



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

TÍTULO DEL TEMA ESCRITO

**DESARROLLO DE UNA CREMA VAGINAL DE CLOTRIMAZOL 2% EMPLEANDO
POLÍMEROS DE ÁCIDO ACRÍLICO PARA IMPARTIR PROPIEDAD
POTENCIALMENTE MUCOADHESIVA.**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

PRESENTA

DANIELA SANJUAN VÁZQUEZ ARMENTA



MÉXICO, D.F.

2014



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Profesor: NORMA TRINIDAD GONZÁLEZ MONZON

VOCAL: Profesor: ENRIQUE AMADOR GONZÁLEZ

SECRETARIO: Profesor: LILIANA AGUILAR CONTRERAS

1er. SUPLENTE: Profesor: ERNESTINA HERNÁNDEZ GARCÍA

2° SUPLENTE: Profesor: MARIA EUGENIA IVETTE GÓMEZ SÁNCHEZ

**LABORATORIO DE DESARROLLO FARMACÉUTICO LUBRIZOL S.A DE C.V Y
LABORATORIO DE TECNOLOGÍA FARMACÉUTICA FACULTAD DE QUIMICA
UNAM.**

Trabajo realizado con el apoyo del Programa UNAM- DGAPA- PAPIME

CLAVE DEL PROYECTO: PE200814

NOMBRE DEL PROYECTO: MEJORAMIENTO DE LA ENSEÑANZA TEÓRICA Y
EXPERIMENTAL EN EL DESARROLLO, FORMULACIÓN, FABRICACIÓN Y EVALUACIÓN DE
FORMAS FARMACÉUTICAS LÍQUIDAS Y SEMISÓLIDAS.

ASESOR DEL TEMA:

M.EN C ENRIQUE AMADOR GONZÁLEZ

SUSTENTANTE (S):

DANIELA SANJUAN VÁZQUEZ ARMENTA

AGRADECIMIENTOS

A mis padres y hermana por todo su amor, apoyo y ejemplo. Mami eres la mujer más maravillosa del mundo, te admiro infinitamente, gracias por tu cariño y motivación. Papa gracias por esa disposición incondicional a ayudarme, por tus consejos tiempo y ejemplo, Mely por todo tu cariño, los amo mucho.

A Iván por todo este tiempo, eres el amor de mi vida te amo gracias por tu apoyo. A Celso, Edith, Ari y Lili por abrirme las puertas de su casa por apoyarme y tratarme con tanto cariño los quiero mucho.

A mis amigos maletas por las risas, salidas y estrés compartido, a Diana por tu amistad, cariño, por esas pláticas eternas, consejos y por estar conmigo siempre, a Alex y Esbeyde por esas salidas locas los quiero mucho.

A mí jurado por sus enseñanzas, tiempo y apoyo.

Al profesor Enrique por sus consejos, trabajo y apoyo incondicional.

ÍNDICE

1	INTRODUCCIÓN.....	1
2	OBJETIVOS	4
3	HIPÓTESIS	5
4	MARCO TEÓRICO.....	6
4.1	ANATOMÍA Y FISIOLOGÍA DE LA VAGINA.....	6
4.1.1	Fluido vaginal	7
4.1.2	Microflora	9
4.1.3	pH vaginal.....	9
4.2	CANDIDIASIS VULVOVAGINAL.....	11
4.2.1	Etiología y Patogenia.....	12
4.2.2	Diagnóstico	13
4.2.3	Tratamiento	14
4.3	CLOTRIMAZOL	16
4.3.1	Propiedades físicas, químicas y fisicoquímicas	16
4.3.2	Usos terapéuticos.....	17
4.3.3	Presentaciones.....	17
4.3.4	Mecanismo de acción.....	17
4.3.5	Farmacocinética	18
4.3.6	Reacciones secundarias y adversas.....	18
4.3.7	Contraindicaciones y precauciones generales.....	18
4.4	CREMAS VAGINALES.....	19
4.4.1	Administración vaginal.....	19
4.4.2	Formulación	20
4.4.3	Selección de excipientes.....	20
4.4.4	Estabilidad física.....	32
4.4.5	Estudios de estabilidad física, condiciones extremas	33
4.4.6	Fabricación	34
4.5	POLÍMEROS DE ÁCIDO ACRÍLICO.....	36
4.5.1	Propiedades mucoadhesivas	37
4.5.2	Polímero emulsionante Pemulen	38
4.6	MUCOADHESIÓN.....	41
4.6.1	Definición e importancia	41
4.6.2	Mecanismos	42
4.6.3	Interacciones atractivas.....	42

4.6.4	Interacciones repulsivas	43
4.6.5	Teorías de mucoadhesión	43
4.6.6	Factores que afectan la mucoadhesión	46
4.6.7	Técnicas para la determinación de mucoadhesión	47
4.7	DISEÑO DE EXPERIMENTOS	48
4.7.1	Diseños factoriales	49
4.7.2	Diseños de superficie de respuesta	49
4.7.3	Optimización simultánea	50
5	MATERIALES	52
6	MÉTODOS.....	54
6.1	FABRICACIÓN DE CLOTRIMAZOL 2 % CREMA VAGINAL	54
6.2	DISEÑOS EXPERIMENTALES.....	55
6.3	ESTUDIO DE ESTABILIDAD	60
6.4	ESTUDIO DE MUCOADHESIÓN.....	61
7	RESULTADOS Y ANÁLISIS.....	65
7.1	ESTUDIO DE ESTABILIDAD	65
7.2	ESTUDIO DE MUCOADHESIÓN.....	73
8	CONCLUSIONES.....	85
9	ANEXOS	86
9.1	VERIFICACIÓN DE SUPUESTOS ESTUDIO DE ESTABILIDAD	86
9.2	VERIFICACIÓN DE SUPUESTOS ESTUDIO DE MUCOADHESIÓN	88
9.3	VERIFICACIÓN DE SUPUESTOS ESTUDIO DE VISCOSIDAD	90
10	REFERENCIAS	92

1 INTRODUCCIÓN

De acuerdo a la Dirección General de Epidemiología de la Secretaría de Salud, la candidiasis vulvovaginal es uno de los trastornos ginecológicos más comunes, aproximadamente el 75% de las mujeres experimentan candidiasis vulvovaginal durante su vida y aproximadamente el 10% sufren de múltiples episodios. El tratamiento local de candidiasis vulvovaginal con agentes antifúngicos es la primera opción. (Secretaría de Salud, 2013)(Rivera Sánchez, y otros, 2006).

La entrega local (vaginal) no sólo permite un tratamiento específico en el sitio, sino que también evita los efectos secundarios tóxicos de los agentes antifúngicos de administración oral. El tratamiento más comúnmente prescrito para candidiasis vaginal ha sido clotrimazol, el cuál es usualmente administrado por vía vaginal en forma de crema, gel, óvulos o supositorios. Sin embargo, este tipo de tratamientos están asociados con un bajo tiempo de residencia en la cavidad vaginal, específicamente en la mucosa vaginal. (Santos, y otros, 2014) (Secretaria de Salud , 2010) (Neves J., y otros, 2008) (Kast C., y otros, 2002).

El término mucoadhesión se ha definido como la unión por fuerzas interfaciales de dos materiales de los cuales al menos uno es un epitelio recubierto por moco. La mucoadhesión es un campo de la investigación ampliamente reconocido por su importancia en la optimización de los sistemas de administración de fármacos, ya que puede influir directamente en la retención del fármaco localmente, la difusión y la biodisponibilidad. (Carvalho F., y otros, 2010)(Rodríguez, y otros, 2000).

Todo sistema mucoadhesivo debe sus propiedades a la inclusión de uno o varios tipos de moléculas poliméricas que, en condiciones apropiadas, son capaces de establecer interacciones con la superficie biológica. Entre las moléculas que ofrecen una mayor capacidad mucoadhesiva están los polímeros de ácido acrílico Carbopol

®, emulsionantes poliméricos Pemulen™ y policarbófilo Noveon® (Lubrizol, 2013) (Rodríguez, y otros, 2000).

Los semisólidos con propiedades mucoadhesivas actualmente tienen gran importancia como sistemas de administración de fármacos vaginales. Sin embargo aún falta mejorar el rendimiento de estos sistemas para lograr la excelencia de los resultados clínicos (Neves J., y otros, 2008)

Existen diversos informes sobre métodos analíticos para la evaluación *in vitro* del potencial mucoadhesivo de semisólidos vaginales, presentándose bastante similitud en estos, particularmente entre los que se basan en medir la fuerza de tensión o el trabajo necesario para desprender una formulación mucoadhesiva de un modelo de membrana. Sin embargo, los datos producidos por dichos métodos son frecuentemente influenciados por las condiciones de estudio y parámetros instrumentales, haciéndose difícil la interpretación o la comparación de resultados obtenidos por diferentes grupos de investigación (Neves J., y otros, 2008).

No existe un método universal para evaluar el potencial mucoadhesivo *in vitro* de formulaciones semisólidas vaginales, sin embargo, existe el trabajo realizado por Neves y sus colaboradores, quienes analizaron la influencia de diferentes condiciones de estudio y parámetros instrumentales (Neves J., y otros, 2008).

El utilizar el diseño estadístico de experimentos como herramienta en el desarrollo de formulaciones farmacéuticas permite planear y llevar a cabo los experimentos necesarios, para determinar la relación entre los factores involucrados en forma individual y las interacciones de los mismos, sobre las propiedades de la formulación de forma eficiente y precisa (Gutiérrez Pulido, y otros, 2008,).

El diseño experimental se puede definir como la estrategia para la creación de experimentos, de tal manera que la información requerida se obtiene de la forma más eficiente y precisa posible (Gutiérrez Pulido, y otros, 2008).

En este trabajo se describe la aplicación del diseño estadístico de experimentos para el desarrollo de Clotrimazol 2 % Crema Vaginal (CVC 2%) potencialmente mucoadhesiva.

Se inicia con un diseño de experimentos factorial 2^2 , para determinar la concentración de los emulsionantes Pemulen™ TR-1 NF y Tween 60 a la cual se tiene una formulación estable. Posteriormente la fórmula se optimiza para una máxima fuerza de desprendimiento de la formulación de un sistema de membrana, siendo este valor un indicativo de mucoadhesión, mediante el empleo de un diseño estadístico de superficie de respuesta Central Compuesto 2^2 . Las variables independientes estudiadas fueron la concentración de polímero Carbopol® 974 P NF y la concentración de policarbófilo Noveon® AA-1.

2 OBJETIVOS

Objetivo central

Desarrollar una fórmula potencialmente mucoadhesiva de Clotrimazol 2% crema vaginal, evaluando en un diseño central compuesto las concentraciones de polímero Carbopol ®974P NF y policarbófilo Noveon ® AA-1 a las cuales se maximiza el valor de fuerza en un estudio de mucoadhesión de fuerza de tensión.

Objetivos Particulares

-Obtener una fórmula físicamente estable evaluando en un diseño factorial las concentraciones de polímero emulsionante Pemulen™ TR-1 NF y Tween 60, a las cuales se obtienen resultados satisfactorios en los estudios de estabilidad preestablecidos.

-Estudiar la influencia de la concentración de Pemulen™ TR-1 NF, la inclusión de Tween 60 y la interacción de estos emulsionantes, en la estabilidad física de la formulación, de acuerdo a los valores obtenidos en las pruebas de estabilidad.

-Evaluar la influencia de la concentración de polímero Carbopol ®974P NF y policarbófilo Noveon ® AA-1, así como su interacción en los valores de fuerza obtenidos del estudio de mucoadhesión.

-Obtener una formulación de Clotrimazol 2% crema vaginal optimizando los valores de Carbopol ®974P NF y policarbófilo Noveon ® AA-1 a un valor máximo de fuerza en el estudio de mucoadhesión y con un valor de viscosidad predeterminado.

-Obtener una formulación de Clotrimazol 2% crema vaginal, que presente un valor de fuerza en el estudio de mucoadhesión mayor al de Canesten® V producto de referencia.

3 HIPÓTESIS

-Las formulaciones de CVC 2% que sólo contienen Pemulen™ TR-1 NF como emulsionante presentan resultados satisfactorios en los estudios de estabilidad preestablecidos.

-La estabilidad de la formulación no depende de la concentración de Pemulen™ TR-1 NF evaluada, sólo de su inclusión y se favorece con la adición de Tween 60.

-El Carbopol ®974P NF tiene un efecto mayor sobre el valor de fuerza del estudio de mucoadhesión que el policarbófilo Noveon ® AA-1. Existe una interacción entre estos polímeros que permite obtener formulaciones con valores de fuerza más altos.

-El valor de fuerza del estudio de mucoadhesión se favorece al aumentar la concentración de Carbopol ®974P NF y Noveon ® AA-1, no obstante a concentraciones altas disminuye.

-Se obtendrá una formulación de CVC 2% con un valor de fuerza en el estudio de mucoadhesión significativamente mayor al de Canesten V producto de referencia.

4 MARCO TEÓRICO

4.1 ANATOMÍA Y FISIOLOGÍA DE LA VAGINA

La vagina es un conducto que se extiende de la porción inferior del cuello uterino a la vulva. La vulva es el nombre que se le da al conjunto de estructuras genitales externas, como los labios mayores, menores y el clítoris (véase Fig. 1) (Muñoz Martínez, y otros, 1997).

La pared vaginal se compone de tres capas: la capa profunda constituida por fibras conjuntivas y elásticas irrigadas por un plexo venoso muy desarrollado. La capa media, formada por fibras musculares lisas, y la capa superficial constituida por un epitelio plano poliestratificado (Santos Ramos, y otros, 1994).

La vagina no posee formaciones glandulares por tanto, no está facultada para secretar. El fluido vaginal está compuesto por la descamación del epitelio de la pared vaginal, así como por fluidos provenientes del tracto reproductivo superior como el endometrio, trompas de Falopio y el moco cervical proveniente del cuello uterino (véase Fig. 1), también puede contener orina y semen residual (Hussain, y otros, 2005).

