED COOLING COMPOUNDS " , J. Pharm. Pharmacol., 46, pp 61B - 630, (1994)