



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTILÁN

DESARROLLO DE UN SISTEMA NANOPARTICULADO
DE APLICACIÓN VAGINAL

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA
P R E S E N T A :
NELY GARCÍA GÓNZALEZ

ASESORES:

DRA. ELIZABETH PIÑÓN SEGUNDO

DR. DAVID QUINTANAR GUERRERO



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.



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

U. N. A. M.
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN
ASUNTO: **VOTOS APROBATORIOS**

**DRA. SUEMI RODRIGUEZ ROMO
DIRECTORA DE LA FES CUAUTITLAN
PRESENTE**



**ATN: L.A. ARACELI HERRERA HERNANDEZ
Jefa del Departamento de Exámenes
Profesionales de la FES Cuautitlán.**

Con base en el Art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la Tesis:

Desarrollo de un sistema nanoparticulado de aplicación vaginal.

Que presenta la pasante Nely García González

Con número de cuenta: 302250475 para obtener el título de:

Química Farmacéutica Bióloga

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cuautitlan Izcalli, Mex. a 5 de marzo de 2011.

PRESIDENTE DESS. Rodolfo Cruz Rodríguez

VOCAL Dra. Flora Adriana Ganem Rondero

SECRETARIO Dra. Elizabeth Piñón Segundo

1er SUPLENTE MC. Néstor Mendoza Muñoz

2º SUPLENTE QFB. Adriana Gil García

DEDICATORIAS

A mis padres: **Alejandra y Marcelo**; por su ejemplo, su apoyo incondicional, sus consejos y sobretodo por el amor y cariño que me brindaron. ¡Mi triunfo es suyo!.

A mis hermanos: **Edy, Miguel Angel, Laura y Marcelo**, por todos los momentos inolvidables que hemos compartido juntos.

A la **Dra. Elizabeth Piñón Segundo**; por compartir sus conocimientos, experiencia y asesorarme en esta tesis.

A la **Dra. Adriana Ganem** y al **Dr. David Quintanar** por haberme aceptado en el laboratorio de Posgrado en Farmacia.

A todos mis amigos de la generación 32 de Q. F. B. por compartir tantos momentos conmigo que significan algo muy importante en mi vida, por que se que cuento con ustedes en cualquier momento: **Evelin, Marisol, Rosalia, Nelly, Karla, Rosa Laura y Daniel**.

A la **FESC** y a todos los profesores por ser parte fundamental en mi formación como profesionista.

A la **UNAM** por formarme humana y profesionalmente a lo largo de estos últimos años. Gracias por darme la oportunidad de formar parte de esta institución

A **Freddy** por ser más que un amigo **te quiero mucho...**

ÍNDICE GENERAL

	Página	
I.	Lista de figuras.	IV
II	Lista de cuadros.	VI
III.	Lista de gráficos.	VII
IV.	Lista de abreviaturas.	IX
1.	INTRODUCCIÓN.	1
2.	MARCO TEÓRICO .	2
2.1	Anatomía del sistema genital femenino.	2
2.1.2	Órganos internos.	2
2.1.3	Órganos externos.	5
2.2	Infecciones ginecológicas.	7
2.3	Flora vaginal habitual.	8
2.4	Vaginitis.	8
2.4.1	Factores que predisponen a la vaginitis.	9
2.4.2	Tipos de vaginitis.	10
2.4.3	Síntomas generales de la inflamación del canal vaginal.	12
2.4.4	Tratamiento de la vaginitis.	14
2.4.5	Complicaciones de la vaginitis.	16
2.5	Sistemas farmacéuticos de aplicación vaginal.	16
2.5.1	Ventajas de la administración de fármacos vía vaginal.	18
2.5.2	Absorción del fármacos en la vagina.	18
2.5.3	Mecanismos de permeación de los principios activos en la vagina.	19
2.5.4	Los geles como sistemas de aplicación vaginal.	19
2.5.5	Nanopartículas de hidrogel "Nanogel".	20
2.6	Evaluación de la liberación del fármaco y de los estudios de permeabilidad.	21
2.6.1	Bioadhesión y mucoadhesión.	22
2.6.2	Mecanismos de bioadhesión.	25
2.6.3	Técnicas experimentales empleadas para la determinación de bioadhesión.	26
2.7	Nanopartículas.	27
2.7.1	Preparación de las nanopartículas.	29
2.7.2	Métodos de preparación.	30
2.7.3	Caracterización de las nanopartículas.	38
3.	OBJETIVOS.	41
4.	PARTE EXPERIMENTAL.	42
4.1	Polímero.	42
4.2	Estabilizante.	42
4.3	Principio activo	42
4.4	Reactivos en general	42
4.5	Membranas	43

4.6	Aparatos y equipos	43
4.7	Metodología.	44
4.7.1	Determinaciones previas	45
4.7.1.1	Espectros de absorción.	45
4.7.1.2	Curvas de calibración.	45
4.7.1.3	Determinación de la solubilidad del miconazol base y nitrato de miconazol.	45
4.7.2	Preparación de las nanopartículas por el método de emulsificación difusión por desplazamiento del solvente.	46
4.7.3	Caracterización de las nanopartículas.	48
4.7.3.1	Tamaño de partícula.	48
4.7.3.2	Determinación del PVAL residual en las nanopartículas de CAP.	48
4.7.3.3	Determinación de nitrato de miconazol y miconazol base en las nanopartículas de CAP.	49
4.7.3.4	Calorimetría diferencial de barrido.	49
4.7.3.5	Perfiles de liberación.	49
5.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	51
6.	CONCLUSIONES	88
7.	PERSPECTIVAS	89
8.	REFERENCIAS	90
9.	ANEXOS	97

I. LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Útero, trompas, ovario y vagina.	2
Figura 2. Esquema de la mucosa vaginal. 1: vasos capilares; 2: arteria; 3: vena.	4
Figura 3. Genitales externos. 1. clítoris; 2. uretra; 3. glándula de Skene; 4. himen; 5. Labios menores; 6. glandulas de Bartholin; 7. fosa navicular; 8. labios mayores; 9. monte de venus.	5
Figura 4. Cámara de Ussing.	22
Figura 5. Superficies presentes en una union bioadhesiva.	23
Figura 6. Representación esquemática de una nanocápsula y una nanoesferas.	28
Figura 7. Representación esquemática del método de “Emulsificación- evaporización” para preparar nanoesferas.	31
Figura 8. Representación esquemática del método de “Desplazamiento del solvente” para preparar nanoesferas y nanocápsulas.	33
Figura 9. Representación esquemática del método “Salting-out” para preparar nanoesferas.	35
Figura 10. Esquema del mecanismo de formación de las nanopartículas por el método de emulsificación- difusión.	37
Figura 11. Representación esquemática del método “Emulsificación- difusión” para preparar nanoesferas y nanocápsulas.	38
Figura 12. Representación esquemática del método “Emulsificación- difusión” para preparar nanoesferas y nanocápsulas.	47
Figura 13. Aparato empleado en la prueba de disolución. 1. Membrana de diálisis; 2. Medio de disolución; 3. Pipeta volumétrica; 4. Baño de agua a 37°C y 5. Parrilla con agitación.	50
Figura 14. Distribución del tamaño de partícula de nanopartículas de CAP (Lote 1).	55
Figura 15. Distribución del tamaño de partícula de nanopartículas de CAP (Lote 2).	55
Figura 16. Distribución del tamaño de partícula de nanopartículas de CAP (Lote 3).	56
Figura 17. Distribución del tamaño de partícula de nanopartículas de CAP (Lote 4).	56
Figura 18. Distribución del tamaño de partícula de nanopartículas de CAP (Lote 5).	57
Figura 19. Distribución del tamaño de partícula de nanopartículas de CAP (Lote 6).	57

		Página
Figura 20.	Distribución del tamaño de partícula de nanopartículas de CAP (Lote 7).	58
Figura 21	Termogramas para NE's de CAP con miconazol base. Porcentajes de miconazol base: lote 1, 0%, lote 2, 4.7%, lote 3, 9.0%, lote 4, 13.0%.	63
Figura 21 (b)	Termogramas para NE's de CAP con miconazol base, señalando la temperatura de transición vítrea (T_g) para los lotes y el CAP y el punto de fusión para el miconazol base. Porcentajes de miconazol base Lote 1, 0%, Lote 2, 4.7%, Lote 3, 9.0%, Lote 4, 13.0%.	64
Figura 22	Termogramas para NE's de CAP con nitrato de miconazol. Porcentajes de nitrato de miconazol: lote 5, 4.7%, lote 6, 9.0%, lote 7, 13.0%.	65
Figura 22 (b)	Termogramas para NE's de CAP con nitrato de miconazol, señalando la temperatura de transición vítrea (T_g) para los lotes y el CAP y el punto de fusión para el nitrato de miconazol. Porcentajes de miconazol base Lote 1, 0%, Lote 2, 4.7%, Lote 3, 9.0%, Lote 4, 13.0%.	66

II. LISTA DE CUADROS

	Página
Cuadro 1. Características, diagnóstico y tratamiento de las infecciones vaginales.	12
Cuadro 2. Principios activos y solubilidad para el tratamiento de la vaginitis de acuerdo al tipo de microorganismos que la produce.	14
Cuadro 3. Materiales y cantidades empleadas para la preparación de los lotes de nanopartículas por el método de Emulsificación-difusión.	47
Cuadro 4. Tamaño de partícula promedio para nanopartículas de CAP y de CAP con miconazol base y nitrato de miconazol.	54
Cuadro 5. Características de las nanoesferas de CAP (Porcentaje de miconazol base cargado en las nanoesferas, Porcentaje de PVAL residual y eficiencia de encapsulamiento).	61
Cuadro 6. Características de las nanoesferas de CAP (Porcentaje de nitrato de miconazol cargado en las nanoesferas, Porcentaje de PVAL residual y eficiencia de encapsulamiento).	62
Cuadro 7. Solubilidad del miconazol base y nitrato de miconazol.	68
Cuadro 8. Análisis de varianza con dos factores con una muestra por grupo para los perfiles de liberación a un pH de 4.5, tomando los porcentajes liberados a 45 min.	73
Cuadro 9. Análisis de varianza con dos factores con una muestra por grupo para los perfiles de liberación a un pH de 5.0, tomando los porcentajes liberados a 45 min.	76
Cuadro 10. Mecanismos de transporte y tipo de liberación de acuerdo al valor de “n” en el modelo semi-empírico de Peppas.	78
Cuadro 11. Coeficientes de determinación y valor de “n” de acuerdo al modelo de Peppas a un pH de 4.5, el tiempo que se reporta es el intervalo en el que se obtiene la máxima linealidad para el cálculo de los coeficientes.	80
Cuadro 12. Coeficientes de determinación y valor de “n” de acuerdo al modelo de Peppas a un pH de 5.0, el tiempo que se reporta es el intervalo en el que se obtiene la máxima linealidad para el cálculo de los coeficientes	81
Cuadro 13. Coeficientes de determinación y valor de K_H de acuerdo al modelo de Higuchi a un pH de 4.5, el tiempo que se reporta es el intervalo en el que se obtiene la máxima linealidad para el cálculo de los coeficientes.	84

	Página
Cuadro 14. Coeficientes de determinación y valor de K_H de acuerdo al modelo de Higuchi a un pH de 5.0, el tiempo que se reporta es el intervalo en el que se obtiene la máxima linealidad para el cálculo de los coeficientes.	85
Cuadro 15. Análisis de varianza con dos factores con una muestra por grupo para las constantes de Higuchi a pH 4.5.	86
Cuadro 16. Análisis de varianza con dos factores con una muestra por grupo para las constantes de Higuchi a pH 5.0.	86

III. LISTA DE GRÁFICOS

	Página
Gráfico 1. Comportamiento del tamaño de partícula.	58
Gráfico 2. Perfil de liberación para las NE's de CAP con miconazol base. En una solución amortiguadora de fosfatos pH = 4.5.	69
Gráfico 3. Perfil de liberación para las NE's de CAP con nitrato de miconazol. En una solución amortiguadora de fosfatos pH = 4.5	70
Gráfico 4. Perfil de liberación para las NE's de CAP con miconazol base. En una solución amortiguadora de fosfatos pH = 5.0.	70
Gráfico 5. Perfil de liberación para las NE's de CAP con nitrato de miconazol. En una solución amortiguadora de fosfatos pH =5.0.	71
Gráfico 6. Perfil de liberación para las NE's de CAP con miconazol base, considerando como 100 % la cantidad máxima liberada. En una solución amortiguadora de fosfatos pH = 4.5.	72
Gráfico 7. Perfil de liberación para las NE's de CAP con nitrato de miconazol, considerando como 100 % la cantidad máxima libera. En una solución amortiguadora de fosfatos pH = 4.5.	72
Gráfico 8. Perfil de liberación para las NE's de CAP con miconazol base, considerando como 100 % la cantidad máxima liberada. En una solución amortiguadora de fosfatos pH = 5.0.	74
Gráfico 9. Perfil de liberación para las NE's de CAP con nitrato de miconazol, considerando como 100 % la cantidad máxima libera. En una solución amortiguadora de fosfatos pH = 4.5.	75
Gráfico 10. Modelo de Peppas aplicado a la liberación de miconazol base a partir de NE's de CAP. En una solución amortiguadora de fosfatos pH = 4.5.	78
Gráfico 11. Modelo de Peppas aplicado a la liberación de nitrato de miconazol a partir de NE's de CAP. En una solución amortiguadora de fosfatos pH = 4.5.	79
Gráfico 12. Modelo de Peppas aplicado a la liberación de miconazol base a partir de NE's de CAP. En una solución amortiguadora de fosfatos pH = 5.0.	79
Gráfico 13. Modelo de Peppas aplicado a la liberación de nitrato de miconazol a partir de NE's de CAP. En una solución amortiguadora de fosfatos pH = 5.0.	80
Gráfico 14. Modelo de Higuchi aplicado a la liberación de miconazol base a partir de NE's de CAP. En una solución amortiguadora de fosfatos pH = 4.5.	82

	Página
Gráfico 15. Modelo de Higuchi aplicado a la liberación de nitrato de miconazol a partir de NE's de CAP. En una solución amortiguadora de fosfatos pH = 4.5.	83
Gráfico 16. Modelo de Higuchi aplicado a la liberación de miconazol base a partir de NE's de CAP. En una solución amortiguadora de fosfatos pH = 5.0	83
Gráfico 17. Modelo de Higuchi aplicado a la liberación de nitrato de miconazol a partir de NE's de CAP. En una solución amortiguadora de fosfatos pH = 5.0.	84

IV. LISTA DE ABREVIATURAS

b	Ordenada al origen
CAP	Acetato ftalato de celulosa
°C	Grados centígrados
cm	Centímetros
C.V.	Coeficiente de variación
d.e.	Desviación estándar
DSC	Calorimetría diferencial de barrido
E.E.	Eficiencia de encapsulamiento
H _i	Hipótesis alterna
H ₀	Hipótesis nula
I.P.	Índice de polidispersidad
K _H	Constante de Higuchi
K ₁	Constante de primer orden
M	Concentración molar
mg	Miligramos
min	Minutos
mL	Mililitros
mm	Milímetros
M _t	Cantidad de fármaco liberado al tiempo t
M _α	Cantidad de fármaco liberado al equilibrio
NE's	Nanoesferas
nm	Nanómetros
NP	Nanopartículas
o/w	Aceite en agua
PLA	Ácido poliláctico
PLGA	Ácido poliláctico co-glicólico
PVAL	Alcohol polivinílico
r ²	Coeficiente de determinación
t	Tiempo
T _g	Temperatura de transición vítrea
T	Temperatura
w/o/w	Agua en aceite en agua
µg	Microgramos
% p/v	Concentración en porcentaje peso/volumen
λ	Longitud de onda

1. INTRODUCCIÓN

El desarrollo de nanopartículas se ha convertido en un área de investigación importante en el campo de la administración de fármacos, ya que tiene la capacidad de suministrar una amplia gama de compuestos para las diferentes vías de administración por periodos prolongados.

Las nanopartículas pueden ser definidas como partículas coloidales sólidas con un tamaño submicrónico (entre 10 y 1000 nm). Están formadas generalmente por materiales macromoleculares biodegradables o no y pueden utilizarse como acarreadores de fármacos. Comparadas con otros acarreadores coloidales, las nanopartículas presentan una mayor estabilidad cuando están en contacto con fluidos biológicos y su naturaleza polimérica las hace susceptibles de convertirse en sistemas de liberación prolongada y controlada.

Las infecciones vaginales, en todo el mundo, representan un alto índice de consultas ginecológicas en la mayoría de las instituciones que prestan servicios de salud. Éstas pueden ser causadas por diversas entidades, desde bacterias aerobias y anaerobias, hongos, virus y parásitos, algunos de éstos pueden o no ser transmitidos sexualmente. Por lo anterior, se debe dar atención especial a dicha problemática ya que afecta a mujeres de todas las edades y ámbitos económicos y socio-culturales. También es importante verificar la aparición de los síntomas que ponen de manifiesto la inflamación del canal vaginal: irritación, sensación de quemazón, prurito, exceso de flujo o leucorrea con señales de sangre y mal olor, en muchas ocasiones, hinchazón de los genitales externos y dolor.

En este proyecto experimental se propone el diseño de un sistema terapéutico nanoparticulado que pueda ser aplicado vaginalmente y que ayude a disminuir los procesos de vaginitis. Las nanopartículas serán obtenidas por el método de emulsificación-difusión.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 ANATOMÍA DEL SISTEMA GENITAL FEMENINO

El sistema genital femenino está conformado por órganos internos y externos. Los primeros se conforman de ovarios, trompas uterinas, útero y vagina. Los segundos están conformados por la vulva junto con sus órganos anexos [Tortora, G. 2003].

2.1.2 ÓRGANOS INTERNOS

Los órganos internos que integran el aparato reproductor femenino son el ovario, trompa uterina, útero y vagina, como se muestra en la figura 1.

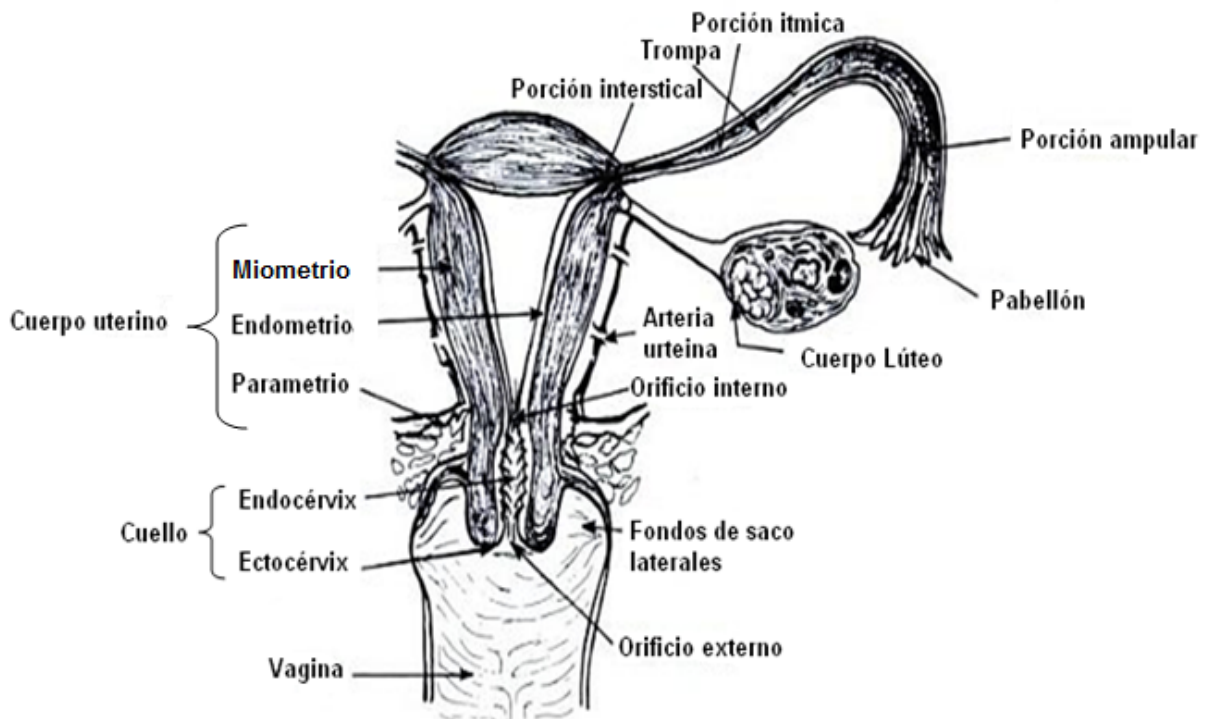


Figura 1. Útero, trompas, ovario y vagina [Tomada de González-Merlo, J. *et. al.* 2003].

- **OVARIO**

Glándula sexual femenina que por su secreción interna (endócrina) asegura los caracteres de la feminidad y por su secreción externa elabora los ovocitos primarios y secundarios, células genitales femeninas. Tiene forma ovoide, algo aplastada. Con una longitud de 2.5 a 4.5 cm y un espesor de 0.5 a 1 cm [Latarjet, M. 2005].

Son de color rosa pálido en la niña y rosado en la mujer adulta, alcanzan un peso de 8 gramos en estado de reposo, pero disminuye hasta 2 gramos después del período menstrual.

- **TROMPA UTERINA**

También llamada trompa de Falopio u oviducto, es un conducto bilateral, extendido desde la extremidad tubárica del ovario (lateralmente), hasta el cuerpo del útero (medialmente). Este conducto muscular, tapizado por una mucosa, conduce al ovocito hasta la cavidad uterina. Tiene una longitud de 10 a 12 cm [Tortora, G. 2003].

- **ÚTERO**

También llamado matriz, es un órgano muscular, hueco, se encuentra tapizado por una mucosa, destinado a recibir el huevo fecundado, alberga el feto durante la gestación y lo expulsa en el momento del parto. Tiene una forma de cono aplanado de adelante hacia atrás. El cuerpo del útero, está constituido de una cara vesical, cara intestinal, fondo del útero y dos bordes laterales. El istmo del útero se encuentra entre el cuerpo y el cuello del útero, su longitud es de 1 cm [Latarjet, M. 2005].

- **VAGINA**

Es un órgano tubular, músculomembranoso que se extiende desde el cuello uterino hacia el vestíbulo vaginal, conducto que pone en comunicación la cavidad uterina con la vulva; la vagina tiene una longitud que oscila entre 8 y 12 cm, con funciones relacionados con la

cópula, la concepción y la menstruación. La superficie interna es rugosa, por la presencia de pliegues longitudinales y transversales, formados por cúmulos de tejido elástico que permiten al órgano su gran extensibilidad.

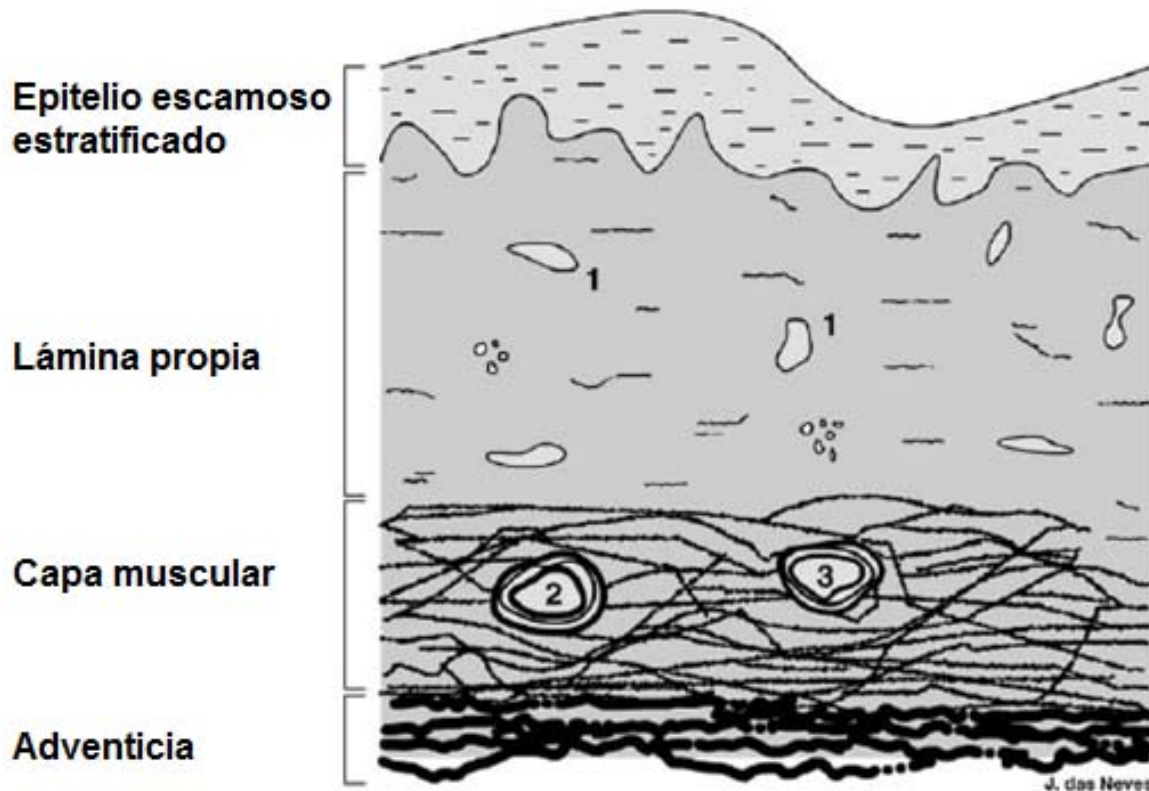


Figura 2. Esquema de la mucosa vaginal. 1: vasos capilares; 2: arteria; 3: vena [Modificada de Das Neves, J. y Bahia, M.F., 2006].

Histológicamente la vagina está compuesta por cuatro capas distintas: epitelio escamoso estratificado, lámina propia, capa muscular y adventicia; su estructura se presenta en la figura 2. La capa de la mucosa forma una serie de pliegues transversales que aumentan la superficie; esta capa de moco tiene importantes funciones fisiológicas ya que juega un papel muy importante en la absorción del fármaco [Das Neves, J. y Bahia, M.F., 2006].

2.1.3 ÓRGANOS EXTERNOS

Los órganos genitales externos o vulva están compuestos por las formaciones que se presentan en la figura 3.

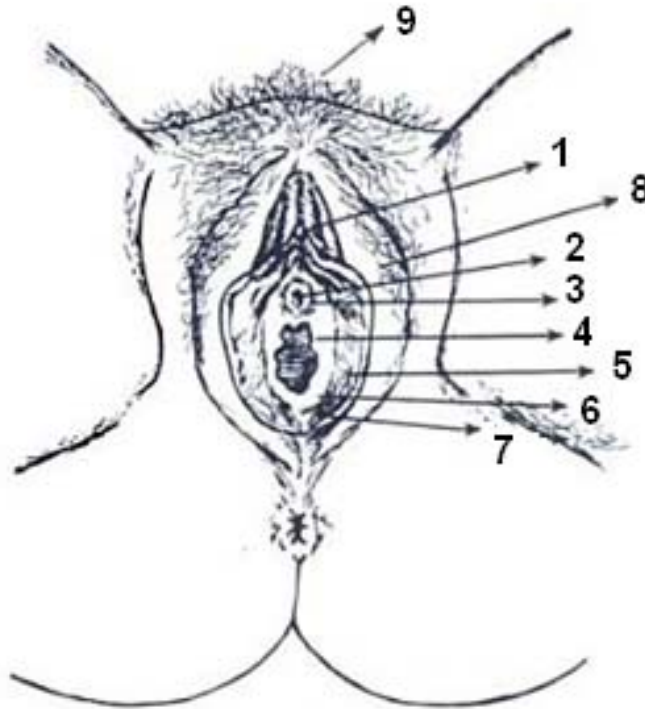


Figura 3. Genitales externos. 1. clítoris; 2. uretra; 3. glándula de Skene; 4. himen; 5. labios menores; 6. glándulas de Bartholin; 7. fosa navicular; 8. labios mayores; 9. monte de venus [Tomada de González-Merlo, J., *et. al.* 2003].

- **LABIOS MAYORES**

Están formados por dos salientes o pliegues cutáneos que rodean la terminación inferior de la vagina. Por delante se continúan con el monte de Venus, y por atrás se fusionan entre sí. Histológicamente están formados por un tejido cutáneo con glándulas sebáceas, sudoríparas y folículo piloso. El vello es menos abundante que en el monte de Venus, particularmente en la cara interna de los labios mayores [González-Merlo, J., *et. al.* 2006].

- **LABIOS MENORES O NINFAS**

Constituyen dos pliegues cutáneos situados por dentro de los labios mayores. Por delante se originan por debajo de los labios mayores y forman un desdoblamiento que engloba al clítoris. Histológicamente está constituido por un epitelio plano estratificado, que contiene numerosos salientes y surcos, los cuales hacen la superficie muy irregular. Carecen de folículos pilosos pero, en cambio, contienen abundantes glándulas sebáceas [González-Merlo, J., *et. al.* 2006].

- **MONTE DE VENUS**

Tiene una forma triangular con base superior que se relaciona con el hipogastrio y con un vértice que termina en los labios mayores. Por lo tanto, está situado sobre la sínfisis del pubis y constituido por la piel, provisto de vello a partir de la pubertad y con glándulas sebáceas y sudoríparas [González-Merlo, J., *et. al.* 2006].

- **HIMEN**

Es una membrana cutaneomucosal que cierra la extremidad inferior de la vagina. Tiene morfología variable, en forma de media luna, circular cribiforme [González-Merlo, J., *et. al.* 2006].

- **GLANDULAS DE BARTHOLIN**

Son dos glándulas secretoras, cuyo epitelio glandular está constituido por células cilíndricas productoras de moco [González-Merlo, J., *et. al.* 2006].

- **CLÍTORIS**

Es un órgano eréctil, muy vascularizado y con abundantes terminaciones nerviosas, su longitud habitualmente es inferior a 2 cm [González-Merlo, J., *et. al.* 2006].

2.2 INFECCIONES GINECOLÓGICAS

Las infecciones vaginales, en todo el mundo, representan un alto índice de consultas ginecológicas en la mayoría de las instituciones que prestan servicios de salud. Éstas pueden ser causadas por diversas entidades, por ejemplo, bacterias aerobias y anaerobias, hongos, virus y parásitos, algunos de éstos pueden o no ser transmitidos sexualmente. Por lo anterior, se debe dar atención especial a dicha problemática ya que afecta a mujeres de todas las edades y ámbitos económicos y socio-culturales. También es importante verificar la aparición de los síntomas que ponen de manifiesto la inflamación del canal vaginal: irritación, sensación de quemazón, prurito, exceso de flujo o leucorrea con señales de sangre y mal olor y, en muchas ocasiones, hinchazón de los genitales externos y dolor.

Las lesiones inflamatorias pueden tener el siguiente origen:

- **Infecioso:** *Escherichia coli*, *Gardnerella* o *Haemophilus vaginalis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Estafilococos*, *Estreptococos*, *Ureaplasma*, *Urealyticum*, *Chlamidia trachomatis*, etc.
- **Parasitario:** *Trichomona vaginalis*.
- **Viral:** Virus herpético, virus del papiloma humano y otros.
- **Micótico:** *Candida albicans* o *Monilia*.
- **Trófico:** Vaginitis senil.
- **Traumático:** Cuerpos extraños y violaciones [López, I., 1999].

La vagina puede sufrir una serie de agresiones, ya que ésta es húmeda y caliente, pero dispone de mecanismos de defensa ante estas agresiones. Por ejemplo, la presencia de *Lactobacillus*, que producen un pH ácido que inhibe el desarrollo de gérmenes patógenos y la presencia de inmunoglobulinas, específicamente la IgA secretora [López, I., 1999].

2.3 FLORA VAGINAL HABITUAL

La flora vaginal normal es un ecosistema dinámico que puede alterarse con facilidad. Las secreciones vaginales tienen una composición que incluye moco cervical y secreciones transudadas a través de la pared vaginal; su cantidad varía con la edad, la fase del ciclo menstrual, la excitación y la actividad sexual, los anticonceptivos, embarazo, frecuencia y estado emocional.

Las secreciones vaginales normales se caracterizan por ser:

- Inodoras.
- Claras o blancas.
- Viscosas.
- Homogéneas o algo floculentas con elementos aglutinados.
- pH ácido (< 4.5).
- No fluyen durante el examen del espéculo.
- Sin neutrófilos polimorfonucleares [Caballero, R., 2000].

Los microorganismos saprófitos más comunes que se encuentran en el canal vaginal son: *Lactobacillus spp.*, *Staphylococcus epidermidis*, *Difteroides*, cocos grampositivos anaerobios, *Bacteroides*.

Los microorganismos patógenos oportunistas que se pueden encontrar a nivel de la vagina son: *Streptococcus agalactie*, *Gardnerella vaginalis*, *Escherichia coli*, y otras enterobacterias [Padilla, M., 1997].

2.4 VAGINITIS

El término “vaginitis” viene del latín *vagina-ae*, *itis* que quiere decir inflamación de la vagina o infección vaginal (irritación o hinchazón). Es una de las infecciones genitales más comunes en la consulta general o ginecológica, así como en clínicas de perinatología y de transmisión sexual. La vaginitis se ha relacionado con riesgos de complicaciones durante la

gestación y de parto pretérmino, y aumenta el riesgo de enfermedad inflamatoria pélvica. Es causada por *Trichomonas vaginalis*, *Candida spp.*, entre otras, generando una alteración de la flora vaginal habitual, provocando la desaparición o disminución de *Lactobacillus spp.* y un incremento de bacterias principalmente anaerobias como *Bacteroides spp.*, *Mobiluncus spp.*, *Peptostreptococcus spp.*, en ocasiones *Mycoplasma hominis* y *Gardenella vaginalis* [Ángeles, M. E., 2008].

2.4.1 FACTORES QUE PREDISPONEN LA VAGINITIS

Se pueden clasificar como exógenos y endógenos (Kinghorn y Mendling). Entre los exógenos se encuentran:

- a) Locales: prendas ajustadas, ropa interior sintética (favorecen la piel caliente y húmeda), obesidad, poca higiene, aerosoles y desodorantes vaginales, anticonceptivos orales, dispositivos intrauterinos, diafragma y duchas vaginales.
- b) Antibióticos: ya que disminuyen las bacterias comensales normales.
- c) Radiaciones.
- d) Inmunosupresores y citostáticos.
- e) Gestágenos y corticoides.
- f) Dieta rica en hidratos de carbono.
- g) Algunos factores que predisponen a la mujer en edad fértil a estas enfermedades son los tratamientos hormonales, debido a que modifican la consistencia del moco cervical y el pH. El uso de dispositivos intrauterinos y duchas vaginales.

Entre los endógenos se encuentran:

- a) Enfermedades metabólicas: la diabetes, la anemia ferropénica, hipo e hipertiroidismo, Cushing y Addison.
- b) Embarazo: más durante el tercer trimestre por el incremento de glucógeno debido a los niveles hormonales aumentados.
- c) Enfermedades crónicas y VIH [Padilla, M., 1997].

2.4.2 TIPOS DE VAGINITIS

- a) Vaginitis bacteriana.
- b) Vaginitis candidiática.
- c) Vaginitis por trichomoniasis.
- d) Vaginitis gonocócica.
- e) Vaginitis por *Clamidia*.
- f) Vaginitis viral.
- g) Vaginitis no infecciosa.

a) Vaginitis bacteriana

Es una alteración en el ecosistema bacteriano de la vagina, con sobrecrecimiento de la *Gardnerella vaginalis*, junto con bacterias anaerobias y disminución de *Lactobacillus*.