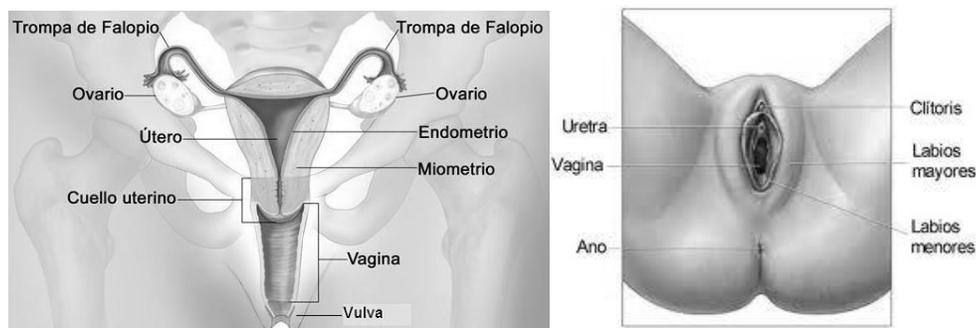


Fig. 1. Anatomía del aparato reproductor femenino. Izquierda. Anatomía del aparato reproductor femenino, compuesto por el útero, ovarios, trompas de Falopio, cuello uterino (contiene una capa muscular externa, miometrio y un revestimiento interno, endometrio) y la vagina. Derecha. Se muestra la vulva (compuesta por labios mayores, menores y clítoris), así como el ano y la uretra

(Crescenti J., 2013) (Armiñana E., 2013).

4.1.1 Fluido vaginal

El fluido vaginal se compone de moco proveniente del cuello uterino, el cual es una estructura altamente viscosa, que regula la penetración de espermatozoides y bacterias al tracto reproductivo superior. Los componentes macromoleculares del moco cervical incluyen plasma derivados, proteínas producidas localmente, lípidos, carbohidratos, sales inorgánicas y una población polidispersa de glicoproteínas, las mucinas, capaces de formar geles viscoelásticos con un contenido acuoso que puede superar el 95% (Wolf D., y otros, 1980) (Rodríguez, y otros, 2000).

Las glicoproteínas del moco, tienen un alto peso molecular y consisten en un esqueleto peptídico de alrededor de 800 aminoácidos ricos en serina, treonina y prolina, a través de los restos hidroxílicos (treonina y serina) se establecen uniones O-glicosídicas con cadenas oligosacáridas (subunidades) de distinta composición y tamaño (entre 2 y 20 azúcares, con un promedio de 8). El tipo de azúcares se limita a galactosa, fucosa, N-acetilglucosamina, N-acetilgalactosamina y ácido siálico que se agrupan en diversas combinaciones. Véase Fig. 2 (Rodríguez, y otros, 2000).

El conjunto de cadenas laterales (cadenas oligosacáridicas) constituye el 70-90% del peso de la glicoproteína debido a que el esqueleto proteico posee aproximadamente una cadena de carbohidratos por cada cuatro aminoácidos. La región, que no contiene cadenas laterales, es susceptible a ataques enzimáticos con acortamiento de la molécula y de formación de enlaces reticulados con otras moléculas de mucina o de asociación entre ellas por medio de enlaces disulfuro (Rodríguez, y otros, 2000).

Debido al ácido siálico (pKa 2,6) y a los grupos sulfato que llevan algunos azúcares, las moléculas de mucina se comportan como un polielectrolito aniónico a pH neutro. Los carbohidratos son los principales determinantes del comportamiento fisicoquímico de gel del moco cervical (Wolf D., y otros, 1980).

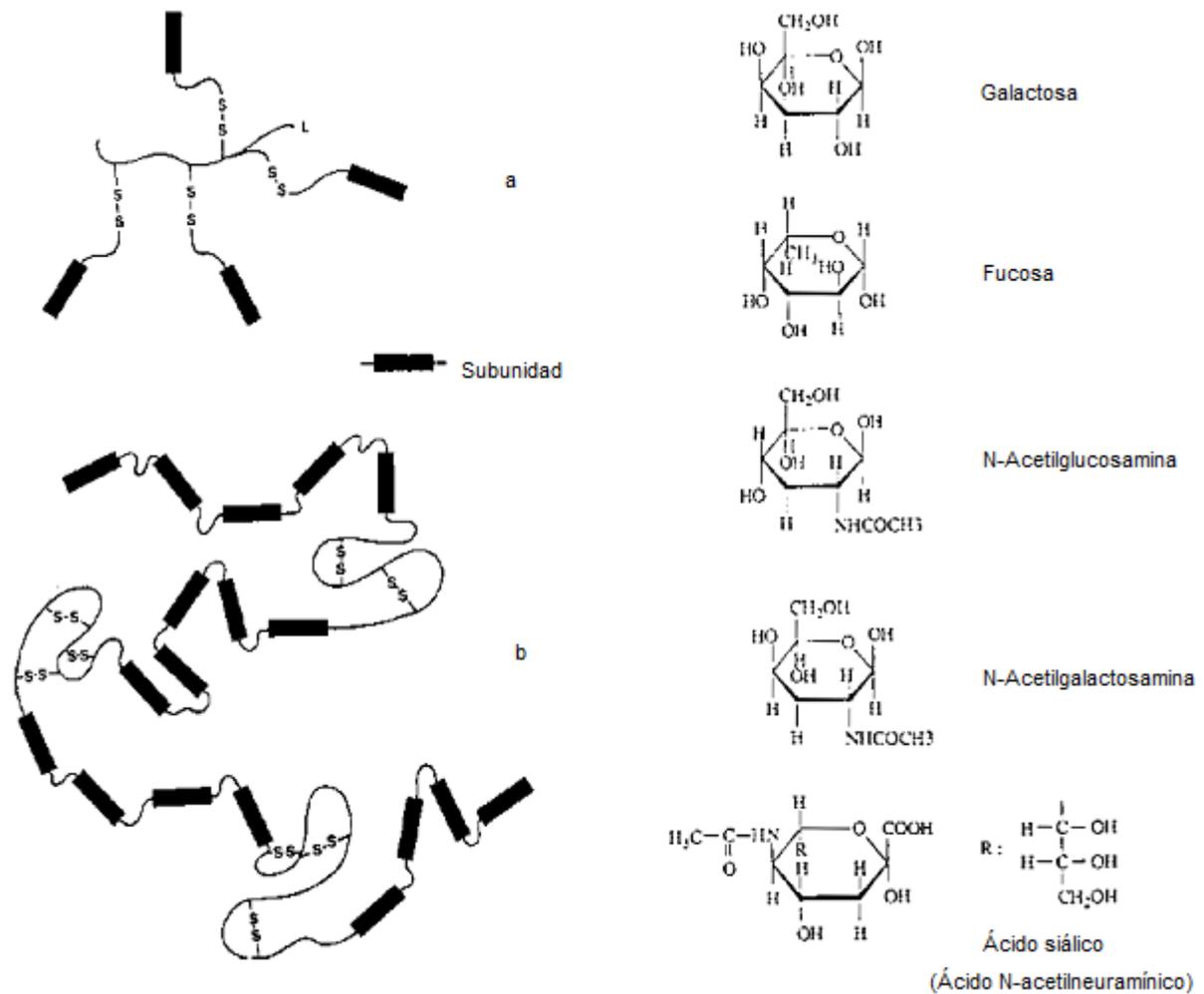


Fig. 2. Glicoproteínas del moco. Izquierda. Estructuras macromoleculares propuestas para las glicoproteínas del moco. a) modelo no lineal, b) modelo lineal. Derecha. Carbohidratos de la mucina. (Rodríguez, y otros, 2000)

Además de los componentes del moco, el fluido vaginal humano está compuesto por proteínas, enzimas, carbohidratos, compuestos orgánicos volátiles, ácidos orgánicos de cadena corta, ácido láctico, ácido acético, glicerol, urea, glucosa, glucógeno, sodio, potasio, cloruro y calcio, algunos compuestos provenientes de la descamación del epitelio y otros de fluidos derivados del tracto reproductivo superior (Owen, y otros, 1999).

Al igual que el espesor del epitelio vaginal, la cantidad y la composición del fluido vaginal cambia a lo largo del ciclo menstrual. Las mujeres en la etapa reproductiva producen el doble de fluido que en la posmenopáusica. También la excitación sexual puede afectar el volumen y la composición del fluido vaginal (Hussain, y otros, 2005).

4.1.2 Microflora

(Valenta, 2005)

La flora vaginal consiste principalmente de *Lactobacillus* (Bacilos de Döderlein) microorganismo prevalente en la vagina, junto con otros facultativos aerobios y anaerobios obligados.

La microflora vaginal se ve influenciada por factores como: el contenido de glucógeno de las células epiteliales, los niveles de glucosa, el pH, los niveles hormonales, traumatismos durante el acto sexual, anticonceptivos, la edad y los tratamientos antimicrobianos.

A medida que la producción de estrógenos disminuye durante la pre-menopausia y menopausia hay una disminución permanente en el contenido de glucógeno vaginal. Los microorganismos acidófilos ya no dominan en este periodo, existiendo una variedad de otros microorganismos.

4.1.3 pH vaginal

(Fernández, y otros, 2004)

La vagina, además de otras, tiene la función depuradora o de defensa. Es una barrera microbiológica, que actúa frente a una serie de agresiones. Esta función se cumple debido a la constante descamación epitelial, así como a la producción de glucógeno por parte de las células epiteliales que por acción de los Bacilos de Döderlein, se metaboliza hasta llegar a ácido láctico, lo que producirá la acidificación del medio que impedirá el desarrollo intravaginal de gérmenes patógenos.

El pH vaginal es normalmente distinto en cada etapa de la vida de la mujer. Durante la niñez, la fase menstrual y la menopausia el pH vaginal está entre 6.8 y 7.2, en la fase premenstrual y durante el embarazo el pH está entre 3.8 y 4.2 y durante el resto del ciclo el pH vaginal varía entre 4.0 y 4.5.

El pH vaginal también sufre variaciones por diversos trastornos fisiopatológicos o circunstancias específicas, por ejemplo: en general elevan el pH vaginal por encima de 5.0 las infecciones por bacterias y protozoos, los lavados vaginales, el semen, el exceso de moco cervical, en todos estos casos conviene disminuir el pH, acidificando el medio con productos de pH de 3.5-4.0. Por otro lado, las infecciones vaginales por hongos, producen un aumento del grado de acidez, con pH de 4.0-4.5, los síntomas aparecen cuando el pH vaginal está por debajo de 4.0, por lo que, en esos casos la recomendación sería la de disminuir la acidez con productos de pH 6.0 a 8.5.

4.2 CANDIDIASIS VULVOVAGINAL

Una de las causas más comunes de infecciones vaginales es la Candidiasis Vulvovaginal (CVV), definida como infección en la vulva y vagina producida por alguna especie de *Candida*. Del 40-75% de las mujeres con vida sexual activa experimentan candidiasis vaginal sintomática (Rosa, y otros, 2013) (Rivera Sánchez, y otros, 2006) (Nyirjesy, y otros, 2003)

Algunas mujeres con CVV son completamente asintomáticas, (*Candida albicans* y otras especies de *Candida* pueden formar parte de la flora vaginal de estas mujeres) mientras que otras pueden desarrollar síntomas graves o episodios frecuentes (Nyirjesy, y otros, 2003).

Debido a la amplia gama de CVV, se propuso en 1998 la clasificación de CVV en enfermedad complicada y no complicada (véase Tabla.1).Este sistema de clasificación tiene importantes implicaciones terapéuticas, porque las mujeres con CVV complicada parecen ser menos propensas a responder a los tratamientos estándar de la terapia antifúngica (Nyirjesy, y otros, 2003) (Secretaría de Salud , 2010).

Tabla1. Clasificación de Candidiasis Vulvovaginal (CVV).

CVV no complicada	CVV complicada
Episodios sintomáticos esporádicos o poco frecuentes	Episodios recurrentes (4 episodios por año)
Síntomas leves a moderados	Síntomas o hallazgos graves
Infección por <i>Candida albicans</i>	Infección por especies de levaduras No- <i>albicans</i>
Paciente sin enfermedad subyacente Paciente no embarazada	Paciente con enfermedad subyacente (por ejemplo: diabetes, inmunosupresión, VIH, neoplasias malignas) Paciente embarazada

Referencia:(Nyirjesy, y otros, 2003) (Secretaría de Salud , 2010).

Numerosos estudios sugieren que *C. albicans* es responsable de la mayoría de los episodios sintomáticos de CVV. Sin embargo, existen otras especies de levaduras No-*albicans* implicadas, *Candida glabrata* (es más común), *Candida parapsilosis*, *Candida krusei*, *Candida lusitanae*, *Candida tropicalis*, *Saccharomyces cerevisiae* (Nyirjesy, y otros, 2003).

4.2.1 Etiología y Patogenia

(Secretaría de Salud , 2010) (Nyirjesy, y otros, 2003)

Se ha postulado que existen diferencias entre la virulencia de las distintas cepas. Las pseudohifas penetran en las células epiteliales vaginales y se adhieren más a las células que las formas ramificadas (blastosporos). La adherencia parece ser una característica patogénica importante de las especies de *Candida*.

Existen diferentes factores implicados en el desarrollo de CVV sin complicaciones y complicada:

-Condiciones médicas y predisposición genética

La CVV se asocia con diabetes mellitus, estas pacientes tienen menor probabilidad de responder a la terapia antimicótica y son más susceptibles a las infecciones causadas por *C. glabrata*. La inmunodeficiencia sistémica causada por cualquier enfermedad o tratamiento con corticosteroides o medicamentos similares puede llevar a una CVV recurrente. También en algunas mujeres, el riesgo se debe a circunstancias genéticas, por ejemplo, las mujeres no secretoras de antígenos Lewis, glicoproteínas que inhiben la unión de *Candida* a la mucosa vaginal, presentan CVV recurrente.

-El uso de antibióticos y terapia hormonal

El uso recurrente de antibióticos puede causar episodios de CVV, debido a que provocan una disminución de la microflora vaginal, lo que facilita el crecimiento

excesivo de *Candida*. También el crecimiento de las levaduras se ve favorecido por niveles de estrógenos elevados.

-Factores sexuales y otros

El sexo orogenital, pueden contribuir a la introducción de microorganismos de la boca o saliva de la pareja. Algunos anticonceptivos pueden contribuir a CVV, anticonceptivos orales, el uso de diafragma, espermicidas y dispositivo intrauterino. También se ha sugerido que la ropa apretada y aislante predispone a la CVV al elevar la temperatura y la humedad de la vagina.

-Factores microbianos

La mayoría de las cepas de *C. albicans* son susceptibles a los agentes antimicóticos disponibles, la resistencia es poco frecuente en pacientes con CVV. Sin embargo, las levaduras No-*albicans* se asocian con menor respuesta a la terapia antimicótica estándar.

4.2.2 Diagnóstico

(Secretaría de Salud, 2010) (Nyirjesy, y otros, 2003)

Los síntomas clínicos de la CVV son inespecíficos y una amplia variedad de enfermedades infecciosas y no infecciosas puede causar una gama similar de síntomas. Para obtener un diagnóstico preciso, una evaluación exhaustiva es necesaria.

Las pacientes sintomáticas pueden quejarse de picazón vulvovaginal, irritación, dolor o ardor. La CVV representa un espectro de quejas vulvares y vaginales, sin embargo, muchas mujeres presentan sólo síntomas y signos vulvares. La mayoría presentan un flujo blanco espeso, pero hay quienes no notan cambio en las secreciones vaginales. También se puede presentar disuria.

El examen físico de una paciente debe comenzar con una inspección de la vulva, en busca de signos de eritema, edema o fisuras cutáneas. Posteriormente la inspección vaginal para detectar la presencia de candidiasis vaginal, eritema o erosiones.

En las mujeres que se quejan de síntomas vaginales, las pruebas estándar que deben realizarse consisten en una medición del pH vaginal y microscopía. Aunque el pH vaginal generalmente no se ve afectado por CVV y sigue siendo inferior a 4,5 un pH normal ayuda a excluir la vaginitis bacteriana, la tricomoniasis, vaginitis atrófica o algún tipo de infección mixta.

El estudio microscópico del material vaginal disuelto en solución salina o en Hidróxido de Potasio (KOH) al 10%, puede revelar levaduras ramificadas o micelios. Sin embargo, la microscopía tiene una sensibilidad sólo del 50%, además *C. glabrata* produce blastosporas que son más difícil de reconocer por microscopía. Cuando el diagnóstico no puede ser establecido por microscopía se debe obtener un cultivo de levadura vaginal. El cultivo es particularmente útil en las mujeres con CVV complicada, ya que se obtiene información sobre el tipo de especie haciendo que la infección influya en la elección de la terapia antimicótica.

4.2.3 Tratamiento

(Rosa, y otros, 2013)(Secretaría de Salud, 2010)(Nyirjesy, y otros, 2003)

La candidiasis vulvovaginal no complicada suele responder al tratamiento con tandas cortas de antifúngicos orales o vaginales. Los agentes efectivos incluyen las preparaciones vaginales que contengan nistatina, miconazol, clotrimazol, butoconazol, terconazol y tioconazol. En la enfermedad no complicada no existe diferencia en cuanto a la eficacia entre las distintas formas de presentación óvulos vaginales, supositorios, pomadas, cremas o la duración del tratamiento (1, 3, 7 o 14 días). Una dosis única de 150 mg de fluconazol por vía oral es igual de efectiva en la candidiasis vulvovaginal no complicada que las preparaciones vaginales mencionadas anteriormente, su uso está aprobado por la FDA, los efectos adversos son escasos y la toxicidad sistémica es poco probable.

El manejo de los casos complicados de CVV, comienza por un cultivo para confirmar el diagnóstico y caracterizar la especie causante. La CVV complicada responde mal a los tratamientos cortos con fluconazol oral o a las preparaciones tópicas. Generalmente es preciso mantener el tratamiento al menos durante 7-14 días.

En las pacientes con infecciones recurrentes, tras la curación de la infección actual puede estar indicado el tratamiento crónico supresor con un agente antifúngico oral para evitar que recidiva. (Fluconazol 100-200 mg a la semana). El tratamiento crónico supresor se mantiene durante 6 meses y durante el mismo son poco frecuente las recurrencias. La enfermedad recidiva a las pocas semanas en cerca de la mitad de las pacientes tras la interrupción del tratamiento supresor. En estas pacientes debe mantenerse el tratamiento supresor de modo crónico.

El ácido bórico intravaginal resulta eficaz en las candidiasis vulvovaginales que no responden a los agentes tópicos y orales disponibles. Las cápsulas de ácido bórico (600 mg) se administran vaginalmente durante 14 días.

El tratamiento en mujeres embarazadas consiste en la administración de agentes tópicos durante al menos una semana, los medicamentos orales deben evitarse.

4.3 CLOTRIMAZOL

(Clarke's, y otros, 2004)(Wells, 1990)

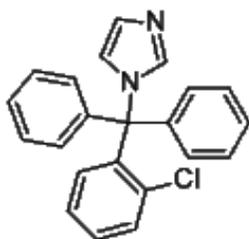
Nombre químico: 1-[(2-clorofenil) difenilmetil] 1-H-Imidazol

Nombre común: Clotrimazol

Fórmula condensada: C₂₂ H₁₇ Cl N₂

Peso molecular: 344.84

Estructura química:



4.3.1 Propiedades físicas, químicas y fisicoquímicas

(Clarke's, y otros, 2004)(Wells, 1990)

Características físicas: Polvo cristalino blanco a amarillo pálido, inodoro.

Solubilidad:(20°C) soluble 1 en 10 de alcohol, 1 en 10 de cloroformo, y 1 en 100 de éter, insoluble en agua.

Estabilidad: El Clotrimazol se hidroliza en imidazol y (o-clorofenil) difenilmetanol, al calentarse en medio ácido.

Pka: 6.62

Punto de fusión: 147-149°C

4.3.2 Usos terapéuticos

(Koda Kimble, y otros, 2008)

El Clotrimazol es un antimicótico sintético del grupo de los imidazoles con actividad eficaz contra *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida glabrata*. Es sumamente efectivo en el tratamiento de la candidiasis vulvovaginal no complicada.

4.3.3 Presentaciones

(BAYER, 2009)

Existen diversas presentaciones de clotrimazol para administración vaginal, tabletas, óvulos y cremas. A continuación se mencionan algunas de las presentaciones en crema.

Tabla 2. Presentaciones de Clotrimazol crema vaginal.

Nombre comercial	Dosis	Posología
Canesten® V Crema 2%	100 mg por día	5 g durante 3 días
	300 mg por tratamiento	
Canesten® V1 Crema 10%	500 mg por tratamiento	5 g durante un día, única aplicación

4.3.4 Mecanismo de acción

(Goodman, y otros, 2011)

El Clotrimazol, actúa como agente antifúngico, inhibiendo a la enzima esteroil 14- α -desmetilasa de los hongos. De ese modo dificulta la biosíntesis de ergosterol en la membrana citoplásmica de los hongos y permite la acumulación de 14- α -metilesteroles. Estos metilesteroles alteran la disposición (empacamiento) de las cadenas acilo de fosfolípidos y con ello alteran las funciones de algunos sistemas enzimáticos de la membrana, como la ATPasa y enzimas del sistema del transporte eléctrico, también produce una mayor permeabilidad de la membrana, inhibiendo así la proliferación de los hongos (agente fungistático).

4.3.5 Farmacocinética

(Goodman, y otros, 2011)

La absorción de clotrimazol en la vagina es de 3 a 10%. Incluso tres días después de administrarlo vía vaginal persiste en concentraciones fungicidas. La pequeña cantidad que se absorbe es metabolizada en el hígado y excretada por la bilis.

4.3.6 Reacciones secundarias y adversas

(Goodman, y otros, 2011)

En promedio el 1.6% de las mujeres que lo reciben manifiestan una sensación ardorosa leve o pruriginosa en la vagina y, en infrecuentes ocasiones, dolor cólico en la mitad inferior del vientre, incremento moderado de la frecuencia urinaria y erupción cutánea. A veces, el compañero sexual puede sentir irritación leve del pene o uretra después del coito.

4.3.7 Contraindicaciones y precauciones generales

(Goodman, y otros, 2011)

Está contraindicado en caso de hipersensibilidad a los antimicóticos del grupo de los imidazoles. En caso de presentar irritación persistente en el sitio de aplicación, debe interrumpirse el tratamiento. El uso del medicamento en niñas menores de 12 años requiere vigilancia médica. Durante el embarazo puede aplicarse clotrimazol vía vaginal sin hacer uso de aplicadores. Existe alergenidad cruzada entre los antimicóticos imidazoles y triazoles debido a sus semejanzas estructurales. La administración en el primer trimestre de embarazo queda a juicio del médico.

4.4 CREMAS VAGINALES

Una crema farmacéutica de uso externo, es una emulsión semisólida que contiene más del 20% de agua y sustancias volátiles y / o menos del 50% de hidrocarburos, ceras, o polietilenglicoles. Hay dos tipos de cremas, aceite en agua con agua como la fase continua y agua en aceite, con aceite como la fase continua (Buhse, y otros, 2005).

Una de las vías de administración de las cremas farmacéuticas es la vaginal. La vagina se ha explorado como un sitio favorable para la administración local y sistémica de diversos fármacos, por ejemplo los utilizados para el tratamiento de infecciones locales (Hussain, y otros, 2005).

4.4.1 Administración vaginal

(Hussain, y otros, 2005)

Ventajas

- Prevención del efecto de primer paso, metabolismo hepático.
- Reducción de los efectos secundarios hepáticos.
- Reducción en la incidencia y gravedad de los efectos secundarios gastrointestinales.

Desventajas

- La administración por vía vaginal es menos preferida en términos de comodidad y debido a cierta sensibilidad cultural.
- Las variaciones hormonales durante los ciclos de la mujer producen diferencias en la cantidad y composición del flujo vaginal, cambios de pH y alteración del epitelio vaginal, complicándose la administración consistente, el éxito y rendimiento de la terapia.
- También la higiene personal, irritación local, la influencia de las relaciones sexuales son factores que influyen en la administración.

4.4.2 Formulación

(Garg, y otros, 2001)

Una formulación farmacéutica puede ser considerada como un sistema que comprende una o varias moléculas activas (fármaco) junto con algunos ingredientes inertes (excipientes). Los excipientes facilitan los sistemas de administración de fármacos, aumentan la estabilidad, biodisponibilidad, eficacia, seguridad y cumplimiento del paciente.

El desarrollo de una formulación vaginal ideal con las características deseadas en términos de seguridad, eficacia, cumplimiento del paciente, estética, aceptabilidad de las autoridades reguladoras y costo requiere una selección cuidadosa del ingrediente (s) activo (s) así como de los excipientes.

4.4.3 Selección de Excipientes

(Garg, y otros, 2001)

La selección del tipo y cantidad de excipiente está dictada por el objetivo del producto, estos ingredientes hacen específicas las propiedades de una formulación y por lo tanto representan un aspecto importante en el diseño de la misma y su optimización. La elección de un excipiente para un desarrollo farmacéutico en particular está gobernada por varios parámetros críticos que abarcan desde su origen hasta su estado normativo.

Estos incluyen:

- | | |
|--|--|
| -Origen, procedencia y disponibilidad | -Compatibilidad con el ingrediente activo y el material de empaque |
| -Categoría funcional | -Historial de uso humano |
| -Calidad y pureza | -Seguridad y toxicología |
| -Niveles de impurezas y el alcance de la caracterización | -Consideraciones de costo |
| -Consistencia lote a lote | -Actividad biológica, si existe |

La selección de excipientes adecuados para formulaciones vaginales es un reto para los formuladores farmacéuticos. Algunos excipientes para las formulaciones vaginales han sido investigados y patentados, pero nunca comercializados o aprobados para la aplicación humana. Se debe tener cuidado al seleccionar tales excipientes porque éstos requerirán estudios toxicológicos detallados antes de su aprobación para su inclusión en una formulación para ser comercializados.

Fase hidrofílica

(Secretaría de Salud, 2013)

Para la fabricación de cremas vaginales se utiliza agua purificada, producida a partir de agua potable tratada por intercambio iónico u otro método apropiado, que cumple con especificaciones químicas y microbiológicas farmacopeicas.

Fase lipofílica

La elección dependerá de su función en la fórmula, muchas emulsiones contienen aceites que se usan como vehículo del principio activo. También las ceras, grasas y aceites se utilizan individualmente o en combinación para controlar la consistencia de la emulsión. Uno de los aceites más utilizados para las cremas farmacéuticas de uso externo es el aceite mineral (Aulton M., 2004). También se ha utilizado como fase oleosa el aceite de cacahuete, ácido mirístico, lanolina, miristato de isopropilo (Garg, y otros, 2001).

Aceite mineral

(Rowe M., y otros, 2009)

Estructura química: Es una mezcla de hidrocarburo alifático saturado (C₁₄-C₁₈) y cíclico obtenido a partir del petróleo.

Descripción: Es un líquido viscoso oleoso, transparente, incoloro e inodoro cuando está frío y tiene un ligero olor a petróleo cuando se calienta.

Solubilidad (20°C): Soluble en acetona, benceno, cloroformo, éter y éter de petróleo. Miscible con aceites volátiles y aceites fijos con la excepción del aceite de ricino. Prácticamente insoluble en etanol (95%), glicerina y agua.

Estabilidad: Se oxida cuando se expone al calor y la luz.

Incompatibilidades: Con agentes oxidantes fuertes.