Gardnerella vaginalis es la causa más común de infección vaginal (40-50% de los casos) en mujeres en edad reproductiva, en un tiempo fue llamada como vaginitis inespecífica, pero Gardner y Dukes en 1955 fueron los primeros en señalar la relación existente entre *Gardnerella vaginalis* y la vaginitis inespecífica. La vaginitis inespecífica es el resultado de la proliferación masiva que incluye *Peptostreptococcus*, especies de *Bacteroides*, *Mycoplasmas* y *Mobiluncus* [Velázquez, C. y Arita, J., 2000].

b) Vaginitis candidiática

Es causada por un hongo levaduriforme que vive generalmente en la vagina llamado *Candida albicans*. Es una de las vaginitis que es común aislar en las mujeres de edad reproductiva, se desconoce el curso normal de la colonización asintomática [Olmos, S., 1998].

c) Vaginitis por trichomoniasis

El agente etiológico es un protozoo de ciclo directo y metabolismo anaerobio, que ocasiona en la mujer una enfermedad con un amplio rango de manifestaciones clínicas: desde casos asintomáticos (40%), pasando por signos y síntomas leves, como flujo vaginal, prurito vulvar, disuria y vaginitis; hasta situaciones más graves que cursan con la invasión de los conductos genitourinarios, glándulas de Bartholin, trompas de Falopio, glándulas de Skene o vejiga, colonización del parénquima, e infertilidad. Las mujeres infectadas durante el embarazo están expuestas a síndromes de ruptura prematura de las membranas placentarias y partos prematuros de bajo peso. En el varón, la infección es asintomática en el 50% de los casos; o bien, se manifiesta prostatitis, uretritis, e incluso puede llegar a ocasionar infertilidad transitoria [Nogal, J., 1999]. Fundamentalmente se contagia por transmisión sexual.

d) Vaginitis gonocócica

La vaginitis también puede ser provocada por la bacteria *Neisseria gonorrhoeae* (*N. gonorrhoeae*), la misma bacteria que causa la enfermedad de transmisión sexual conocida como gonorrea [López, I., 1999].

a) Vaginitis por *Clamidia*

La clamidia, que es provocada por la bacteria *Chlamydia trachomatis*, existe en varias cepas diferentes. Esta forma de vaginitis es la más diagnosticada en mujeres jóvenes de entre 18 y 35 años de edad que tienen muchas parejas sexuales [López, I., 1999].

b) Vaginitis viral

Los virus son una causa común de la vaginitis y la mayoría se propaga a través del contacto sexual como el virus herpes simplex (sus siglas en inglés son HSV, o simplemente herpes) que tiene como síntoma principal el dolor en la región genital vinculado a lesiones y llagas y el virus papiloma humano (sus siglas en inglés son HPV), virus que también se transmite

a través del contacto sexual y que provoca verrugas dolorosas que crecen en la vagina, en el recto, en la vulva o en la ingle.

c) Vaginitis no infecciosa

La vaginitis no infecciosa por lo general se refiere a las irritaciones vaginales sin infección. Con frecuencia, la irritación se debe a una reacción alérgica a pulverizaciones y duchas vaginales o productos espermicidas. La vaginitis no infecciosa también puede ser provocada por la sensibilidad a los jabones, los detergentes o los suavizantes perfumados.

2.4.3 SÍNTOMAS GENERALES DE LA INFLAMACIÓN DEL CANAL VAGINAL

Estos síntomas son: irritación, sensación de quemazón, prurito, exceso de flujo o leucorrea con señales de sangre y mal olor en muchas ocasiones, hinchazón de los genitales externos y dolor. Dependiendo del microorganismo que produzca los síntomas que se presenten van a ser diferentes, esta información se incluye en el cuadro 1.

Cuadro 1. Características, diagnóstico y tratamiento de las infecciones vaginales [Modificado de Latarjet, M. 2005].

Diagnóstico	Vagina normal	Vulvovaginitis	Vaginitis	
Flora microbiana	<i>Lactobacillus spp.</i>	Por <i>Candida</i> también por otras levaduras.	<i>Gardenella vaginalis</i> , <i>Mycoplasmas y anaerobios.</i>	<i>Trichomonas vaginalis.</i>
Síntomas	Ninguno	Irritación y prurito vulvar, leucorrea.	Leucorrea maloliente y abundante.	Leucorrea con un aspecto purulento y homogéneo de baja viscosidad.
Exudado vaginal	Claro o blanco flocular no Homogéneo.	Blanco en agregados diferentes.	Blanco a grisáceo Homogéneo.	Blanco a verdoso.
pH de exudado	Menor a 4.5	Menor a 4.5	Mayor o igual a 4.5	Mayor a 4.5

Cuadro 1. (Continuación). Características, diagnóstico y tratamiento de las infecciones vaginales [Modificado de Latarjet, M. 2005].

Diagnóstico	Vagina normal	Vulvovaginitis	Vaginitis	
Olor a aminas con KOH al 10%	No	No	Siempre	Débil olor a aminas.
Examen microscópico	Células epiteliales, predominan los <i>Lactobacillus</i> .	Leucocitos, células epiteliales, levaduras en un 80%.	<i>Lactobacillus</i> , flora mixta.	Gran número de leucocitos y <i>Trichomonas</i> .
Tratamiento	No	Aplicaciones locales de agentes antifúngicos Nistatina, Clotrimazol o Miconazol	Metronidazol y tinidazoles.	Metronidazol.

El término vulvovaginitis es designado a cualquier proceso inflamatorio de la vagina y de la vulva que, fundamentalmente, se manifiesta por leucorrea, prurito y/o dispareunia [López, N., 2010].

El término “vaginosis” se refiere al hecho de que la vaginitis bacteriana no resulta en un proceso inflamatorio verdadero ya que no existe migración de glóbulos blancos, enrojecimiento o hinchazón de la vagina [López, N., 2010].

El término “bacteriana” se refiere al crecimiento exagerado de bacterias. Cuando la infección vaginal se extiende hasta el cuello uterino entonces se denomina cérvico vaginitis [López, N., 2010].

La leucorrea o colporeea vaginal, es el síntoma principal de la cérvico vaginitis y es producto de la exudación patológica de los genitales, que no es sino la exageración de un proceso fisiológico de los genitales, aunque el término leucorrea significa colporeea (blanco), las características y el color puede variar de acuerdo a la causa [López, N., 2010].

2.4.4 TRATAMIENTO DE LA VAGINITIS

El principal objetivo del tratamiento es eliminar las manifestaciones y signos de la infección vaginal; por tanto, toda mujer con sintomatología requiere de tratamiento. En el cuadro 2, se agrupa los diferentes tratamientos que existen de acuerdo al tipo de vaginitis que se presentan.

Cuadro 2. Principios activos y solubilidad para el tratamiento de la vaginitis de acuerdo al tipo de microorganismos que la produce [Clarke's, 2004; <http://w20.ssaver.gob.mx>].

Agente Causal	Tratamiento (principio activo)	Solubilidad	Presentación	Contenido de principio activo	Nivel de acción
Bacterias	Metronidazol	Soluble 1:100 de agua, 1:200 de etanol y 1:250 de cloroformo, soluble en ácidos diluidos, ligeramente soluble en éter.	Tabletas orales	500 mg	Sistémico
			Ampolletas	200 mg	Sistémico
			Suspensión	250 mg en 5 ml	Sistémico
			Óvulos	500 mg	Local
			Gel	0.75%	Local
	Clindamicina	Soluble 1:2 de agua y 1:200 de etanol, soluble en metanol y muy poco soluble en cloroformo.	Crema vaginal	2%	Local
Tabletas orales			300 mg	Sistémico	
Óvulos			100 mg	Local	
Hongos o levaduras	Clotrimazol	Poco soluble en agua, benceno y tolueno, soluble en etanol, acetona, cloroformo y acetato de etilo, ligeramente soluble en éter.	Tabletas vaginales	100 mg	Local
			Crema vaginal	1%	Local
			Tabletas vaginales	500 mg	Local

Cuadro 2. (Continuación). Principios activos y solubilidad para el tratamiento de la vaginitis de acuerdo al tipo de microorganismos que la produce [Clarke's ,2004; <http://w20.ssaver.gob.mx>].

Agente Causal	Tratamiento (principio activo)	Solubilidad	Presentación	Contenido de principio activo	Nivel de acción
Hongos o levaduras	Miconazol	Poco soluble en agua, soluble en cloroformo y en la mayoría de los disolventes orgánicos.	crema	2%	
			Supositorios vaginales		Local
	Nistatina	Soluble en agua, poco soluble en etanol, insoluble en éter y cloroformo.	Tabletas vaginales	100000 UI	Local
			Crema	2%	Local
	Fluconazol	Ligeramente soluble en agua y solución salina.	Tabletas orales	100, 150 y 200 mg	Sistémico
	Butoconazol	Insoluble en agua, soluble en acetona y poco soluble en metanol.	Crema vaginal	2%	Local
Ketoconazol	Insoluble en agua, 1:2 de cloroformo y 1:9 de metanol, muy poco soluble en éter.	Óvulos	400 mg	Local	
Parásitos	Tinidazol	Insoluble en agua, soluble en acetona, poco soluble en metanol.	Tabletas orales	500mg	Sistémico
	Metronidazol	Soluble 1:100 de agua, 1:200 de etanol y 1:250 de cloroformo, soluble en ácidos diluidos, ligeramente soluble en éter.	Tabletas orales	500 mg	Sistémico
			Ampolletas	200 mg	Sistémico
			Suspensión	250 mg en 5 ml	Sistémico
			Óvulos	500 mg	Local
Gel	0.75%	Local			

2.4.5 COMPLICACIONES DE LA VAGINITIS

Las infecciones del tracto genital femenino que no son tratadas de manera acertada o que no reciban tratamiento pueden presentar las siguientes complicaciones:

- a) Enfermedad pélvica inflamatoria.
- b) Infección diseminada.
- c) Infertilidad.
- d) Embarazo ectópico.
- e) Incremento de riesgo de reinfección.
- f) Dolor pélvico crónico [López, N., 2010].

2.5 SISTEMAS FARMACEUTICOS DE APLICACIÓN VAGINAL

La vagina se ha utilizado como una vía de administración de fármacos durante mucho tiempo, tradicionalmente con el fin de obtener un efecto farmacológico local. Los sistemas de aplicación vaginal incluyen una gran variedad de formas farmacéuticas: tabletas, cápsulas, óvulos, formas semi-sólidas, soluciones, espumas, anillos vaginales, pesarios y tampones. Las formas farmacéuticas más utilizadas son las semi-sólidas como son cremas, pomadas, ungüentos y geles. La pared vaginal es muy adecuada para la absorción de fármacos de uso sistémico, ya que contiene una amplia red de vasos sanguíneos [Das-Neves, J. y Bahia, M.F., 2006].

Un fármaco administrado por vía vaginal, para ejercer un efecto local o sistémico, debe poseer al menos cierto grado de solubilidad en el flujo vaginal. Por lo tanto, es importante tener en cuenta la naturaleza del flujo vaginal y en particular, las características del flujo vaginal que pueden afectar la absorción del fármaco [Touitou, E., y Barry B., 2007].

A continuación se muestran las definiciones de algunas formas farmacéuticas semisólidas que se puedan usar vaginalmente. Estas definiciones se incluyen en la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos, Tomó I, 7° ed., [2000].

- **Crema:** preparación líquida o semisólida que contiene el o los principios activos y aditivos necesarios para obtener una emulsión, generalmente aceite en agua, con un contenido de agua superior al 20%.
- **Gel:** preparación semisólida que contiene el o los principios activos y aditivos sólidos en un líquido que puede ser agua, alcohol o aceite, de tal manera que se forma una red de partículas atrapadas en una fase líquida.
- **Ungüento o pomada:** preparación de consistencia blanda que contiene el o los principios activos y aditivos incorporados a una base apropiada que le da masa y consistencia. Se adhiere y aplica en la piel y mucosas. Esta base puede ser liposoluble o hidrosoluble, generalmente es anhidra o con un máximo de 20 % de agua. También se denomina unguento hidrofílico cuando contiene una base lavable o removible con agua.
- **Pasta:** forma semisólida que contiene el o los principios activos y aditivos, hecha a base de una alta concentración de polvos insoluble (20 a 50 %), en bases grasas o acuosas, absorbentes o abrasivas débiles combinados con jabones.
- **Espuma:** preparación semisólida constituida por dos fases; una líquida que lleva a los principios activos y aditivos y otra gaseosa que lleva gas propulsor para que el producto salga en forma de nube.
- **Jalea:** coloide semisólido que contiene el o los principios activos y aditivos, cuya base hidrosoluble por lo general está constituido por gomas como la tragacanto.

El sistema ideal de aplicación vaginal para la administración de fármacos debe de ser discreto, fácil de usar, no causar dolor, de bajo costo, ampliamente disponible, seguro para la administración continua, no matar la flora bacteriana normal, y obtener alta biodisponibilidad con respecto a otros medicamentos [Das-Neves, J. y Bahia, M.F., 2006].

2.5.1 VENTAJAS DE LA ADMINISTRACIÓN DE FÁRMACOS VÍA VAGINAL:

- Evitan el efecto del primer paso del metabolismo hepático.
- Disminuye los efectos secundarios como irritación de la mucosa gástrica.
- Se puede tener un efecto local o sistémico.
- Fácil administración.
- Bajos costos [Das-Neves, J. y Bahia, M.F., 2006].

2.5.2 ABSORCIÓN DEL FÁRMACO EN LA VAGINA

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

La absorción sistémica de los fármacos a través del epitelio vaginal consiste en una serie de pasos bien definidos:

1. La liberación del fármaco desde el sistema de entrega.
2. Disolución del fármaco en el fluido vaginal.
3. La absorción del fármaco a través del epitelio vaginal.

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

La absorción local de los fármacos a través del epitelio vaginal consiste en:

1. La liberación del fármaco.
2. La disolución y la entrega a lo largo del espacio vaginal.

La secuencia de eventos que conducen a la absorción de un principio activo administrado por vía vaginal depende, en parte, de la naturaleza del sistema de prestación que se

emplea; es decir, sólido o semisólido, hinchables o erosionable, soluble o insoluble, liberación inmediata o controlada [Touitou, E., y Barry B., 2007].

2.5.3 MECANISMO DE PERMEACIÓN DE LOS PRINCIPIOS ACTIVOS EN LA VAGINA

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

2.5.4 LOS GELES COMO SISTEMAS DE APLICACIÓN VAGINAL

Los geles son matrices poliméricas tridimensionales que incluyen pequeñas cantidades de sólidos, dispersos en, relativamente, grandes cantidades de líquido; sin embargo, poseen un carácter más sólido; los geles son capaces de hincharse en contacto con agua y extenderse sobre la superficie de moco vaginal. Su afinidad para absorber el agua se atribuye a la presencia de grupos hidrofílicos tales como: $-OH$, $-CONH-$, $-CONH_2-$, y SO_3H que forman la estructuras del polímero. Debido a la contribución de estos grupos y dominios de la red, el polímero es hidratado en diferentes grados (a veces, más del 90% en peso) dependiendo de la naturaleza del medio acuoso y la composición del polímero. Sin embargo, las redes poliméricas hidrofóbicas (por ejemplo, el ácido poliláctico (PLA) o poliláctico-có-glicólido (PLGA)) tienen un limitada capacidad de absorción de agua (<5-10%).

Su alto contenido de agua de un hidrogel es una característica fisicoquímica que los hace únicos, los geles tienen más propiedades físicas parecidas a los tejidos vivos que cualquier otra clase de biomateriales sintéticos: contenido algido, consistencia blanda y su tensión interfacial [Mehrdad, H., Amir, A., y Pedram, R., 2008].

Estos sistemas se han utilizado y están recibiendo un gran interés como sistemas de aplicación vaginal. Los geles son versátiles y han sido utilizados como sistemas de entrega de microbicidas, anticonceptivos, inductores de trabajo de parto, y otras sustancias. La caracterización de geles farmacéuticos vaginales es un paso importante para optimizar la

seguridad, eficacia y aceptabilidad. De hecho, la simple formulación de un gel puede dar lugar a perfiles de liberación diferentes para sistemas que contienen la misma cantidad de sustancia activa [Das-Neves, J. y Bahia, M.F., 2006].

Los geles de aplicación vaginal presentan ventajas tales como:

- Mayor biodisponibilidad.
- Mayor seguridad.
- Versatilidad y bajo costo.

2.5.5 NANOPARTÍCULAS DE HIDROGEL “NANOGELES”

Como una familia de partículas de materiales a nanoescala, las nanopartículas de hidrogel (recientemente denominado nanogeles) han sido el punto de convergencia de una enorme suma de esfuerzos y estudios dedicados a estos sistemas para la administración de fármacos. Resulta interesante la combinación de las características de un hidrogel con las características de las nanopartículas para la administración de fármacos.

Características de hidrogel:

- Hidrofilicidad.
- Flexibilidad.
- Versatilidad.
- Alta absorción de agua.
- Biocompatibilidad.

Características de las nanopartículas:

- Presentan una mayor estabilidad cuando están en contacto con fluidos biológicos en relación con otros sistemas coloidales como los liposomas.
- Sistemas de liberación prolongada y controlada.
- La posibilidad de ser activa o pasivamente dirigida a órganos diana.

El objetivo de la combinación de estos sistemas es la fabricación de dispositivos a escala manométrica, en donde el fármaco se libere de forma menos invasiva y tóxica para los tejidos y que además el efecto terapéutico dure por más tiempo [Mehrdad H., Amir A. Pedram R., 2008].

2.6 EVALUACIÓN DE LA LIBERACIÓN DEL FÁRMACO Y LOS ESTUDIOS DE PERMEABILIDAD

En la industria farmacéutica, la evaluación de la liberación del fármaco es muy importante en el desarrollo de fármacos y el control de calidad. La elección correcta del método *in vitro* no necesariamente puede imitar muy de cerca el medio ambiente vivo, pero se debe probar el rendimiento de la formulación. Por lo tanto, el método de difusión celular de Franz es generalmente considerado como uno de los más apropiados para evaluar la liberación de fármaco *in vitro* de geles de uso vaginal (Siewert, M., *et al.*, 2003).

A una formulación de gel se tiene que evaluar el pH y la osmolaridad ya que afectan la difusión y la permeabilidad del fármaco administrado a través del gel y el moco vaginal.

Para geles vaginales destinados a lograr una absorción sistémica también deben ser realizadas las pruebas de permeabilidad. La mucosa vaginal de humanos y animales se ha utilizado como modelos para el estudio *in vivo* de la permeabilidad. Aunque la mucosa vaginal porcina, se consideran apropiada para evaluar el grado de absorción a través de la pared vaginal, en estos estudios realizados no siempre la permeabilidad es muy cercana con muestras humanas. Cuando se utiliza mucosa vaginal humana, se debe de realizar un tratamiento adecuado de las muestras, a fin de obtener resultados de permeabilidad coherentes y homogéneos. Una técnica propuesta es la cámara de Ussing que ha mostrado que esta técnica puede ser útil en los estudios de permeabilidad vaginal [Das-Neves, J. y Bahia, M.F., 2006].

La cámara de Ussing, consiste en dos piezas plásticas separadas que permiten colocar, entre ambas, un epitelio aislado y crear dos compartimientos como se muestra en la figura 4. Por medio de los electrodos se puede medir la diferencia de potencial entre

ambas caras y por los agujeros (A y B) introducir sustancias y retirar muestras. La cámara de Ussing mide con facilidad la diferencia de potencial eléctrico, la resistencia eléctrica, los flujos de agua y de solutos y cómo estos son modificados por los agentes físicos, los fármacos y las hormonas. [<http://fundabiomed.fcs.uc.edu.ve/cap41.pdf>]

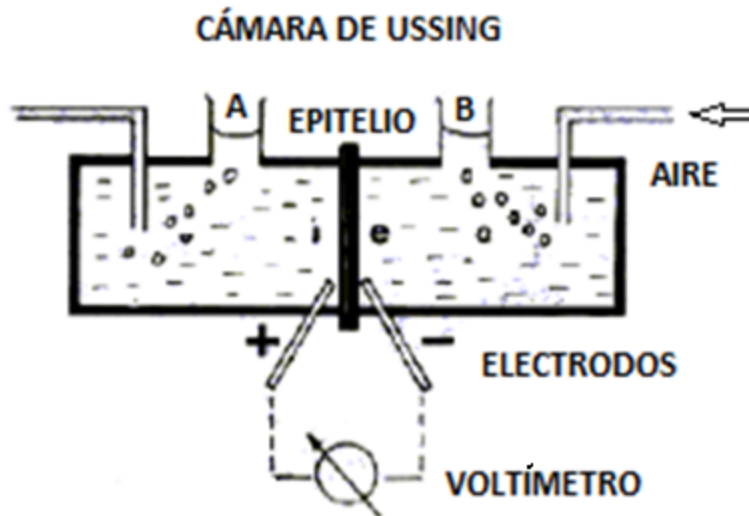


Figura 4. Cámara de Ussing [Tomada de <http://fundabiomed.fcs.uc.edu.ve/cap41.pdf>]

2.6.1 BIOADHESIÓN Y MUCOADHESIÓN

Se conoce por bioadhesión la unión de polímeros sintéticos o naturales a un sustrato biológico como se muestra en la figura 5, este proceso sólo tiene lugar en presencia de agua. Si ese sustrato es mucoso hablamos de mucoadhesión. La adhesión entre el polímero y la mucosa se establece mediante mecanismos termodinámicos y cinéticos debidos a la interacción y el entrecruzamiento de cadenas de polímero y glicoproteínas de la capa mucosa. Dependiendo de los grupos funcionales de ambos componentes se van a establecer diversas interacciones físicas o químicas [Beiro, F., *et. al.*, 2003].

En comparación con las formas de administración estándar, los fármacos que se entregan en un sistema con capacidad bioadhesiva, se van a encontrar por mucho más tiempo en contacto con el tejido absorbente y se podría pensar entonces, en un aumento de la

biodisponibilidad del fármaco en cuestión y en sistemas de administración controlada de fármacos.

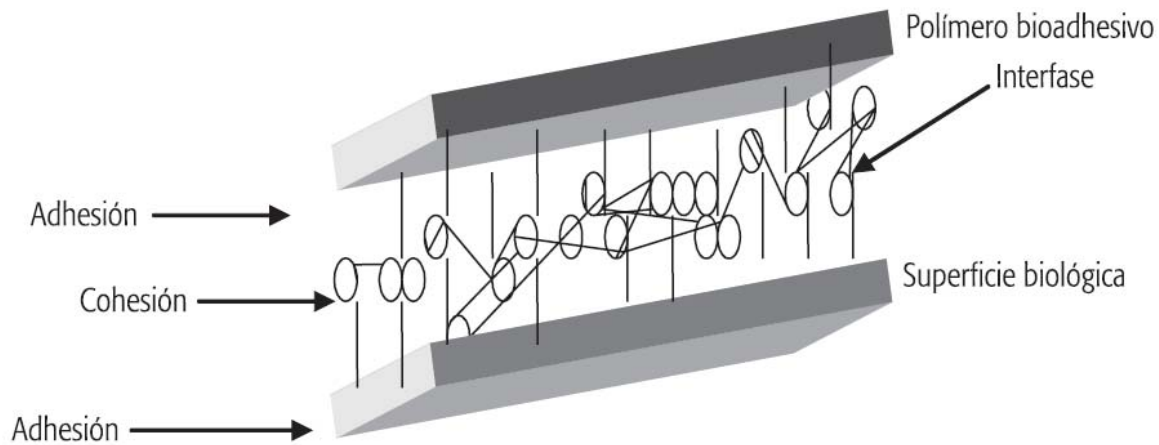


Figura 5. Superficies presentes en una unión bioadhesiva [Tomada de Vallejo, B.M. y Perilla, J.E., 2008].

Para que el fenómeno de mucoadhesión tenga lugar, el material bioadhesivo debe estar en íntimo contacto con el tejido absorbente, que en este caso será una membrana mucosa, pudiendo ser ésta la mucosa oftálmica, la bucal, nasal, vaginal, rectal o intestinal. Para que un material pueda presentar bioadhesividad, éste debe interactuar con el moco (*mucus*) que tapiza y protege a las mucosas. El *mucus* es un hidrogel altamente hidratado, viscoso y aniónico, compuesto en gran parte de cadenas flexibles glucoproteicas, las cuales se entrecruzan formando tetrámeros por medio de puentes disulfuro [<http://www.ffyb.uba.ar/farmacotecnia%20I/BIOADHESION.htm>].

La vía vaginal parece ser muy apropiada para llevarse a cabo el fenómeno de mucoadhesión de sistemas de suministro de medicamentos, proporcionando ventajas como: mantener el efecto local o mantener el efecto de anticoncepción, mejorar la absorción del fármaco, retención prolongada del fármaco, liberación controlada y protección de principios activos lábiles [Das-Neves, J., Amaral, M. H. y Bahia, M.F., 2008].

Existen numerosos artículos en la literatura que describen las características que necesita tener un material para que pueda presentar una capacidad adhesiva apropiada, como por ejemplo:

- Grupos funcionales capaces de formar uniones tipo puente hidrógeno (-OH, -COOH).
- Cargas aniónicas.
- Cadenas poliméricas con elasticidad suficiente para poder penetrar a través de la capa de *mucus*.
- Alto peso molecular.
- Solubilidad polímero-*mucus*.
- Hidratación e hinchamiento.
- Concentración del polímero bioadhesivo [Vallejo, B.M. y Perilla, J.E., 2008].

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

Informes de diversos métodos analíticos para la evaluación *in vitro* del potencial mucoadhesivo de formulaciones semisólidas de aplicación vaginal (la mayoría geles hidrófilos) han sido frecuentes, especialmente basados en la medición de la fuerza de tracción o trabajo necesario para separar una formulación mucoadhesiva de una membrana [Das-Neves, J., Amaral, M. H. y Bahia, M.F., 2008].

2.6.2 MECANISMOS DE BIOADHESIÓN

- a) Teoría electrónica.
- b) Teoría de adsorción.
- c) Teoría mecánica.
- d) Teoría de fractura.
- e) Teoría de la humectación.
- f) Teoría de difusión [Vallejo, B.M. y Perilla, J.E., 2008].

a) Teoría electrónica.

Se fundamenta en el hecho de que el sistema adhesivo–sustrato se comporta como un condensador, que se carga por contacto entre los dos materiales. La separación de las partes, como una interfase de ruptura, da lugar a una separación de carga y a una diferencia de potencial que aumenta hasta que ocurre la descarga [Vallejo, B.M. y Perilla, J.E., 2008].

b) Teoría de adsorción.

También conocida como teoría de adsorción termodinámica, explica la bioadhesión en términos del desarrollo de fuerzas superficiales que generan uniones químicas entre el polímero y el sustrato como enlaces covalentes y enlaces iónicos o fuerzas débiles como puentes de hidrógeno y del tipo Van der Waals [Vallejo, B.M. y Perilla, J.E., 2008].

c) Teoría mecánica.

Es una de las primeras teorías planteadas para explicar el comportamiento adhesivo de materiales. En ella se establece que el fenómeno se debe al anclaje del adhesivo en los poros y oquedades superficiales del sustrato, que proveen un aumento de área superficial y al endurecerse se fijan a múltiples sitios de anclaje [Vallejo, B.M. y Perilla, J.E., 2008].

d) Teoría de fractura.

En ésta se relacionan las fuerzas de adhesión con la fuerza necesaria para separarlas dos superficies adheridas. Se utiliza para explicar el comportamiento bioadhesivo de polímeros rígidos; también se conoce como modelo de capas débiles de rotura preferente [Vallejo, B.M. y Perilla, J.E., 2008].

e) Teoría de la humectación.

Ha sido la teoría más aceptada para explicar el comportamiento de bioadhesivos líquidos y para analizar la bioadhesión en términos de la capacidad de un material para distribuirse sobre una superficie biológica. La capacidad bioadhesiva de un polímero es función de su capacidad de dispersión para entrar en contacto con el sustrato biológico [Vallejo, B.M. y Perilla, J.E., 2008]

f) Teoría de difusión.

Es también conocida como teoría de la interpenetración. Se utilizó inicialmente en el estudio del comportamiento adhesivo de polímeros gomosos y es actualmente una de las más importantes para describir el fenómeno bioadhesivo, mediante la difusión.

La bioadhesión es el resultado de un gradiente de concentración entre las moléculas del sustrato biológico y las cadenas flexibles del polímero hasta desarrollar el enredamiento físico entre los dos tipos de moléculas [Vallejo, B.M. y Perilla, J.E., 2008].

2.6.3 TÉCNICAS EXPERIMENTALES EMPLEADAS PARA LA DETERMINACIÓN DE BIOADHESIÓN.

- a) Análisis de la interfase.
- b) Determinación de la formación de la unión bioadhesiva

a) Análisis de la interfase.

En esta clase de ensayos puede determinarse el ángulo de contacto de una gota de agua sobre el sistema bioadhesivo, o en el caso de sistemas líquidos bioadhesivos, el ángulo de contacto estático de una gota del sistema bioadhesivo sobre el sustrato biológico.

b) Determinación de la formación de la unión bioadhesiva.

Generalmente en estos ensayos se estudian las interacciones macroscópicas y que involucran la presencia de *mucus*. Las técnicas *in vitro* incluyen ensayos de destrucción de la unión adhesiva por fuerzas de corte, *peeling* y por tensión. Estos se caracterizan por la realización de pruebas mecánicas en las cuales se obtienen curvas de esfuerzo *versus* deformación a bajas longitudes. Es importante señalar que esto dificulta diferenciar si se mide la fuerza de bioadhesión o el trabajo de bioadhesión. El ensayo más simple para medir macroscópicamente la adhesividad consiste en emplear máquinas de ensayo universal en las cuales se mide la fuerza necesaria para separar dos superficies [Vallejo, B.M. y Perilla, J.E., 2008].

2.7 NANOPARTÍCULAS

El desarrollo de nanopartículas se ha convertido en un área de investigación importante en el campo de la administración de fármacos, ya que tiene la capacidad de suministrar una amplia gama de compuestos para las diferentes vías de administración por periodos de tiempo sostenido.

Las nanopartículas son sistemas sólidos coloidales submicrónicos de aproximadamente 10-1000 nm constituidos de materiales macromoleculares en los que el principio activo (fármaco o material biológicamente activo) es atrapado, absorbido o unido químicamente [Jiménez, P. E. y López, M. R., 2009].

El término nanopartículas es el nombre colectivo que recibe tanto nanoesferas como nanocápsulas. La diferencia entre estas dos formas está ligada a la morfología y a la arquitectura de la entidad. Las nanoesferas se encuentran formadas por una densa matriz polimérica, en este caso el activo es dispersado o adsorbido en la superficie de la partícula. Las nanocápsulas están compuestas de un núcleo aceitoso envuelto por una membrana polimérica, de tal manera que los activos pueden ser absorbidos en la superficie, pueden ser disueltos en aceite constituyendo el corazón lipofílico de la nanocápsula o bien. El mismo aceite puede ser la sustancia terapéutica (Quintanar-Guerrero, D., *et al*, 1997). Representados en la figura 6.

Desde el punto de vista farmacéutico las nanocápsulas son atractivas porque su cavidad central basada en aceite permite un alto nivel de encapsulación para sustancias lipofílicas y un aumento de la liberación de fármacos.

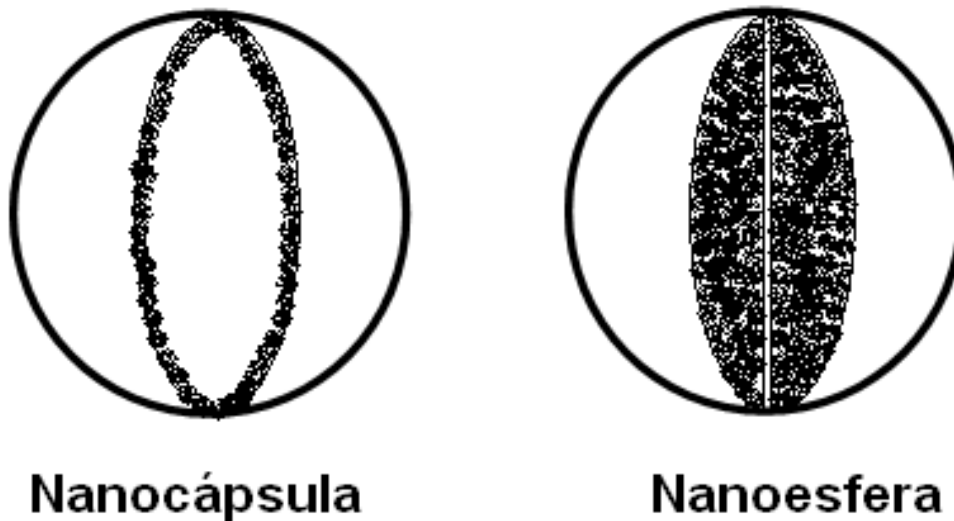


Figura 6. Representación esquemática de una nanocápsula y una nanoesferas.

Comparadas con otros acarreadores coloidales, las nanopartículas presentan una mayor estabilidad cuando están en contacto con fluidos biológicos y su naturaleza polimérica las hace susceptibles de convertirse en sistemas de liberación prolongada y controlada.

2.7.1 PREPARACIÓN DE LAS NANOPARTÍCULAS

Las nanopartículas pueden ser preparadas por polimerización de monómeros dispersos o por dispersión de polímeros preformados utilizando materiales de origen natural o sintético. La preparación de nanopartículas a partir de la polimerización de monómeros presenta diversos inconvenientes pues los productos de reacción pueden ser no compatibles entre sí o con el activo o incluso provocar irritación. Además de dejar residuos más o menos tóxicos tales como monómeros, oligómeros, catalizadores e iniciadores. También son probables las reacciones cruzadas con el activo o la degradación de los componentes cuando se recurre a la radiación para inducir la polimerización. Por lo anterior, desde el punto de vista farmacéutico se prefiere la preparación de nanopartículas a partir de polímeros ya preformados. La elección de método de producción de nanopartículas depende esencialmente del tipo del polímero que se utilizara (biocompatibilidad, degradación, perfil de liberación deseado) y de la ruta de administración y la aplicación biomédica que se pretende [De Jaeghere, F., *et al.*, 1999].

Es importante mencionar que algunos principios activos pierden su efecto terapéutico durante la preparación de nanoesferas preparadas por polimerización de monómeros dispersos. Las moléculas de los principios activos reaccionan covalentemente con el polímero del que están formadas las nanoesferas. Algunos de los principios activos que pierden su actividad biológica son la fenilbutazona y la vidarabina [Fattal, E. y Vauthier, C., 2000].

Los materiales utilizados para la preparación de nanopartículas pueden dividirse en dos grupos: polímeros naturales hidrofílicos y polímeros sintéticos hidrofóbicos. La tendencia actual es el uso de polímeros biodegradables y biocompatibles para la preparación de un sistema de liberación debido a su habilidad para ser reabsorbidos por el cuerpo, lo cual evita que deban extraerse después de cierto tiempo [Piñón-Segundo, E., 2003].

2.7.2 MÉTODOS DE PREPARACIÓN

La elección del método de producción de nanopartículas depende esencialmente del tipo de polímero que se utilizará (biocompatibilidad, degradación, perfil de liberación deseado), de las características del activo que será asociado con las partículas (solubilidad y toxicidad) y de la ruta de administración y la aplicación biomédica que se pretende [De Jaeghere, F., *et. al.*, 1999].

Quintanar-Guerrero, D., y colaboradores [1998] reúnen las técnicas de preparación de nanopartículas a partir de polímeros preformados en cuatro categorías:

- a) Emulsificación evaporación.
- b) Desplazamiento del solvente.
- c) Efecto “Salting-out” o inmiscibilidad por soluciones salinas.
- d) Emulsificación difusión.

a) Emulsificación evaporación

En esta técnica el polímero y el activo son disueltos en un solvente orgánico volátil inmiscible al agua, el cual es emulsificado en una solución acuosa que contiene un estabilizante formando una emulsión aceite en agua (o/w). Esta emulsión cruda es entonces expuesta a una fuente de alta energía como un dispositivo de ultrasonido o pasada a través de homogenizadores, molinos coloidales o microfluidizadores, con el objeto de reducir el tamaño del glóbulo. Finalmente, se remueve el solvente orgánico, a temperatura ambiente o con calor por agitación y/o con rotavapor a presión reducida, para obtener una dispersión fina de nanoesferas, como se muestra en la figura 7. Esta técnica fue utilizada por primera vez para la preparación de nanoesferas por Gurny y colaboradores [1981] y se fundamenta en el procedimiento propuesto por Vanderhoff [1979]. Este método fue adoptado posteriormente para la producción de nanoesferas de

diferentes polímeros incluidos PLGA, PCL, PHB (poli-hidroxibutarato), copolímeros de ácido acrílico y derivados de celulosa. Los solventes orgánicos usados comúnmente son cloroformo y cloruro de metileno, algunos agentes estabilizantes que se han utilizado en este método incluyen polisorbatos, polaxameros, dodecil sulfato de sodio y polivinilalcohol. Este método ha permitido el encapsulamiento con alta eficiencia de sustancias tales como testosterona, indometacina, ciclosporina A y acetato de triamcinolona [Quintanar-Guerrero, D., *et. al.*, 1998 y De Jaeghere, F., *et. al.*, 1999].