Emulsionantes

La elección del emulsionante que se va a utilizar depende de su capacidad emulsionante y toxicidad. Algunos que se han utilizado en medicamentos vaginales son: alcohol cetosteárico, alcohol cetílico, polisorbatos, ácido esteárico, lanolina, lecitina y monoestearato de glicerilo, todos estos son tensoactivos no iónicos. (Garg, y otros, 2001) (Food and Drug Administration, 2013)

Los tensoactivos no iónicos son particularmente útiles debido a su baja toxicidad y capacidad irritante. También tienen un mayor grado de compatibilidad que los tensoactivos aniónicos o catiónicos y son menos sensibles a los cambios de pH o a la adición de electrolitos (Aulton M., 2004)

Polisorbatos

(Rowe M., y otros, 2009)

Los polisorbatos son ésteres de ácidos grasos de sorbitán polioxietileno, se utilizan ampliamente como agentes emulsionantes en la preparación de emulsiones farmacéuticas de aceite en agua. Existen diferentes tipos de polisorbatos, en la siguiente tabla se muestran algunos que se han empleado en formulaciones vaginales.

Tabla 3. Polisorbatos.

Polisorbato Grado	Fórmula	HLB	Apariencia y solubilidad (25°C)
Polisorbato 20	$C_{58}H_{114}O_{26}$	16.7	Son solubles en etanol y agua e insolubles en aceite mineral, son líquidos aceitosos color amarillo.
Polisorbato 60	$C_{64}H_{126}O_{26}$	14.9	
Polisorbato 80	$C_{64}H_{124}O_{26}$	15.0	

Referencia: (Rowe M., y otros, 2009).

Estabilidad: Los polisorbatos son higroscópicos, la saponificación gradual ocurre con ácidos y bases fuertes. Los ésteres de ácido oleico son sensibles a la oxidación. En común con otros agentes tensoactivos de polioxietileno, su almacenamiento prolongado puede conducir a la formación de peróxidos.

Incompatibilidades: La actividad antimicrobiana de los parabenos se reduce en presencia de polisorbatos. No compatibles con fenoles, taninos, alquitranes y materiales similares al alquitrán.

Agente viscosante

(Aulton M., 2004) (Garg, y otros, 2001) (Food and Drug Administration, 2013)

Los agentes para incrementar la viscosidad de la formulación pueden proporcionarle las propiedades reológicas deseadas. También la viscosidad retarda el movimiento de los glóbulos de la fase dispersa manteniéndose una emulsión físicamente estable. Algunos de los utilizados para fórmulas vaginales son los polímeros de ácido acrílico y policarbófilo (más adelante se hablará a detalle de éstos), alginato de sodio, metilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa entre otros.

Disolventes/Humectantes

(Aulton M., 2004) (Food and Drug Administration, 2013)

Se usan para dispersar o disolver el principio activo o algún otro excipiente. Algunos

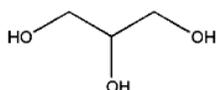
que se han utilizado en formulaciones vaginales son: glicerina, propilenglicol, sorbitol, glicol etileno.

Glicerina

(Rowe M., y otros, 2009)

Fórmula condensada: $C_3H_8O_3$

Estructura química:



Descripción: La glicerina es líquido viscoso claro, inodoro.

Solubilidad (20°C): Soluble en agua, etanol (95%), soluble en acetato de etilo 1 en 11, ligeramente soluble en acetona, prácticamente insoluble en cloroformo, benceno y aceites.

Estabilidad: Es higroscópica, la glicerina pura no es propensa a la oxidación por la atmósfera en condiciones de almacenamiento normales, pero se descompone en calentamiento en acroleína compuesto tóxico. Puede cristalizar si se almacenan a bajas temperaturas, los cristales no se funden hasta que se calienta a 20°C.

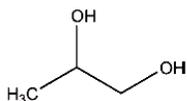
Incompatibilidades: Puede explotar si se mezcla con agentes oxidantes fuertes. Sensible a la luz, incompatible con óxido de zinc y nitrato de bismuto básico. Un contaminante de hierro en glicerina es responsable del oscurecimiento en el color de las mezclas que contienen fenoles, salicilatos y taninos. La glicerina forma un complejo de ácido bórico.

Propilenglicol

(Rowe M., y otros, 2009)

Fórmula condensada $C_3H_8O_2$:

Estructura química:



Descripción: Es un líquido claro viscoso, incoloro, prácticamente inodoro.

Solubilidad (20°C): Miscible con acetona, cloroformo, etanol (95%), glicerina y agua, soluble a 1 en 6 partes de éter, no miscible con aceite mineral ligero o aceites fijos, pero se disolverá en algunos aceites esenciales.

Estabilidad: Es higroscópico, a altas temperaturas tiende a oxidarse. Es químicamente estable cuando se mezcla con etanol (95%), glicerina o agua.

Incompatibilidades: Es incompatible con reactivos oxidantes tales como permanganato de potasio.

Conservadores antimicrobianos

(Aulton M., 2004) (Food and Drug Administration, 2013)

La contaminación de las cremas por microorganismos puede afectar negativamente las propiedades fisicoquímicas del producto provocando producción de gas, cambios en su color y olor, hidrólisis de grasas y aceites, cambios de pH y separación de la emulsión. Por tanto, es necesario incluir un agente antimicrobiano para prevenir el crecimiento de cualquier microorganismo que pudiera contaminar al producto. No hay una forma teórica de elegir el sistema conservador adecuado, las características deseables de un conservador idóneo para usar en una crema son:

- Un amplio espectro.
- Una actividad bactericida mejor que bacteriostática.
- Ausencia de actividad tóxica, irritante o sensibilizante.
- Hidrosolubilidad alta. Como el crecimiento de los microorganismos se produce en la fase acuosa, es importante que el conservador tenga un coeficiente de partición aceite/agua bajo.

- Compatibilidad con los demás componentes.
- Estabilidad y eficacia en un intervalo amplio de pH y temperatura.

Es necesario estudiar la eficacia de un nuevo conservador en el producto terminado y el envase, utilizando los métodos de provocación adecuados. Hay que tener en cuenta que ningún conservador muestra por sí solo todas las propiedades deseables, en muchos casos se requiere usar combinaciones.

Algunos de los conservadores utilizados en formulaciones vaginales son: ácido sórbico, metilparabeno, propilparabeno, ácido benzoico, alcohol bencílico.

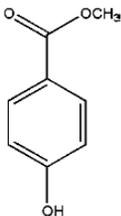
Parabenos

(Rowe M., y otros, 2009)

Metilparabeno

Fórmula condensada: $C_8H_8O_3$

Estructura química:



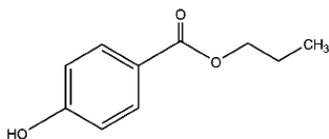
Descripción: Son cristales incoloros o polvo blanco cristalino inodoro.

Solubilidad (25°C): Soluble en etanol 1 en 2, propilenglicol 1 en 5, éter 1 en 10, glicerina 1 en 60, soluble en agua 1 en 400, 1 en 50 a 50°C, 1 en 30 a 80°C. Prácticamente insoluble en aceite mineral.

Propilparabeno

Fórmula condensada: $C_{10}H_{12}O_3$

Estructura química:



Descripción: Polvo blanco, cristalino, inodoro.

Solubilidad: (20°C): Soluble en acetona, en etanol (95%) 1 en 1, soluble en éter, en propilenglicol 1 en 3.9, en glicerina 1 en 250, en agua 1 en 2500, 1 en 225 a 80°C en aceite mineral 1 en 3330.

Los parabenos tienen actividad antimicrobiana de pH 4 a 8. Son más activos contra levaduras y mohos que contra las bacterias y más activos contra bacterias gram-positivas que contra bacterias gram-negativas.

La actividad antimicrobiana de los parabenos en una formulación puede ser mejorada mediante su combinación, por ejemplo utilizando propilparabeno (0.02% w/v) con metilparabeno (0.18% w/v) se produce un efecto sinérgico. La actividad también se mejora por la adición de otros excipientes, tales como propilenglicol (2-5%).

Incompatibilidades: La actividad antimicrobiana de los parabenos es reducida considerablemente en presencia de agentes tensoactivos no iónicos, tales como polisorbato 80. Sin embargo, se sabe que el propilenglicol (10%) potencia la actividad antimicrobiana de los parabenos en presencia de tensoactivos no iónicos y evita la interacción. Presentan incompatibilidades con bentonita, trisilicato de magnesio, talco, goma de tragacanto, alginato de sodio, aceites esenciales, sorbitol, atropina y hierro. También reacciona con diversos azúcares y alcoholes de azúcares relacionados. También se ha informado la absorción de metilparabeno y propilparabeno por plástico; la cantidad absorbida depende del tipo de plástico y el vehículo. Se ha afirmado que el polietileno de baja y alta densidad no absorbe el metilparabeno. El metilparabeno se hidroliza con bases débiles y ácidos fuertes. El

silicato de aluminio y magnesio, trisilicato de magnesio, óxido de hierro amarillo, azul ultramarino absorben propilparabeno, reduciendo de este modo la eficacia de conservación.

Antioxidantes

Muchos de los aceites y grasas usados en la formulación de cremas son de origen animal o vegetal y pueden ser susceptibles a la oxidación por el oxígeno atmosférico o por acción de los microorganismos (Aulton M., 2004).

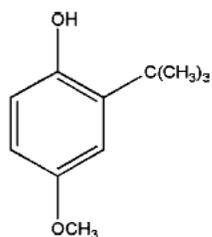
La eficiencia de un antioxidante en un producto dependerá de muchos factores, incluida su compatibilidad con otros componentes, su coeficiente de partición aceite en agua, su grado de solubilidad dentro de las micelas del emulsionante y su adsorción sobre el envase y cierre. Por tanto, se debe tener en cuenta que la elección del antioxidante y la concentración a la que se va a utilizar sólo puede determinarse estudiando su eficacia en el producto y envase definitivo. Algunos de los antioxidantes usados en formulaciones vaginales son: butilhidroxianisol (BHA), butilhidroxitolueno, (BHT), metabisulfito de sodio, terbutilhidroquinona (Aulton M., 2004) (Food and Drug Administration, 2013).

Butilhidroxianisol

(Rowe M., y otros, 2009)

Fórmula condensada: $C_{11}H_{16}O_2$

Estructura química:



Descripción: Es un polvo blanco o casi blanco cristalino o sólido ceroso de color blanco amarillento con un débil olor aromático característico.

Solubilidad (20°C): Soluble en metanol, libremente soluble en etanol acuoso al 55%, propilenglicol, cloroformo, éter, hexano, aceite de semilla de algodón, aceite de cacahuete y en soluciones alcalinas, prácticamente insoluble en agua.

Estabilidad: Sensible a la luz.

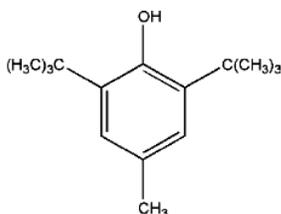
Incompatibilidades: Es incompatible con agentes oxidantes, sales férricas y trazas de metales.

Butilhidroxitolueno

(Rowe M., y otros, 2009)

Fórmula condensada: C₁₅H₂₄O

Estructura química:



Descripción: Sólido cristalino o polvo, blanco o amarillo pálido con un característico olor fenólico débil.

Solubilidad (20°C): Soluble en acetona, benceno, etanol (95%), éter, metanol, tolueno, aceites fijos y aceite mineral. Prácticamente insoluble en agua, glicerina, y propilenglicol.

Estabilidad: La exposición a la luz, la humedad y el calor causa la decoloración y la pérdida de actividad.

Incompatibilidades: Es incompatible con oxidantes fuertes agentes tales como peróxidos y permanganatos. En contacto con agentes oxidantes puede causar una combustión espontánea. Las sales de hierro causan decoloración con pérdida de actividad. El calentamiento con ácidos provoca una descomposición rápida con producción de la isobuteno gas inflamable.

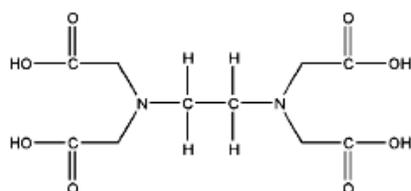
Quelantes

(Rowe M., y otros, 2009)

Etilendiamino tetraacetato disódico (EDTA)

Fórmula condensada: $C_{10}H_{16}N_2O_8$

Estructura química:



Descripción: Polvo cristalino blanco.

Solubilidad (20°C): Soluble en soluciones de hidróxidos alcalinos, soluble 1 en 500 de agua.

Además de su actividad quelante, tiene cierta actividad antimicrobiana contra los microorganismos gram-negativos, *pseudomonas aeruginosa* y algunas levaduras y hongos, aunque esta actividad es insuficiente para ser utilizado eficazmente como único antimicrobiano conservante en formulaciones. Sin embargo, cuando se utiliza con otro conservante antimicrobiano, demuestra un marcado efecto sinérgico en su actividad antimicrobiana. Se utilizan con frecuencia en combinación con parabenos. Sin embargo, en la presencia de algunos iones metálicos divalentes, tales como

Ca^{2+} o Mg^{2+} , el efecto sinérgico puede ser reducido o perdido por completo. El nitrato fenilmercúrico reduce la eficacia antimicrobiana del conservante.

Estabilidad: Aunque el EDTA sólido es bastante estable, las sales de EDTA son más estables que el ácido libre, que se descarboxila si se calienta por encima de 150°C . El EDTA disódico dihidrato pierde el agua de cristalización cuando se calienta a 120°C .

Incompatibilidades: Con agentes oxidantes fuertes, bases fuertes y iones metálicos polivalentes tales como el cobre, níquel y aleación de cobre. Se comporta como ácido débil, desplazando el dióxido de carbono a partir de carbonatos y reacciona con metales para formar hidrógeno.

Ácidos y Bases

(Rowe M., y otros, 2009) (Food and Drug Administration, 2013)

Algunos de los ácidos y bases utilizados en las formulaciones vaginales para ajustar su pH son: hidróxido de sodio, hidróxido de potasio, ácido tartárico.

Hidróxido de sodio

Fórmula Química: NaOH

Descripción: Disponible en diferentes figuras o formas de color blanco o casi blanco.

Solubilidad (20°C): Soluble en glicerina, en agua 1 en 0.9 y 1 en 0.3 a 100°C , soluble en metanol 1 en 4.2, soluble en etanol 1 en 7.2, prácticamente insoluble en éter.

Estabilidad: Cuando se expone al aire, absorbe rápidamente la humedad y se licua, pero posteriormente se convierte en sólido de nuevo debido a la absorción de dióxido de carbono y formación de carbonato de sodio.

Incompatibilidades: Es una base fuerte incompatible con cualquier compuesto que experimente fácilmente hidrólisis u oxidación. Reacciona con ésteres ácidos y éteres, especialmente en solución acuosa.

4.4.4 Estabilidad física

Una emulsión en la cual las gotas dispersadas mantienen sus características iniciales y además permanecen uniformemente distribuidas dentro de la fase continua por un tiempo previamente determinado se considera estable (Aulton M., 2004).

Existen tres fenómenos relacionados con la inestabilidad física de las emulsiones, mostrados en la Fig. 3.

- a) Emulsión inicial: emulsión estable con gotas uniformemente distribuidas.

- b) Floculación: agregación de las gotas dispersas de diferentes tamaños.

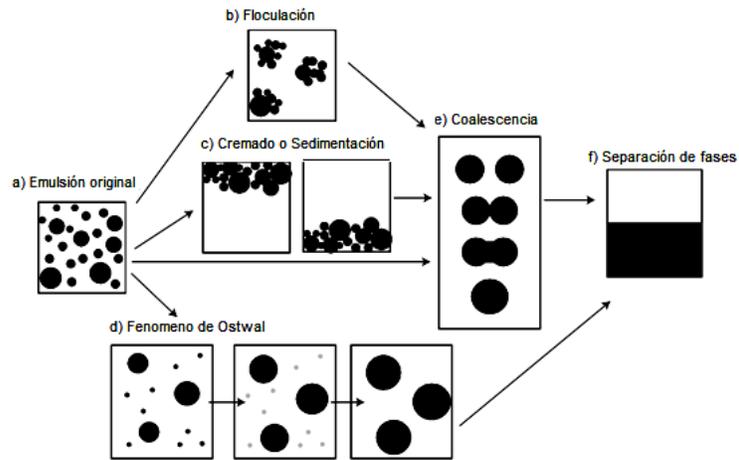
- c) Cremado o Sedimentación: movimientos ascendentes o descendentes de los glóbulos dispersos en la fase continua, denominados formación de crema o sedimentación respectivamente, debido a la diferencia de densidades de las fases.

- d) Fenómeno de Ostwal: unión espontánea de gotas, proceso favorecido porque las gotas más grandes son energéticamente más estables que las pequeñas.

- e) Coalescencia: agregación de gotas que se origina como consecuencia de la tensión interfacial.

- f) Separación de fases: agregación y posible coalescencia de los glóbulos dispersos para formar nuevamente dos fases separadas (Nielloud, y otros, 2000).

Fig.3 Estabilidad física de las cremas



Referencia:(Ibrahim, 2011)

4.4.4 Estudios de estabilidad física, condiciones extremas

(Lubrizol, 2013)

Con frecuencia, para comparar las estabildades relativas de varios productos o formulaciones similares es necesario acelerar los fenómenos de inestabilidad física de las emulsiones, lo que puede conseguirse con los métodos mostrados a continuación. Cabe aclarar que estos procesos pueden destruir una emulsión que se mantendría estable en condiciones de almacenamiento normales. Sin embargo, estos métodos dan una indicación útil de las estabildades relativas de una serie de productos de prueba.

Ciclo de congelamiento

Consiste en el congelamiento de la formulación seguido por la descongelación a temperatura ambiente durante varios ciclos. La formación continua y fusión de pequeños cristales de hielo interrumpirá la capa adsorbida del emulgente de la superficie de contacto aceite/agua y cualquier debilidad de la estructura de la película será rápidamente evidente.

Temperatura

Después de un almacenamiento de las muestras a 50°C o 60°C, durante una semana un aumento en la viscosidad de menos de 20% sobre los valores originales indica la estabilidad a temperatura ambiente durante un año. Un aumento de la viscosidad es el precursor de que se presentará cremado visible.

Centrifugación

La centrífuga puede aumentar a muchos miles de veces la gravedad, si se supone que el efecto es directamente proporcional a la fuerza gravitacional se puede predecir el comportamiento. Por ejemplo, la centrifugación a 3750 rpm en una centrífuga de radio de 10 cm en un periodo de cinco horas sería equivalente al efecto de la gravedad de aproximadamente un año.

Someter a la emulsión a unos 5-10 g de fuerza durante varios minutos, pondrá a prueba la resistencia al cremado. Aunque esta prueba ejerce una fuerza gravitacional artificialmente elevada en las emulsiones, puede determinar el límite elástico de la emulsión que ayuda al mantenimiento de la estabilidad.

4.4.5 Fabricación

(Remington, 2013)

Es importante garantizar que los métodos de fabricación desarrollados en una escala de laboratorio pueden ampliarse fácilmente a una producción a gran escala y sin ningún cambio en la calidad del producto.

De acuerdo con Remington (2013). Las emulsiones suelen prepararse por tres principales métodos. Adición de la fase externa a la fase interna, mezclando ambas fases después de calentar y alternando la adición de las dos fases con el agente emulsionante.

El método de adición de la fase interna a la fase externa es el método más satisfactorio para preparar emulsiones, porque siempre existe un exceso de la fase

externa promoviendo el tipo de emulsión deseada. Se añade la fase discontinua a la fase continua durante el mezclado inicial. Los demás componentes se disuelven antes de la mezcla en la fase en la que son solubles.

4.5 POLÍMEROS DE ACIDO ACRÍLICO

(Lubrizol, 2013)

Noveon®, Carbopol® y Pemulen™, son polímeros de ácido acrílico (véase Fig. 4) de alto peso molecular, entrecruzados. Las principales diferencias entre estos polímeros están relacionadas con el tipo y densidad de entrecruzamiento así como con la presencia de co-monomeros hidrófobos, a continuación se muestran algunos ejemplos:

-Carbopol® homopolímeros: son polímeros de ácido acrílico entrecruzados con alil sacarosa o alilpentaeritritol. Ejemplo polímero Carbopol® 974P NF, (alta densidad de entrecruzamiento), polímero Carbopol® 971P NF (baja densidad de entrecruzamiento).

-Polímeros Pemulen™ son polímeros de ácido acrílico, modificados por una cadena larga (C10-C30) de acrilatos de alquilo, y entrecruzados con alil pentaeritritol.

-Policarbófilo Noveon® es un polímero de ácido acrílico entrecruzado con divinil glicol.

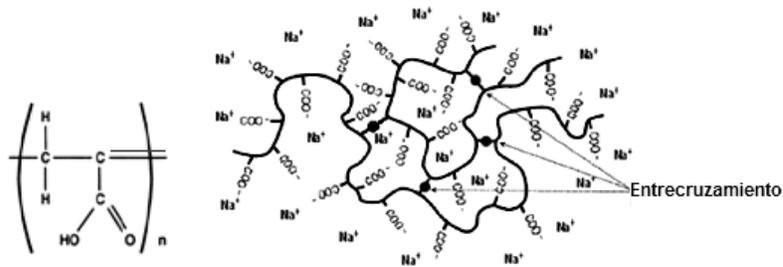


Fig. 4 Estructura general de los polímeros de ácido acrílico (Lubrizol, 2013).

Carbopol®, Pemulen™ y Noveon® se han usado ampliamente en formulaciones farmacéuticas semisólidas para modificar la reología de los sistemas a base de agua, estabilizar emulsiones y suspensiones y en sistemas bioadhesivos.

Las dispersiones de los polímeros de ácido acrílico en sistemas líquidos se gelifican cuando se exponen a un pH por encima de 4. Arriba de su pKa de 6 ± 0.5 los grupos carboxílicos del polímero se ionizan por completo, dando como resultado la repulsión

entre los aniones, aumentando aún más el hinchamiento del polímero, la viscosidad aumenta a medida que los polímeros son neutralizados. Una meseta se alcanza de pH 5 a 10 y una pérdida en la eficiencia se produce a un pH más alto. Hidróxido de sodio, hidróxido de potasio, hidróxido de amonio y algunas aminas orgánicas solubles en agua son excelentes agentes neutralizantes de las dispersiones de estos polímeros en sistemas acuosos.

Incompatibilidades de los polímeros de ácido acrílico:

- Las sales disminuyen su eficiencia.
- Debido a que son polímeros aniónicos, son incompatibles con la mayoría de los ingredientes catiónicos.
- Las dispersiones muestran sensibilidad a la mezcla prolongada y/o de alto corte.

4.5.1 Propiedades Mucoadhesivas

Los polímeros Noveon®, Carbopol® y Pemulen™, son excelentes bioadhesivos por diversas razones:

- Se hinchan fácilmente en agua, proporcionando una gran superficie adhesiva que permite un máximo contacto con la mucina. Un polímero ligeramente entrecruzado, consigue una mayor hinchazón y en un ritmo más rápido, que uno altamente entrecruzado.
- Presenta gran número de grupos carboxílicos, que proporcionan la capacidad de formar enlaces de hidrógeno con las proteínas y polisacáridos de las mucosas. Sin embargo, los efectos de pH son muy importantes, ya que el polímero se adhiere mejor a valores de pH ácido en el que se encuentra altamente protonado. A un pH $\leq 5,0$ menos del 10% de los grupos de ácido carboxílico están ionizados.

-En condiciones alcalinas, la adhesión específica todavía es posible, debido a que los iones carboxilato interactúan con cationes. El calcio, magnesio y otros iones polivalentes de las proteínas y polisacáridos ofrecen este tipo de sitios de unión para los polímeros.

-También se ha demostrado que son cadenas flexibles, propiedad crítica para que se lleve a cabo la interpenetración de la cadena, difusión y enredo con la mucina.

Estos polímeros se han usado en diversas aplicaciones bioadhesivas. Siendo una de estas la administración vaginal su uso en cremas hidratantes, espermicidas y reemplazos hormonales.

Las propiedades bioadhesivas de los diferentes grados de polímeros de ácido acrílico han sido estudiadas por Tamburic y Craig (1995) y Chopra (2007) coinciden en que el Noveon® AA-1 USP es menos mucoadhesivo que el Carbopol® 974P NF, sin embargo, los estudios resultan difíciles de comparar, ya que utilizan diferentes métodos para medir mucoadhesión.

En algunos ensayos realizados por Lubrizol, el Carbopol® 974P NF proporciona un mayor nivel de adherencia que el policarbófilo Noveon® AA-1 USP sin embargo, estas pruebas pueden simplemente mostrar la adhesión del polímero, en lugar de bioadhesión y no siempre se correlacionan bien con las pruebas *in vivo*. Por ello, Lubrizol recomienda evaluar diferentes grados de polímeros para determinar cual funciona mejor en su aplicación.

4.5.2 Polímero emulsionante Pemulen™

El Pemulen™ se compone de una porción hidrófila y otra hidrófoba. El metacrilato de cadena larga, es la región hidrófoba y el ácido acrílico la región hidrófila. Esta estructura química permite que el Pemulen™ funcione como emulsionante primario en emulsiones aceite en agua. Este polímero forma una capa de gel alrededor de

cada gota de aceite, las porciones hidrófobas del polímero se anclan a la fase de aceite. Este mecanismo se representa en la Fig. 5

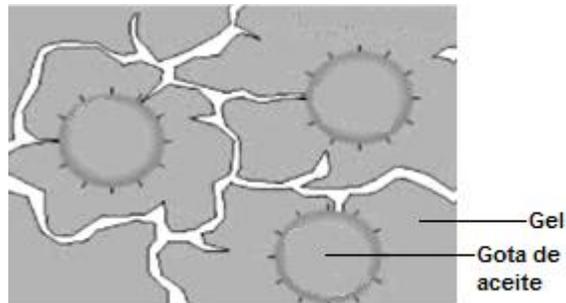


Fig. 5. Mecanismo emulsionante de Pemulen™ (Lubrizol, 2013)

Algunos de los beneficios de Pemulen™ son: es un emulsionante de cualquier aceite en una emulsión aceite en agua, presenta un alto rendimiento y se requiere de concentraciones entre 0.1-0.3%.

Los polímeros emulsionantes Pemulen™ son capaces de producir macro emulsiones extremadamente estables. Sin embargo, niveles bajos (0.1 hasta 0.4%) de tensoactivos no iónicos con un HLB entre 8 a 12 son aditivos eficaces para disminuir el tamaño de las gotas de aceite.

Los polímeros emulsionantes Pemulen™ son adaptables a una variedad de métodos de preparación de la emulsión. Pemulen™ se dispersa más fácilmente en aceite a temperatura ambiente que en agua. La fase de aceite se combina con la fase acuosa que contiene el neutralizante mezclando.

Existen dos grados farmacéuticos de polímeros Pemulen™, en general la selección se basa en el nivel de aceite a emulsionar:

-Pemulen™ TR-1 NF puede emulsionar hasta el 30% w/w de aceite, dentro de un intervalo de pH de 4.0 a 5.5 y hasta el 20% w/w de aceite en un pH de 3–11.

-Pemulen™ TR-2 NF puede emulsionar hasta un 60-80% w/w de aceite dentro de un intervalo de pH de 4-8.

Los polímeros de Carbopol® pueden utilizarse con Pemulen™ para proporcionar mayor viscosidad a la emulsión.

4.6 MUCOADHESIÓN

4.6.1 Definición e importancia

(Ivarsson, y otros, 2012) (Shaikh, y otros, 2011) (Carvalho F., y otros, 2010) (Junginger H., y otros, 2007)

Considerando que la mayoría de las vías anatómicas de acceso para los fármacos están revestidas de una capa de moco, surgió la idea de adaptar el fenómeno de *adhesión* (unión durante un tiempo suficientemente prolongado de dos superficies por fuerzas interfaciales de tipo físico y/o químico) a la fijación de la forma farmacéutica a una zona concreta del cuerpo, desde donde se liberará el fármaco. Esto corresponde a un fenómeno de *bioadhesión* y más específicamente de *mucoadhesión*, dado que una de las superficies es una membrana mucosa.

A las formas de administración que se fijan a las mucosas se les denominan *mucoadhesivas*, siendo su objetivo mantenerse fijas en el lugar donde se realiza la liberación y/o absorción del fármaco.