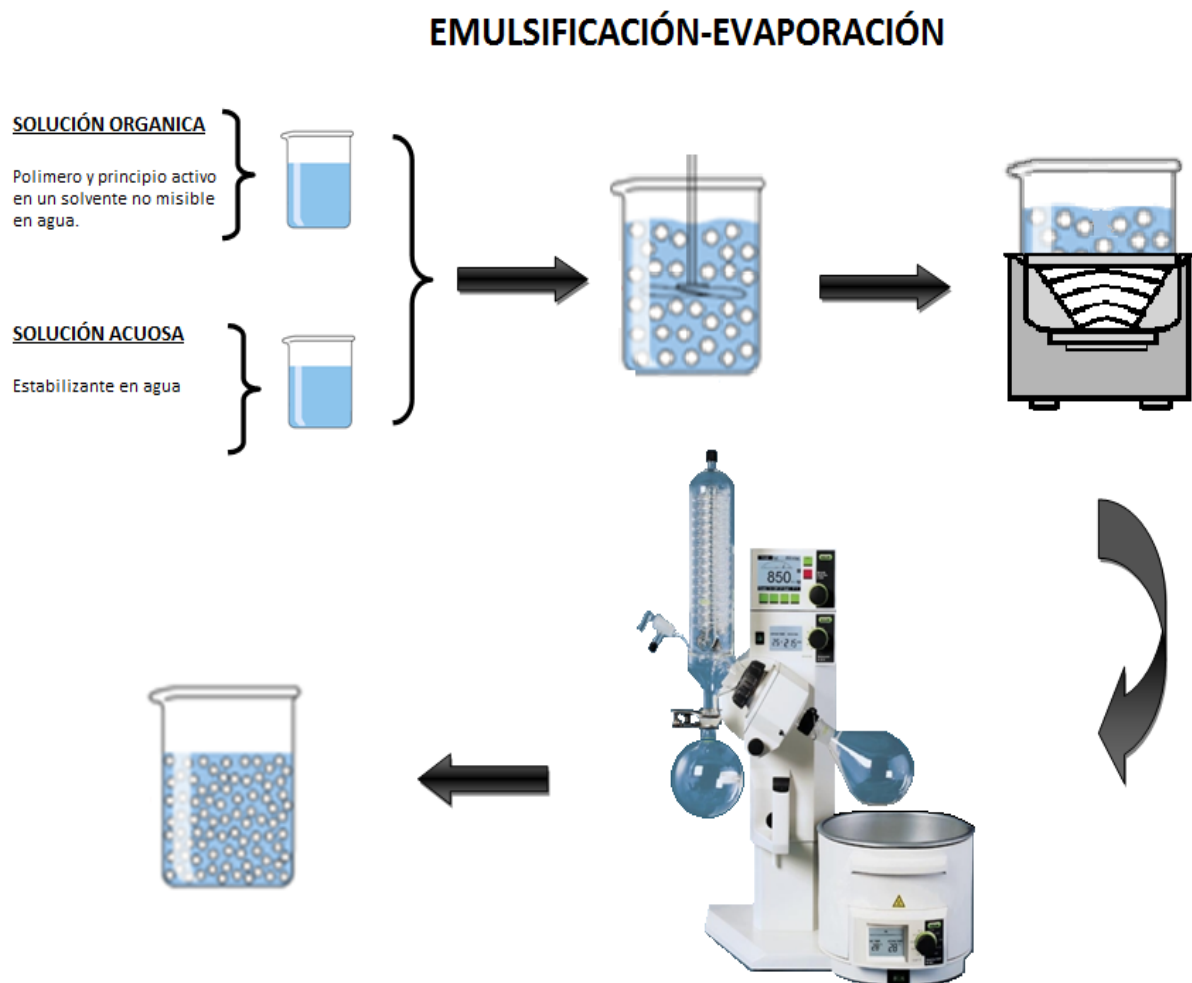


Figura 7. Representación esquemática del método de “Emulsificación-evaporización” para preparar nanoesferas.

Esta técnica ha dado buenos resultados para encapsular fármacos hidrofóbicos, pero ha tenido pobres resultados en la incorporación de agentes activos de carácter hidrofílicos [Llabot J., *et. al.* 2008].

b) Desplazamiento del solvente

Esta técnica involucra el uso de un solvente orgánico que es completamente miscible con la fase acuosa, típicamente se utiliza acetona aunque también puede emplearse etanol o metanol. Esta técnica fue propuesta por Fessi y colaboradores en 1981. Este método permite la formación de nanocápsulas y nanoesferas sin necesidad de formar previamente una emulsión.

En este caso, la precipitación del polímero es inducida directamente en un medio acuoso (conteniendo o no surfactantes) por la adición de la fase acuosa a la solución del polímero con agitación magnética. Después de la formación de las nanopartículas, el solvente es removido a presión reducida como se esquematiza en la figura 8.

La aplicación de este método se limita fármacos que son muy solubles en solventes polares, pero ligeramente solubles en agua para evitar pérdida del fármaco durante la difusión del solvente. De hecho, la principal limitación del método es la difícil selección del sistema polímero/fármaco/solvente/no solvente que permita altas eficiencia de encapsulamiento y rendimientos aceptables. En general, este método se ha llevado a cabo con bajas concentraciones de polímero en la fase orgánica. En estos casos la dispersión del polímero y partículas de tamaño pequeños se obtienen fácilmente. En contraste, cuando se aumenta la cantidad del polímero en la fase orgánica (por ejemplo, para lotes más grandes), se forman agregados y se tiene bajos rendimientos [Quintanar-Guerrero, D., *et al.*, 1998 y De Jaeghere, F., *et al.*, 1999].

El mecanismo de formación de nanopartículas por esta técnica ha sido explicado por la turbulencia interfacial generada durante el desplazamiento del solvente. La mutua miscibilidad entre solventes provoca una violenta propagación del solvente polar de donde las minúsculas gotas son arrancadas de la interface durante el proceso de difusión. Estas gotas son rápidamente estabilizadas por el agente para este propósito, hasta que se completa la difusión del solvente y entonces se da la agregación del polímero.

Este método también se conoce con el término de nanoprecipitación, sin embargo, es importante señalar que de acuerdo con el mecanismo descrito, la formación de nanopartículas es debida a la agregación del polímero desde las gotas de la emulsión y aparentemente no se involucran fenómenos de nucleación y crecimiento del cristal [Quintanar-Guerrero, D., *et al.*, 1998 y De Jaeghere, F., *et al.*, 1999].

DESPLAZAMIENTO DEL SOLVENTE

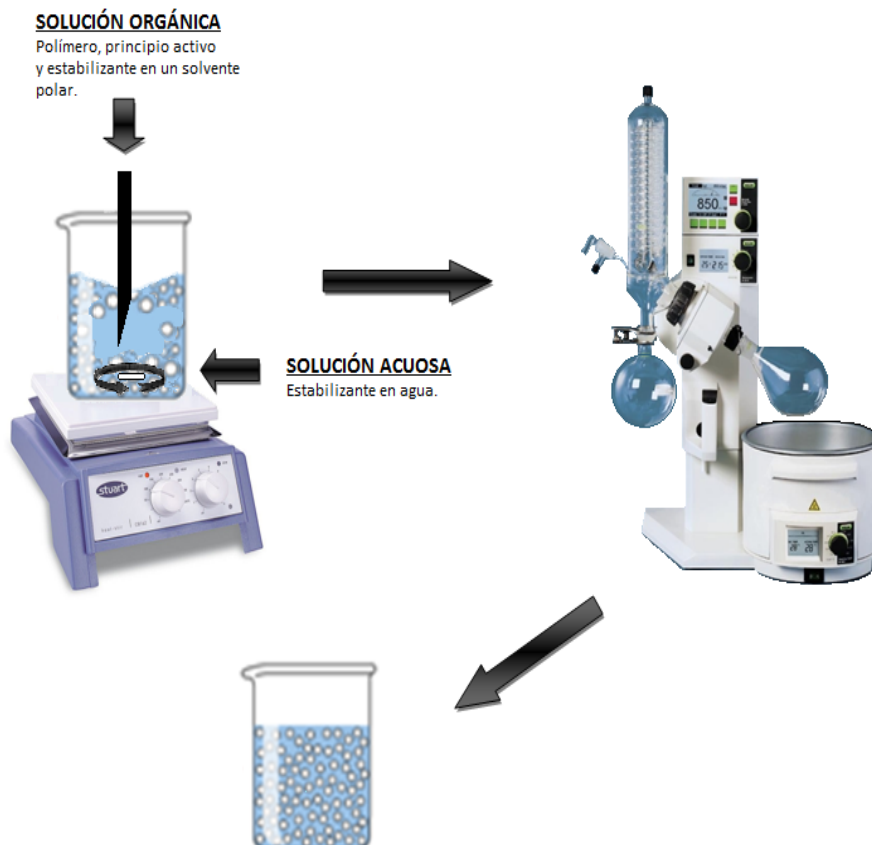


Figura 8. Representación esquemática del método de “Desplazamiento del solvente” para preparar nanoesferas y nanocápsulas.

c) Efecto “Salting-out” o inmiscibilidad por soluciones salinas

Este proceso está basado en la separación (inmiscibilidad) de un solvente originalmente acuoso de soluciones acuosas por el efecto de la adición de sales. Generalmente, se utiliza acetona como solvente acuoso, debido a las propiedades solubilizantes y su conocida separación de soluciones por electrolitos. El polímero y el activo son disueltos en acetona y esta solución se emulsifica con agitación mecánica vigorosa en un gel acuoso que contiene el electrolito (acetato de magnesio o cloruro de magnesio) y un estabilizante coloidal como el polivinilalcohol. Esta emulsión aceite/agua (o/w) se diluye con un volumen de agua o soluciones acuosas para permitir la difusión de la acetona hacia la fase acuosa, induciendo así la formación de nanoesferas. Finalmente, el solvente y el electrolito son eliminados por filtración tangencial y se esquematiza en la figura 9. Cabe señalar que Allemann y colaboradores [1992] utilizaron como solvente orgánico el tetrahidrofurano y como agente “salting-out” la sucrosa (no electrolito), lo que resalta la versatilidad de este método.

Aunque el mecanismo de formación no ha sido propuesto, este puede tener cierta similitud con el observado con la técnica de desplazamiento del solvente. Las ventajas de esta técnica radica en la posibilidad de incorporar altas cantidades del polímero y activo con excelentes rendimientos, además existe la posibilidad de escalamiento industrial. Por otro lado, esta técnica se limita a activos lipofílicos, electrolitos que permitan separación de fases sin precipitación y estabilizantes soluble y compatibles con lo electrolitos y que no coacerven en presencia del solvente orgánico.

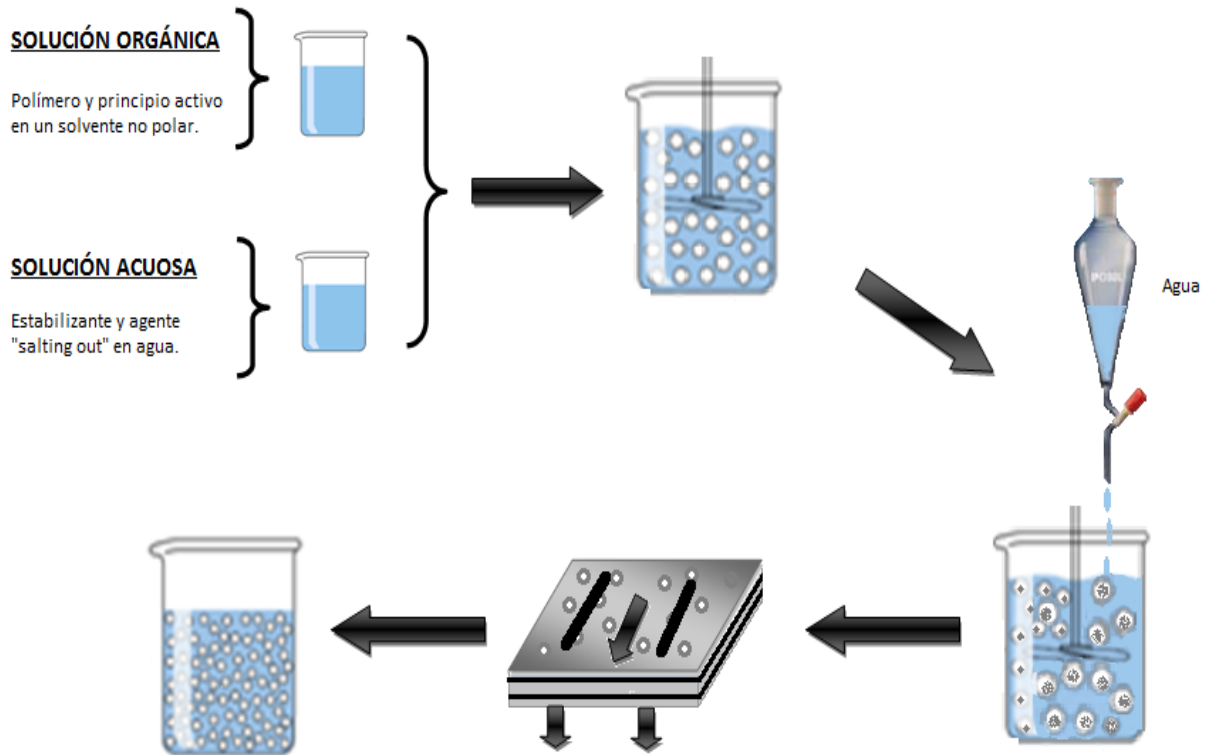
"SALTING - OUT"

Figura 9. Representación esquemática del método "Salting-out" para preparar nanoesferas.

d) Emulsificación-difusión

Este método puede ser considerado como una modificación del proceso "salting-out", pero suprimiendo el uso de sales y por lo tanto evitando prolongadas etapas de purificación. Involucra el uso de solventes parcialmente miscibles con agua, los cuales son previamente saturados en agua con el objeto de asegurar el equilibrio termodinámico de ambos líquidos. El polímero es disuelto en el solvente (saturado en agua) y esta fase orgánica se emulsifica con agitación vigorosa en una solución acuosa que contiene el estabilizante. La subsecuente adición de agua al sistema causa que el solvente difunda

hacia la fase externa, dando como resultado la formación de nanopartículas, representándose en la figura 11 [Quintanar-Guerrero, D., *et al.*, 1998 y De Jaeghere, F., *et al.*, 1999].

El mecanismo de formación de las nanopartículas por este método ha sido revisado bajo diferentes condiciones de preparación y métodos turbidimétricos [Quintanar-Guerrero, D., *et al.*, 1996]. Se ha reportado que cada gota de la emulsión produce varias nanopartículas y que estas son formadas por fenómenos interfaciales durante la difusión del solvente. Sin embargo, estos fenómenos no pueden ser explicados completamente por los efectos de convección causados por la turbulencia interfacial, por lo que se sugiere que las nanopartículas se forman debido a una inestabilidad fisicoquímica producida por el transporte del solvente por un mecanismo similar al usado para explicar los procesos de emulsificación espontánea:

- a) Después de la saturación mutua de las dos fases, ambas fases están en equilibrio termodinámico.
- b) La agitación provoca la dispersión de la solución del polímero como glóbulos en equilibrio con la fase continua y el agente estabilizante es absorbido en el área interfacial creada.
- c) La formación de la emulsión o/w es necesaria ya que el polímero no emulsiona espontáneamente en el agua, como es el caso de la acetona en el proceso de nanoprecipitación.
- d) La adición de agua al sistema desestabiliza el equilibrio, hace que el polímero difunda hacia la fase externa. Durante este transporte de solutos se producen nuevos glóbulos de tamaño nanométrico.
- e) El estabilizante permanece en la interfase líquido-líquido, durante el proceso de difusión, y si su efecto de protección es la adecuada, las nanopartículas se forman [Quintanar-Guerrero, D., Fessi, H., Alléman, E., y Doelker, E., 1996].

Mecanismo de Emulsificación-Difusión

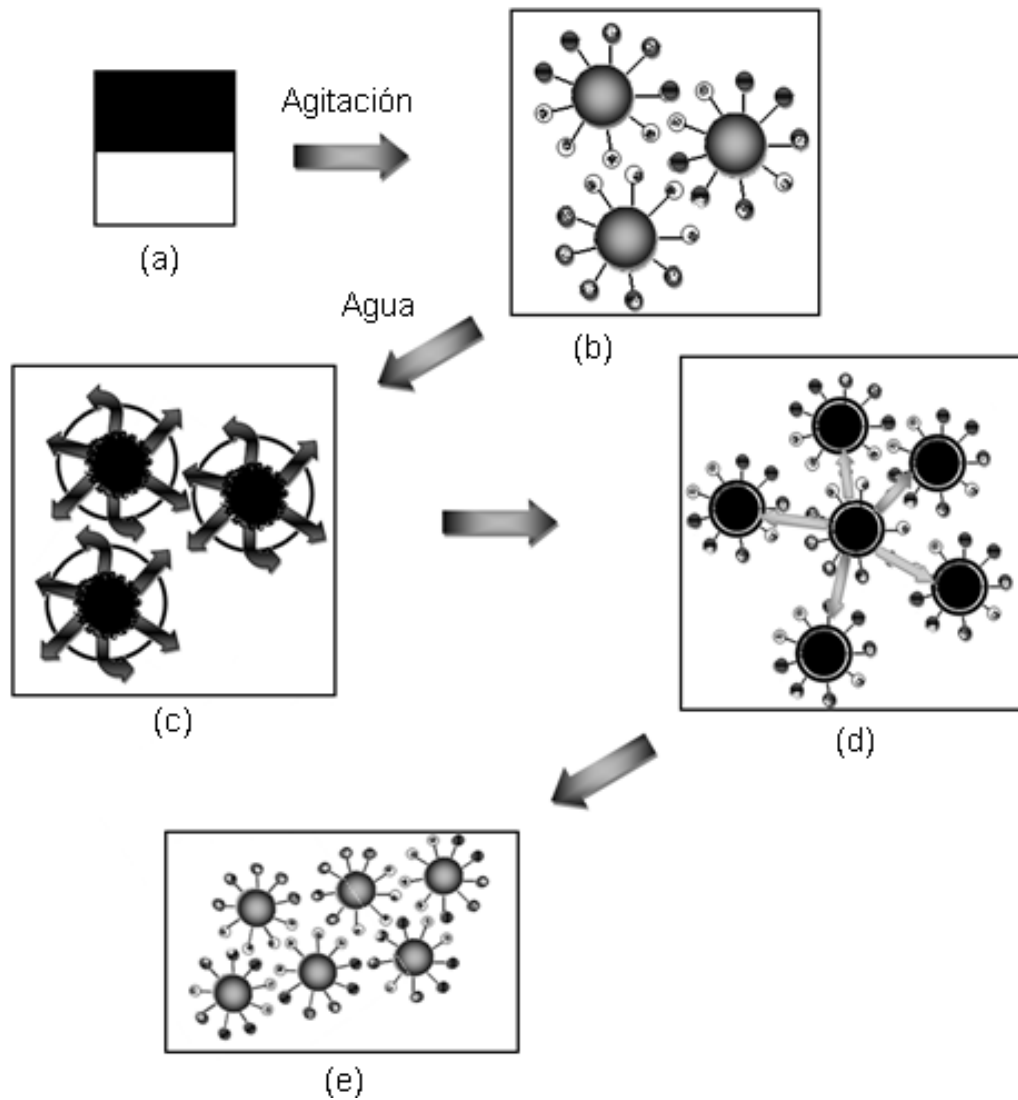


Figura 10. Esquema del mecanismo de formación de las nanopartículas por el método de Emulsificación- difusión [Modificado Quintanar-Guerrero, D., Fessi, H., Alléman, E., y Doelker, E., 1997].

EMULSIFICACIÓN - DIFUSIÓN

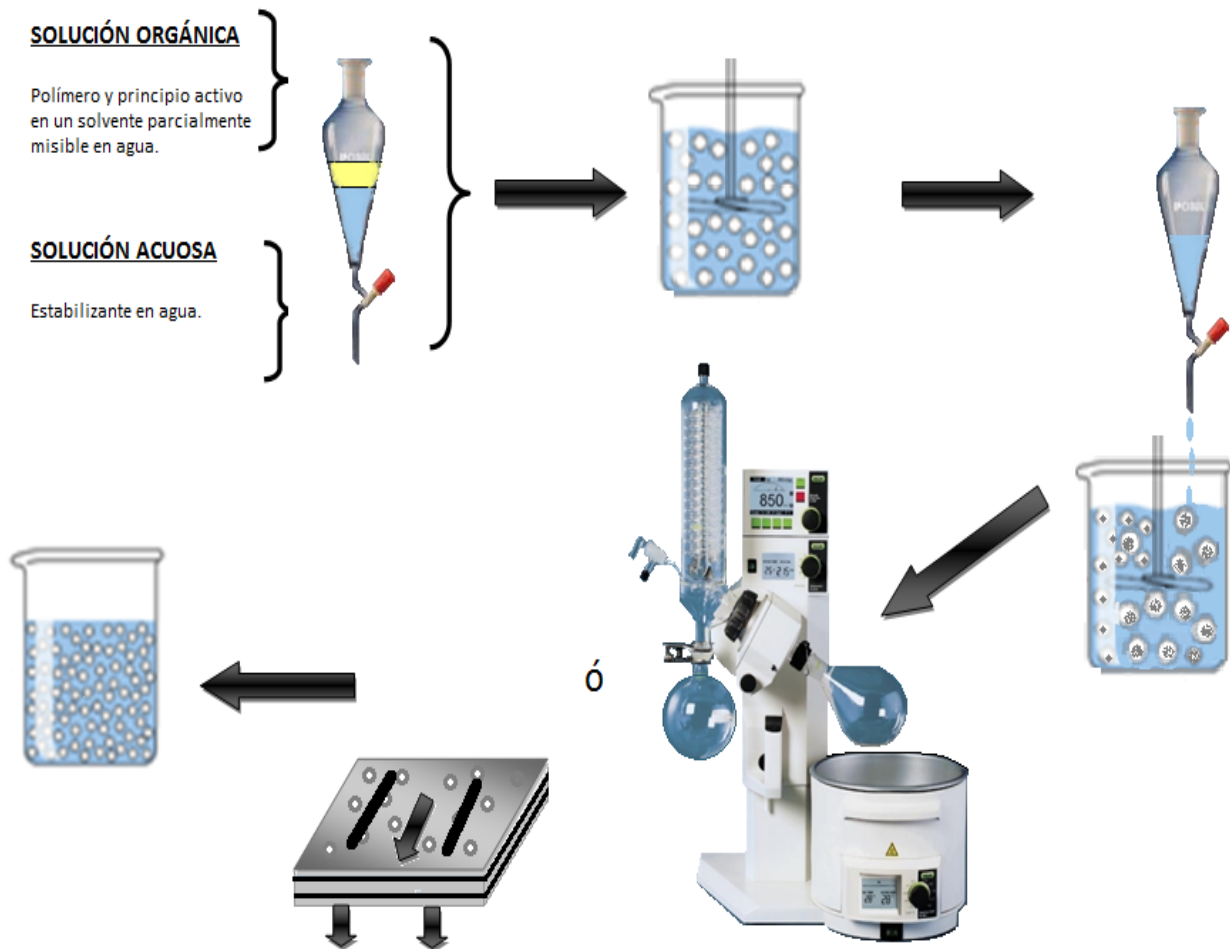


Figura 11. Representación esquemática del método “Emulsificación-difusión” para preparar nanoesferas y nanocápsulas.

2.7.3 CARACTERIZACIÓN DE LAS NANOPARTÍCULAS

Las nanopartículas obtenidas por cualquiera de los procedimientos descritos deben ser caracterizadas y controladas de acuerdo con ensayos que aseguren su calidad y su homogeneidad.

Las nanopartículas son caracterizadas a través de diferentes técnicas fisicoquímicas. La finalidad de la caracterización es dar una descripción química y física completa de las nanopartículas. Los principales parámetros que se evalúan son:

- a) Tamaño de partícula.
- b) Morfología.
- c) Potencial Z.
- d) Peso molecular.
- e) Cristalinidad.
- f) Hidrofobicidad.
- g) Área superficial.

Morfología

La forma de las nanopartículas se determina por medio de las diferentes técnicas de microscopía electrónica. La microscopía electrónica requiere del uso de un agente de recubrimiento que se aplica a las nanopartículas. Aunque hoy en día existen técnicas donde no se necesita recubrirlas, este método consiste en enfriar las nanopartículas a muy bajas temperaturas y utilizar microscopía electrónica de criotransmisión. También se utiliza la microscopía electrónica de barrido [Fattal, E. y Vauthier, C., 2000].

La **microscopía electrónica de barrido** permite examinar más a fondo la superficie de las nanopartículas, la técnica esencialmente consiste en hacer incidir en la muestra un haz de electrones. Este bombardeo de electrones provoca la aparición de diferentes señales que captada con detectores adecuados, nos proporciona información acerca de la naturaleza de la muestra (tamaño y forma). La muestra requiere un recubrimiento con oro [Martínez-Pérez, A., 2010].

Potencial zeta

La carga superficial de las nanopartículas se mide a través de su potencial zeta. Las nanopartículas presentan una carga eléctrica debida a sus características iónicas y bipolares. Las nanopartículas se rodean por otras partículas iónicas con carga opuesta, a estas últimas se les llama capa difusa. Por fuera de la capa difusa hay una mezcla de partículas iónicas de diferentes cargas formando una especie de nube, por lo que requiere el nombre de la doble capa difusa [Li, L., *et. al.*, 2007].

Cristalinidad

Los polímeros presentan una estructura cristalina por lo que las nanopartículas al estar formadas de polímeros biodegradables y no biodegradables presentan esta propiedad. Para determinar la cristalinidad se utiliza la técnica de difracción de rayos X y calorimetría diferencial de barrido.

La difracción de rayos X por un cristal presenta un patrón de interferencia típico para una sustancia cristalina. La longitud de onda de los rayos X son comparables con el tamaño de distancia entre los átomos de muchos cristales y la repetición de los monómeros actúa como una red cristalina, donde son difractados los rayos X. Por lo tanto, el patrón de interferencia emitido es detectado en un difractómetro. El detector es un instrumento que convierte los rayos X en pulsos de corriente eléctrica [Martínez-Pérez, A., 2010].

La **calorimetría diferencial de barrido** es una técnica termoanalítica en la que la diferencia de calor entre una muestra y una referencia es medida como una función de la temperatura. La muestra y la referencia son mantenidas aproximadamente a la misma temperatura a través de un experimento [Martínez-Pérez, A., 2010].

3 OBJETIVOS

Objetivo General:

- Desarrollar un sistema terapéutico nanoparticulado para el tratamiento de la vaginitis.

Objetivos Particulares:

- Obtener nanopartículas poliméricas aplicando la técnica de Emulsificación-difusión.
- Incorporar en las nanopartículas un principio activo para el tratamiento de vaginitis.
- Caracterizar las nanopartículas obtenidas de acuerdo con su tamaño, morfología, cristalinidad y eficiencia de encapsulamiento.
- Evaluar los perfiles de liberación *in vitro* del principio activo a partir de las nanopartículas.

PARTE EXPERIMENTAL

4.1 Polímero

- Acetato ftalato de celulosa (cellulose acetate phthalate, CAP, Sigma-Aldrich, USA), con un peso molecular 2532.12 g/mol.

4.2 Estabilizante

- Alcohol polivinílico Mowiol® (polyvinyl alcohol, PVAL, Glomarza, México).

4.3 Principio activo

- Miconazol Base.
- Nitrato de Miconazol.

4.4 Reactivos en general

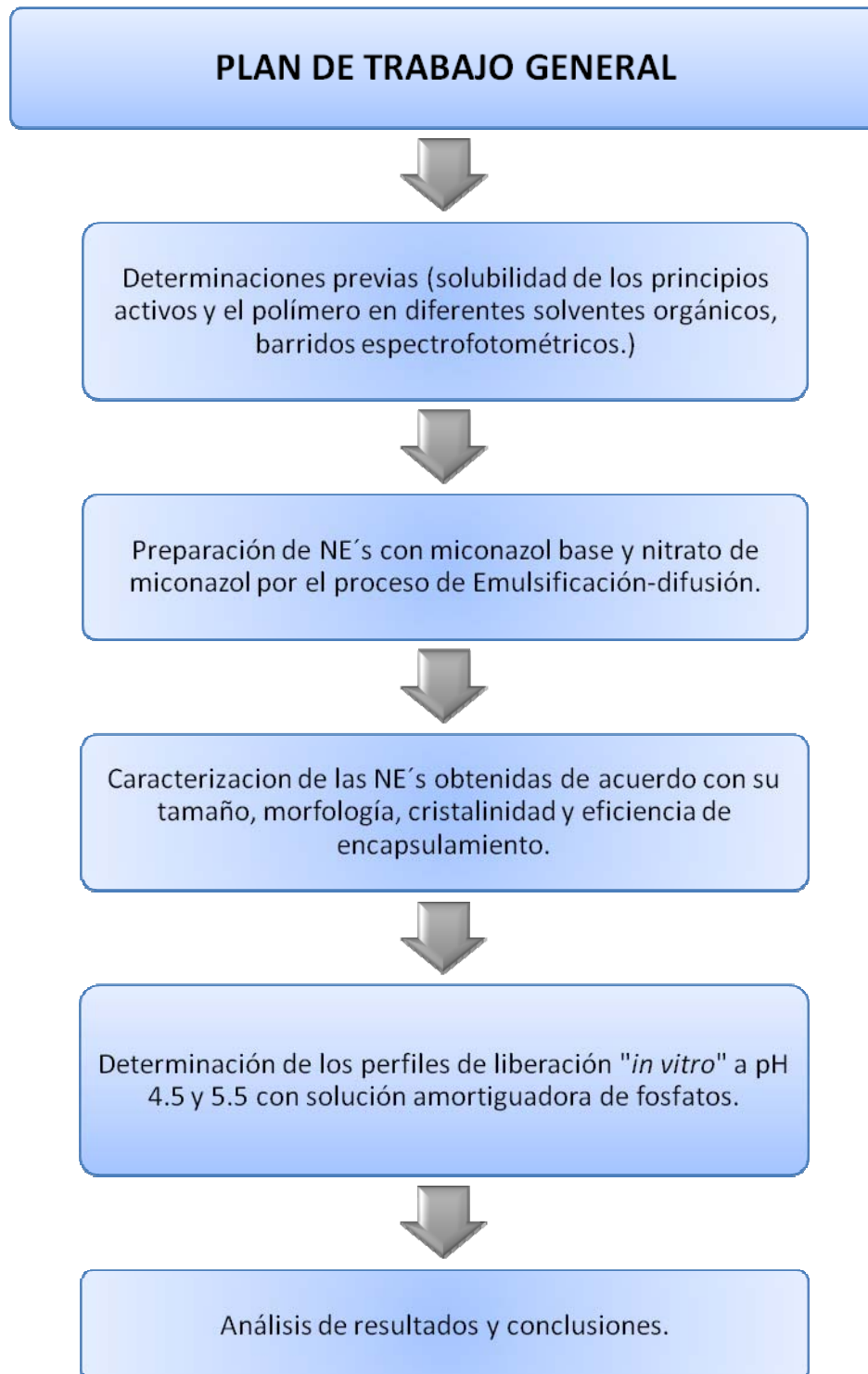
- Fosfato monobásico de potasio (grado reactivo Fermont, Productos Químicos Monterrey, México).
- Fosfato dibásico de sodio (grado reactivo Fermont, Productos Químicos Monterrey, México).
- Hidróxido de sodio en hojuelas (grado reactivo Fermont, Productos Químicos Monterrey, México).
- Polioxietilen(20)cetiléter, Brij® 58 (Sigma-Aldrich, USA).
- Ácido clorhídrico (grado reactivo, J.T. Baker, México).
- Ácido bórico (grado reactivo Fermont, Productos Químicos Monterrey, México).
- Yoduro de potasio (grado reactivo, J.T. Baker, México).
- Yodo metálico (grado reactivo).
- Metiletil cetona (grado analítico Fermont, Productos Químicos Monterrey, México).
- Agua destilada (obtenida del equipo Milli-Q, Millipore).

4.5 Membrana

- Tubos de membranas de celulosa, con un diámetro de 32 mm y un umbral de peso molecular de 6 – 8000 Da. (Spectra /Por®).

4.6 Aparatos y equipos

- Balanza analítica (BBC 32, Boeco, Alemania).
- Parrilla eléctrica con agitación (Cimarec®, Thermoline, USA).
- Agitador magnético multiplazas (Multistirrer 15, VELP SCIENTIFICA, Europa).
- Agitador de velocidad variable (RZR-1; Caframo®, Alemania).
- Rotavapor (Laborota® 4000, Heidolph, Alemania).
- Ultracentrífuga Optima LE-80K (Beckman, USA).
- Nanosizer® Coulter N4 plus (Beckman 3200, USA).
- Liofilizadora de mesa (Laboconco®, USA).
- Recirculador de líquidos con termostato (Polyscience, USA).
- Espectrofotómetro UV-Vis (Thermo Scientific, Genesys 10uv Scanning, USA).
- Calorímetro diferencial de barrido (DSC Q10, TA Instrument, USA).
- pH metro (Thermo Electron Corporation, ORION 3 Star PH Benchtop, USA).
- Filtros Millex® -GV de 2.5 cm de diámetro y poro de 0.22 µm (Millipore®).
- Cronómetro.
- Material de cristalería.

4.7 METODOLOGÍA

4.7.1 DETERMINACIONES PREVIAS

4.7.1.1 Espectros de absorción.

Se determinaron las longitudes de onda (λ) de máxima absorción para el nitrato de miconazol y miconazol base, en una solución amortiguadora de fosfatos pH 4.5, 5.0 y 5.5 con Brij® 58 al 2.5% p/v. Los barridos se realizaron de 200 a 400 nm.

La λ de máxima absorción para el complejo PVAL con H_3BO_3 0.65 M y una solución de I_2 0.05M en KI 0.15M se determinó realizando un barrido desde 400 a 800 nm.

4.7.1.2 Curvas de calibración.

Las curvas de calibración para el nitrato de miconazol y miconazol base en una solución amortiguadora de fosfatos pH = 4.5, 5.0 y 5.5 con Brij® 58 al 2.5% p/v. Para el complejo de PVAL con H_3BO_3 0.65M y una solución de I_2 0.05M en KI 0.15M. Se prepararon cada una de las curvas de calibración por triplicado leyéndose $\lambda = 272$ y 640 nm, respectivamente.

Para la curva del complejo PVAL - H_3BO_3 - I_2 - KI se mantuvo la misma proporción de H_3BO_3 y I_2 / KI para todos los puntos, es decir, se prepararon diferentes concentraciones de solución acuosa de PVAL tomando 1 mL de dicha solución y llevándola a un volumen de 5mL con agua destilada con 2 mL de H_3BO_3 0.65M y 1 mL de I_2 0.05M en KI 0.15M para formar el complejo colorido. Se utilizó como blanco un sistema 5 mL de H_2O , 2 mL de H_3BO_3 0.65M y 1 mL de I_2 0.05M en KI 0.15M.

4.7.1.3 Determinación de la solubilidad del miconazol base y el nitrato de miconazol.

Se saturaron 10 mL de solución amortiguadora de fosfatos pH 4.5 y 5.5 con Brij® 58 al 2.5% p/v con miconazol base y nitrato de miconazol a cada pH y se mantuvieron con agitación magnética constante a temperatura ambiente por 72 horas. Después se dejó

reposar por 2 horas y se realizó una dilución (1/10). Posteriormente se leyó en el espectrofotómetro a $\lambda=272$ nm y la lectura obtenida se interpoló en la curva correspondiente.

4.7.2 PREPARACIÓN DE LAS NANOPARTÍCULAS POR EL MÉTODO DE EMULSIFICACIÓN - DIFUSIÓN POR DESPLAZAMIENTO DEL SOLVENTE

Se saturó en un embudo de separación el solvente orgánico (metil etil cetona) y el agua destilada, agitando suavemente y después se dejó reposar por una hora para separar ambas fases (la orgánica y la acuosa). En la fase orgánica saturada se disolvió el principio activo (miconazol base o nitrato de miconazol) y el polímero CAP. Con la fase acuosa saturada se preparó una solución de PVAL al 5%. A la fase orgánica se le añadió la fase acuosa, esta mezcla se agitó mecánicamente a 2000 rpm durante 10 minutos, posteriormente se agregó agua destilada no saturada sin detener la agitación por 10 minutos más a la misma velocidad.

Posteriormente, se procedió a eliminar el solvente orgánico de la emulsión, lo cual se llevó a cabo bajo presión reducida con un rotavapor a 30 rpm y 35°C. La suspensión se concentró hasta llegar a un volumen aproximado de 40 mL. Dicha suspensión fue centrifugada a 20 000 rpm durante 20 minutos a 25°C. La pastilla obtenida se resuspendió en agua destilada, con agitación magnética durante 3 horas y se volvió a centrifugar. El proceso de lavado centrifugado se realizó dos veces.