La investigación y el desarrollo de las formas mucoadhesivas tienen un particular atractivo debido a que con ellas se intenta lograr, entre otros, los siguientes objetivos:

- Localización del sistema medicamentoso en una región determinada del organismo, superando hasta cierto punto, los procesos naturales de eliminación local y/o evacuación de las cavidades corporales.
- Incremento del tiempo de permanencia del medicamento en dicha región por disminución de la velocidad de tránsito, consiguiendo un aumento neto del tiempo de efectividad del medicamento.
- Mejora sustancial en el contacto del fármaco disuelto con la mucosa a través de la cual se realiza el fenómeno de absorción.

-Pueden formularse como sistemas de liberación prolongada o controlada de la sustancia activa.

4.6.2 Mecanismos

(Rodríguez, y otros, 2000)

La dilucidación de los mecanismos de interacción entre la mucosa y los polímeros mucoadhesivos son fundamentales para el desarrollo de estos sistemas farmacéuticos. La mayor parte de los autores destacan dos tipos de interacciones: físicas o mecánicas y enlaces químicos.

Interacciones físicas o mecánicas

Se producen a través del contacto íntimo entre el polímero mucoadhesivo y la mucosa. En la interfase de contacto se origina una interpenetración de las moléculas del polímero en el gel del moco y al contrario, dando lugar a uniones semipermanentes no específicas que suponen una primera fase que promueve la posterior interacción química propiamente mucoadhesiva (véase Fig. 5).

Enlaces químicos

La interacción entre las dos entidades que reaccionan es el resultado de fuerzas de atracción y repulsión. La suma de estos dos fenómenos determina si interaccionan o no. Para que pueda ocurrir mucoadhesión, la interacción atractiva debe ser mayor que la repulsión.

4.6.3 Interacciones atractivas

(Rodríguez, y otros, 2000)

Fuerzas de Vander Walls

Son de dos clases: *fuerzas dipolo-dipolo* en donde las moléculas polares neutras se atraen cuando el extremo positivo de una de ellas está cerca del extremo negativo de otra; *fuerzas de dispersión* cuando el dipolo temporal de un átomo puede inducir

un dipolo similar en un átomo adyacente y hacer que los átomos se atraigan; ambas fuerzas son significativas cuando las moléculas están muy cercanas unas a otras.

Enlaces de hidrógeno

La atracción existe entre el átomo de hidrógeno de un enlace polar y un par de electrones no compartido en un ion o átomo electronegativo cercano.

Atracciones electrostáticas

Son interacciones entre polielectrolitos de cargas contrarias. La interacción de las moléculas de mucina con los iones depende del pH del medio.

4.6.4 Interacciones repulsivas

(Rodríguez, y otros, 2000)

Repulsión electrostática

Dos polielectrolitos de igual carga se repelen. Las moléculas de mucina se cargan negativamente a pH 7 debido al ácido siálico y a los grupos sulfato que llevan algunos azúcares. Así que, los polímeros aniónicos a este pH se repelen con la mucina.

Repulsión estérica

En ausencia de interacciones atractivas fuertes las moléculas de polímero tienden a repelerse por interacciones estéricas.

4.6.5 Teorías sobre mucoadhesión

(Shaikh, y otros, 2011) (Carvalho F., y otros, 2010) (Junginger H., y otros, 2007)

Existen varias teorías para explicar algunas de las observaciones experimentales realizadas durante el proceso de mucoadhesión, las teorías principales son:

Teoría de la humectación

Aplica a los sistemas líquidos, establece que el movimiento del mucoadhesivo sobre la mucosa debe superar los efectos de tensión superficial presentes en la interface, para que se lleve a cabo la interacción.

Teoría de la Difusión

Describe que la interpenetración polímero-mucina a una profundidad aproximadamente equivalente al tamaño de la cadena de polímero crea una unión adhesiva semipermanente. (véase Fig. 6). La tasa de penetración depende del coeficiente de difusión, flexibilidad y naturaleza de las cadenas del mucoadhesivo, la existencia de gradientes de concentración y el tiempo de contacto. Cuanto mayor sea la similitud estructural, entre el mucoadhesivo y el moco mejor será la unión.

Teoría de la Adsorción

Establece, que después de un primer contacto el mucoadhesivo se adhiere a la mucosa por las interacciones químicas descritas anteriormente.

Teoría Electroestática

Se basa en la premisa de que el material mucoadhesivo y la mucosa poseen cargas eléctricas opuestas. Por lo tanto, cuando se ponen en contacto, la transferencia de electrones conduce a la construcción de una capa electrónica doble en la interface, donde las fuerzas de atracción dentro de esta capa determina la fuerza mucoadhesiva.

Teoría Mecánica

Considera que la mucoadhesión se debe al llenado de las irregularidades de la mucosa rugosa por un líquido mucoadhesivo. Por otra parte establece que la rugosidad aumenta el área interfacial disponible para las interacciones.

Teoría de la Fractura

Esta es quizás la teoría más utilizada en los estudios de mucoadhesión. Analiza la fuerza requerida para separar dos superficies después de que se estableció la adhesión.

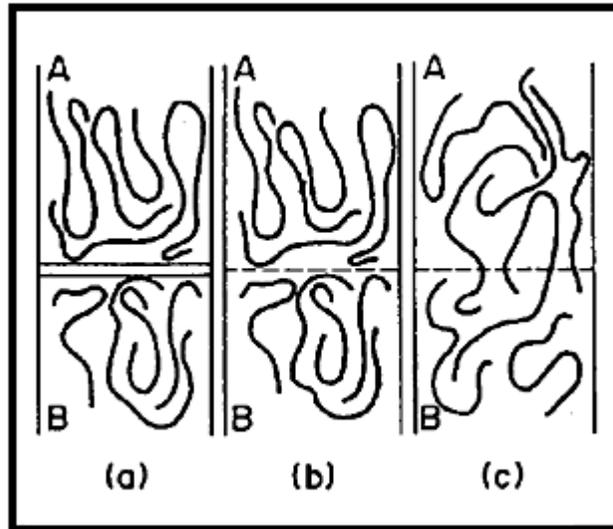


Fig. 6. Modelo representativo de la interpenetración molecular del polímero bioadhesivo A, con las glicoproteínas del mucus B. (a) (b) y (c) representan sucesivos estadios de acercamiento, contacto superficial e interpenetración polímero

Mucoadhesivo/glicoproteínas del mucus (Lubrizol, 2013).

Ninguno de estos mecanismos o teorías solos puede explicar la mucoadhesión que se produce en una variedad de situaciones diferentes. Sin embargo, la comprensión de estos mecanismos en cada caso puede ayudar el desarrollo de nuevos productos mucoadhesivos.

4.6.6 Factores que afectan la mucoadhesión

Los mecanismos que regulan la mucoadhesión están determinados por las propiedades intrínsecas de la formulación, del polímero mucoadhesivo y por el entorno en el que se aplica. A continuación se muestran algunos factores que afectan la mucoadhesión (Shaikh, y otros, 2011).

Tabla 4. Factores involucrados en la mucoadhesión.

Factores que afectan	Factores que favorecen
<p>-Un exceso de hinchamiento del polímero produce un mucílago resbaladizo que se desprende fácilmente del sustrato.</p> <p>-Los sistemas semisólidos altamente concentrados más allá de la concentración óptima, la fuerza bioadhesiva se reduce significativamente.</p> <p>-El pH puede influir en la bioadhesión de materiales que poseen grupos ionizables. Si el pH local está por encima del pKa del polímero, será ionizado en gran medida. Polímeros aniónicos se repelen con la mucosa que es aniónica a pH 7.</p>	<p>-Polímeros de bajo peso molecular, tienen mejor interpenetración en la mucosa, sin embargo, pesos moleculares altos favorecen la interacción mecánica.</p> <p>-Polímeros con baja densidad de entrecruzamiento, tienen mayor flexibilidad e hidratación y exponen un número máximo de sitios bioadhesivos.</p> <p>-A mayor tiempo de contacto inicial mucoadhesivo-sustrato, mayor es el hinchamiento y la interpenetración de las cadenas del polímero.</p>

Referencia: (Junginger H., y otros, 2007) (Carvalho F., y otros, 2010) (Shaikh, y otros, 2011).

4.6.7 Técnicas para la determinación de la mucoadhesión

Se han desarrollado diversos métodos para la evaluación *in vitro* del potencial mucoadhesivo de semisólidos vaginales (Ivarsson, y otros, 2012) (Walewijka, y otros, 2008) (Han I., y otros, 2006) (Chang J., y otros, 2002). Sin embargo, el más utilizado se basa en la medición de la fuerza de tracción o trabajo necesario para separar una formulación mucoadhesiva de un modelo de membrana, (Pliszczaka, y otros, 2012). No obstante todos estos estudios de fuerza de tracción usan diferentes condiciones de prueba y parámetros instrumentales lo que influencia los datos producidos, por lo que los resultados obtenidos por diferentes grupos de investigación son difíciles de interpretar o comparar (Neves J., y otros, 2008).

No existe un método universal para evaluar el potencial mucoadhesivo *in vitro* de formulaciones semisólidas vaginales sin embargo, en el estudio de Neves y sus colaboradores (Neves J., y otros, 2008) se analiza la influencia de diferentes condiciones experimentales (modelo de mucosa, temperatura de la muestra, velocidad de sonda, fuerza aplicada, tiempo de contacto mucosa/muestra) sobre el desempeño del método de resistencia a la tracción, utilizando un equipo analizador de textura (en métodos se describe a detalle en qué consiste este estudio).

Existe un número limitado de estudios *in vivo* Gammagrafía (Brown, y otros, 1997), Resonancia magnética (Mertha, y otros, 2012) y Colposcopia (Poelvoorde, y otros, 2009).

4.7 DISEÑO DE EXPERIMENTOS

(Gutiérrez Pulido, y otros, 2008) (Lewis G., y otros, 1999)

El diseño de experimentos consiste en determinar cuáles pruebas experimentales se deben realizar y de qué manera, para obtener datos que, al ser analizados estadísticamente, proporcionen evidencias objetivas que permitan responder las interrogantes planteadas, y de esta manera clarificar los aspectos inciertos de un proceso, resolver un problema o lograr mejoras.

A continuación se muestra la clasificación general de los diseños experimentales de acuerdo con su objetivo. Dentro de cada rama se pueden clasificar de acuerdo al número de factores, al tipo de efectos que se pretende estudiar y según las restricciones existentes. En la misma tabla se listan los diseños particulares más representativos de cada rama.

Tabla 5. Clasificación de los diseños experimentales.

Objetivo	Tipos de Diseños
Comparar dos o más tratamientos	-Completamente al azar -Bloques completos al azar -Cuadros latino y grecolatino
Estudiar el efecto de varios factores sobre una o más variables de respuesta	-Factoriales 2^k -Factoriales 3^k -Factoriales fraccionados 2^{k-p}
Optimización de procesos	Primer Orden -Factoriales 2^k y 2^{k-p} -Plakett Burman -Simplex Segundo orden -Composición central -Box-Behenken -Factoriales 3^k y 3^{k-p}
Diseños robustos	-Arreglos ortogonales (diseños factoriales) -Diseño con arreglo interno y externo
Diseños de mezclas	-Simplex Reticular -Simplex con centroide -Con restricciones -Axial

Referencia:(Gutiérrez Pulido, y otros, 2008)

4.7.1 Diseños Factoriales

El objetivo de un diseño factorial es estudiar el efecto de varios factores sobre una o varias respuestas, cuando se tiene el mismo interés sobre todos los factores. Y uno de los objetivos particulares más importantes de este diseño es determinar una combinación de niveles de los factores en la que el desempeño del proceso sea mejor.

Así la matriz del diseño es el conjunto de puntos experimentales o tratamientos que pueden formarse considerando todas las posibles combinaciones de los niveles (mínimo dos) de los factores. A continuación se muestran las ventajas de los diseños factoriales:

- Permiten estudiar el efecto individual y de interacción de los distintos factores.

- Son diseños que se pueden aumentar para formar diseños compuestos en caso de que se requiera una exploración más completa.

- Se pueden correr fracciones de diseños factoriales.

4.7.2 Diseños de superficie de Respuesta

La metodología de superficie de respuesta (MSR) es la estrategia experimental y de análisis que permite resolver el problema de encontrar las condiciones de operación óptimas de un proceso, es decir, aquellas que dan por resultado valores óptimos de una o varias características de calidad del producto.

La región experimental es el espacio delimitado por los rangos de experimentación utilizados con cada factor. La región de operatividad considera todas las combinaciones posibles de los niveles de los factores donde el proceso puede operarse y ésta siempre es igual o más grande que la región experimental.

En MRS es importante tener presente la visión de las regiones de operatividad y experimental, ya que en principio, el punto óptimo que interesa encontrar pudiera localizarse en cualquier lugar de la región de operatividad, dentro o fuera de la región experimental inicial.

La MRS implica tres aspectos: diseño, modelo y técnica de optimización. El diseño y el modelo se piensan al mismo tiempo, y depende del tipo de comportamiento que se espera en la respuesta. De manera específica, el modelo puede ser de primer o segundo orden por ello, el tipo de diseño utilizado y el método de optimización se clasifican, según sea el caso, como de primer o segundo orden.

Con los diseños de segundo orden se estudia además de los efectos lineales y de interacción, los efectos cuadráticos o de curvatura pura. Por consiguiente estos diseños se emplean cuando se quiere explorar una región que se espera sea más compleja o cuando se cree que el punto óptimo se encuentra dentro de la región experimental.

El diseño de segundo orden de composición central es el más utilizado. Este diseño se compone de tres tipos de puntos: 1. Una réplica de un diseño factorial en dos niveles, completo o fraccionado; 2. puntos o repeticiones al centro del diseño; 3. dos puntos sobre cada eje a una distancia α del origen. Estos puntos se llaman porción axial.

4.7.3 Optimización simultánea

Es típico considerar diversas características (variables) para lograr productos con mejor calidad y propiedades. Si la optimización sólo se hace para una característica del producto podrían resultar condiciones inadecuadas para las otras. Por ello es imprescindible contar con técnicas que sirvan para que, en la medida de lo posible, se optimicen simultáneamente todas las respuestas de interés. El problema de la optimización simultánea radica en que, por lo general, los óptimos individuales no son las mismas combinaciones de los factores de control. Esto hace necesario buscar una solución compromiso, donde todas las variables tengan un nivel

satisfactorio. Hay dos métodos de optimización simultánea, uno gráfico y otro analítico, basado en una función de deseabilidad.

5 MATERIALES

Polímero Pemulen™ TR-1 NF, Policarbófilo Noveon® y Carbopol® 974P NF se proporcionaron por la compañía Lubrizol de México Comercial, S. de R.L. de C.V. Mucina gástrica porcina (tipo II) se adquirió de Sigma - Aldrich Química, S.A. de C.V. clotrimazol, aceite mineral, propilenglicol, glicerina, metilparabeno, propilparabeno, tween 60, EDTA, butilhidroxianisol (BHA), butilhidroxitolueno (BHT), hidróxido de sodio, cloruro de sodio, fueron grado farmacéutico. Se empleó agua destilada en todas las pruebas.

Formulación

Ingrediente	% w/w	Función
Clotrimazol	2.00	Principio activo
Polímero Pemulen™ TR - 1 NF	*	Emulsionante
Policarbófilo Noveon®	*	Polímero mucoadhesivo
Carbopol® 974P NF	*	Viscosante
Aceite mineral	12.50	Vehículo
Propilenglicol	10.00	Humectante
Glicerina	10.00	Humectante
Metilparabeno	0.20	Conservador anti-microbiano
Propilparabeno	0.02	Conservador anti-microbiano
Tween 60	*	Emulsificante
EDTA	0.05	Quelante
BHA	0.005	Antioxidante
BHT	0.01	Antioxidante
NaOH 18%	cs.	Base para ajustar pH
Agua destilada	cs.	Vehículo

* Se evaluaron diferentes concentraciones de estos ingredientes

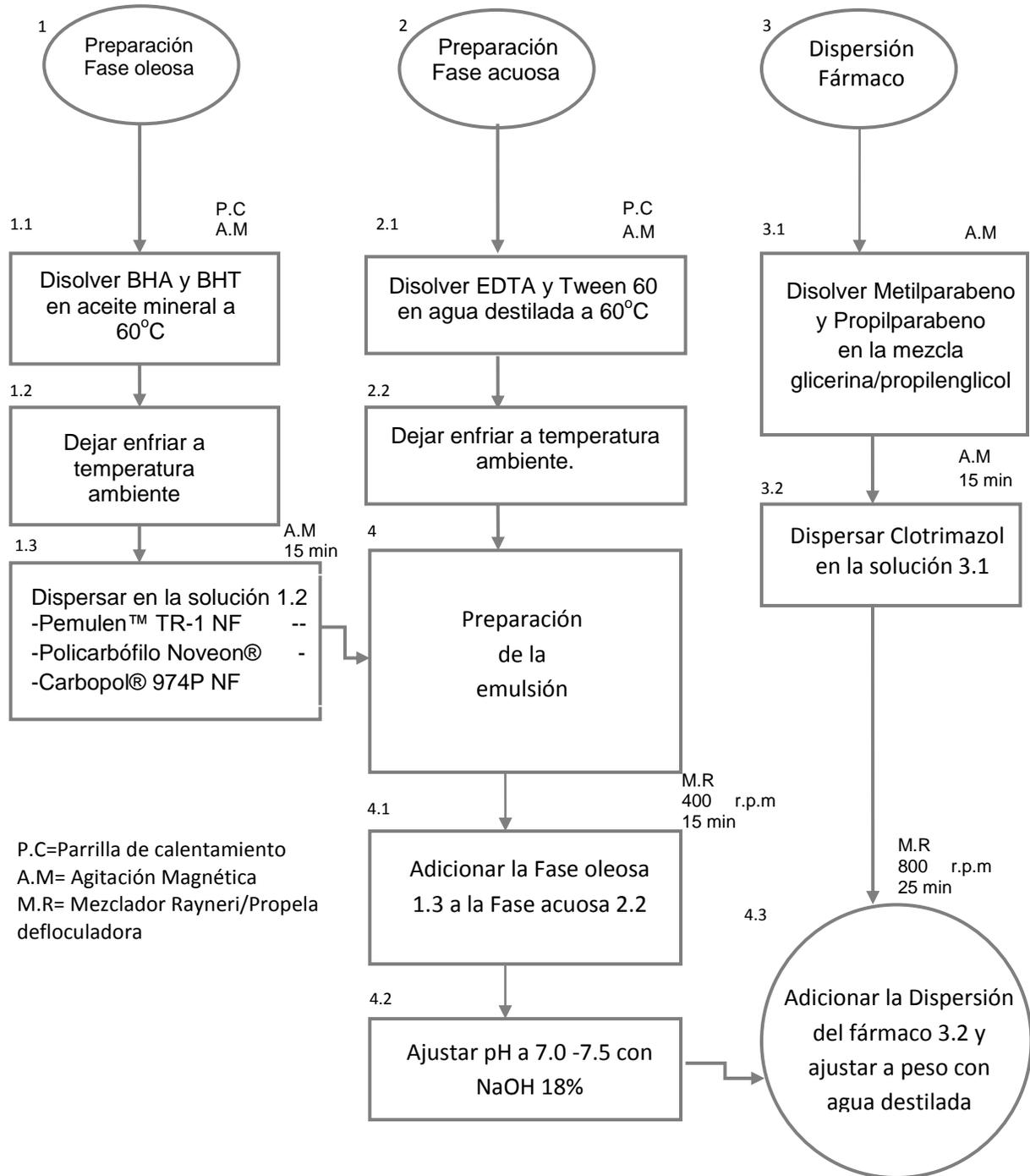
Se prepararon diferentes cremas variando las concentraciones de Polímero Pemulen™ TR-1 NF y Tween 60, se evaluó su estabilidad física (para este estudio las concentraciones de Policarbófilo Noveon® y Carbopol® 974P NF se fijaron en

0.5% y 0.7% w/w respectivamente). Las pruebas se realizaron de acuerdo a un diseño experimental factorial 2^2 .

Ya que se encontró una formulación físicamente estable y se fijaron las concentraciones de Polímero Pemulen™ TR-1 NF y Tween 60, se prepararon diferentes cremas variando las concentraciones de Policarbófilo Noveon® y Carbopol® 974P NF para el estudio de mucoadhesión. Los experimentos se realizaron empleando un diseño experimental central compuesto 2^2 .

6 MÉTODOS

6.1 FABRICACIÓN DE CLOTRIMAZOL 2% CREMA VAGINAL



La crema se dejó reposar 24 horas a temperatura ambiente para que el hinchamiento de los polímeros continuara. Posteriormente el valor de pH fue determinado con un pH metro HANNA PH21 y la viscosidad evaluada con un viscosímetro Fungilab V100001.

6.2 DISEÑOS EXPERIMENTALES

Diseño para el estudio de estabilidad

Se usó un diseño factorial 2^2 para encontrar los parámetros precisos para obtener una crema vaginal de Clotrimazol que 2% físicamente estable, así como para evaluar los principales efectos e interacciones de los factores estudiados sobre la estabilidad física de la crema. Las variables dependientes e independientes del diseño se muestran en la Tabla 6 y el arreglo factorial en la Fig. 7.

La construcción del diseño y el análisis estadístico de los resultados se realizó con Design-Expert[®] Software V8 para el Diseño de Experimentos. Las pruebas se corrieron por duplicado y aleatoriamente. El experimento se realizó en dos días, llevándose a cabo 4 pruebas por día.

Tabla 6. Variables independientes y dependientes del Diseño Factorial 2².

Variables	Niveles	
	<i>Bajo</i>	<i>Alto</i>
	Codificados	
	-1	+1
	Reales % w/w	
<i>Independientes</i>		
Polímero Pemulen™ TR-1 NF	0.2	0.5
Tween 60	0	0.5
<i>Dependientes</i>	<i>Criterios</i>	
% separación de la crema centrífuga	Mínima	
% variación de la viscosidad cámara 60 °C	< 20%,sin separación de fases	
% variación de la viscosidad ciclos congelamiento	<20%,sin separación de fases	

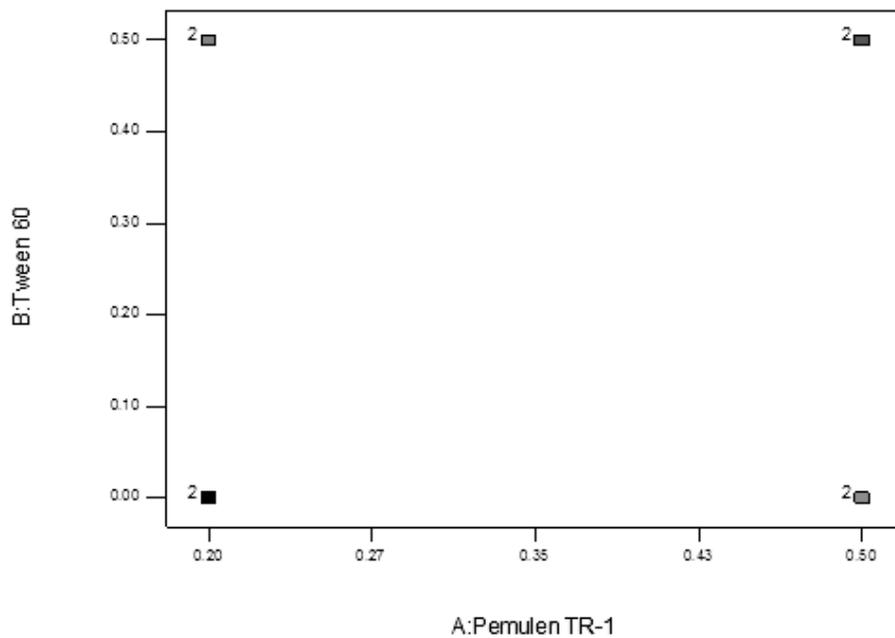


Fig. 7. Matriz del diseño factorial 2^2 . Se muestra el arreglo factorial realizado. En el eje X se muestran los niveles de Polímero Pemulen™ TR-1 NF estudiados y en el eje Y los de Tween 60. Los cuadros en la gráfica representan los puntos experimentales realizados y el número a lado del cuadro las veces que se realizó la prueba.

Diseño para el estudio de mucoadhesión

Se realizó un diseño central compuesto 2^2 para optimizar estadísticamente los parámetros que permitieran obtener una crema vaginal de Clotrimazol al 2% potencialmente mucoadhesiva, también para evaluar los efectos lineales, de interacción y cuadráticos de las variables independientes estudiadas.

Se eligió este diseño porque se esperaba tener un comportamiento de segundo orden y encontrar el punto óptimo dentro de la región experimental.

La construcción del diseño y el análisis estadístico de los resultados se realizó con Design-Expert[®] Software V8 para el Diseño de Experimentos. Las variables dependientes e independientes del diseño se muestran en la Tabla 7. Y la matriz del diseño en la Fig. 8. Las pruebas se corrieron aleatoriamente y el experimento se realizó en dos días, llevándose a cabo 6 pruebas por día. Se repitieron las pruebas de la combinación factorial +1, +1 y -1,-1 así como el punto central 0,0.

Tabla 7. Se muestran Las variables dependientes e independientes.

Variables	Niveles Codificados				
	-1.4	-1	0	+1	+1.4
	Niveles Reales % w/w				
<i>Independientes</i>	Axial bajo	Factorial bajo	Central	Factorial alto	Axial alto
Policarbófilo Noveon [®]	0.22	0.3	0.5	0.7	0.78
Carbopol [®] 974P NF	0.28	0.4	0.7	1.0	1.12
<i>Dependientes</i>	<i>Criterios</i>				
Fuerza (N)	Máxima				
Viscosidad (P)	En el rango				

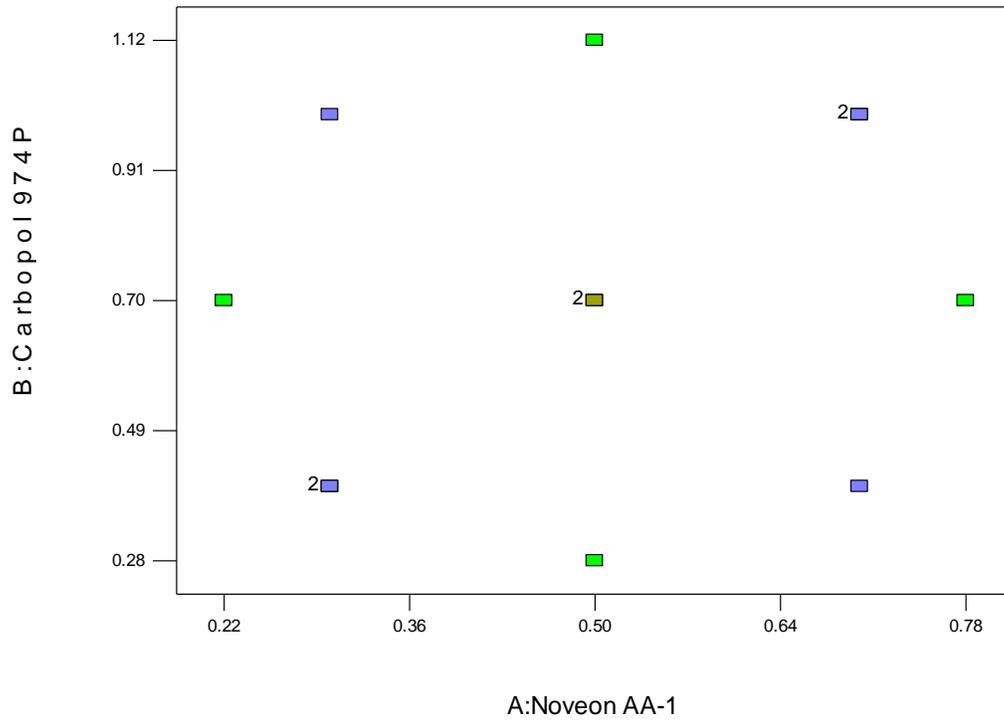


Fig. 8. Diseño central compuesto 2^2 . Se muestra el diseño central compuesto realizado. En el eje X se muestran los niveles de Policarbófilo Noveon® estudiados y en el eje Y los de Carbopol® 974P NF. Los cuadros azules corresponden a las corridas factoriales, los verdes claro a las axiales y el verde olivo al central. El número dos representa los puntos del diseño que se duplicaron experimentalmente.