La pastilla del último centrifugado se resuspendió en agua destilada. Parte de esta suspensión se congeló y se liofilizó, y la otra parte de la suspensión se utilizó para algunas pruebas de caracterización de las NE's.

En el cuadro 3 se incluye la descripción de todos los lotes preparados incluyendo los materiales y cantidades empleadas para los dos principios activos utilizados.

Cuadro 3. Materiales y cantidades empleadas para la preparación de los lotes de nanopartículas por el método de Emulsificación-difusión.

No. de lote	Polímero	Solvente Saturado	Principio activo	Principio activo (mg)	Polímero (mg)	Solvente Saturado (ml)	PVAL 5% (ml)
1	CAP	Butanona		0	400	20	40
2	CAP	Butanona	Miconazol Base	20	400	20	40
3	CAP	Butanona	Miconazol Base	40	400	20	40
4	CAP	Butanona	Miconazol Base	60	400	20	40
5	CAP	Butanona	Nitrato de miconazol	20	400	20	40
6	CAP	Butanona	Nitrato de miconazol	40	400	20	40
7	CAP	Butanona	Nitrato de miconazol	60	400	20	40

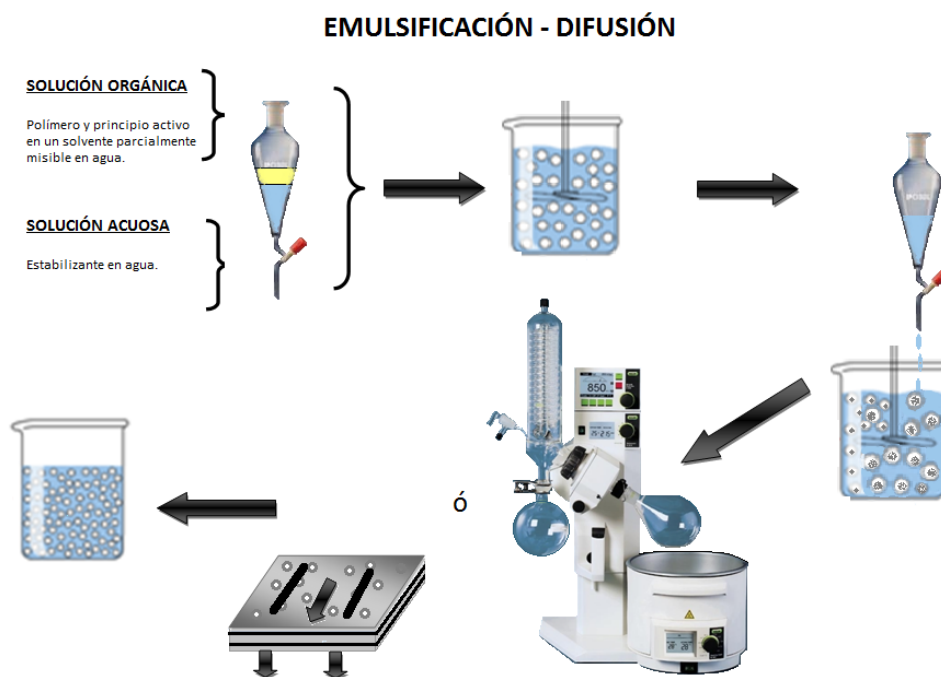


Figura 12. Representación esquemática del método “Emulsificación-difusión” para preparar nanoesferas y nanocápsulas.

4.7.3 CARACTERIZACIÓN DE LAS NANOPARTÍCULAS

4.7.3.1 Tamaño de partícula.

Se determinó el tamaño de partícula promedio, la distribución del tamaño de partícula, la desviación estándar así como el índice de polidispersión con un contador electrónico Nanosizer® N4 Plus. Para todos los lotes de nanopartículas analizados se utilizó como medio de dispersión agua destilada, todas las lecturas se realizaron a 25°C y un ángulo de incidencia de 90°. Las determinaciones se realizaron por triplicado preparando diluciones de una suspensión acuosa de nanopartículas.

4.7.3.2 Determinación del PVAL residual en nanopartículas de CAP.

Se disolvió una cantidad conocida de nanopartículas liofilizadas (5-10 mg) con 5 mL de metil etil cetona en un vaso de precipitados con agitación magnética y posteriormente se llevó a sequedad. Después se agregaron 5 mL de agua destilada y se continuó la agitación magnética por 3 horas. Posteriormente se filtró con una membrana Millipore® de 0.22 μm , el filtrado se llevó a un volumen de 10 mL, de este se tomó 1 mL y se llevó a 5 mL con agua destilada. Los 5 mL se mezclan con 2 mL de H_3BO_3 0.65M y 1 mL de I_2 0.05M en KI 0.15M para formar el complejo colorido. El sistema se leyó a $\lambda = 640$ nm en el espectrofotómetro, la absorbancia obtenida se interpoló en la curva de calibración para obtener la concentración del sistema.

Cuando la lectura de absorbancia era baja o alta para ser interpolada en la curva de calibración se tomaron mayores volúmenes del filtrado o bien se hacían diluciones del mismo, llevando siempre a un volumen final de 5 mL antes de mezclar con los 2 mL de H_3BO_3 0.65M y 1 mL de I_2 0.05M en KI 0.15M para formar el complejo colorido. Se utilizó como blanco un sistema 5 mL de H_2O , 2 mL de H_3BO_3 0.65M y 1 mL de I_2 0.05M en KI 0.15M.

4.7.3.3 Determinación de nitrato de miconazol y miconazol base en nanopartículas de CAP.

Se disolvió una cantidad conocida de nanopartículas liofilizadas (10-15 mg) con 5 mL de metil etil cetona en un vaso de precipitados con agitación magnética y posteriormente se llevó a sequedad. Después se agregaron 10 mL de la solución amortiguadora de fosfatos pH = 4.5 y 5.0 con Brij® 58 al 2.5% p/v y se continuó la agitación magnética por 3 horas. Posteriormente se filtró con una membrana Millipore® de 0.22 μm , el filtrado se llevó a un volumen de 25 ml. El sistema se leyó a una $\lambda = 272 \text{ nm}$ en el espectrofotómetro, la absorbancia obtenida se interpoló en la curva de calibración para obtener la concentración del sistema.

4.7.3.4 Calorimetría diferencial de barrido.

De cada uno de los lotes preparados se tomó una muestra y se analizó por calorimetría diferencial de barrido a una velocidad de calentamiento de 10 $^{\circ}\text{C} / \text{min.}$, Los termogramas se corrieron de 30 a 250 $^{\circ}\text{C}$ con un flujo de nitrógeno de 50 mL/min. También se obtuvieron los termogramas del PVAL, CAP, miconazol base y nitrato de miconazol bajo las mismas condiciones.

4.7.3.5 Perfiles de liberación.

Para los estudios de liberación se utilizó la técnica de membranas de difusión en donde las nanopartículas son suspendidas en un pequeño volumen de fase continua y son separadas a través de una membrana de diálisis (membrana de celulosa, diámetro de 32 mm y un umbral de peso molecular de 6 - 8000 Da) de otra fase que se encuentra en condiciones "sink". Periódicamente se toman muestras que se analizan para determinar la cantidad de fármaco, como se ilustra en la figura 13.

PARTE EXPERIMENTAL

Se pusieron a hidratar las membranas de diálisis por 12 horas. Se dispersó una cantidad conocida de nanopartículas (100 mg) en 2 mL de solución amortiguadora de fosfatos pH = 4.5 y 5.0 con Brij® 58 al 2.5% p/v, con las membranas hidratadas se formaron las bolsas de diálisis y se colocaron los 2 mL de dispersión de nanopartículas, se cierran las bolsas y se sumergen dentro 30 mL de una solución amortiguadora de fosfatos pH = 4.5 y 5.0 con Brij® 58 al 2.5% p/v en condiciones "sink" con agitación magnética a una temperatura de $37^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$.

Se tomaron muestras de 3 mL reponiendo el mismo volumen del medio de disolución a los 10, 20, 30, 45, 60, 90, 120, 150, 180, 210, 240, 350 y 450 minutos. Las muestras de la disolución se leyeron a $\lambda=272\text{ nm}$.

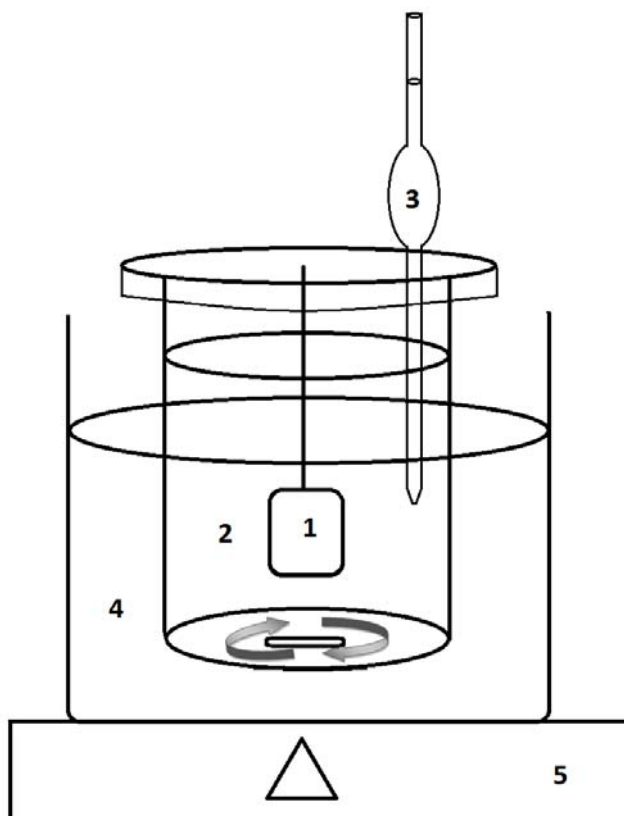


Figura 13. Aparato empleado en la prueba de disolución. 1 Membrana de diálisis, 2 medio de disolución, 3 pipeta volumétrica, 4 baño de agua y 5 parrilla con agitación.

5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los espectros de absorción obtenidos del miconazol base, nitrato de miconazol en Brij® 58 al 2.5% p/v y del complejo de PVAL-H₃BO₃-I₂-KI se incluyen en el anexo 1 junto con los valores de los coeficientes de absorptividad obtenidos para las curvas de calibración. Las curvas de calibración para el miconazol base, nitrato de miconazol y la del complejo PVAL-H₃BO₃-I₂-KI se leyeron a las longitudes de onda de máxima absorción (272 nm para miconazol base y nitrato de miconazol y 640 nm para el complejo) determinadas según los espectrogramas obtenidos.

En el anexo 2 se incluyen las concentraciones y las correspondientes absorbancias de las curvas de calibración así como sus parámetros estadísticos: desviación estándar (d.e.), coeficiente de determinación (r^2), coeficiente de correlación (r), coeficiente de variación (C.V.), ordenada al origen (b) y la pendiente (m).

De acuerdo al análisis estadístico podemos observar que en todas las curvas de calibración se obtuvo una r^2 mayor a 0.997 lo cual indica que los puntos experimentales se ajustan a una línea recta ya que r^2 es muy cercana a 1. El porcentaje de C.V. es aceptable ya que los valores obtenidos con este método espectrofotométrico son menores al 5.0 %, lo cual indica que la dispersión del conjunto de los datos de la curva de calibración es bajo [Aguilar, G., *et al.*, 1992].

También se incluyen los resultados de la prueba de varianza para evaluar la linealidad del sistema que es la capacidad para dar una respuesta analítica directamente proporcional a la cantidad o concentración del analito presente en la solución o mezcla de la cual se obtiene la señal analítica. Obteniéndose que F-calculada es mayor a F-crítica para todos los casos, por lo que de acuerdo al criterio de aceptación se rechaza la H₀, lo cual quiere decir que hay una relación lineal entre la concentración del principio activo con su respectiva absorbancia.

El anexo 2 también incluye los resultados de la prueba de intercepto para todas las curvas de calibración. En la mayoría de los casos se obtuvo que t-calculada es mayor a t-crítica,

de acuerdo al criterio de aceptación se rechaza la H_0 , lo cual quiere decir que el intercepto es diferente a cero. No obstante, se considera que las curvas obtenidas pueden ser empleadas sin problema para los cálculos, pues la ordenada al origen es muy cercana a cero.

Las nanopartículas fueron preparadas por el método de Emulsificación–difusión, como se señaló anteriormente, esta técnica involucra el uso de solventes parcialmente miscibles con agua, los cuales son previamente saturados en agua con el objeto de asegurar el equilibrio termodinámico de ambos líquidos. La selección del tipo de solvente a utilizar para la preparación de las nanopartículas se apoyó en trabajos de investigación en los que se han preparado nanoesferas y nanocápsulas con PLA, PLGA y CAP [Piñón-Segundo, E., 2003].

El polímero utilizado como estabilizante durante la preparación de las nanopartículas por el método de Emulsificación–difusión fue el PVAL, ya que evita la agregación de las nanopartículas aún después de ser sometidas a un proceso de liofilización, este proceso se da ya que las cadenas de PVAL poseen una gran afinidad a la superficie de las nanopartículas y se unen fuertemente a la superficie de éstas formando una capa estable, [Quintanar-Guerrero, D., *et al.*, 1998]. Su principal inconveniente de la utilización de este polímero estabilizante es la dificultad para removerlo completamente de las nanopartículas obtenidas.

Cabe recordar que los compuestos o principios activos que pueden ser encapsulados por la técnica de Emulsificación-difusión deben de ser insolubles en agua. Los principios activos incorporados en las nanopartículas fueron el miconazol base y nitrato de miconazol, éstos son derivados imidazólicos que se utilizan en medicina como antifúngicos. El miconazol base y nitrato de miconazol son prácticamente insolubles en agua, y solubles en disolventes orgánicos.

Para la determinación del tamaño de partícula, se utilizó un contador de partículas submicrónicas Nanosizer® N4 plus, la determinación del tamaño de partículas se basa en

la medición y las fluctuaciones de luz dispersa después de que un rayo láser incide sobre una celda conteniendo la dispersión de la muestra de estudio. La velocidad de medición de las partículas en un medio líquido depende de la temperatura, viscosidad del líquido y del tamaño de las partículas por lo que se requiere que todas las muestras sean analizadas bajo las mismas condiciones. Las condiciones para todos los lotes analizados fueron a 25°C, utilizando como medio de dispersión agua grado MilliQ® y con un ángulo de incidencia del rayo láser de 90°. Los resultados obtenidos del tamaño promedio de las partículas, índice de polidispersidad (I.P.), la distribución del tamaño de partícula y su desviación estándar (d.e.). Cabe señalar que el índice de polidispersidad está relacionado con el coeficiente de variación (C.V.) de la distribución del tamaño de la partícula por la expresión.

Ecuación 1.

$$CV = \frac{1}{\sqrt{\frac{1}{I.P.} + 4}}$$

A continuación se muestran los resultados obtenidos en las determinaciones del tamaño de partícula para los diferentes lotes de NE's (cuadro 4, figuras 14 a la 20 y gráfico 1). Todas las mediciones se realizaron por triplicado.

Cuadro 4. Tamaño de partícula promedio para nanopartículas de CAP y de CAP con miconazol base y nitrato de miconazol.

No. Lote	Tamaño (nm)	d. e. (nm)	I. P.	C.V.
1	288.1	84.4	0.131	0.358
	296.5	110.9	-0.317	0.642
	283.8	42.6	0.025	0.204
	$\bar{X} = 289.4$			$\bar{X} = 0.401$
2	278.6	78.8	-0.099	0.332
	281.8	74.2	-0.229	0.742
	276.1	97.5	-0.117	0.348
	$\bar{X} = 278.8$			$\bar{X} = 0.474$
3	486.3	181.3	-0.313	0.645
	467.8	207.0	-0.904	0.538
	473.1	187.8	-0.427	0.594
	$\bar{X} = 475.7$			$\bar{X} = 0.593$
4	576.2	261.5	-1.171	0.529
	552.4	266.2	-3.274	0.510
	596.3	200.9	-1.968	0.517
	$\bar{X} = 574.9$			$\bar{X} = 0.518$
5	300.9	35.5	0.015	0.164
	303.6	99.2	-0.186	0.873
	297.0	79.5	-0.101	0.334
	$\bar{X} = 300.5$			$\bar{X} = 0.457$
6	341.3	130.4	-0.351	0.623
	350.6	100.5	-0.156	1.122
	349.7	106.4	-0.147	1.292
	$\bar{X} = 347.2$			$\bar{X} = 1.012$
7	523.7	217.3	-1.209	0.528
	479.7	218.7	-1.231	0.527
	500.3	232.7	-1.609	0.521
	$\bar{X} = 501.2$			$\bar{X} = 0.525$

Figura 14. Distribución del tamaño de partícula de nanopartículas de CAP (Lote 1).

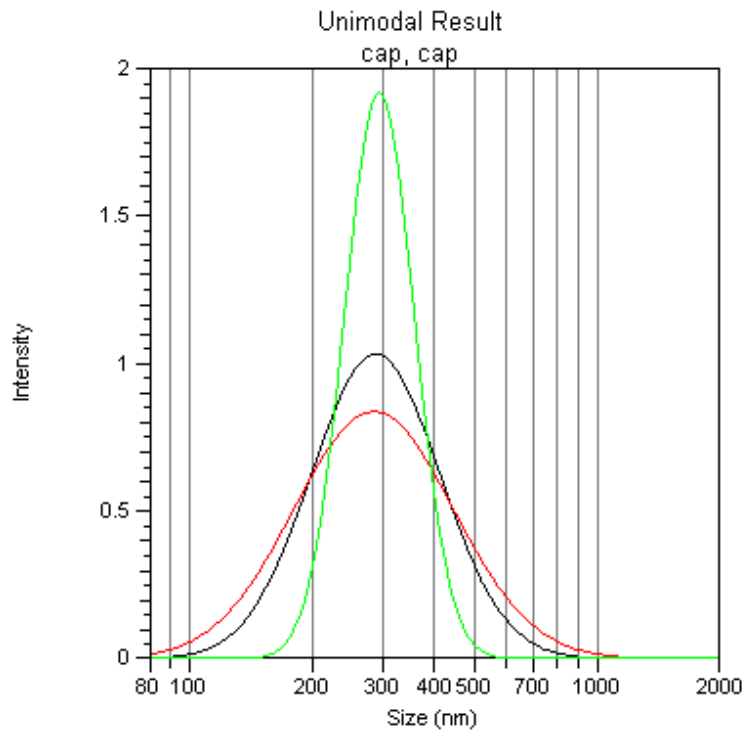


Figura 15. Distribución del tamaño de partícula de nanopartículas de CAP (Lote 2).

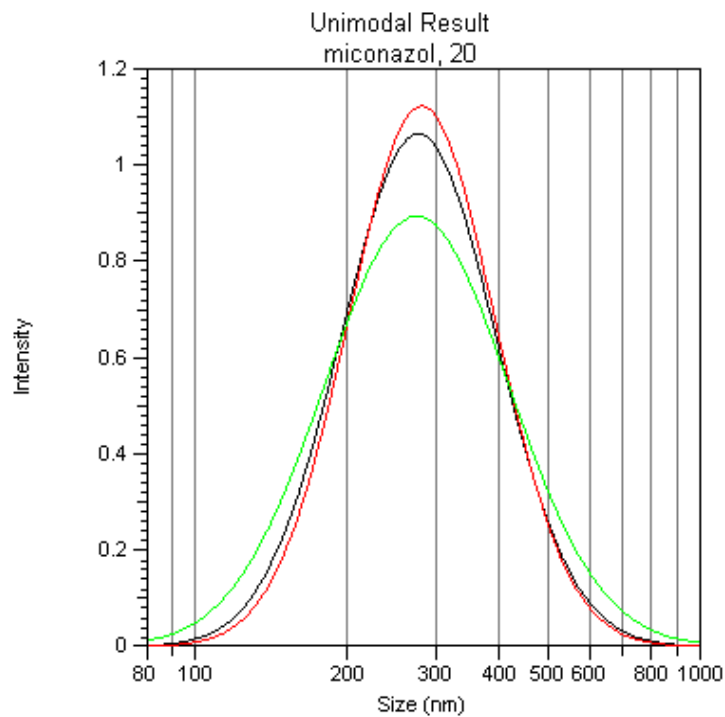


Figura 16. Distribución del tamaño de partícula de nanopartículas de CAP (Lote 3).

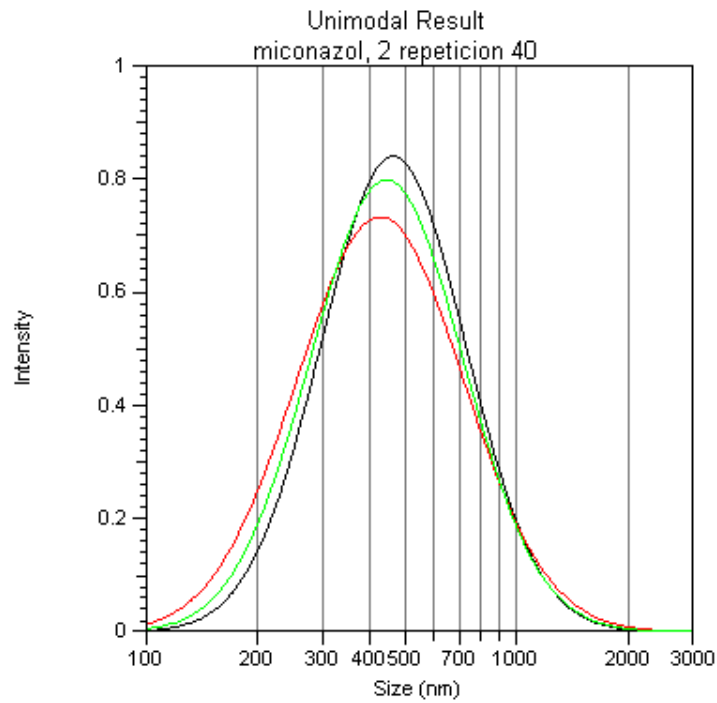


Figura 17. Distribución del tamaño de partícula de nanopartículas de CAP (Lote 4).

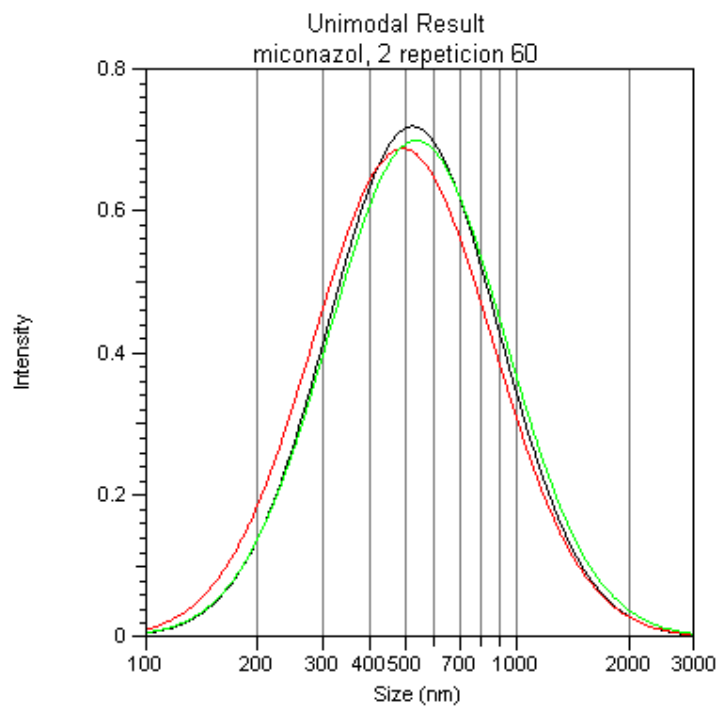


Figura 18. Distribución del tamaño de partícula de nanopartículas de CAP (Lote 5).

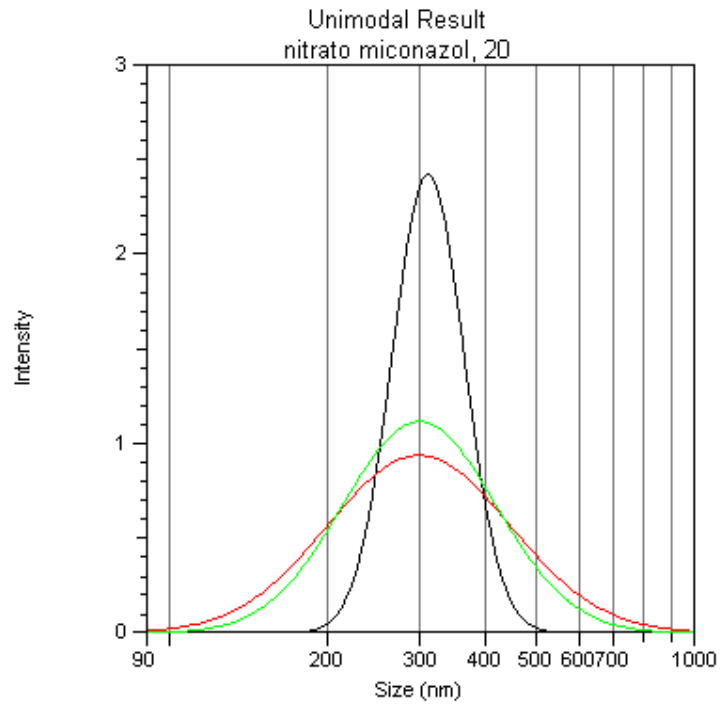


Figura 19. Distribución del tamaño de partícula de nanopartículas de CAP (Lote 6).

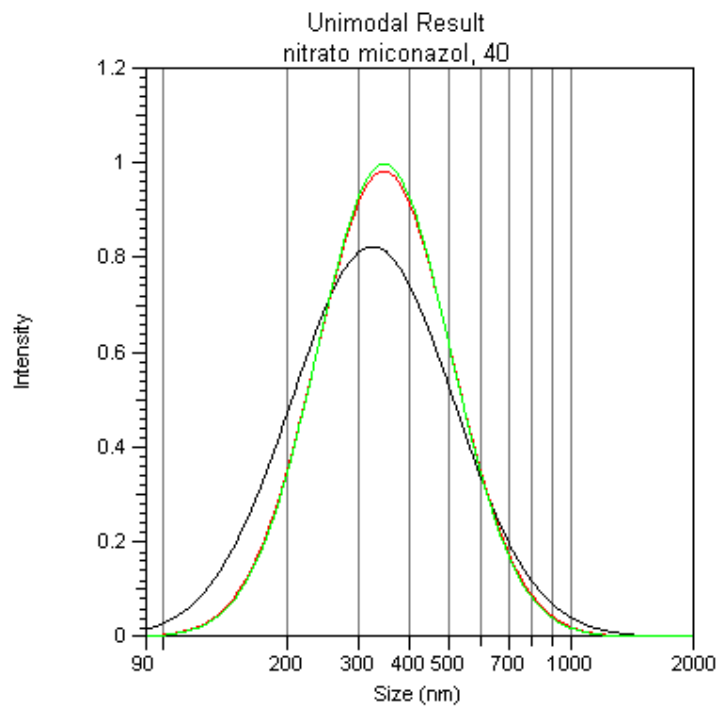


Figura 20. Distribución del tamaño de partícula de nanopartículas de CAP (Lote 7).

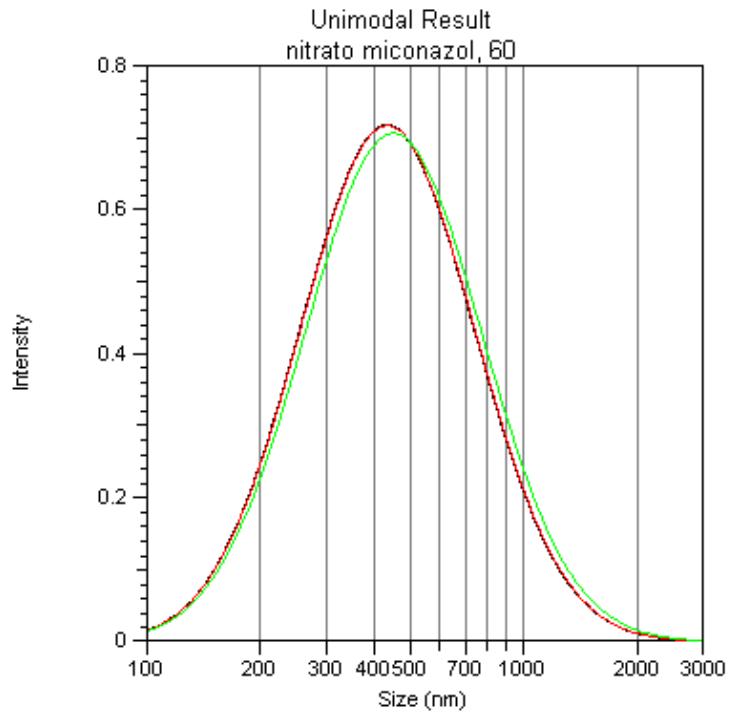
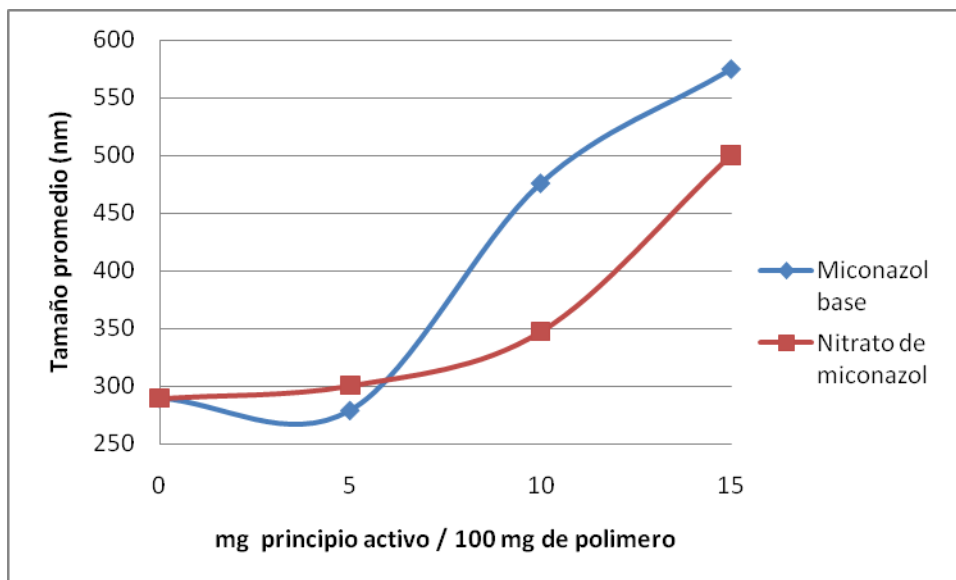


Gráfico 1. Comportamiento del tamaño de partícula.



De manera general, todos los lotes preparados presentan un tamaño submicrónico y todas las partículas obtenidas son menores a 600 nm, como se muestra en el cuadro 4 y en las figuras 14 a la 20. Se puede apreciar que al aumentar la cantidad de miconazol base para los lotes del 2 al 4 y nitrato de miconazol para los lotes del 5 al 7 en las NE's el tamaño de partícula se ve incrementada ya que el principio activo es encapsulado en mayor cantidad. Esta tendencia se puede apreciar claramente en el Grafico 1. Existen algunos reportes que señalan que al aumentar la proporción de principio activo puede aumentar el tamaño de las NE's poliméricas. Por ejemplo, Piñón-Segundo, E., [2003] preparó NE's de PLGA en el cual al aumentar la cantidad de triclosán en las NE's el tamaño de las mismas se ve incrementado. En estudios posteriores Domínguez-Delgado, C.L., [2006] preparó NE's de Eudragit® E100; de igual manera, al aumentar la cantidad de triclosán en las NE's la tamaño de las mismas se ve incrementada aún cuando se trabajó con diferente polímero.

Los lotes con mayor cantidad de principio activo tanto de miconazol base como de nitrato de miconazol presentan una mayor desviación estándar en la distribución del tamaño de partícula, lo cual es indicativo de que los lotes incrementan su índice de polidispersidad. El índice de polidispersidad indica que tan homogénea es la dispersión; así, para considerar que una población es monodispersa su índice de polidispersión debe encontrarse en un rango de 0 a 0.5. Para calcular el coeficiente de variación se consideraron los valores absolutos de los índices de polidispersidad.

Quintanar-Guerrero, D., *et al.*, [1997], sugieren que el mecanismo de formación de las nanopartículas por el método de Emulsificación–difusión se fundamenta en la difusión del solvente desde los glóbulos de la emulsión. Cuando el solvente difunde acarrea moléculas de polímero hacia la fase acuosa, originando regiones locales de supersaturación, desde las cuales son formados nuevos glóbulos o agregados de polímeros (no totalmente desolvatados). La estabilidad de estas "protonanopartículas" por la presencia de un estabilizante (PVAL) es muy importante para evitar su coalescencia y la formación de aglomerados. Por lo tanto, si el estabilizante permanece en la interfase líquido-líquido

durante el proceso de difusión y su efecto protector es adecuado, se forman nanopartículas después de que se ha completado la difusión del solvente.

La cantidad residual de estabilizante (PVAL) en las nanoesferas se determinó con base a un método validado por Raygoza, T., *et al.*, [1995]. El PVAL forma un complejo colorido con yodo en presencia con ácido bórico, el compuesto formado es de color verde y dicho complejo es estable por 15 minutos [Raygoza, T. D., *et al.*, 1995].

En los cuadros 5 y 6 se incluyen los resultados de esta evaluación. Puede observarse que en todos los casos el porcentaje de PVAL residual es menor al 4.5%, lo cual indica que los lavados realizados durante el proceso con la finalidad de eliminar el PVAL son adecuados. Similares resultados fueron encontrados por Quintanar-Guerrero, D., *et al.*, [1998] en donde reportan 6-8% de PVAL residual en NE's de PLA preparadas por el método de Emulsificación-difusión, así como Piñón-Segundo, E., [2003], que reporta PVAL residual menor al 4% para NE's de PLGA, PLA y CAP preparadas por el método de Emulsificación-difusión.

El PVAL funciona como un coloide protector para los glóbulos de la emulsión formada durante la preparación de las nanoesferas así como previene la coalescencia ya que las moléculas de PVAL forman una capa estable sobre la superficie de las nanopartículas la cual permite la redispersión casi instantánea cuando las partículas liofilizadas son suspendidas en agua [Piñón-Segundo., 2003].

Se determinó la cantidad de miconazol base y nitrato de miconazol presente en las NE's espectrofotométricamente. Después se procedió a calcular el porcentaje de fármaco contenido en las NE's (%de miconazol base y nitrato de miconazol cargado) y la eficiencia de encapsulamiento (E.E.); para cada uno de los lotes de acuerdo a lo propuesto por Leroux, J., *et al.*, [1994], las fórmulas empleadas fueron las siguientes:

Ecuación 2.

$$\text{Principio activo cargado} = \frac{\text{Cantidad de principio activo en las nanoesferas}}{\text{cantidad de nanoesferas}} \times 100$$

Ecuación 3.

$$E.E. = \frac{\% \text{ de principio activo cargado}}{\% \text{ de principio activo inicial} \times (1 - \text{fracción PVAL residual})} \times 100$$

En la ecuación 3 debido a que cierta cantidad de PVAL se absorbe en la superficie de la nanopartículas durante el proceso de obtención de las mismas, se debe introducir el factor de correlación $1/(1-\text{fracción de PVAL residual})$ para evitar una sobreestimación de la eficiencia de encapsulamiento [Leroux, J., *et al.*, 1994].

Para el porcentaje de miconazol base y nitrato de miconazol inicial (% miconazol base y % nitrato de miconazol) se consideró la cantidad de miconazol base y nitrato de miconazol empleada en la preparación de cada lote. Los resultados obtenidos para cada lote de nanoesferas se incluyen en el cuadro 5 y 6.

Cuadro 5. Características de las nanoesferas de CAP (% de miconazol base cargado en las nanoesferas, porcentaje de PVAL residual y eficiencia de encapsulamiento).

Lote	Polímero (mg)	Miconazol Base (mg)	% miconazol base	E.E. (%)	% miconazol base cargado	% PVAL residual
1	400.0	0.0	0.00	0.00	0.00	3.52
2	400.0	20.0	4.76	88.54	4.05	3.91
3	400.0	40.0	9.09	85.03	7.61	1.55
4	400.0	60.0	13.0	81.06	10.43	1.02

Cuadro 6. Características de las nanoesferas de CAP (% de nitrato de miconazol cargado en las nanoesferas, porcentaje de PVAL residual y eficiencia de encapsulamiento).

Lote	Polímero (mg)	Nitrato de miconazol (mg)	% nitrato de miconazol	E.E. (%)	% nitrato de miconazol	% PVAL residual
1	400.0	0.0	0.00	0.00	0.00	3.52
5	400.0	20.0	4.76	83.91	3.82	4.36
6	400.0	40.0	9.09	84.05	7.52	2.42
7	400.0	60.0	13.0	78.23	10.01	1.58

Los porcentajes de E.E. pueden considerarse como muy aceptables ya que generalmente, es difícil alcanzar eficiencias mayores de 80%. A pesar de que tanto el miconazol base como el nitrato de miconazol son compuestos considerados como prácticamente insolubles en agua, es probable que al manejar grandes volúmenes de agua durante la preparación de las NE's parte del principio activo sea arrastrado, lo cual disminuye la cantidad de principio activo en las NE's. Asimismo, al utilizar un solvente prácticamente miscible en agua (metil etil cetona) el principio activo pudo ser arrastrado fuera de los glóbulos de la emulsión durante etapa de difusión en el proceso de formación de las nanopartículas, es decir, en el momento en que se agrega agua destilada al sistema y ser eliminado junto con el sobrenadante del proceso lavado-centrifugado.

Una de las principales aplicaciones de la calorimetría diferencial de barrido para el análisis de las nanopartículas es la determinación de la forma en la que se encuentra el principio activo en la matriz polimérica, ya que permite establecer si el principio activo se encuentra disperso molecularmente en la matriz o en forma de cristales [Calvo, P., *et al.*, 1996].

Cuando existe una dispersión molecular del principio activo en la matriz polimérica de las nanopartículas no se detecta el pico característico de fusión del principio activo en los termogramas de las nanopartículas cargadas [Calvo, P., *et al.*, 1996].

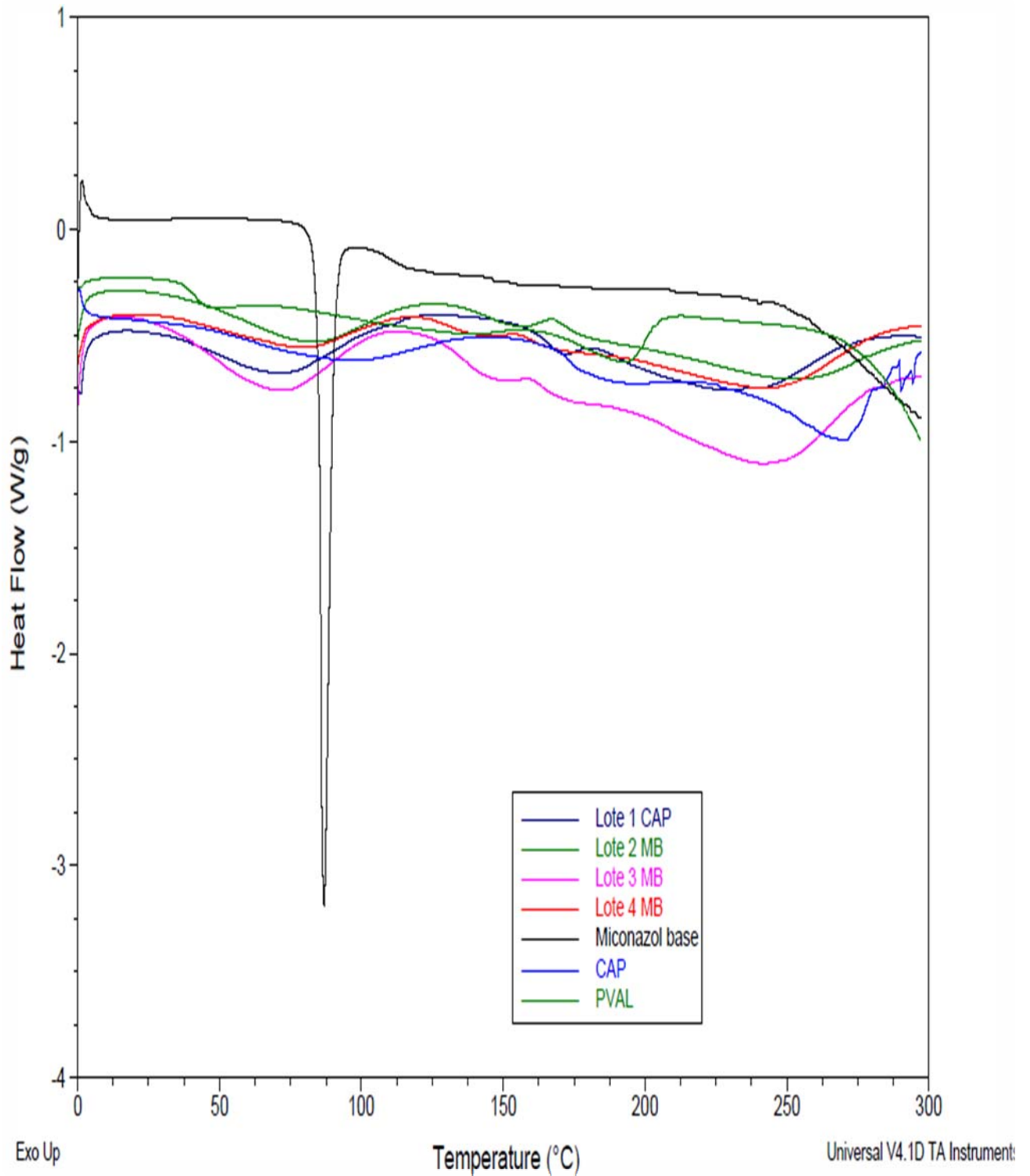


Figura 21 (a). Termogramas para NE's de CAP con miconazol base. Porcentajes de miconazol base Lote 1, 0%, Lote 2, 4.7%, Lote 3, 9.0%, Lote 4, 13.0%.

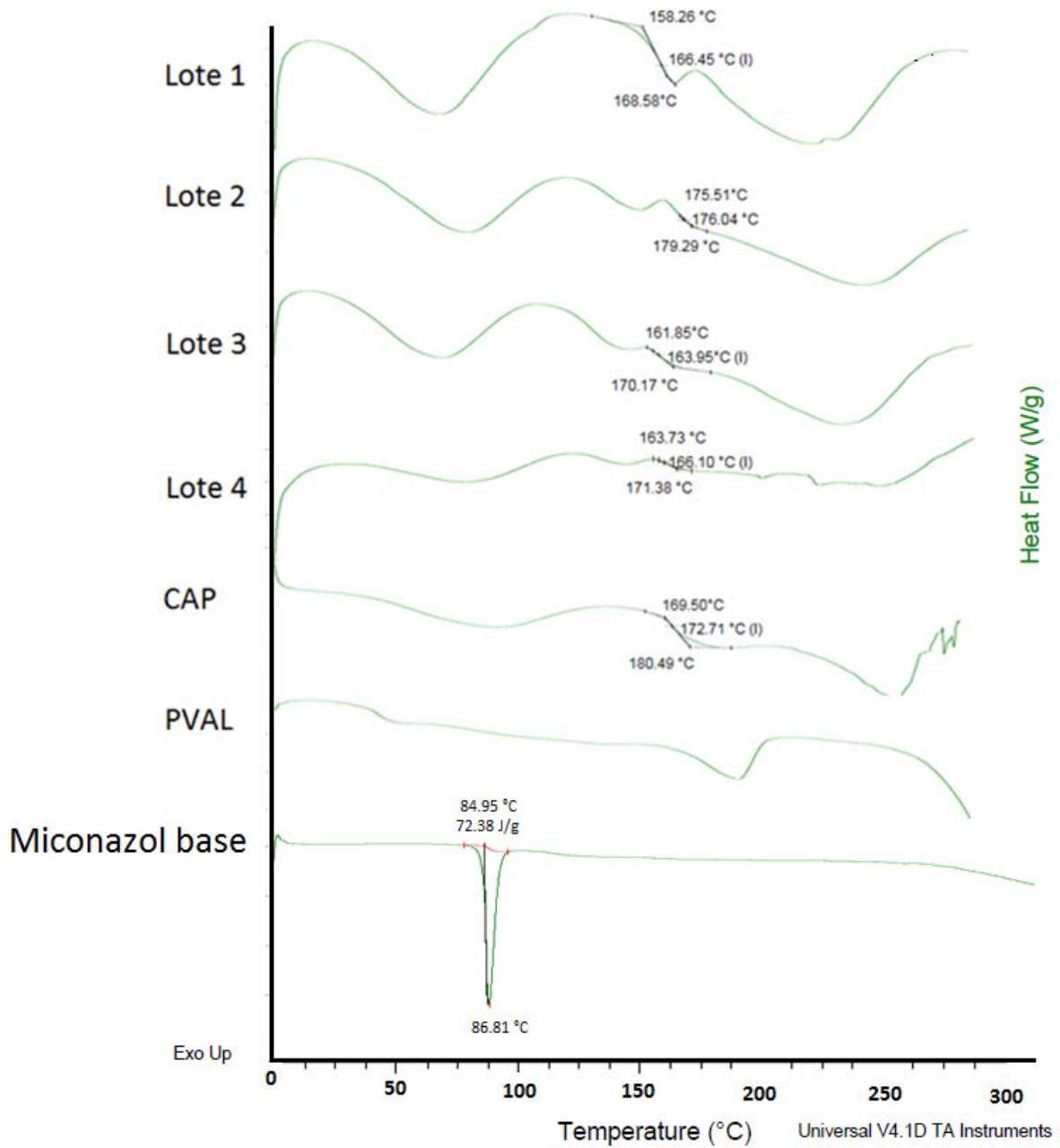


Figura 21 (b). Termogramas para NE's de CAP con miconazol base, señalando la temperatura de transición vítrea (T_g) para los lotes y el CAP y el punto de fusión para el miconazol base. Porcentajes de miconazol base Lote 1, 0%, Lote 2, 4.7%, Lote 3, 9.0%, Lote 4, 13.0%.

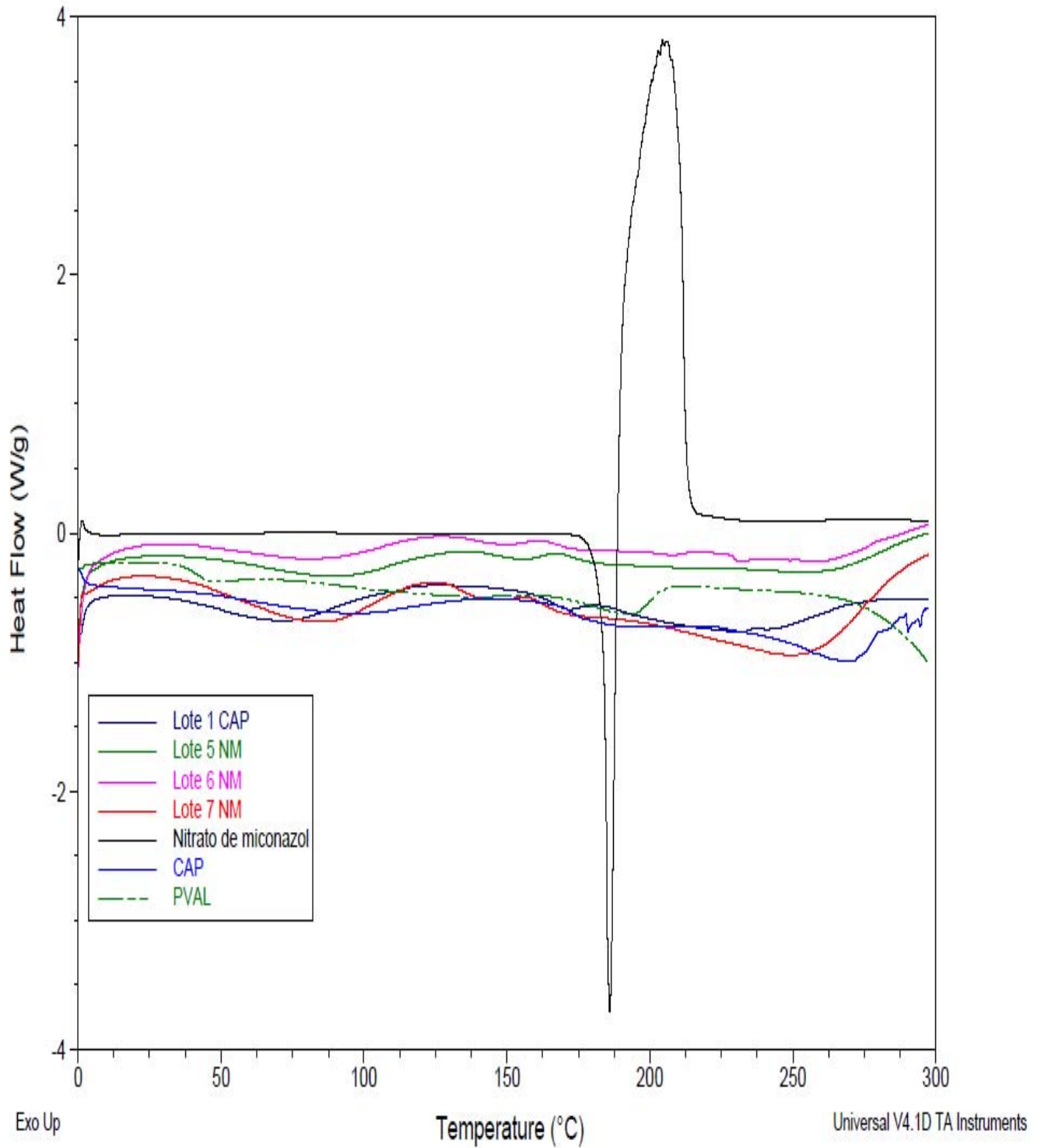


Figura 22 (a). Termogramas para NE's de CAP con nitrato de miconazol. Porcentajes de nitrato de miconazol Lote 5, 4.7%, Lote 6, 9.0%, Lote 7, 13.0%.

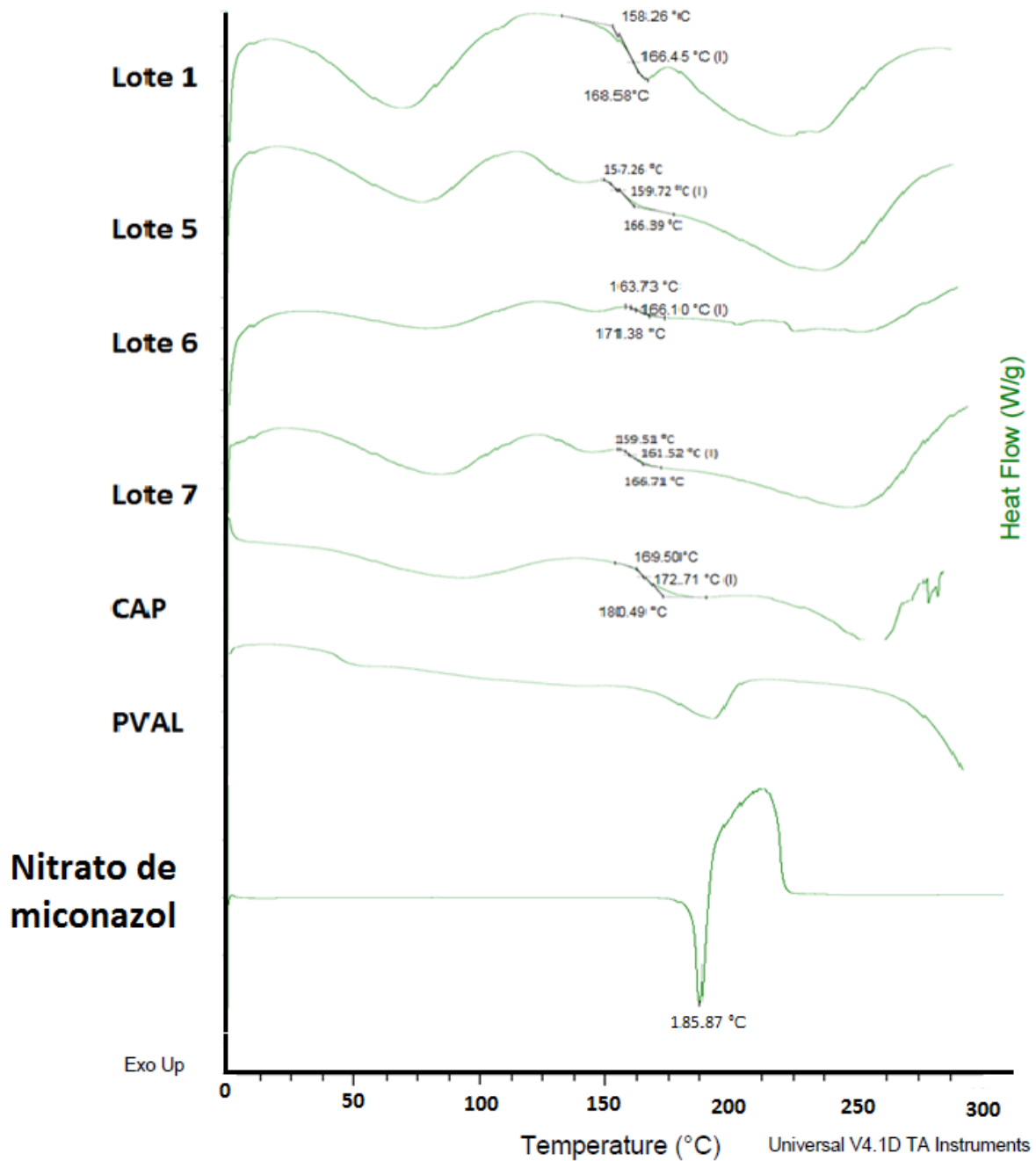


Figura 22 (b). Termogramas para NE's de CAP con nitrato de miconazol, señalando la temperatura de transición vítrea (T_g) para los lotes y el CAP y el punto de fusión para el nitrato de miconazol. Porcentajes de nitrato de miconazol Lote 5, 4.7%, Lote 6, 9.0%, Lote 7, 13.0%.

Los resultados de las pruebas de calorimetría diferencial de barrido se muestran en las figuras 21 y 22. Estudios realizados por Roxin, P., Karlsson, A. y Singh, S. K., [1998] muestran que la temperatura de transición vítrea del CAP promedio es de 171.6°C con un rango de 165°C - 205°C. En las figuras 21 a y b se muestran los termogramas de las nanopartículas de CAP cargadas con miconazol base en diferentes proporciones; puede apreciarse que el miconazol base se encuentra disperso molecularmente en el polímero ya que no aparece el pico característico de fusión del miconazol base (p.f. = 86.81°C) y que además no se detectan cambios considerables en las temperaturas de transición vítrea en los diferentes lotes de NE's, ni una tendencia al abatimiento de estas temperaturas cuando se aumenta la proporción de principio activo. Para el CAP se obtuvo una temperatura de transición vítrea de 172.71°C muy parecida a lo que reporta Roxin, P., Karlsson, A. y Singh, S. K., [1998].

Las figuras 22 a y b también comprueban la ausencia de cristales de nitrato de miconazol en los diferentes lotes de NE's; cabe señalar que existe un abatimiento de la temperatura de transición vítrea del CAP para los lotes 5 y 6. En el termograma de nitrato de miconazol se observa una exoterma a 212°C, la cual se le atribuye a un proceso de cristalización, además se detectó un pico endotérmico a 185.87°C atribuido a la fusión del compuesto.

En cuanto al análisis de la liberación *in vitro* del nitrato de miconazol y miconazol base a partir de las nanoesferas preparadas se realizaron estudios empleando un sistema de membranas de difusión en donde las nanopartículas son suspendidas en un pequeño volumen de fase continua y son separadas a través de una membrana de diálisis de otra fase que se encuentra en condiciones "sink".

Es recomendable que los estudios de liberación se realicen bajo condiciones "sink", es decir, por debajo del 15% de solubilidad. Si el fármaco en estudio es poco soluble en agua es válido adicionar solventes no acuosos o agentes solubilizantes al medio de dispersión con el objeto de mantener las condiciones "sink". Este tipo de estudios son de gran importancia para la determinar el mecanismo de liberación del principio activo a partir del acarreador.

Para corroborar que se trabajó bajo condiciones “sink” se determinó la solubilidad de los principios activos usado, en una solución amortiguadora de fosfatos con Brij 58® 2.5 p/v a dos diferentes pH’s. En el cuadro 7 podemos ver que la solubilidad del fármaco no es motivo de que la liberación se detenga porque el medio se saturó, sino porque el principio activo ha alcanzado la liberación máxima.

Cuadro 7. Solubilidad del miconazol base y nitrato de miconazol.

Principio activo	pH	Solubilidad mg/mL
Miconazol base	4.5	2.042
Miconazol base	5.0	1.628
Nitrato de miconazol	4.5	2.269
Nitrato de miconazol	5.0	1.858

Debido a que los fármacos empleados (miconazol base y nitrato de miconazol) son prácticamente insolubles en agua se decidió adicionar al medio de disolución un agente que facilitará su disolución y por lo tanto aumentar la solubilidad. Estudios realizados por Piñón-Segundo, E., [2003] muestran que el Brij 58® es un agente surfactante que aumenta la solubilidad del triclosán y que no interfiere en la detección espectrofotométrica del mismo. Se realizaron varias pruebas utilizando diferentes concentraciones de Brij 58® para ver a que concentración se solubilizan mejor los principios activos, finalmente se decidió trabajar con Brij 58® 2.5% p/v ya que a esta concentración aumento la solubilidad tanto del miconazol base y nitrato de miconazol además no interfiere en la detección espectrofotométrica del mismo. En el anexo 1 se muestran los barridos para la solución amortiguadora de fosfatos pH = 4.5 y 5.0 conteniendo Brij 58® al 2.5 p/v. Puede observarse que a las longitudes de onda seleccionadas para cuantificar el miconazol base y nitrato de miconazol (tanto para el miconazol base y nitrato de miconazol 272 nm) no hay interferencia del Brij 58®.

De acuerdo a los resultados obtenidos de los perfiles de liberación sólo se muestran las 6 primeras horas de liberación ya que después de estas no se detectó ningún cambio alguno, lo cual quiere decir que tanto el miconazol base como el nitrato de miconazol han sido liberados por completo y se ha alcanzado la concentración máxima liberada (M_{α}) como se muestra en los gráficos de 2 al 5.

El los gráficos anteriores se puede apreciar que tanto el miconazol base como el nitrato de miconazol se liberaron rápidamente. Piñón-Segundo, E., [2005] preparó nanopartículas de CAP con triclosán para el tratamiento de enfermedades periodontales, dando liberaciones muy rápidas, liberando más del 60 % en los primeros 45 minutos. Comportamiento semejante a los perfiles determinados para el miconazol base y nitrato de miconazol.

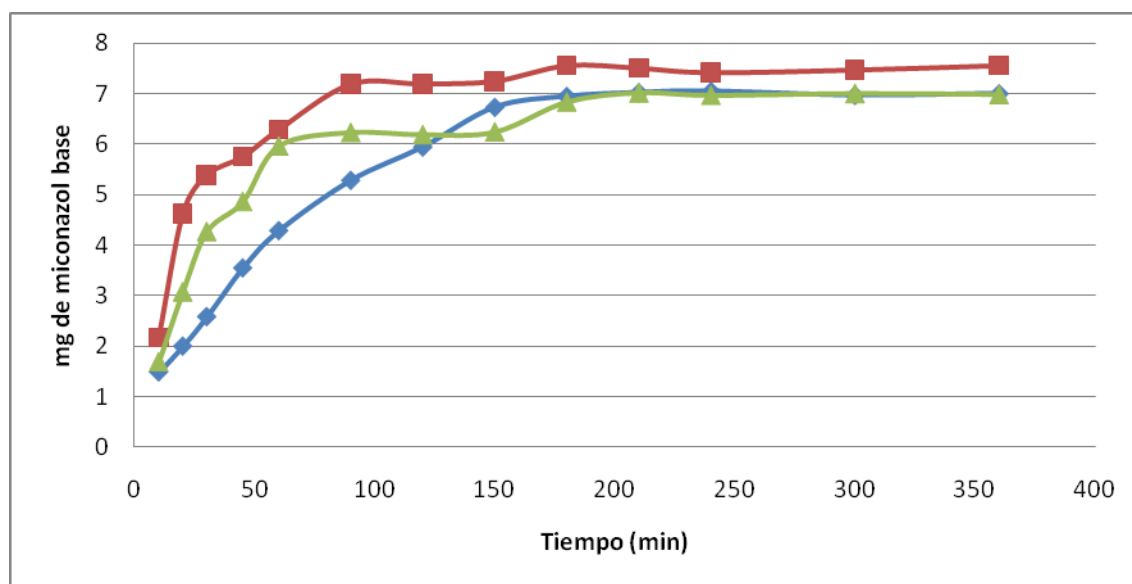


Gráfico 2. Perfil de liberación para las NE's de CAP con miconazol base. Lote 2 ◆ (con 4.76 % de miconazol base en las NE's); Lote 3 ■ (con 9.09 % de miconazol base en las NE's); Lote 4 ▲ (con 13.0 % de miconazol base en las NE's), en una solución amortiguadora de fosfatos pH = 4.5.

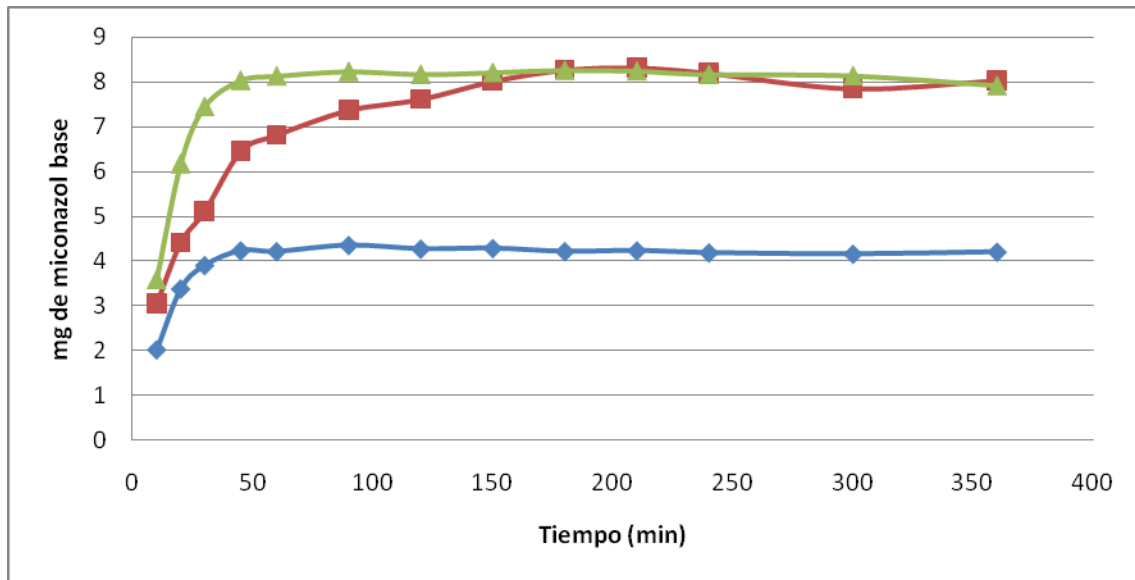


Gráfico 3. Perfil de liberación para las NE's de CAP con nitrato de miconazol. Lote 5 (con 4.76 % de nitrato de miconazol en las NE's); Lote 6 (con 9.09 % de nitrato de miconazol en las NE's); Lote 7 (con 13.0 % de nitrato de miconazol en las NE's), en una solución amortiguadora de fosfatos pH = 4.5.

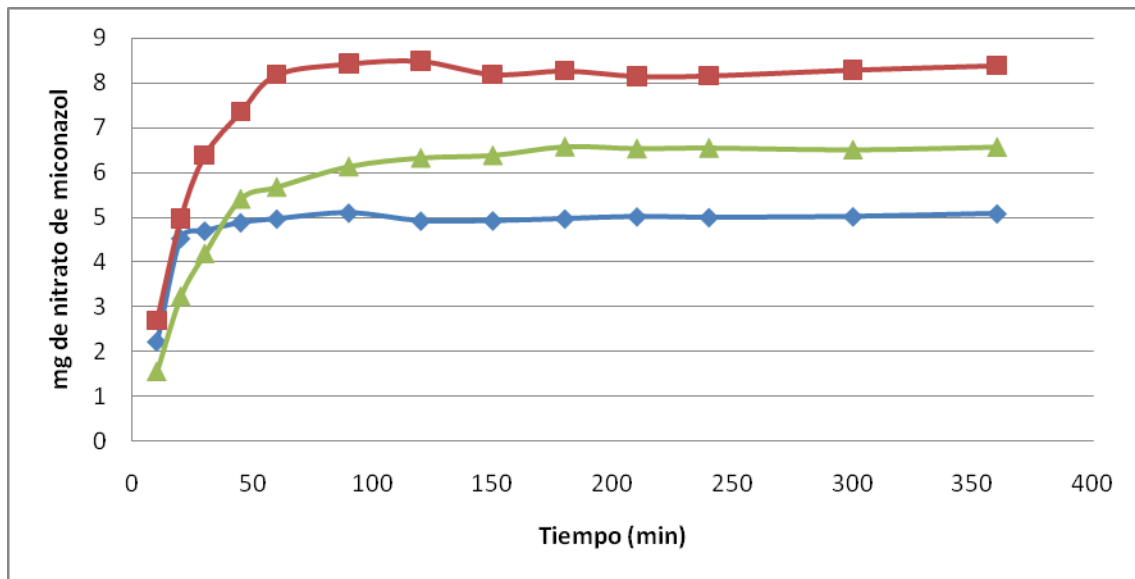


Gráfico 4. Perfil de liberación para las NE's de CAP con miconazol base. Lote 2 (con 4.76 % de miconazol base en las NE's); Lote 3 (con 9.09 % de miconazol base en las NE's); Lote 4 (con 13.0 % de miconazol base en las NE's), en una solución amortiguadora de fosfatos pH = 5.0.

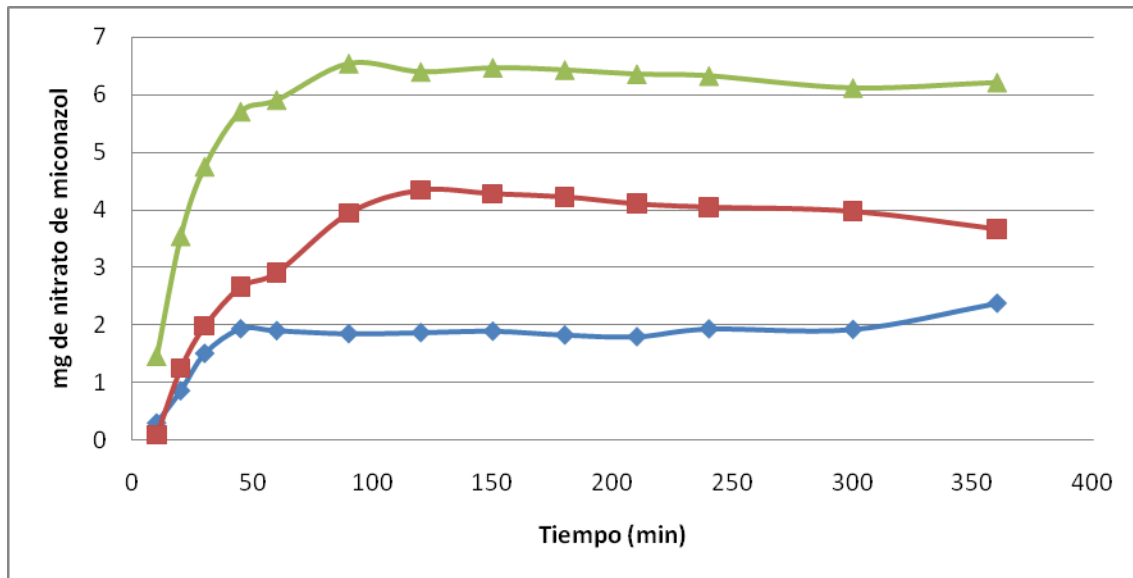


Gráfico 5. Perfil de liberación para las NE's de CAP con nitrato de miconazol. Lote 5 ◆ (con 4.76 % de nitrato de miconazol en las NE's); Lote 6 ■ (con 9.09 % de nitrato de miconazol en las NE's); Lote 7 ▲ (con 13.0 % de nitrato miconazol en las NE's), en una solución amortiguadora de fosfatos pH = 5.0.

Los porcentajes incluidos en el anexo 4 representan la cantidad de fármaco que realmente es capaz de difundir hacia el medio de disolución (la cantidad que participa en el proceso de liberación). Por esta razón, se procedió a calcular los porcentajes liberados para cada tiempo considerando como 100% la cantidad máxima liberada al equilibrio, con los datos obtenidos se obtuvieron los gráficos 6 al 9, donde M_t es la cantidad liberada a un tiempo t y M_α es la cantidad máxima liberada.

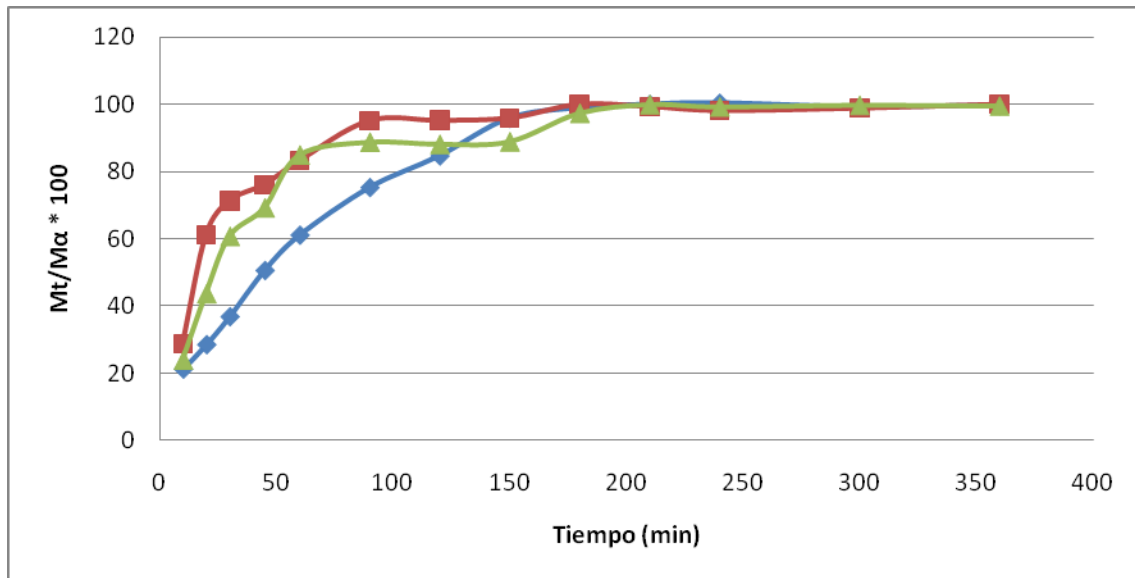


Gráfico 6. Perfil de liberación para las NE's de CAP con miconazol base, considerando como 100 % la cantidad máxima liberada. Lote 2 \blacklozenge (con 4.76 % de miconazol base en las NE's); Lote 3 \blacksquare (con 9.09 % de miconazol base en las NE's); Lote 4 \blacktriangle (con 13.0 % de miconazol base en las NE's), en una solución amortiguadora de fosfatos pH = 4.5.

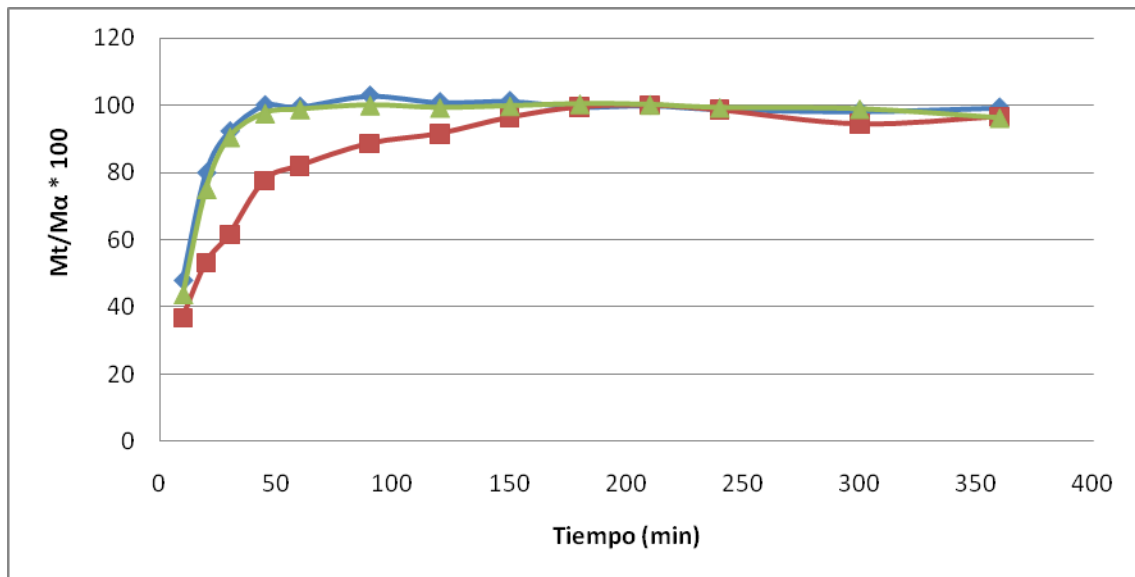


Gráfico 7. Perfil de liberación para las NE's de CAP con nitrato de miconazol, considerando como 100 % la cantidad máxima liberada. Lote 5 \blacklozenge (con 4.76 % de nitrato de miconazol en las NE's); Lote 6 \blacksquare (con 9.09 % de nitrato de miconazol en las NE's); Lote 7 \blacktriangle (con 13.0 % de nitrato de miconazol en las NE's), en una solución amortiguadora de fosfatos pH = 4.5.

Teóricamente, se esperaría que la liberación del principio activo fuera más lenta para los lotes que contienen una menor cantidad de fármaco; es decir, una menor proporción principio activo/polímero. Sin embargo, no todas las liberaciones obtenidas a pH=4.5 para ambos principios activos (gráficos 6 y 7) presentaron este comportamiento. En el gráfico 6, se observa que el lote 2 con la menor cantidad de principio activo muestra la liberación más lenta; en contraste, para el nitrato de miconazol la liberación más lenta se obtuvo para la carga de principio activo intermedia (9.09%). En el gráfico 7 se aprecia que los perfiles de liberación para los lotes 5 y 7 son muy semejantes. Para determinar si existe evidencia estadísticamente significativa en la velocidad de liberación de los principios activos se aplicó un análisis de varianza. Con los porcentajes obtenidos de los perfiles de liberación a un tiempo de 45 min se realizó un análisis de varianza con dos factores con una muestra por grupo, para saber qué efectos (principio activo y cantidad de activo) son estadísticamente significativos. Se establecieron las siguientes pruebas de hipótesis:

H₀: Todas las medias son iguales y por lo tanto no hay diferencia entre los tratamientos.

H_i: No todas las medias son iguales y por lo tanto al menos un tratamiento es diferente.

El criterio de aceptación fue el siguiente:

Si F calculada $>$ F crítica se rechaza la H_0 , por lo tanto hay diferencia entre tratamientos.

Si F calculada $<$ F crítica se acepta la H_0 , por lo tanto no hay diferencia entre los tratamientos.

Cuadro 8. Análisis de varianza con dos factores con una muestra por grupo para los perfiles de liberación a un pH de 4.5, tomando los porcentajes liberados a 45 min.

ANÁLISIS DE VARIANZA						
<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Principio activo	1049.01812	1	1049.01812	3.62582846	0.19719442	18.5128205
Cantidad de principio activo	75.5405594	2	37.7702797	0.13054927	0.8845258	19
Error	578.636378	2	289.318189			
Total	1703.19506	5				

De acuerdo al análisis de varianza en cuanto al principio activo, se encontró que F calculada es menor que F crítica, por lo tanto se acepta la H_0 , lo que indica que no hay diferencia estadísticamente significativa entre las cantidades liberadas a los 45 minutos de la prueba de liberación utilizando miconazol base y nitrato de miconazol en las NE's a un $pH = 4.5$.

En relación a la cantidad de principio activo en las NE's, se encontró que F calculada es menor que F crítica a $pH = 4.5$, por lo tanto se acepta la H_0 , lo que indica que no hay diferencia significativa entre la cantidad de principio activo incorporada. Por lo tanto, la carga de principio activo en las NE's no influye en la liberación del activo a partir de las NE's, al menos a los 45 minutos.

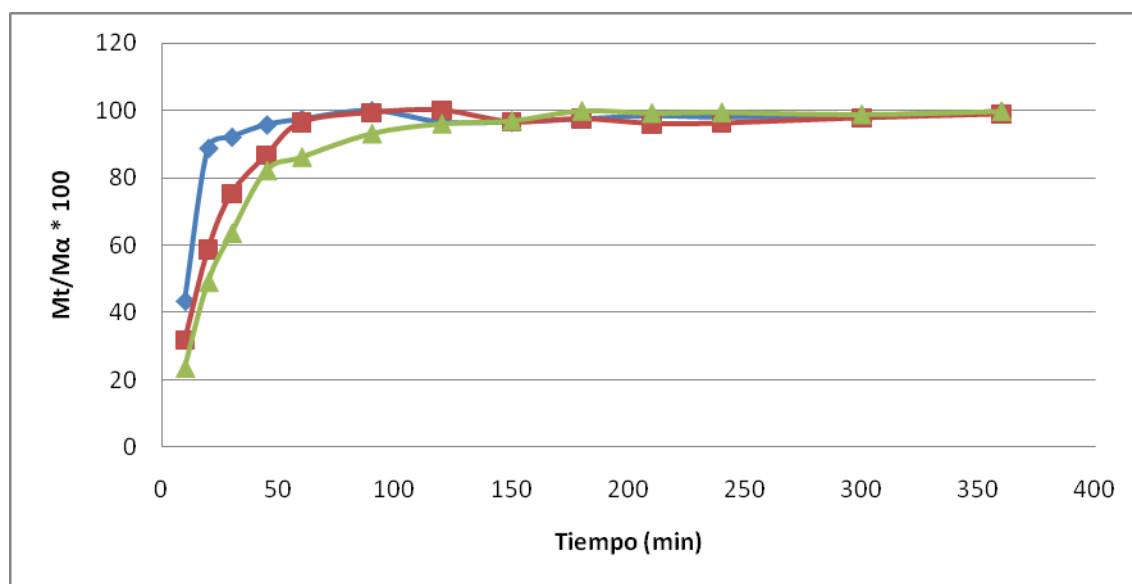


Gráfico 8. Perfil de liberación para las NE's de CAP con miconazol base, considerando como 100 % la cantidad máxima liberada. Lote 2 \blacklozenge (con 4.76 % de miconazol base en las NE's); Lote 3 \blacksquare (con 9.09 % de miconazol base en las NE's); Lote 4 \blacktriangle (con 13.0 % de miconazol base en las NE's), en una solución amortiguadora de fosfatos $pH = 5.0$.

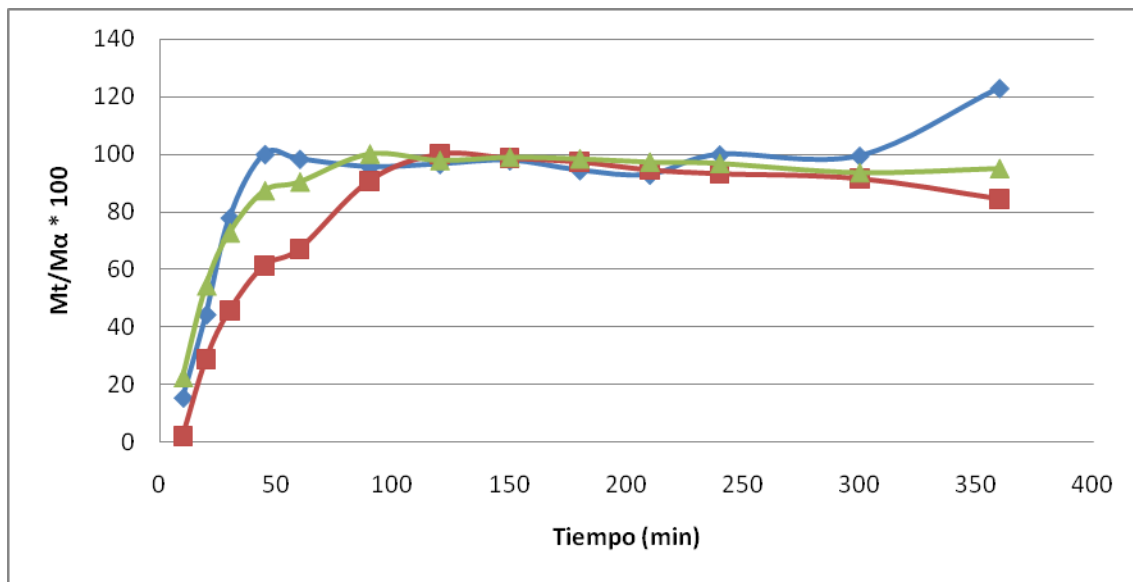


Gráfico 9. Perfil de liberación para las NE's de CAP con nitrato de miconazol, considerando como 100 % la cantidad máxima liberada. Lote 5 ◆ (con 4.76 % de nitrato de miconazol en las NE's); Lote 6 ■ (con 9.09 % de nitrato de miconazol en las NE's); Lote 7 ▲ (con 13.0 % de nitrato de miconazol en las NE's), en una solución amortiguadora de fosfatos pH = 5.0.

Al comparar los perfiles de liberación a pH=5.0 de los gráficos 8 y 9 puede apreciarse que no hay una clara influencia de la cantidad de principio activo cargada en las NE's sobre la velocidad de liberación. Al igual que para los lotes analizados a pH = 4.5 se aplicó un análisis de varianza para verificar si existe evidencia estadísticamente significativa que demuestre que la cantidad de principio activo incluida en las NE's o la naturaleza del principio activo tienen efecto sobre la velocidad de liberación. Con los porcentajes obtenidos de los perfiles de liberación a un tiempo de 45 min, se realizó un análisis de varianza con dos factores con una muestra por grupo, para saber qué efectos (principio activo y cantidad de activo) son estadísticamente significativos. Se establecieron las siguientes pruebas de hipótesis:

H₀: Todas las medias son iguales y por lo tanto no hay diferencia entre los tratamientos.

H_i: No todas las medias son iguales y por lo tanto al menos un tratamiento es diferente.

El criterio de aceptación fue el siguiente:

Si F calculada $>$ F crítica se rechaza la H_0 , por lo tanto hay diferencia entre tratamientos.

Si F calculada $<$ F crítica se acepta la H_0 , por lo tanto no hay diferencia entre los tratamientos.

Cuadro 9. Análisis de varianza con dos factores con una muestra por grupo para los perfiles de liberación a un pH de 5.0, tomando los porcentajes liberados a 45 min.

ANÁLISIS DE VARIANZA						
<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Principio activo	42.6471845	1	42.6471845	0.28647103	0.6460373	18.5128205
Cantidad de principio activo	569.20117	2	284.600585	1.91172814	0.34343866	19
Error	297.741691	2	148.870846			
Total	909.590046	5				

De acuerdo al análisis de varianza en cuanto al principio activo, se encontró que F calculada es menor que F crítica, por lo tanto se acepta la H_0 , lo que indica que no hay diferencia significativa entre las cantidades de principio activo liberadas a los 45 min en las NE's a un pH = 5.0, independientemente del tipo de principio activo usado.

En relación a la cantidad de principio activo en las NE's, se encontró que F calculada es menor que F crítica a pH = 5.0, por lo tanto se acepta la H_0 , lo que indica que no hay diferencia significativa entre la cantidad de principio activo incorporada en las NE's y que ésta no influye en la liberación del miconazol base ni del nitrato de miconazol.

La liberación de fármacos a partir de nanopartículas depende de la naturaleza del sistema acarreador. En el caso de un sistema tipo matriz, el activo es distribuido o disperso en la matriz polimérica y la liberación ocurre por difusión o por erosión del sistema. Si la difusión del activo es más rápida que la degradación de la matriz, entonces el mecanismo de liberación ocurre principalmente por difusión. La liberación inicial del activo se le atribuye a la liberación de la fracción del fármaco que es adsorbido o enlazado débilmente

a la superficie de la NE's. Trabajando en condiciones "sink" se observa al principio una fase de liberación rápida seguida por una liberación lenta debida a la difusión del activo a partir de la matriz. Además, la velocidad de liberación del principio activo está relacionada directamente proporcional con la manera en que se encuentra presente el fármaco en la matriz, es decir, si se encuentra disperso molecularmente en la matriz o formando cristales [Calvo, P., *et al.*, 1996].

De acuerdo con los termogramas obtenidos para las NE's de CAP el nitrato de miconazol y el miconazol base se encuentran atrapados molecularmente en la matriz polimérica, por lo que podemos decir que las nanopartículas preparadas son un sistema tipo matriz. Y podemos afirmar que el proceso que controla la liberación fue un proceso de difusión, ya que los tiempos obtenidos son muy cortos como para poder hablar de una degradación del polímero que influyera sobre la liberación.

Para determinar el probable mecanismo de liberación los datos obtenidos se trataron de acuerdo al modelo semi-empírico propuesto por Rigter y Peppas. De acuerdo a este modelo se graficó $\ln (M_t/M_\infty)$ en función de $\ln t$, donde M_t es la cantidad liberada el tiempo t y M_∞ es la cantidad máxima liberada [Lowman, M. y Peppas, N. A., 1999y Peppas, N. A., *et al.*, 2000].

De manera general, la ecuación de Peppas describe la liberación de principios activos desde matrices con diferentes formas geométricas. De acuerdo con este modelo, la fracción liberada de una sustancia depende de una constante y de su exponente difusional "n" que indica el probable mecanismo físico de transporte y el tipo de liberación (ver cuadro 10). Si $n = 0.5$ el mecanismo de transporte es difusión fickiana y el tipo de liberación es dependiente del tiempo.

Cuadro 10. Mecanismos de transporte y tipo de liberación de acuerdo al valor de “n” en el modelo semi-empírico de Peppas.

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

En los gráficos 10, 11, 12 y 13 se reportan los datos obtenidos de acuerdo al modelo de Peppas, en la cuadro 8 y 9 se muestran los valores de “n” para los diferentes lotes de NE’s. Los gráficos se obtuvieron a partir de los datos incluidos en el anexo 4.

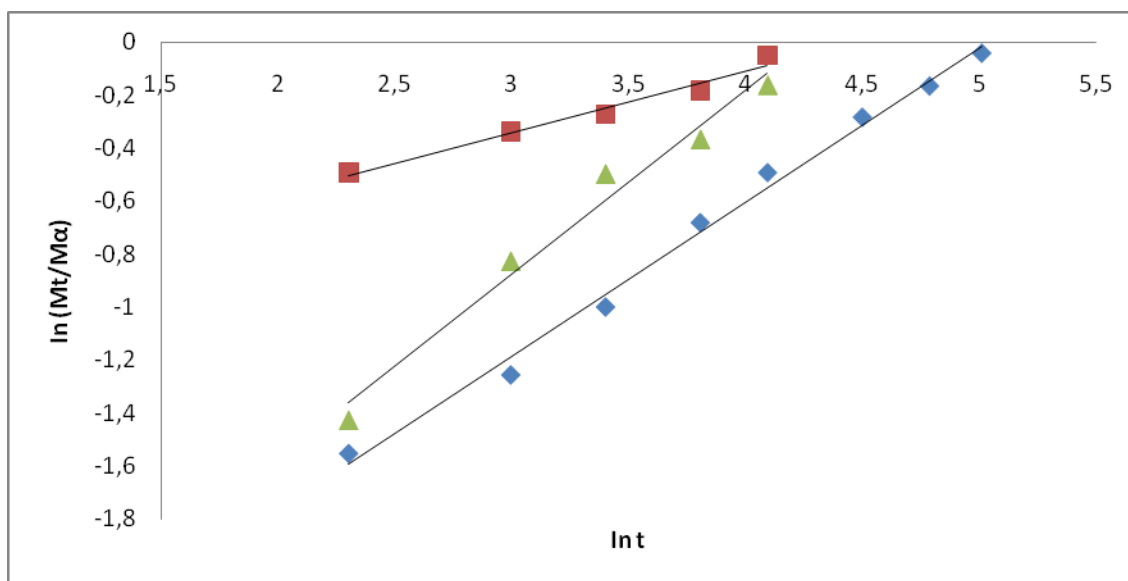


Gráfico 10. Modelo de Peppas aplicado a la liberación de miconazol base a partir de NE’s de CAP. Lote 2 \blacklozenge (con 4.76 % de miconazol base en las NE’s); Lote 3 \blacksquare (con 9.09 % de miconazol base en las NE’s); Lote 4 \blacktriangle (con 13.0 % de miconazol base en las NE’s), en una solución amortiguadora de fosfatos pH = 4.5.

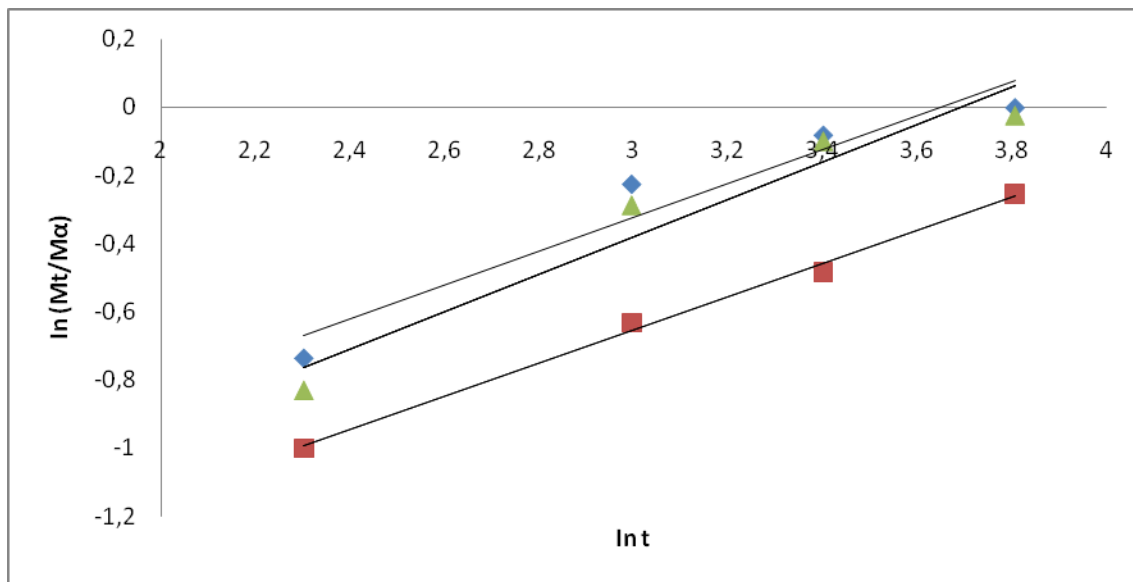


Gráfico 11. Modelo de Peppas aplicado a la liberación de nitrato de miconazol a partir de NE's de CAP. Lote 5 ▲ (con 4.76 % de nitrato de miconazol en las NE's); Lote 6 ■ (con 9.09 % de nitrato de miconazol en las NE's); Lote 7 ▲ (con 13.0 % de nitrato de miconazol en las NE's), en una solución amortiguadora de fosfatos pH = 4.5.

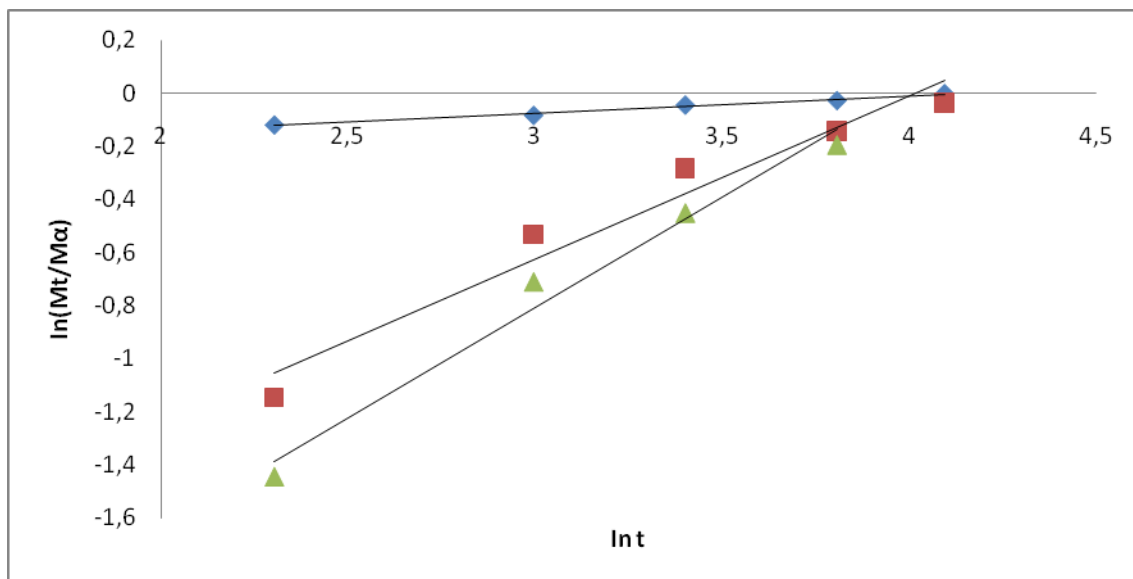


Gráfico 12. Modelo de Peppas aplicado a la liberación de miconazol base a partir de NE's de CAP. Lote 2 ▲ (con 4.76 % de miconazol base en las NE's); Lote 3 ■ (con 9.09 % de miconazol base en las NE's); Lote 4 ▲ (con 13.0 % de miconazol base en las NE's), en una solución amortiguadora de fosfatos pH = 5.0.

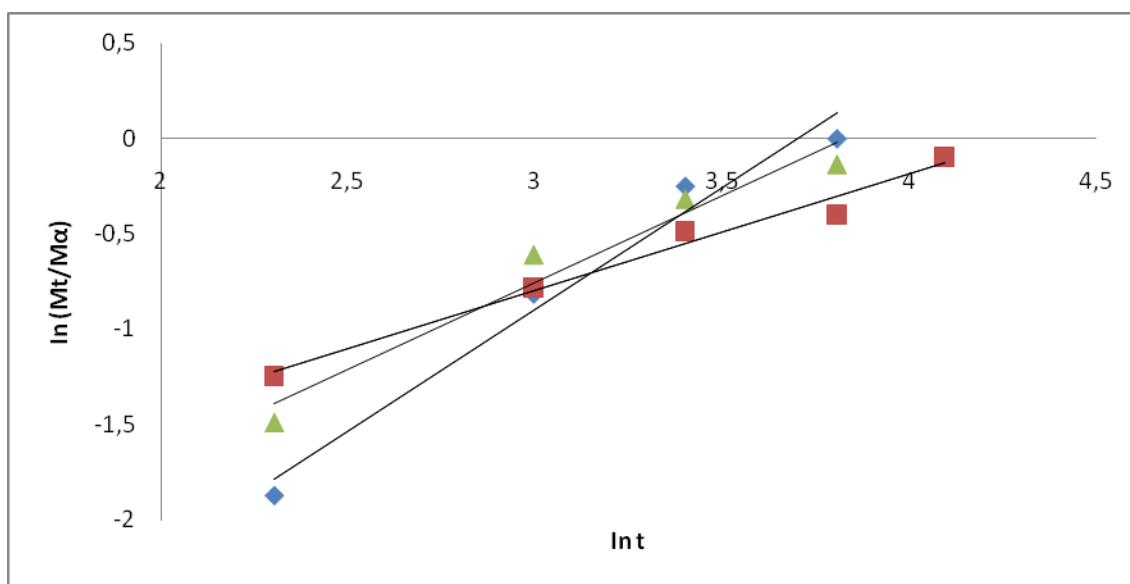


Gráfico 13. Modelo de Peppas aplicado a la liberación de nitrato de miconazol a partir de NE's de CAP. Lote 5 \blacklozenge (con 4.76 % de nitrato de miconazol en las NE's); Lote 6 \blacksquare (con 9.09 % de nitrato de miconazol en las NE's); Lote 7 \blacktriangle (con 13.0 % de nitrato de miconazol en las NE's), en una solución amortiguadora de fosfatos pH = 5.0.

Cuadro 11. Coeficientes de determinación y valor de "n" de acuerdo al modelo de Peppas a un pH de 4.5; el tiempo que se reporta es el intervalo en el que se obtiene la máxima linealidad para el cálculo de los coeficientes.

Lote	n	r ²	b	t (min)
2	0.5831	0.9929	-2.938	10-150
3	0.2806	0.9855	-1.922	20-90
4	0.6933	0.9776	-2.957	10-60
5	0.4969	0.9315	-1.813	10-45
6	0.4571	0.9897	-2.031	10-60
7	0.5499	0.9378	-2.0298	10-45

Cuadro 12. Coeficientes de determinación y valor de “n” de acuerdo al modelo de Peppas a un pH de 5.0; el tiempo que se reporta es el intervalo en el que se obtiene la máxima linealidad para el cálculo de los coeficientes.

Lote	n	r ²	b	t (min)
2	0.0794	0.9901	-0.352	20-90
3	0.6148	0.9569	-2.469	10-60
4	0.8325	0.9802	-3.304	10-45
5	1.2802	0.9755	-4.736	10-45
6	0.7301	0.9692	-3.346	20-90
7	0.9144	0.9533	-3.349	10-45

La mayoría de los valores del coeficiente difusional “n” obtenidos para las liberaciones tanto a pH = 4.5 y pH = 5.0 son mayores a 0.5, siendo que el menor valor propuesto por Peppas para “n” es de 0.5, lo cual nos indica que el mecanismo de transporte no es por difusión fickiana, si no por transporte no fickiano o anómalo y el tipo de liberación es dependiente del tiempo.

En los lotes 5 y 6 a pH = 4.5 y en el lote 1 a pH = 5.0 el valor de “n” es menor a 0.5, lo cual puede explicarse por la presencia de poros en el sistema que dan valores de “n” menores a 0.5. Morales, A., 2009 reporta valores de “n” menores a 0.5 para la liberación de nanopartículas de monoleína atribuyéndose a la presencia de poros en el sistema.

El análisis detallado del modelo de Peppas ha demostrado que “n” es 0.5 únicamente para sistemas planos y es diferente para otras formas geométricas; por ejemplo, la liberación Fickiana de una sustancia a partir de una esfera se caracteriza por un valor de “n” = 0.432 [Lowman, M. y Peppas, N. A., 1999y Peppas, N. A., *et al.*, 2000].

Los datos obtenidos de las liberaciones de los diferentes lotes fueron tratados de acuerdo al modelo propuesto por Higuchi que estudia la liberación de fármacos a partir de

sistemas matriciales. El modelo asume que al estar en contacto la matriz con el medio de disolución, éste es capaz de penetrar formando una capa de hidratación. Cuando sólo una cara de la matriz está expuesta al medio de disolución, el grosor de la capa de hidratación aumenta de manera unidireccional. Sin embargo, la hidratación relativa disminuye al incrementar la profundidad de la penetración del fármaco contenido en la matriz, la liberación obedece el modelo de la raíz cuadrada de Higuchi. La penetración del medio a la base favorece la difusión del fármaco hacia el seno del solvente constituyendo lo que Higuchi llama “zona de depleción”. Esta zona de depleción aumenta conforme transcurre la difusión del fármaco de manera proporcional con respecto al tiempo estableciéndose un estado pseudoestable [Washington, C., 1990].

En los gráficos 14, 15, 16 y 17 se reportan los datos obtenidos de acuerdo al modelo de Higuchi, en la cuadro 10 y 11 se muestran los valores obtenidos de la constante de Higuchi (K_H) para los diferentes lotes de NE's y los coeficientes de determinación. Los intervalos de tiempo que se adaptan a una línea recta. Los gráficos se obtuvieron a partir de los datos incluidos en el anexo 4.

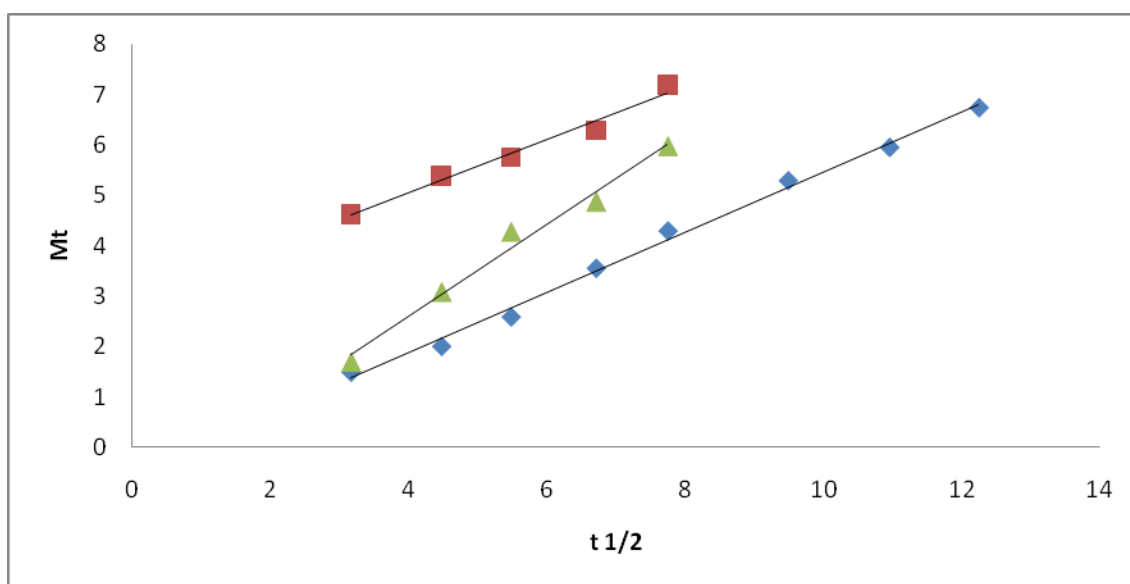


Gráfico 14. Modelo de Higuchi aplicado a la liberación de miconazol base a partir de NE's de CAP. Lote 2 ◆ (con 4.76 % de miconazol base en las NE's); Lote 3 ■ (con 9.09 % de miconazol base en las NE's); Lote 4 ▲ (con 13.0 % de miconazol base en las NE's), en una solución amortiguadora de fosfatos pH = 4.5.

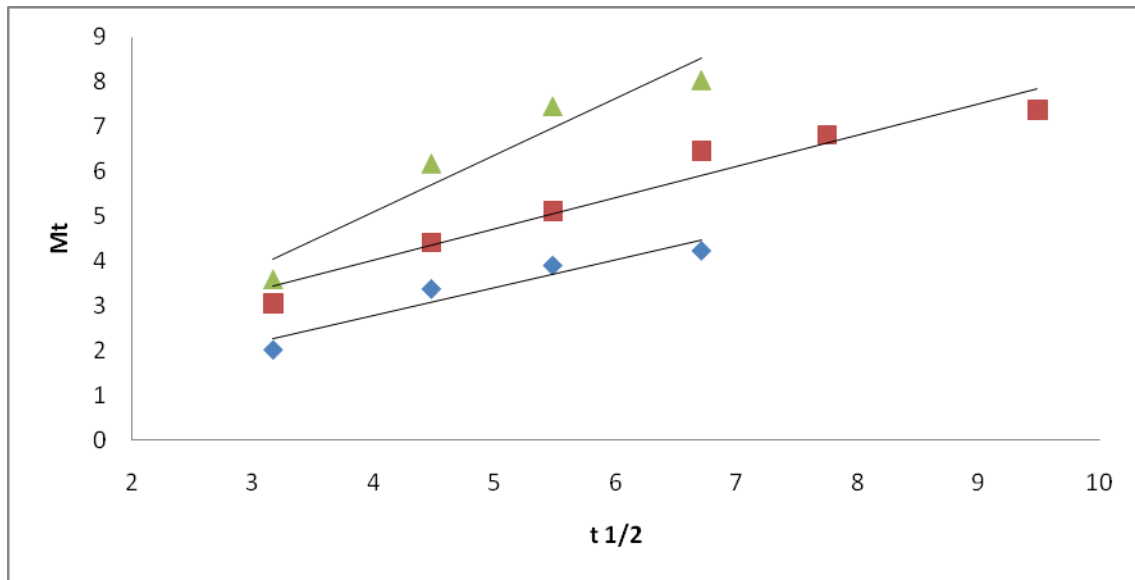


Gráfico 15. Modelo de Higuchi aplicado a la liberación de nitrato de miconazol a partir de NE's de CAP. Lote 5 \blacklozenge (con 4.76 % de nitrato de miconazol en las NE's); Lote 6 \blacksquare (con 9.09 % de nitrato de miconazol en las NE's); Lote 7 \blacktriangle (con 13.0 % de nitrato de miconazol en las NE's), en una solución amortiguadora de fosfatos pH = 4.5.

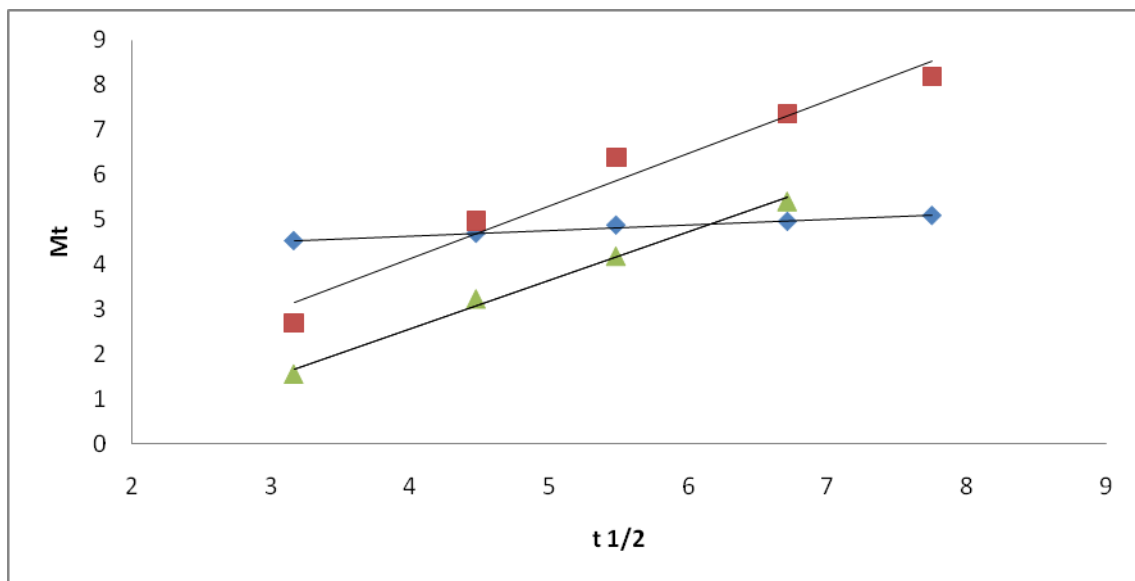


Gráfico 16. Modelo de Higuchi aplicado a la liberación de miconazol base a partir de NE's de CAP. Lote 2 \blacklozenge (con 4.76 % de miconazol base en las NE's); Lote 3 \blacksquare (con 9.09 % de miconazol base en las NE's); Lote 4 \blacktriangle (con 13.0 % de miconazol base en las NE's), en una solución amortiguadora de fosfatos pH = 5.0.

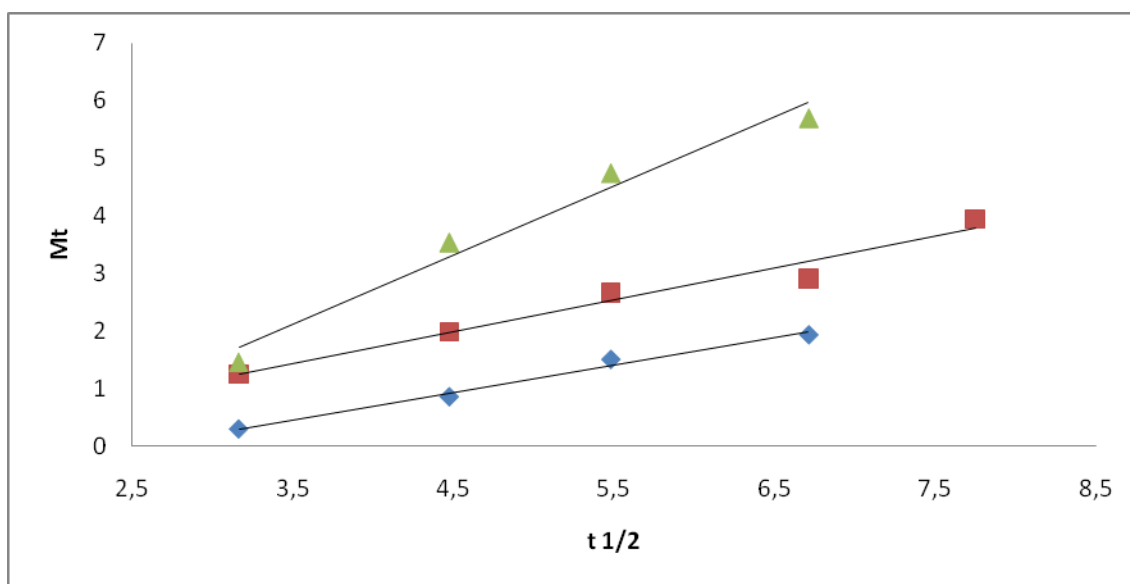


Gráfico 17. Modelo de Higuchi aplicado a la liberación de nitrato de miconazol a partir de NE's de CAP. Lote 5 ◆ (con 4.76 % de nitrato de miconazol en las NE's); Lote 6 ■ (con 9.09 % de nitrato de miconazol en las NE's); Lote 7 ▲ (con 13.0 % de nitrato de miconazol en las NE's), en una solución amortiguadora de fosfatos pH = 5.0.

Cuadro 13. Coeficientes de determinación y valor de K_H de acuerdo al modelo de Higuchi a un pH de 4.5, el tiempo que se reporta es el intervalo en el que se obtiene la máxima linealidad para el cálculo de los coeficientes.

Lote	K_H	r^2	b	t (min)
2	0.5980	0.9948	-0.521	10-150
3	0.4902	0.9872	2.525	20-90
4	0.9074	0.9842	-1.032	10-60
5	0.6167	0.9640	0.330	10-45
6	0.6965	0.9471	1.239	10-90
7	1.2613	0.9227	0.060	10-45

Cuadro 14. Coeficientes de determinación y valor de K_H de acuerdo al modelo de Higuchi a un pH de 5.0, el tiempo que se reporta es el intervalo en el que se obtiene la máxima linealidad para el cálculo de los coeficientes.

Lote	K_H	r^2	b	t (min)
2	0.1128	0.9630	-4.068	20-90
3	1.1757	0.9634	-0.561	10-60
4	1.0807	0.9946	-1.757	10-45
5	0.4757	0.9882	-1.207	10-45
6	0.5132	0.9840	-0.926	20-90
7	1.1966	0.9734	-0.206	10-45

Los valores de los coeficientes de determinación obtenidos después del análisis de regresión lineal por el modelo propuesto por Higuchi son superiores a 0.96 para la mayoría de los lotes tanto de nitrato de miconazol como miconazol base a dos diferentes pH's, indicando que este modelo permite describir la liberación a partir de las NE's obtenidas. Para los lotes 6 y 7 de nitrato de miconazol los valores de r^2 fueron de 0.9471 y 0.9227 respectivamente.

Las NE's preparadas son sistemas matriciales en los que el principio activo (miconazol base o nitrato de miconazol) se encuentra disperso homogéneamente en toda la matriz, de manera que el fármaco que sale primero es el que se encuentra localizado en la parte más superficial de la matriz y posteriormente el que se encuentra en la región más interna. Además, dado que el grosor de la capa hidrodinámica de difusión se incrementa al aumentar el tiempo, y por lo tanto el fármaco que se encuentra en la región más interna va a tardar un poco más en salir.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Con los datos obtenidos de las constantes de Higuchi se realizó un análisis de varianza con dos factores con una muestra por grupo, para saber qué efectos (principio activo y cantidad de activo) son estadísticamente significativos.

H₀: Todas las medias son iguales y por lo tanto no hay diferencia entre los tratamientos.

H_i: No todas las medias son iguales y por lo tanto al menos un tratamiento es diferente.

El criterio de aceptación fue el siguiente:

Si $F_{calculada} > F_{crítica}$ se rechaza la H_0 , por lo tanto hay diferencia entre tratamientos.

Si $F_{calculada} < F_{crítica}$ se acepta la H_0 , por lo tanto no hay diferencia entre los tratamientos.

Cuadro 15. Análisis de varianza con dos factores con una muestra por grupo para las constantes de Higuchi a pH 4.5.

ANÁLISIS DE VARIANZA						
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Principio activo	0.0558542	1	0.0558542	3.9580496	0.18494192	18.5128205
Cantidad de principio activo	0.31253733	2	0.15626867	11.0738157	0.08282386	19
Error	0.02822309	2	0.01411155			
Total	0.39661463	5				

Cuadro 16. Análisis de varianza con dos factores con una muestra por grupo para las constantes de Higuchi a pH 5.0.

ANÁLISIS DE VARIANZA						
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Principio activo	0.00562428	1	0.00562428	0.03927661	0.86121935	18.5128205
Cantidad de principio activo	0.73485669	2	0.36742835	2.56589906	0.28043419	19
Error	0.28639345	2	0.14319673			
Total	1.02687443	5				

Cabe recordar que se trabajó con dos principios activos (miconazol base y nitrato de miconazol) de los cuales la cantidad de principio activo fue variada (4.76, 9.09 y 13.0 % de principio activo en las NE's) a dos diferentes pH's (4.5 y 5.0) con los cuales se realizó un análisis de varianza.

De acuerdo al análisis de varianza en cuanto al principio activo, se encontró que F calculada es menor que F crítica, por lo tanto se acepta la H_0 , lo que indica que no hay diferencia significativa entre la velocidad de liberación utilizando miconazol base y nitrato de miconazol en las NE's a los dos diferentes pH's.

En relación a la cantidad de principio activo en las NE's, se encontró que F calculada es menor que F crítica a pH = 4.5 y a pH = 5.0, por lo tanto se acepta la H_0 , lo que indica que no hay diferencia significativa entre la cantidad de principio activo incorporada y que no influye en la liberación del activo a partir de las NE's.

6 CONCLUSIONES

Durante el desarrollo de esta investigación se logró la obtención de NE's con tamaños menores a 600 nm utilizando la técnica de Emulsificación–difusión. Se prepararon tres lotes de NE's para miconazol base y tres para nitrato de miconazol; cada uno con diferente proporción de principio activo (20, 40 y 60 mg de principio activo en 400 mg de polímero). Se obtuvieron eficiencias de encapsulamiento superiores al 75 % para miconazol base y nitrato de miconazol, agentes antifúngico eficaces contra muchos microorganismos causantes de la vaginitis.

El tamaño de las nanopartículas de CAP tiende a aumentar conforme se incrementa la proporción de principio activo.

Se comprobó que el estabilizante PVAL utilizado durante la preparación de las nanopartículas por el método de Emulsificación – difusión evita la agregación de las nanopartículas aun después de ser sometidas a un proceso de liofilización. El PVAL residual fue menor al 5% en todos los lotes preparados.

Mediante los estudios de calorimetría diferencial de barrido pudo determinarse que tanto el miconazol base como nitrato de miconazol se encontraba disperso molecularmente en las matrices poliméricas.

De manera general la liberación tanto del miconazol base como del nitrato de miconazol fue muy rápida y los datos obtenidos se adaptan al modelo propuesto por Higuchi.

Este trabajo de tesis es el primer reporte generado dentro de una línea de investigación que pretende evaluar la capacidad de los sistemas nanoparticulados para tratar padecimientos vaginales.

7 PERSPECTIVAS

Para continuar los estudios realizados de este trabajo de tesis se propone realizar pruebas de permeación *ex vivo* para evaluar el comportamiento de las nanopartículas a través de una mucosa vaginal de cerda.

También se propone aumentar la eficiencia de encapsulamiento manipulando las variables preparativas (tiempo, temperatura y velocidad) del proceso.

Además, debe evaluarse la efectividad antifúngica de las nanopartículas y comparar su desempeño frente a formulaciones disponibles comercialmente.

8 REFERENCIAS

1. Aguilar, G., *et al.*, (1992). "Validación de métodos analíticos". Comité de Elaboración de Guías Oficiales de Validación de la Dirección General de Control de Insumos para la Salud, SSA. Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biológicos. México AC.
2. Ángeles-Ricaño, M.E., (2008). "Elaboración de una forma farmacéutica sólida (óvulo) con extracto de *Calendula officinalis*. Para el tratamiento de ectropión e infecciones vaginales humanas". Tesis de licenciatura, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Universidad Nacional Autónoma de México, México.
3. Allémann, E., Gurny, R., y Doelker, E., (1992). "Preparation of aqueous polymeric nanodispersions by a reversible salting-out process; influence of process parameters on particle size". *International Journal of Pharmaceutics*, 87:247-253.
4. Arthur, H. y Kibbe, Ph. D., (1986). "Handbook of Pharmaceutical Excipients". 3ª Ed., United States of America: Pharmaceutical Press.
5. Beiro R., Vidal M.C. y Orgeira J., (2003). "Papel de los bioadhesivos en el tratamiento tópico de las enfermedades orales". *Revista de la SEMG*, 56: 489-490.
6. Caballero. R. I., Batista, R., Cué, M., Ortega, L. y Rodríguez, M. E., (2000). "Vaginosis bacteriana". *RESUMED*, 13(2):63-75.
7. Calvo, P., Vila-Jato, J. L. y Alonso, M. J.,(1996). "Comparative in vitro evaluation of several colloidal systems, nanoparticles, nanocapsules and nanoemulsions as ocular drug carriers". *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 85(5):530-536.

8. Castro, H., (1995). "Ginecología Básica Ilustrada". México: Trillas.
9. Das Neves, J. y Bahia, M. F. (2006). "Gels as vaginal drug delivery systems". *International Journal of Pharmaceutics*, 318: 1–14.
10. Das Neves, J., Amaral, M. y Bahia, M.F. (2008). "Performance of an *in vitro* mucoadhesion testing method for vaginal semisolids: Influence of different testing conditions and instrumental parameters". *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 69: 622–632.
11. De Jaeghere, F., Doelker, E., y Gurny, R., (1999). "Nanoparticles". En *Encyclopedia of Controlled Drug Delivery*, Vol. 2, Ed. John & Sons, Inc USA. pp 641-664.
12. Dominguez-Delgado, C. L., (2006). "Estudio comparativo de la absorción percutánea *in vitro* de triclosán a partir de un sistema nanoparticulado y dos formas comerciales, destinados al tratamiento del acné". Tesis de licenciatura, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Universidad Nacional Autónoma de México, México.
13. Fattal, E. y Vauthier, C., (2000). "Nanoparticles as Drug Delivery Systems", *Encyclopedia of Pharmaceutical Technology* Ed. Marcel Dekker Inc, USA.
14. Fessi, H., Puisieux, F., Devissaguet J.Ph., Ammoury, N. y Benita S. (1989). "Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement". *International Journal of Pharmaceutics*, 55: R1-R4.
15. González-Merlo, J., González-Bosquet, J. y González-Bosquet, E. (2003). "Ginecología", 8ª Ed., Barcelona España: Masson Elsevier.

16. González-Merlo, J., Laila, J. M. y González, E.,(2006). "Obstetricia", 5ª Ed., Barcelona España: Masson Elsevier.

17. Gurny, R. y Peppas, N. A., (1981). "Development of biodegradable and injectable latices for controlled release of potente drugs". *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 7:1-25.

18. Jiménez, P. E. y López, M. R., (2009). "Evaluación del potencial uso de nanopartículas lipídicas sólidas en el recubrimiento de película acuosa". Tesis de licenciatura, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Universidad Nacional Autónoma de México, México.

19. Latarget, M., (2005). "Anatomía Humana", 4ª Ed., Tomó 2., Buenos Aires Argentina: Medica Panamericana., pp. 1607-1643.

20. Li, L. y Tian, Y., (2007). "Zeta Potential". En *Enciclopedia of Pharmaceutical technology*. USA. Marcel Dekker, Inc. p 4117-4126.

21. Llabot, J. M., Palma. D., Allemandi, D., (2008). "Nanopartículas poliméricas sólidas". *Nuestra farmacia*, 53: 40-47.

22. Leurox, J. C., Allémann, E., Doelker, E. y Gurny, R., (1995). "New approach for the preparation of nanoparticles by an emulsification-diffusion method". *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 41(1) : 14-18.

23. López-Camacho N. I., (2010). "Cervico vaginitis en el primer nivel de atención, diagnóstico y tratamiento acertado".Tesis Doctoral. Universidad Nacional Autónoma de México, México.

24. López-López I., (1999) . “Frecuencia de vulvovaginitis y agentes patógenos más comunes en mujeres derechohabientes sexualmente activas de 16 a 55 años de edad, que reciben asistencia medica en la clínica de consulta externe del ISSTECH de la ciudad de Tuxtla Gutiérrez, Chiapas: en el periodo de octubre diciembre 1997”, Tesis doctoral, Universidad Nacional Autónoma de México, México.
25. Lowman, M. y Peppas, N. A. (1999). “Hydrogels” en *Enciclopedia of Controlled Drug Delivery*, Vol. 1. (Mathiowitz, E., ed) John Wiley & Sons, Inc. E. U. A. pp 397-418.
26. Martínez-Pérez, A., (2010) “Sistemas nanoparticulados de aplicaciones farmacéuticas (revisión bibliográfica)”, Tesis de Licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Universidad Nacional Autónoma de México, México.
27. Mehrdad, H., Amir, A. y Pedram. R. (2008). “Hydrogel nanoparticles in drug delivery”. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 60, 1638–1649.
28. Morales, A. P.(2009). “Elaboración de un sistema de liberación controlada a base de moleina para administración parenteral”.Tesis de Licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Universidad Nacional Autónoma de México, México.
29. Nogal-Ruiz, J., (1999). “Modelo experimental de *Trichomonas vaginalis*: estudio de quimiosensibilidad, patogenia e inmunomodulación”. Tesis doctoral, Universidad Complutense de Madrid, Madrid.
30. Olmos-Ramírez, S., (1998) “Evolución de la vaginitis estudio comparativo”, Tesis Doctoral. Universidad Nacional Autónoma de México, México.

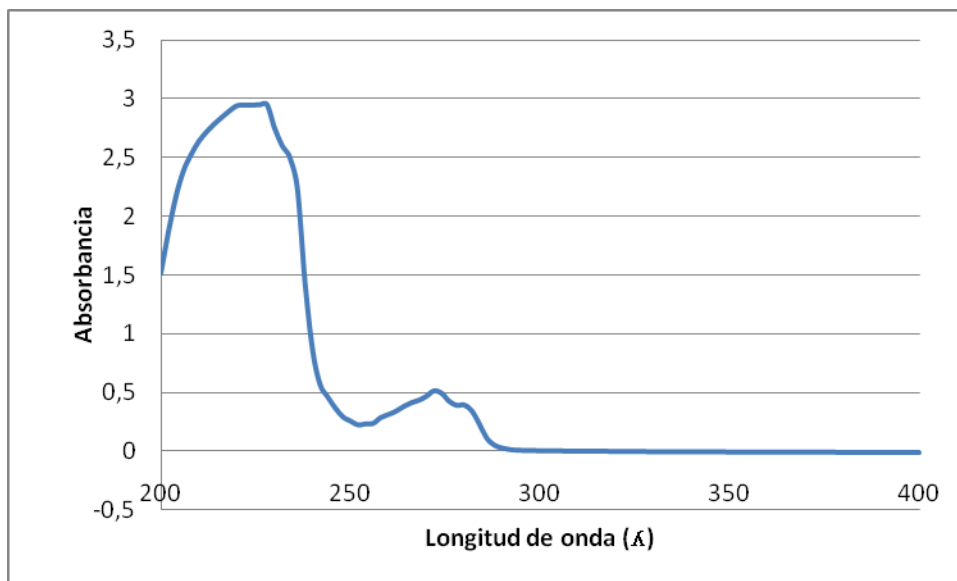
31. Padilla, M., (1997). "Diagnostico Bacteriológico de la vaginitis". *Revista del Instituto Médico Sucre*, 62, 43-47.
32. Peppas, N. A., Bures, P., Leobandung, W. y Ichikawa, H. (2000). "Hydrogels in pharmaceutical formulations". *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 50:27-46.
33. Piñón-Segundo, E., (2000). "Diseño de un sistema terapéutico nanoparticulado destinado al tratamiento de la gingivitis y periodontitis". Tesis de licenciatura, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Universidad Nacional Autónoma de México, México.
34. Piñón-Segundo, E., (2003). "Desarrollo tecnológico y caracterización de partículas submicrónicas poliméricas como vectores terapéuticos para el tratamiento de enfermedades periodontales". Tesis para optar el grado de Maestro en Ciencias, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Universidad Nacional Autónoma de México, México.
35. Piñón-Segundo, E., (2005). "Preparation and characterization of triclosán nanoparticles for periodontal treatment". *International Journal of Pharmaceutical*, 294: 217-232.
36. Quintanar-Guerrero, D., Alléman, E., Fessi, H., y Doelker, E., (1998) "Preparation techniques and mechanisms of formation of biodegradable nanoparticles from preformed polymers". *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 24:1113-1117.
37. Quintanar-Guerrero, D., Fessi, H., Alléman, E., y Doelker, E., (1996). "Influence of stabilizing agents and preparative variables on the formation of poly(D,L-lactic

- acid) nanoparticles by an emulsification-diffusion technique". *International Journal of Pharmaceutics*, 143, 133-141.
38. Quintanar-Guerrero, D., Fessi, H., Alléman, E., y Doelker, E., (1997). "A mechanistic study of the formation of polymer nanoparticles by the emulsification-diffusion technique". *Colloid and Polymer Science*, 275: 640-647.
39. Raygosa, T., (1995). "Estudios de liberación del clorhidrato de pseudoefedrina en matrices hidrofílicas de PVAL 5222 y su relación con el hinchamiento". Tesis de licenciatura, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Universidad Nacional Autónoma de México, México.
40. Roxin, P., Karlsson, A. y. Singh, S. K. (1998). "Characterization of Cellulose Acetate Phthalate (CAP)". *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 24(1 I), 1025-1041.
41. Tortora, G. y Reynolds, S., (Eds.). (2003). "Principios de Anatomía y Fisiología". 9ª Ed., Oxford University Press. México, pp. 1055-1065.
42. Touitou, E., y Barry B., (Eds.). (2007). "Enhancement *in Drug Delivery*". United States of America: CRC Pres Taylon & Francis Group.
43. Siewert, M., Dressman, J., Brown, C., y Shah, V. (2003). "Guidelines to Dissolution: in Vitro Release. Testing of Novel: Special Dosage Forms". *AAPS PharmSciTech*, 4 (1), 1-10.
44. Valenta, C., (2005). "The use of mucoadhesive polymers in vaginal delivery". *Advances Drug Delivery Reviews*, 57: 1692-1712.

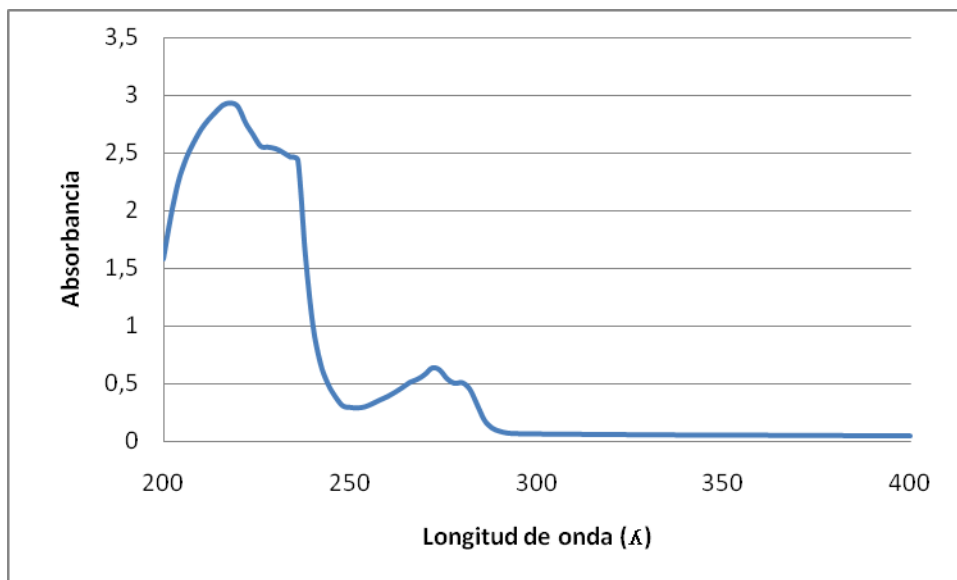
45. Vallejo, B.M. y Perilla, J.E., (2008). "Elementos conceptuales para estudiar el comportamiento bioadhesivo en polímeros". *Revista Colombiana de Ciencias Químico Farmacéuticas*, 37, 33-61.
46. Velázquez-Torres, C. y Arita-Erazo, J., (2000). "Prevalencia de la vaginosis bacteriana por *Gardnerella vaginalis* en la amenaza de parto preterminó en las pacientes ingresadas en el Hospital escuela". *Revista Mededica Post-grado UNAH*, 5, 138-141.
47. Washington, C.,(1990). "Drug Release from microdisperse systems: a critical review". *International Journal of Pharmaceutics*. 58:1-12.
48. <http://www.ffyb.uba.ar/farmacotecnia%20I/BIOADHESION.htm> (2010).
49. <http://fundabiomed.fcs.uc.edu.ve/cap41.pdf> (2010).
50. http://w20.ssaver.gob.mx/guiapedia/index.php/VAGINITIS_AGUDA (2010).

ANEXO 1. Espectros de absorción y coeficientes de absorptividad (ϵ).

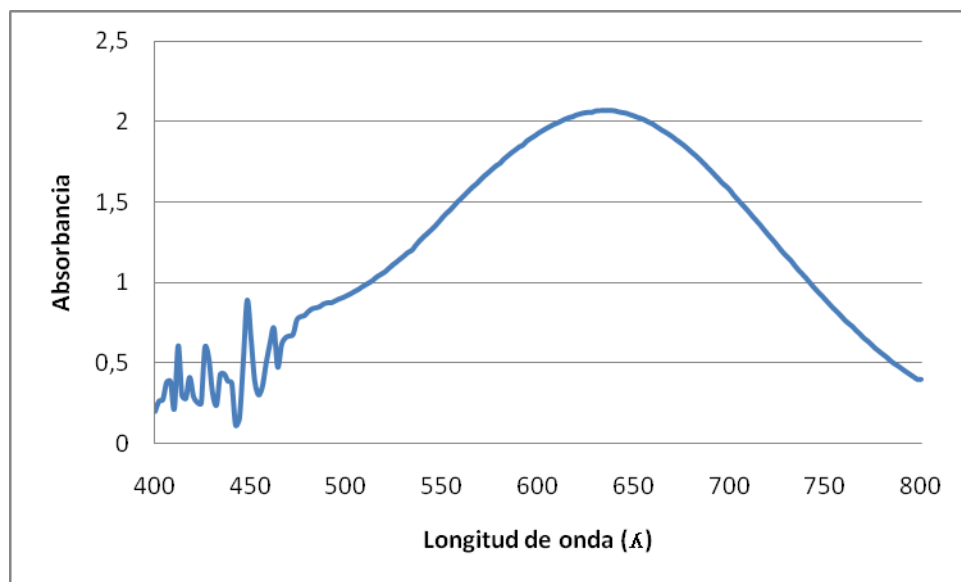
- a) Barrido de nitrato de miconazol en solución amortiguadora de fosfatos pH = 5 Brij® 58 al 2.5% p/v con un blanco del medio de disolución.



- b) Barrido de miconazol base en solución amortiguadora de fosfatos pH = 5 Brij® 58 al 2.5% p/v con un blanco del medio de disolución.

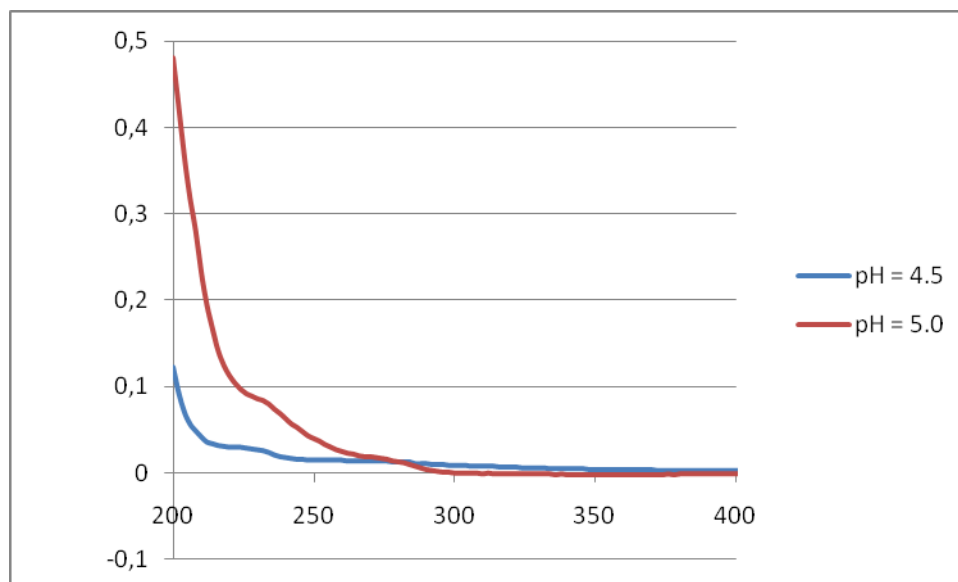


- c) Barrido del complejo de PVAL - H_3BO_3 - I_2 - KI con un blando del medio de disolución.



Sistema	λ_{max} (nm)	ϵ (mg/ml.cm)
Nitrato de miconazol en Brij® 58 al 2.5% p/v.	272	4.226
Miconazol base en Brij® 58 al 2.5% p/v.	272	5.258
Complejo PVAL - H_3BO_3 - I_2 - KI.	640	0.958

- d) Barrido de la solución buffer de fosfatos a pH 4.5 y 5.0 con Brij 58® al 2.5 % p/v con un blanco del medio de disolución.



ANEXO 2. CURVAS DE CALIBRACIÓN.

a) PVAL EN AGUA DESTILADA, $\lambda = 640$ nm.

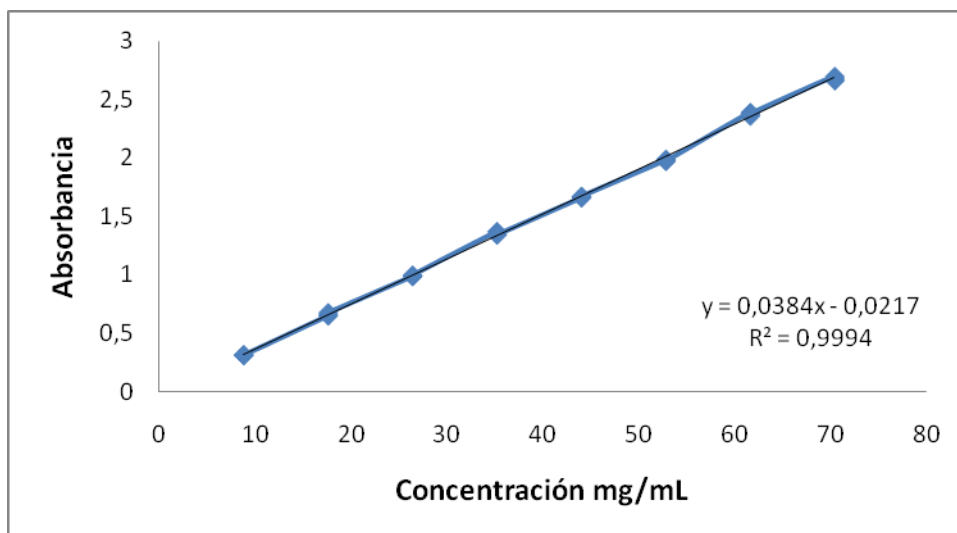
Concentración mg/mL	Absorbancia	Abs/Conc
8.8043	0.314	28.039172
8.8043	0.309	28.492880
8.8043	0.312	28.218910
17.6086	0.649	27.131895
17.6086	0.653	26.965697
17.6086	0.674	26.125519
26.4129	0.986	26.787931
26.4129	0.988	26.733704
26.4129	0.996	26.518976
35.2172	1.369	25.724763
35.2172	1.345	26.183792
35.2172	1.341	26.261894
44.0215	1.658	26.550965
44.0215	1.668	26.391787
44.0215	1.670	26.360180
52.8258	1.980	26.679697
52.8258	1.988	26.572334
52.8258	1.971	26.801522
61.6301	2.388	25.808250
61.6301	2.359	26.125519
61.6301	2.375	25.949516
70.4344	2.697	26.115832
70.4344	2.662	26.459204
70.4344	2.677	26.310945
	Promedio	26.637953
	d. e.	0.715042
	C. V.	2.684298

r 0.9994

 r^2 0.9988

m 0.0384

b 0.0217



Análisis de varianza para evaluar la linealidad del sistema.

Prueba de hipótesis

H_0 : No existe una relación lineal entre la concentración del PVAL y su respectiva absorbancia.

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

Criterio de aceptación

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

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

Fuente	SC	g.l.	CM	F calculada	F crítica P-value
Modelo	14.5272000	1	14.527200000	28345.04	0.000
Residual	0.0112753	22	0.000512513		
Total	14.5385000	23			

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

Prueba del intercepto

H_0 : La ordenada al origen es igual a cero.

H_i : La ordenada al origen es diferente de cero.

Criterio de aceptación

Si t calculada $<$ t crítica no se rechaza H_0 , por lo tanto el intercepto es igual a cero.

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

Parámetro	Estimación	Error estándar	T calculada	T crítica
Intercepto	-0.022857143	0.010184400	0.0352	-2.24432
Pendiente	0.038566563	0.000229072	168.3600	0.0000

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

b) MICONAZOL BASE EN UNA SOLUCIÓN AMORTIGUADORA DE FOSFATOS pH = 4.5
CON BRIJ® 58 AL 2.5% p/v.

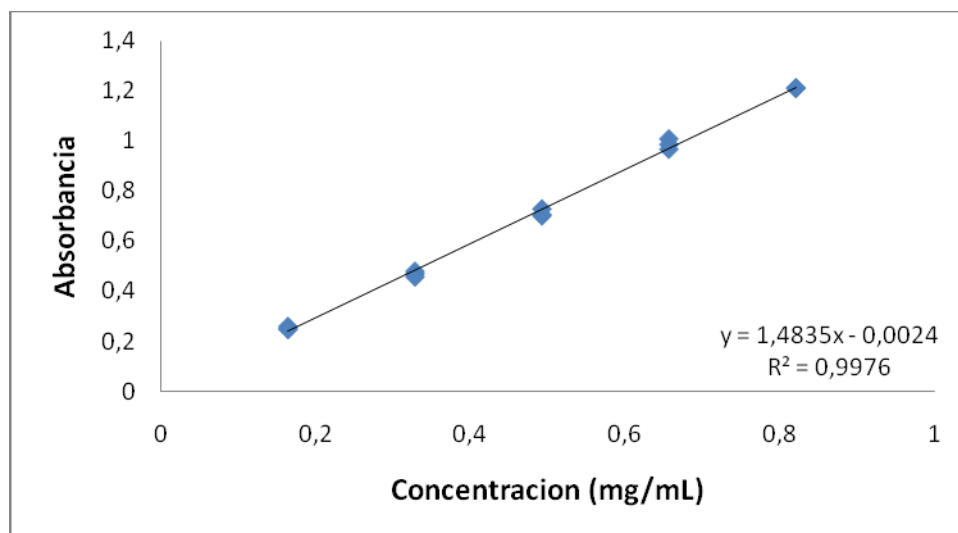
Concentración mg/mL	Absorbancia	Abs/Conc
0.164	0.261	1.5914634
0.164	0.249	1.5182927
0.164	0.253	1.5426829
0.328	0.471	1.4359756
0.328	0.481	1.4664634
0.328	0.459	1.3993902
0.492	0.730	1.4837398
0.492	0.702	1.4268293
0.492	0.707	1.4369919
0.656	1.009	1.5381098
0.656	0.987	1.5045732
0.656	0.968	1.4756098
0.820	1.212	1.4780488
0.820	1.211	1.4768293
0.820	1.213	1.4792683
	Promedio	1.4836179
	d. e.	0.0499626
	C. V.	3.3676173

r 0.998396047

r² 0.996794670

m 1.478868018

b -6.97315E-05



Análisis de varianza para evaluar la linealidad del sistema.

Prueba de hipótesis

H₀: No existe una relación lineal entre la concentración de miconazol base y su respectiva absorbancia.

H_i: Existe una relación lineal entre la concentración de miconazol base y su respectiva absorbancia.

Criterio de aceptación

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

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

Fuente	SC	g.l.	CM	F calculada	F crítica P-value
Modelo	1.77585000	1	1.775850000	5423.03	0.000
Residual	0.00425703	13	0.000327464		
Total	1.78010000	14			

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

Prueba del intercepto

H_0 : La ordenada al origen es igual a cero.

H_i : La ordenada al origen es diferente de cero.

Criterio de aceptación

Si t calculada $<$ t crítica no se rechaza H_0 , por lo tanto el intercepto es igual a cero.

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

Parámetro	Estimación	Error estándar	T calculada	T crítica
Intercepto	-0.00236667	0.0109577	-0.215983	0.8324
Pendiente	1.48354000	0.0201455	7306412	0.0000

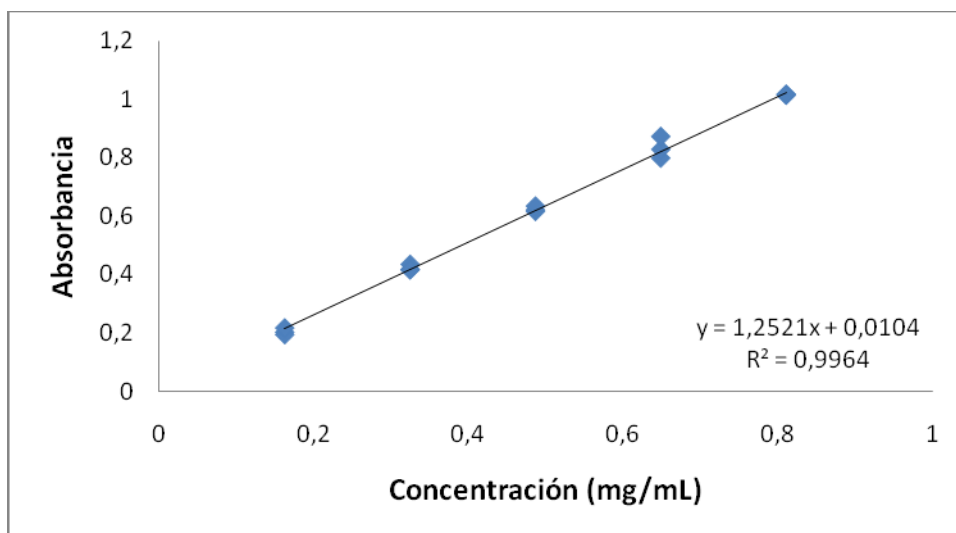
Como t calculada $>$ t crítica se rechaza H_0 , por lo tanto el intercepto es diferente de cero.

c) NITRATO DE MICONAZOL EN UNA SOLUCIÓN AMORTIGUADORA DE FOSFATOS

pH = 4.5 CON BRIJ® 58 AL 2.5% p/v.

Concentración mg/mL	Absorbancia	Abs/Conc
0.162	0.202	1.24691358
0.162	0.194	1.19753086
0.162	0.217	1.33950617
0.324	0.417	1.28703704
0.324	0.434	1.33950617
0.324	0.415	1.28086420
0.486	0.615	1.26543210
0.486	0.620	1.27572016
0.486	0.633	1.30246914
0.648	0.797	1.22993827
0.648	0.827	1.27623457
0.648	0.871	1.34413580
0.810	1.012	1.24938272
0.810	1.014	1.25185185
0.810	1.015	1.25308642
	Promedio	1.27597394
	d. e.	0.04192528
	C. V.	3.28574713

r 0.998191295
r² 0.996385860
m 1.252057613
b 0.010366667



Análisis de varianza para evaluar la linealidad del sistema.

Prueba de hipótesis

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

H_i: Existe una relación lineal entre la concentración del nitrato de miconazol y su respectiva absorbancia.

Criterio de aceptación

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

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

Fuente	SC	g.l.	CM	F calculada	F crítica P-value
Modelo	1.2342400	1	1.234240000	3583.98	0.0000
Residual	0.0044769	13	0.000344377		
Total	1.2387200	14			

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

Prueba del intercepto

H_0 : La ordenada al origen es igual a cero.

H_i : La ordenada al origen es diferente de cero.

Criterio de aceptación

Si t calculada $<$ t crítica no se rechaza H_0 , por lo tanto el intercepto es igual a cero.

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

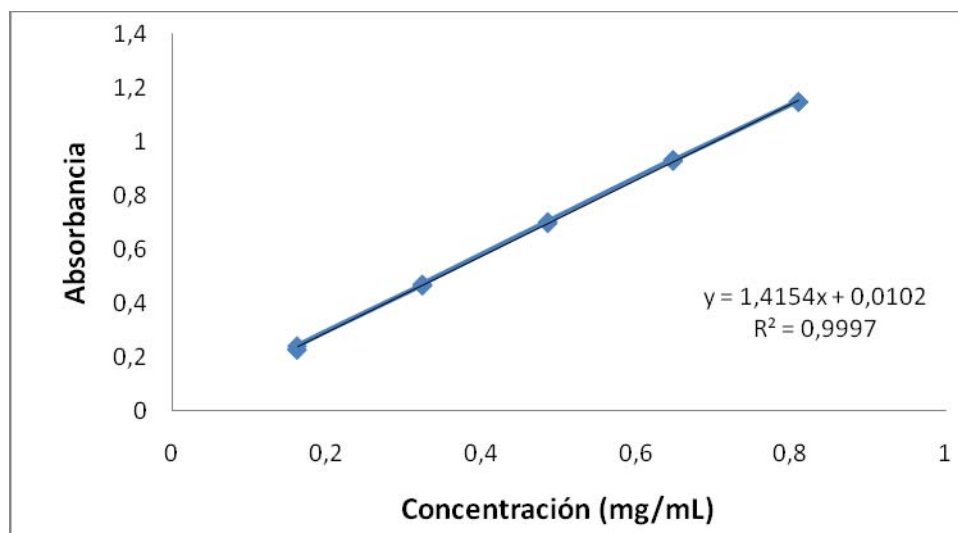
Parámetro	Estimación	Error estándar	T calculada	T crítica
Intercepto	0.0103667	0.0112371	0.922543	0.3731
Pendiente	1.25206007i	0.0209142	59.866400	0.0000

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

d) MICONAZOL BASE EN UNA SOLUCIÓN AMORTIGUADORA DE FOSFATOS pH = 5.0 CON BRIJ® 58 AL 2.5% p/v.

Concentración mg/mL	Absorbancia	Abs/Conc
0.162	0.232	1.43209877
0.162	0.229	1.41358025
0.162	0.244	1.50617284
0.324	0.469	1.44753086
0.324	0.468	1.44444444
0.324	0.473	1.45987654
0.486	0.704	1.44855967
0.486	0.699	1.43827160
0.486	0.704	1.44855967
0.648	0.934	1.44135802
0.648	0.935	1.44290123
0.648	0.930	1.43518519
0.810	1.150	1.41975309
0.810	1.150	1.41975309
0.810	1.150	1.41975309
	Promedio	1.44118656
	d. e.	0.02236464
	C. V.	1.55182160

r 0.999835768
r² 0.999671560
m 1.415432099
b 0.010366667



Análisis de varianza para evaluar la linealidad del sistema.

Prueba de hipótesis

H₀: No existe una relación lineal entre la concentración de miconazol base y su respectiva absorbancia.

H_i: Existe una relación lineal entre la concentración de miconazol base y su respectiva absorbancia.

Criterio de aceptación

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

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

Fuente	SC	g.l.	CM	F calculada	F crítica P-value
Modelo	1.577350000	1	1.577350000	39568.30	0.0000
Residual	0.000518233	13	0.0000398641		
Total	1.577870000	14			

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

Prueba del intercepto

H_0 : La ordenada al origen es igual a cero.

H_i : La ordenada al origen es diferente de cero.

Criterio de aceptación

Si t calculada $<$ t crítica no se rechaza H_0 , por lo tanto el intercepto es igual a cero.

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

Parámetro	Estimación	Error estándar	T calculada	T crítica
Intercepto	0.0101667	0.00382320	2.65921	0.0197
Pendiente	1.4154300	0.00711566	198.91800	0.0000

Como t calculada $<$ t crítica no se rechaza H_0 , por lo tanto el intercepto es igual a cero.

e) NITRATO DE MICONAZOL EN UNA SOLUCIÓN AMORTIGUADORA DE FOSFATOS

pH = 5.0 CON BRIJ® 58 AL 2.5% p/v.

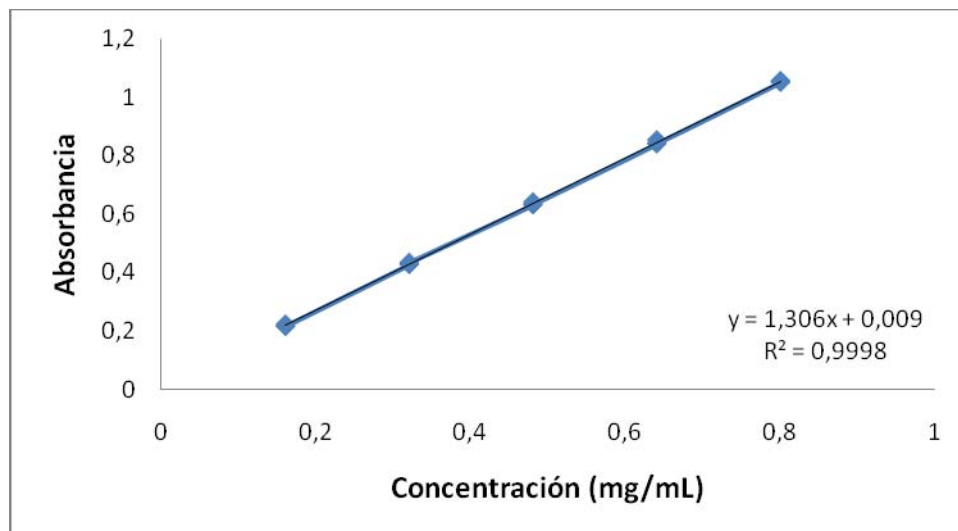
Concentración mg/mL	Absorbancia	Abs/Conc
0.160	0.221	1.38125000
0.160	0.214	1.33750000
0.160	0.215	1.34375000
0.320	0.426	1.33125000
0.320	0.429	1.34062500
0.320	0.433	1.35312500
0.480	0.631	1.31458330
0.480	0.640	1.33333333
0.480	0.633	1.31875000
0.640	0.840	1.31250000
0.640	0.853	1.33281250
0.640	0.842	1.31562500
0.800	1.051	1.31375000
0.800	1.056	1.32000000
0.800	1.054	1.31750000
	Promedio	1.33109028
	d. e.	0.01874590
	C. V.	1.40831182

r 0.999910205

r² 0.99982042

m 1.306041667

b 0.008966667



Análisis de varianza para evaluar la linealidad del sistema.

Prueba de hipótesis

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

H_i: Existe una relación lineal entre la concentración del nitrato de miconazol y su respectiva absorbancia.

Criterio de aceptación

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

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

Fuente	SC	g.l.	CM	F calculada	F crítica P-value
Modelo	1.3100100	1	1.3102500000	72253.53	0.0000
Residual	0.0002357	13	0.0000181308		
Total	1.3102500	14			

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

Prueba del intercepto

H_0 : La ordenada al origen es igual a cero.

H_i : La ordenada al origen es diferente de cero.

Criterio de aceptación

Si t calculada $<$ t crítica no se rechaza H_0 , por lo tanto el intercepto es igual a cero.

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

Parámetro	Estimación	Error estándar	T calculada	T crítica
Intercepto	0.00896667	0.00257836	3.47766	0.0041
Pendiente	1.30604000	0.00485878	268.80000	0.0000

Como t calculada $<$ t crítica no se rechaza H_0 , por lo tanto el intercepto es igual a cero.

f) MICONAZOL BASE EN UNA SOLUCIÓN AMORTIGUADORA DE FOSFATOS pH = 5.5 CON BRIJ® 58 AL 2.5% p/v.

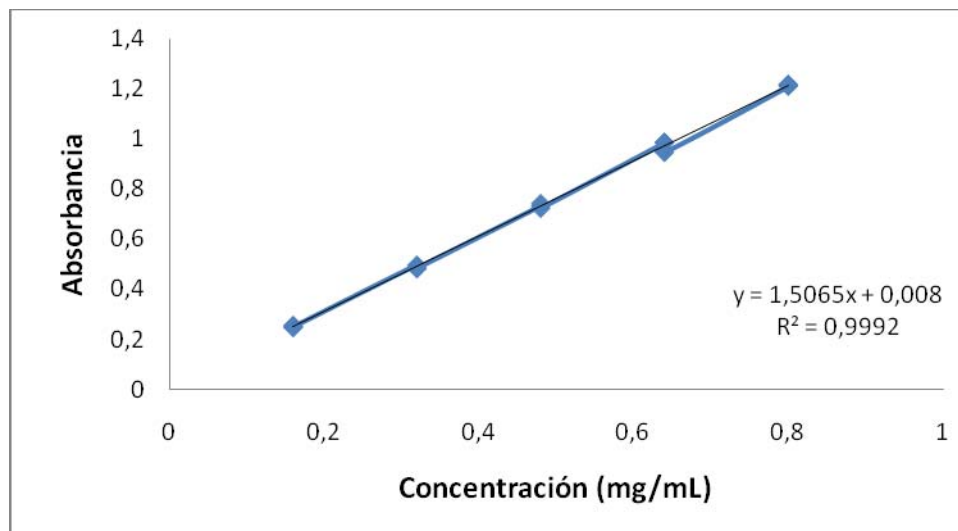
Concentración mg/mL	Absorbancia	Abs/Conc
0.160	0.255	1.59375000
0.160	0.251	1.56875000
0.160	0.247	1.54375000
0.320	0.495	1.54687500
0.320	0.484	1.51250000
0.320	0.482	1.50625000
0.480	0.732	1.52500000
0.480	0.741	1.54375000
0.480	0.723	1.50625000
0.640	0.984	1.53750000
0.640	0.986	1.54062500
0.640	0.946	1.47812500
0.800	1.210	1.51250000
0.800	1.215	1.51875000
0.800	1.216	1.52000000
	Promedio	1.53029167
	d. e.	0.02813181
	C. V.	1.83833004

r 0.999606725

r² 0.9992136

m 1.506458333

b 0.008033333



Análisis de varianza para evaluar la linealidad del sistema.

Prueba de hipótesis

H₀: No existe una relación lineal entre la concentración de miconazol base y su respectiva absorbancia.

H_i: Existe una relación lineal entre la concentración de miconazol base y su respectiva absorbancia.

Criterio de aceptación

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

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

Fuente	SC	g.l.	CM	F calculada	F crítica P-value
Modelo	1.7429100	1	1.742910000	16518.08	0.0000
Residual	0.0013717	13	0.000105515		
Total	1.3102500	14			

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

Prueba del intercepto

H_0 : La ordenada al origen es igual a cero.

H_i : La ordenada al origen es diferente de cero.

Criterio de aceptación

Si t calculada $<$ t crítica no se rechaza H_0 , por lo tanto el intercepto es igual a cero.

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

Parámetro	Estimación	Error estándar	T calculada	T crítica
Intercepto	0.00803333	0.00622005	1.29152	0.2190
Pendiente	1.50646000	0.01172130	128.52300	0.0000

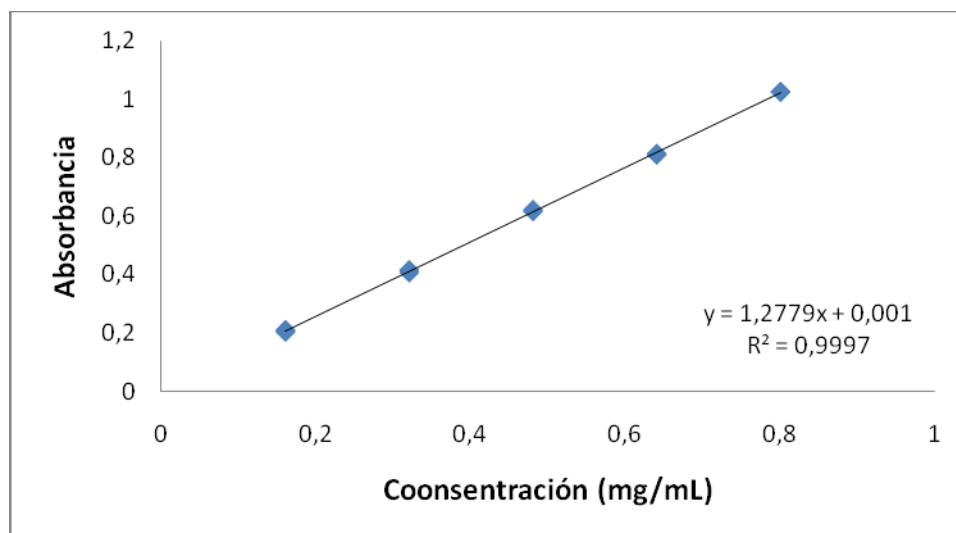
Como t calculada $<$ t crítica no se rechaza H_0 , por lo tanto el intercepto es igual a cero.

g) NITRATO DE MICONAZOL EN UNA SOLUCIÓN AMORTIGUADORA DE FOSFATOS

pH = 5.5 CON BRIJ® 58 AL 2.5% p/v.

Concentración mg/mL	Absorbancia	Abs/Conc
0.160	0.209	1.30625000
0.160	0.204	1.27500000
0.160	0.201	1.25625000
0.320	0.405	1.26562500
0.320	0.415	1.29687500
0.320	0.412	1.28750000
0.480	0.617	1.28541667
0.480	0.622	1.29583333
0.480	0.616	1.28333333
0.640	0.810	1.26562500
0.640	0.811	1.26718750
0.640	0.815	1.27343750
0.800	1.027	1.28375000
0.800	1.026	1.28250000
0.800	1.026	1.28250000
	Promedio	1.28047222
	d. e.	0.01350664
	C. V.	1.05481738

r 0.999864855
r² 0.999729730
m 1.277916667
b 0.001000000



Análisis de varianza para evaluar la linealidad del sistema.

Prueba de hipótesis

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

H_i: Existe una relación lineal entre la concentración del nitrato de miconazol y su respectiva absorbancia.

Criterio de aceptación

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

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

Fuente	SC	g.l.	CM	F calculada	F crítica P-value
Modelo	1.254200000	1	1.2542000000	48086.65	0.0000
Residual	0.000339067	13	0.0000260821		
Total	1.254540000	14			

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

Prueba del intercepto

H_0 : La ordenada al origen es igual a cero.

H_i : La ordenada al origen es diferente de cero.

Criterio de aceptación

Si t calculada $<$ t crítica no se rechaza H_0 , por lo tanto el intercepto es igual a cero.

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

Parámetro	Estimación	Error estándar	T calculada	T crítica
Intercepto	0.00100	0.00309248	0.323365	0.7516
Pendiente	1.27792	0.00582761	219.287000	0.0000

Como t calculada $<$ t crítica no se rechaza H_0 , por lo tanto el intercepto es igual a cero.

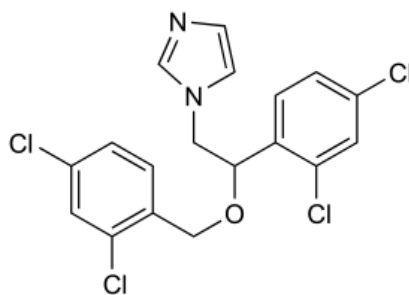
ANEXO III. PROPIEDADES LOS MATERIALES UTILIZADOS

MICONAZOL BASE

Polvo blanco cristalino.

1-[2-(2,4-Dichlorophenyl)-2-[(2,4-dichlorophenyl)methoxy]ethyl]-1-*H*-imidazole

$C_{18}H_{14}Cl_4N_2O=416.1$



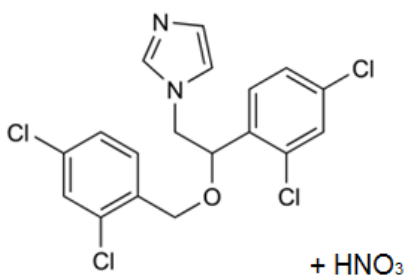
Propiedades

Punto de fusión: 82 °C

Solubilidad: Significativamente poco soluble en agua y éter, soluble 1:40 etanol, muy poco soluble en cloroformo. Soluble en la mayoría de solventes orgánicos.

NITRATO DE MICONAZOL

Polvo blanco cristalino.



Propiedades

Punto de fusión: 182 °C

Solubilidad: Significativamente poco soluble en agua y éter, soluble 1:40 etanol, soluble en cloroformo. Soluble en la mayoría de solventes orgánicos.

pK_a 6.7.

ACETATO FTALATO DE CELULOSA (CAP).

Es un polvo o granulado higroscópico blanco a grisáceo, sin sabor, de libre flujo de energía, puede tener un ligero olor a ácido acético.

Propiedades

Solubilidad: Insoluble en agua, alcoholes, hidrocarburos e hidrocarburos clorados. Soluble en una serie de cetonas, esterés y éteres de alcoholes, éteres cíclicos y en determinados solventes. Soluble en soluciones acuosas tamponadas pH 6.0

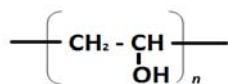
La siguiente tabla muestra algunos de los solventes y mezclas de solventes en la que el CAP tiene una solubilidad de 10% w/w o más.

Solventes	Mezcla de solventes
Acetona	Acetona: agua 97:3
diacetona	Acetona: etanol 1:1
Dioxano	Acetona: metanol 1:1
Acetato de metilo	Acetona: cloruro de metileno 1:3
Metiletilcetona	Acetato de benceno: metanol 1:1

Viscosidad: Un 15% de solución en acetona con un contenido de humedad de 0.4% tiene una viscosidad de 50-90 cps. [Arthur, H. y Kibbe, Ph. D., 1986].

ALCOHOL POLIVINÍLICO (PVAL).

El alcohol polivinílico es un polímero sintético hidrosoluble representado por la fórmula $(C_2H_4O)_n$.



El valor de n se encuentra entre 5000 y 5000, resultando en un peso molecular de 20 000 – 200 000 aproximadamente.

Propiedades

Punto de fusión: 228 °C hidrolizado
180 – 190 °C parcialmente hidrolizado

Solubilidad: Soluble en agua, ligeramente soluble en etanol (95%), insoluble en solventes orgánicos.

METIL ETIL CETONA (METHYL ETHYL KETONE)

Líquido incoloro, olor semejante a acetona.

Propiedades

Punto de fusión: -86.4 °C

Punto de ebullición : 79.6 °C

Solubilidad: En agua 22.6% en peso.

Soluble en agua, alcohol y éter, miscible con aceites.

Viscosidad 0.40 centipoises (25°C).

ANEXO 4

- a) Resultados de la liberación de miconazol base en NE's de CAP lote 2 (con 4.67% miconazol base en las NE's) aplicando el modelo de Peppas y Higuchi a un pH = 4.5.

Tiempo	$t^{1/2}$	$\ln t$	Mt	Mt/M α * 100	$\ln (Mt/M\alpha)$	Mt/M α
10	3.16227766	2.30258509	1.48227693	21.1015441	-1.55582397	0.21101544
20	4.47213595	2.99573227	1.99564877	28.4098535	-1.25843415	0.28409854
30	5.47722558	3.40119738	2.5798794	36.7269016	1.00166069	0.36726902
45	6.70820393	3.80666249	3.54751139	50.5020125	-0.683157	0.50502012
60	7.74596669	4.09434456	4.28794258	61.0427157	-0.49359631	0.61042716
90	9.48683298	4.49980967	5.28600324	75.2510062	-0.28434091	0.75251006
120	10.9544512	4.78749174	5.94731986	84.6654426	-0.16646267	0.84665443
150	12.2474487	5.01063529	6.73440836	95.8703545	-0.04217338	0.95870355
180	13.4164079	5.19295685	6.94943769	98.9314903	-0.01074259	0.9893149
210	14.4913767	5.34710753	7.0244951	99.9999999	-6.2452E-10	1
240	15.4919334	5.48063892	7.05086662	100.375422	0.00374719	1.00375422
300	17.3205081	5.70378247	6.97175205	99.2491553	-0.00753678	0.99249155
360	18.973666	5.88610403	7.00420931	99.7112135	-0.00289204	0.99711214

- b) Resultados de la liberación de miconazol base en NE's de CAP lote 3 (con 9.09% miconazol base en las NE's) aplicando el modelo de Peppas y Higuchi a un pH = 4.5.

Tiempo	$t^{1/2}$	$\ln t$	Mt	Mt/M α * 100	$\ln (Mt/M\alpha)$	Mt/M α
10	3.16227766	2.30258509	2.17199365	28.7376345	-1.24696262	0.28737634
20	4.47213595	2.99573227	4.62062947	61.1355197	-0.49207715	0.6113552
30	5.47722558	3.40119738	5.39148933	71.3347617	-0.33778644	0.71334762
45	6.70820393	3.80666249	5.75054774	76.0854613	-0.27331299	0.76085461
60	7.74596669	4.09434456	6.28812107	83.1980906	-0.18394579	0.83198091
90	9.48683298	4.49980967	7.19083854	95.1419399	-0.04980031	0.9514194
120	10.9544512	4.78749174	7.1948957	95.1956201	-0.04923625	0.9519562
150	12.2474487	5.01063529	7.24763874	95.893463	-0.04193237	0.95893463
180	13.4164079	5.19295685	7.55801127	99.9999999	-6.6085E-10	1
210	14.4913767	5.34710753	7.5072968	99.3289972	-0.00673264	0.99328997
240	15.4919334	5.48063892	7.41803934	98.1480323	-0.01869331	0.98148032
300	17.3205081	5.70378247	7.47078239	98.8458752	-0.01160837	0.98845875
360	18.973666	5.88610403	7.55801127	99.9999999	-6.6085E-10	1

c) Resultados de la liberación de miconazol base en NE's de CAP lote 4 (con 13.0% miconazol base en las NE's) aplicando el modelo de Peppas y Higuchi a un pH = 4.5.

Tiempo	$t^{1/2}$	$\ln t$	Mt	Mt/M α * 100	$\ln (Mt/M\alpha)$	Mt/M α
10	3.16227766	2.30258509	1.68513479	24.0102095	-1.42669105	0.24010209
20	4.47213595	2.99573227	3.07079542	43.7534385	-0.82659998	0.43753438
30	5.47722558	3.40119738	4.26765679	60.8066098	-0.49747169	0.6080661
45	6.70820393	3.80666249	4.86203032	69.275388	-0.36708049	0.69275388
60	7.74596669	4.09434456	5.96557707	84.99899	-0.16253081	0.8499899
90	9.48683298	4.49980967	6.23334945	88.8142758	-0.11862279	0.88814276
120	10.9544512	4.78749174	6.18872072	88.1783948	-0.12580821	0.88178395
150	12.2474487	5.01063529	6.24349234	88.9587942	-0.11699691	0.88958794
180	13.4164079	5.19295685	6.83786587	97.4275725	-0.02606093	0.97427572
210	14.4913767	5.34710753	7.01840936	100	-2.2723E-11	1
240	15.4919334	5.48063892	6.96972347	99.3063117	-0.00696106	0.99306312
300	17.3205081	5.70378247	7.00420931	99.7976742	-0.00202531	0.99797674
360	18.973666	5.88610403	6.98798068	99.5664448	-0.00434498	0.99566445

d) Resultados de la liberación de nitrato de miconazol en NE's de CAP lote 5 (con 4.76% nitrato de miconazol en las NE's) aplicando el modelo de Peppas y Higuchi a un pH = 4.5.

Tiempo	$t^{1/2}$	$\ln t$	Mt	Mt/M α * 100	$\ln (Mt/M\alpha)$	Mt/M α
10	3.16227766	2.30258509	2.02786195	47.9246493	-0.73551658	0.47924649
20	4.47213595	2.99573227	3.38075496	79.8976952	-0.22439955	0.79897695
30	5.47722558	3.40119738	3.90309514	92.2422091	-0.08072873	0.92242209
45	6.70820393	3.80666249	4.2313548	100	2.3633E-05	1
60	7.74596669	4.09434456	4.21218635	99.5469903	-0.00451676	0.9954699
90	9.48683298	4.49980967	4.35115759	102.83131	0.02794333	1.0283131
120	10.9544512	4.78749174	4.26969169	100.906019	0.00904303	1.00906019
150	12.2474487	5.01063529	4.28406803	101.245777	0.01240444	1.01245777
180	13.4164079	5.19295685	4.21458241	99.6036165	-0.00394808	0.99603616
210	14.4913767	5.34710753	4.2313548	100	2.3633E-05	1
240	15.4919334	5.48063892	4.18582974	98.924102	-0.01079364	0.98924102
300	17.3205081	5.70378247	4.15707707	98.2445874	-0.01768639	0.98244587
360	18.973666	5.88610403	4.20260213	99.3204854	-0.0067947	0.99320485

- e) Resultados de la liberación de nitrato de miconazol en NE's de CAP lote 6 (con 9.09% nitrato de miconazol en las NE's) aplicando el modelo de Peppas y Higuchi a un pH = 4.5.

Tiempo	$t^{1/2}$	$\ln t$	Mt	Mt/M α * 100	$\ln (Mt/M\alpha)$	Mt/M α
10	3.16227766	2.30258509	3.05816597	36.7716966	-1.00044175	0.36771697
20	4.47213595	2.99573227	4.41824716	53.1254501	-0.63251409	0.5312545
30	5.47722558	3.40119738	5.12268758	61.5957129	-0.48457791	0.61595713
45	6.70820393	3.80666249	6.4524986	77.5854949	-0.2537897	0.77585495
60	7.74596669	4.09434456	6.81909514	81.9934888	-0.19853035	0.81993489
90	9.48683298	4.49980967	7.370188	88.6198849	-0.12081392	0.88619885
120	10.9544512	4.78749174	7.61458569	91.5585475	-0.08819155	0.91558548
150	12.2474487	5.01063529	8.01712308	96.3986977	-0.03667749	0.96398698
180	13.4164079	5.19295685	8.271105	99.452602	-0.00548902	0.99452602
210	14.4913767	5.34710753	8.31663007	100	-4.4639E-10	1
240	15.4919334	5.48063892	8.19922333	98.5882895	-0.0142177	0.98588289
300	17.3205081	5.70378247	7.85179523	94.4107789	-0.05751494	0.94410779
360	18.973666	5.88610403	8.03389547	96.6003706	-0.03458761	0.96600371

- f) Resultados de la liberación de nitrato de miconazol en NE's de CAP lote 7 (con 13.0% nitrato de miconazol en las NE's) aplicando el modelo de Peppas y Higuchi a un pH = 4.5.

Tiempo	$t^{1/2}$	$\ln t$	Mt	Mt/M α * 100	$\ln (Mt/M\alpha)$	Mt/M α
10	3.16227766	2.30258509	3.58529827	43.5618007	-0.83098955	0.43561801
20	4.47213595	2.99573227	6.17216006	74.9924793	-0.28778235	0.74992479
30	5.47722558	3.40119738	7.44925784	90.5093694	-0.09971681	0.90509369
45	6.70820393	3.80666249	8.03389547	97.6127862	-0.02416169	0.97612786
60	7.74596669	4.09434456	8.12973771	98.7772808	-0.01230256	0.98777281
90	9.48683298	4.49980967	8.23037205	100	5.7983E-10	1
120	10.9544512	4.78749174	8.1680746	99.2430786	-0.00759801	0.99243079
150	12.2474487	5.01063529	8.20880755	99.7379888	-0.00262355	0.99737989
180	13.4164079	5.19295685	8.26152078	100.378461	0.00377746	1.00378461
210	14.4913767	5.34710753	8.24235233	100.145562	0.00145456	1.00145562
240	15.4919334	5.48063892	8.1680746	99.2430786	-0.00759801	0.99243079
300	17.3205081	5.70378247	8.13692588	98.8646179	-0.01141877	0.98864618
360	18.973666	5.88610403	7.91888479	96.2153927	-0.03858083	0.96215393

g) Resultados de la liberación de miconazol base en NE's de CAP lote 2 (con 4.67% miconazol base en las NE's) aplicando el modelo de Peppas y Higuchi a un pH = 5.0.

Tiempo	$t^{1/2}$	$\ln t$	Mt	Mt/M α * 100	$\ln (Mt/M\alpha)$	Mt/M α
10	3.16227766	2.30258509	2.20780638	43.3155451	-0.83665861	0.43315545
20	4.47213595	2.99573227	4.5268862	88.8141936	-0.11862371	0.88814194
30	5.47722558	3.40119738	4.69432623	92.0992445	-0.08230345	0.92099245
45	6.70820393	3.80666249	4.88084172	95.7585418	-0.04334035	0.95758542
60	7.74596669	4.09434456	4.96350199	97.3802758	-0.0265465	0.97380276
90	9.48683298	4.49980967	5.09703012	99.9999999	-6.8372E-10	1
120	10.9544512	4.78749174	4.91899261	96.5070344	-0.03555429	0.96507034
150	12.2474487	5.01063529	4.9211121	96.5486173	-0.0351235	0.96548617
180	13.4164079	5.19295685	4.96562148	97.4218587	-0.02611958	0.97421859
210	14.4913767	5.34710753	5.01225035	98.336683	-0.01677305	0.98336683
240	15.4919334	5.48063892	4.9952944	98.0040196	-0.02016169	0.9800402
300	17.3205081	5.70378247	5.01436985	98.3782659	-0.01635028	0.98378266
360	18.973666	5.88610403	5.08007416	99.6673365	-0.00333218	0.99667337

h) Resultados de la liberación de miconazol base en NE's de CAP lote 3 (con 9.09% miconazol base en las NE's) aplicando el modelo de Peppas y Higuchi a un pH = 5.0.

Tiempo	$t^{1/2}$	$\ln t$	Mt	Mt/M α * 100	$\ln (Mt/M\alpha)$	Mt/M α
10	3.16227766	2.30258509	2.69529003	31.7612289	-1.14691207	0.31761229
20	4.47213595	2.99573227	4.97833845	58.6646131	-0.5333217	0.58664613
30	5.47722558	3.40119738	6.38780204	75.2736961	-0.28402765	0.75273696
45	6.70820393	3.80666249	7.35641085	86.6877576	-0.14284573	0.86687758
60	7.74596669	4.09434456	8.18301355	96.4284228	-0.0363574	0.96428423
90	9.48683298	4.49980967	8.42675538	99.3006702	-0.00700608	0.9930067
120	10.9544512	4.78749174	8.48610121	100	1.1784E-05	1
150	12.2474487	5.01063529	8.19361103	96.5533031	-0.03506318	0.96553303
180	13.4164079	5.19295685	8.26991281	97.4524415	-0.02579392	0.97452441
210	14.4913767	5.34710753	8.15334064	96.0787579	-0.03999015	0.96078758
240	15.4919334	5.48063892	8.16181861	96.1786622	-0.03895088	0.96178662
300	17.3205081	5.70378247	8.29110775	97.7022021	-0.0232343	0.97702202
360	18.973666	5.88610403	8.38860448	98.8511011	-0.01154371	0.98851101

- i) Resultados de la liberación de miconazol base en NE's de CAP lote 4 (con 13.0% miconazol base en las NE's) aplicando el modelo de Peppas y Higuchi a un pH = 5.0.

Tiempo	$t^{1/2}$	$\ln t$	Mt	Mt/M α * 100	$\ln (Mt/M\alpha)$	Mt/M α
10	3.16227766	2.30258509	1.5507632	23.5578214	-1.4457123	0.23557821
20	4.47213595	2.99573227	3.23187529	49.0957876	-0.71139695	0.49095788
30	5.47722558	3.40119738	4.18988663	63.6490476	-0.45178582	0.63649048
45	6.70820393	3.80666249	5.41495423	82.2591898	-0.19529507	0.8225919
60	7.74596669	4.09434456	5.67777151	86.251677	-0.14790069	0.86251677
90	9.48683298	4.49980967	6.13770173	93.2385297	-0.07000914	0.9323853
120	10.9544512	4.78749174	6.33057569	96.1685002	-0.03906832	0.961685
150	12.2474487	5.01063529	6.38780204	97.0378321	-0.03006926	0.97037832
180	13.4164079	5.19295685	6.58279549	100	6.6708E-10	1
210	14.4913767	5.34710753	6.53828612	99.323853	-0.00678443	0.99323853
240	15.4919334	5.48063892	6.55312258	99.5492354	-0.00451784	0.99549235
300	17.3205081	5.70378247	6.51285219	98.9374833	-0.01068202	0.98937483
360	18.973666	5.88610403	6.57219802	99.8390127	-0.00161117	0.99839013

- j) Resultados de la liberación de nitrato de miconazol en NE's de CAP lote 5 (con 4.76% nitrato de miconazol en las NE's) aplicando el modelo de Peppas y Higuchi a un pH = 5.0.

Tiempo	$t^{1/2}$	$\ln t$	Mt	Mt/M α * 100	$\ln (Mt/M\alpha)$	Mt/M α
10	3.16227766	2.30258509	0.29784655	15.3931389	-1.8712483	0.15393139
20	4.47213595	2.99573227	0.85747646	44.3156186	-0.81383301	0.44315619
30	5.47722558	3.40119738	1.50768543	77.9193542	-0.24949581	0.77919354
45	6.70820393	3.80666249	1.9349306	100	1.0473E-09	1
60	7.74596669	4.09434456	1.90277236	98.338016	-0.0167595	0.98338016
90	9.48683298	4.49980967	1.84994097	95.6076136	-0.04491773	0.95607614
120	10.9544512	4.78749174	1.86831711	96.5573188	-0.03503338	0.96557319
150	12.2474487	5.01063529	1.89358429	97.8631634	-0.02159997	0.97863163
180	13.4164079	5.19295685	1.8269708	94.420482	-0.05741217	0.94420482
210	14.4913767	5.34710753	1.79710958	92.8772111	-0.07389188	0.92877211
240	15.4919334	5.48063892	1.93263358	99.881287	-0.00118784	0.99881287
300	17.3205081	5.70378247	1.92344552	99.4064344	-0.00595334	0.99406434
360	18.973666	5.88610403	2.37902058	122.95121	0.20661742	1.2295121

- k) Resultados de la liberación de nitrato de miconazol en NE's de CAP lote 6 (con 9.09% nitrato de miconazol en las NE's) aplicando el modelo de Peppas y Higuchi a un pH = 5.0.

Tiempo	$t^{1/2}$	$\ln t$	Mt	Mt/M α * 100	$\ln (Mt/M\alpha)$	Mt/M α
10	3.16227766	2.30258509	0.09264635	2.1336247	-3.84734792	0.02133625
20	4.47213595	2.99573227	1.25041952	28.7968823	-1.24490306	0.28796882
30	5.47722558	3.40119738	1.98546498	45.7248152	-0.78252903	0.45724815
45	6.70820393	3.80666249	2.66767905	61.4360529	-0.48717334	0.61436053
60	7.74596669	4.09434456	2.91345987	67.0963304	-0.39904083	0.6709633
90	9.48683298	4.49980967	3.94252352	90.7954365	-0.09656116	0.90795436
120	10.9544512	4.78749174	4.34220449	100	-2.7763E-10	1
150	12.2474487	5.01063529	4.28018503	98.5717056	-0.01438593	0.98571706
180	13.4164079	5.19295685	4.22505662	97.3021107	-0.0273495	0.97302111
210	14.4913767	5.34710753	4.10561173	94.5513216	-0.05602741	0.94551322
240	15.4919334	5.48063892	4.0481863	93.2288268	-0.07011321	0.93228827
300	17.3205081	5.70378247	3.97468176	91.5360335	-0.08843748	0.91536034
360	18.973666	5.88610403	3.66917849	84.5003614	-0.16841437	0.84500361

- l) Resultados de la liberación de nitrato de miconazol en NE's de CAP lote 7 (con 13.0% nitrato de miconazol en las NE's) aplicando el modelo de Peppas y Higuchi a un pH = 5.0.

Tiempo	$t^{1/2}$	$\ln t$	Mt	Mt/M α * 100	$\ln (Mt/M\alpha)$	Mt/M α
10	3.16227766	2.30258509	1.47085659	22.5123342	-1.49110684	0.22512334
20	4.47213595	2.99573227	3.54743658	54.2956252	-0.61072653	0.54295625
30	5.47722558	3.40119738	4.75107353	72.718004	-0.31858118	0.72718004
45	6.70820393	3.80666249	5.70203859	87.2730895	-0.13612802	0.87273089
60	7.74596669	4.09434456	5.90187908	90.3317669	-0.10168099	0.90331767
90	9.48683298	4.49980967	6.53355877	100	1.8595E-10	1
120	10.9544512	4.78749174	6.3888467	97.7850957	-0.02239802	0.97785096
150	12.2474487	5.01063529	6.46005423	98.8749693	-0.01131407	0.98874969
180	13.4164079	5.19295685	6.42330195	98.3124539	-0.01701947	0.98312454
210	14.4913767	5.34710753	6.34979741	97.1874231	-0.02852887	0.97187423
240	15.4919334	5.48063892	6.31993618	96.7303794	-0.03324267	0.96730379
300	17.3205081	5.70378247	6.11090763	93.5310731	-0.06687647	0.93531073
360	18.973666	5.88610403	6.20508533	94.9725188	-0.05158261	0.94972519