6.3 ESTUDIO DE ESTABILIDAD

Centrífuga

Se utilizó una centrífuga marca: FARLAB, modelo: 80-5. Se depositaron 40 g de CVC 2% en un tubo FALCON de 50 mL, posteriormente la muestra se introdujo en la centrífuga y se sometió a 3500 rpm durante 30 min, finalizado el ensayo se determinó el porcentaje de separación de fases de la emulsión. Como se muestra en la Fig. 9.

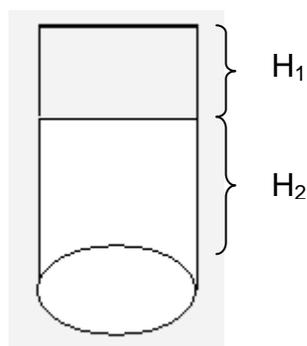


Fig.9. % Separación de fases = $H_1 \cdot (100 / (H_1 + H_2))$

H_1 = altura (cm) de la fase 1, H_2 = altura (cm) de la fase 2

Ciclos de congelamiento

En esta prueba se sometió a la emulsión al siguiente procedimiento:

Día	Condición de almacenamiento
1	Congelamiento
2	Congelamiento
3	Congelamiento
4	Temperatura Ambiente
5	Congelamiento
6	Temperatura Ambiente
7	Congelamiento
8	Temperatura Ambiente

Finalizada la prueba, se evaluó la viscosidad de las fórmulas que no presentaron separación de fases y se determinó el % de variación respecto al valor inicial. Se empleó un viscosímetro marca: Fungilab, Modelo: Alpha.

Cámara 60°C

En este ensayo se almacenaron las formulaciones en una cámara a 60°C durante 7 días, al finalizar la prueba se evaluó la viscosidad de las fórmulas que no presentaron separación de fases y se determinó el porcentaje de variación respecto al valor de viscosidad inicial.

6.4 ESTUDIO DE MUCOADHESIÓN

Preparación Fluido Vaginal Simulado (FVS)

La composición y preparación de FVS es similar a la implementada en el estudio de Neves J. (Neves J., y otros, 2008) y se describe a continuación.

Con agitación magnética se disolvieron 4.5 g de NaCl en aproximadamente 400 mL de agua destilada, posteriormente se dispersaron 7.5 g de mucina gástrica porcina tipo II, finalmente la mezcla se adicionó a un matraz volumétrico de 500 mL y se llevó al aforo con agua destilada.

Se dividió el FVS en seis vasos de precipitados de 100 mL y se adicionaron 40 mL a cada uno. Antes de iniciar la prueba el FVS se colocó en la parilla de calentamiento hasta que alcanzó una temperatura de 37°C \pm 2°C. Posteriormente se colocó en el baño de agua del sistema para el estudio de mucoadhesión (véase Fig. 3). Se utilizó el mismo FVS para las tres mediciones de cada formulación, y se cambió entre formulaciones.

Modelo de Mucosa

Se utilizó el mismo modelo de mucosa que el empleado en el estudio de de Neves J. (Neves J., y otros, 2008) mucosa vaginal de vaca (*Bos taurus*).

La mucosa vaginal de vaca se obtuvo de un animal recién sacrificado, se separó cuidadosamente de los tejidos subyacentes, se lavó con solución salina y se cortó

en pedazos de tamaño adecuado. Posteriormente las muestras se congelaron hasta que fueron requeridas. Las muestras fueron proporcionadas por la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM.

Medición de la Mucoadhesión

La mucoadhesión de las diferentes formulaciones de crema vaginal Clotrimazol al 2% se evaluó con base en el ensayo de tracción, de de Neves J. (Neves J., y otros, 2008) en donde la medición de la fuerza máxima (fuerza de desprendimiento) necesaria para separar la mucosa vaginal de vaca de una muestra de crema, después de un periodo inicial de contacto, es indicativo del potencial mucoadhesivo de la crema.

Las fuerzas que intervienen en el proceso de desprendimiento se midieron con un texturómetro TA-XT plus TEXTURE ANALYSER (TA) en modo adhesivo.(véase Fig. 10).

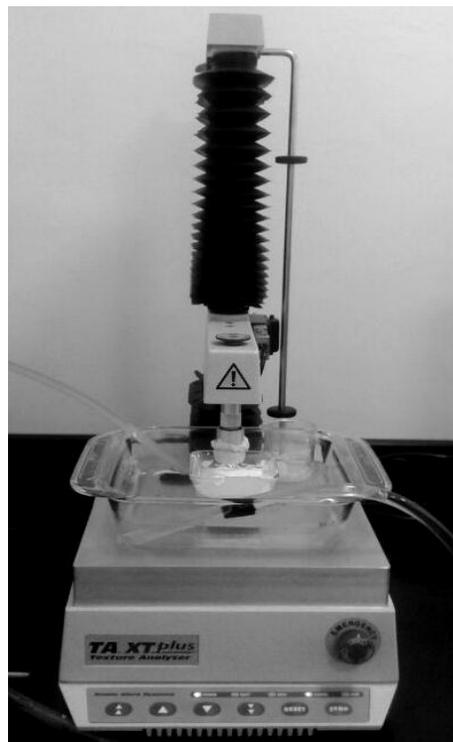


Fig. 10 Se muestra el equipo utilizado para el estudio de mucoadhesión. TA-XT plus TEXTURE ANALYSER.

Inmediatamente antes de la medición, la mucosa vaginal de vaca se descongela en un baño de solución salina a $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 60 min. Posteriormente la mucosa se sujetó con una liga en la sonda cilíndrica de aluminio de 25 mm de diámetro, cubriendo toda la superficie inferior, manteniéndola lo más lisa posible. Véase punto 2 y 3 de la Fig. 11.

A continuación la mucosa de vaca se sumergió durante 15 min en el fluido vaginal simulado que se encontraba en el baño maría (véase punto 5 de la Fig. 11). Se utilizó la misma mucosa montada en la sonda, para todas las pruebas de un día, es decir, las mediciones de las seis formulaciones diferentes y sus dos repeticiones. Entre cada medición se lavó la mucosa con solución salina cinco veces.

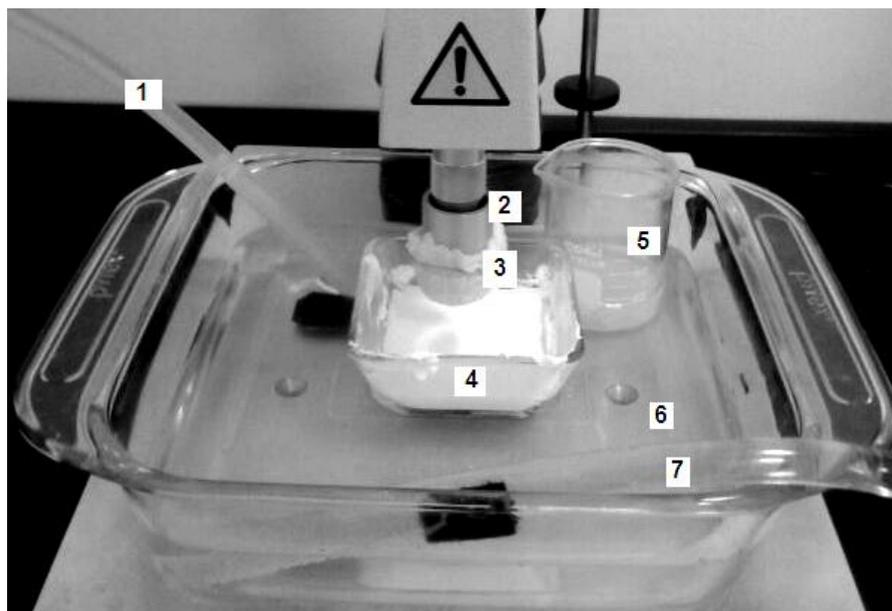


Fig. 11 Sistema para el estudio de mucoadhesión. 1 - Entrada de agua; 2 - sonda; 3 - mucosa; 4 - muestra; 5 - fluido vaginal simulado; 6 - baño de agua a $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ (para mantener la muestra y el FVS a $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$); 7 - salida de agua.

Se pesaron 60 g de crema (48 horas después de su fabricación) en un recipiente de vidrio con una superficie cuadrada de 62 mm, posteriormente la muestra se colocó en la parrilla de calentamiento hasta que alcanzó una temperatura de $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, después se puso en el baño de agua del sistema para el estudio de mucoadhesión

sujetándose al piso del recipiente del baño con velcro (véase Fig. 11). La muestra se rasó para mantener la superficie lo más lisa posible.

Después se colocó la sonda cilíndrica de 25 mm con la mucosa en el TA, el exceso de FVS se eliminó cuidadosamente con papel absorbente, posteriormente se corrió la prueba. (véase Fig.11).

A continuación, la sonda bajó a una velocidad 2.5 mm/s hasta tocar la superficie de la crema, posteriormente se dio el contacto íntimo entre la mucosa y la muestra de crema, se aseguró por medio de una fuerza constante de 0.2 N aplicada por la sonda en la superficie de la muestra. Después de 150 s, la sonda subió a su posición inicial a una velocidad de 2.5 mm/s, los valores de Fuerza (F) fueron medidos automáticamente por el software del TA-XT plus TEXTURE ANALYSER. Este parámetro se consideró como indicador del potencial mucoadhesivo de las muestras. Cada formulación se midió 3 veces, cambiándose la muestra a medir de la misma formulación por medición ya que después de la prueba se quedan residuos del FVS.

7 RESULTADOS Y ANÁLISIS

7.1 ESTUDIO DE ESTABILIDAD

Datos obtenidos del estudio

Tabla 8. Resultados de las pruebas.

Orden corrida	Tipo de punto	Pemulen™ (% w/w)	Twen 60 (% w/w)	C.C % var μ	C.60°C % var μ	Cnt % sf
1	Factorial (-1,-1)	0.2	0	s.f	s.f	13.2
2	Factorial (-1,+1)	0.2	0.5	-2.8	-11.2	0
3	Factorial (+1,-1)	0.5	0	s.f	s.f	6.5
4	Factorial (+1,+1)	0.5	0.5	-2.6	-11.6	0
5	Factorial (-1,+1)	0.2	0.5	-2.0	10.3	0
6	Factorial (-1,-1)	0.2	0	s.f	s.f	12.9
7	Factorial (+1,+1)	0.5	0.5	-3.4	-10.7	0
8	Central (0,0)	0.35	0.25	-0.4	-10.2	1
9	Central (0,0)	0.35	0.25	-6.2	-14.1	1.2
10	Factorial (+1,-1)	0.5	0	s.f	s.f	6.7

C.C = Ciclos de Congelamiento. %var μ = Porcentaje de variación de la viscosidad. C.60°C= Cámara 60°C. Cnt = Centrífuga. %sf = Porcentaje de separación de fases. Las corridas azules presentaron separación de fases en todas las pruebas y las grises en la prueba de Cnt.

Como se observa en la Tabla. 8, los resultados de las pruebas C.C y C.60°C mostraron la misma tendencia, en ambos casos las fórmulas que no tenían Tween 60 (corridas 1 y 3 y sus respectivas repeticiones 6 y 10) presentaron separación de fases y debido a esto no se les midió la viscosidad. Por el contrario las fórmulas que tenían Tween 60 se consideraron estables porque presentaron un porcentaje de variación de la viscosidad menor a 20.

La prueba de Cnt a diferencia de las otras dos pruebas, resultó más estresante para la emulsión, las formulaciones correspondientes a los puntos centrales del diseño (corridas 8 y 9) presentaron separación de fases.

En la prueba de Cnt se observó menor separación de fases en las fórmulas 3 y 10 que tenían mayor concentración de Polímero Pemulen™ TR-1 NF que en las fórmulas 1 y 6 que tenían menos polímero.

Ya que no se obtuvieron todas las viscosidades de las formulaciones en los estudios C.C y C.60°C, no se consideraron estas pruebas para el análisis estadístico en el Software Design-Expert®V8. Sólo se evaluaron los resultados de la prueba Cnt, siendo el % sf la única respuesta a optimizar en la búsqueda de una formulación estable de CVC 2%.

Los resultados de la prueba de Cnt permitieron detectar diferencias entre las formulaciones, que con las otras pruebas no se distinguieron. Además resultó ser la prueba más estresante para la CVC 2%. Por esto resulta óptimo utilizar sólo esta variable independiente al elegir una fórmula estable de CVC 2%.

Análisis estadístico de los datos

Efectos

A partir del Diseño Factorial 2^2 , se pretende encontrar los niveles de los factores a los cuales se obtiene una fórmula estable de CVC 2%. Para esto, primero se evaluaron los efectos que producen los factores en la respuesta %sf.

En la Tabla 9 y Fig.12 se observan los valores de los efectos, que muestran como la estabilidad de CVC 2% depende principalmente de la presencia de Tween 60, el cual tiene el efecto negativo más grande sobre la respuesta, es decir, este factor contribuye un 74.83% en disminuir los valores de %sf en la formulación. El Polímero Pemulen™ TR-1 NF contribuye sólo en un 8.06%, sin embargo, ambas contribuciones son significativas de acuerdo a la gráfica de normalidad de la Fig.12, donde se observa que ambos factores están fuera de la línea.

Tabla 9.Efectos que producen los factores sobre la respuesta.

Factor	Efecto	% Contribución
A-Polímero Pemulen™ TR-1 NF	-3.22	8.06
B-Tween 60	-9.82	74.83
AB	3.22	8.06

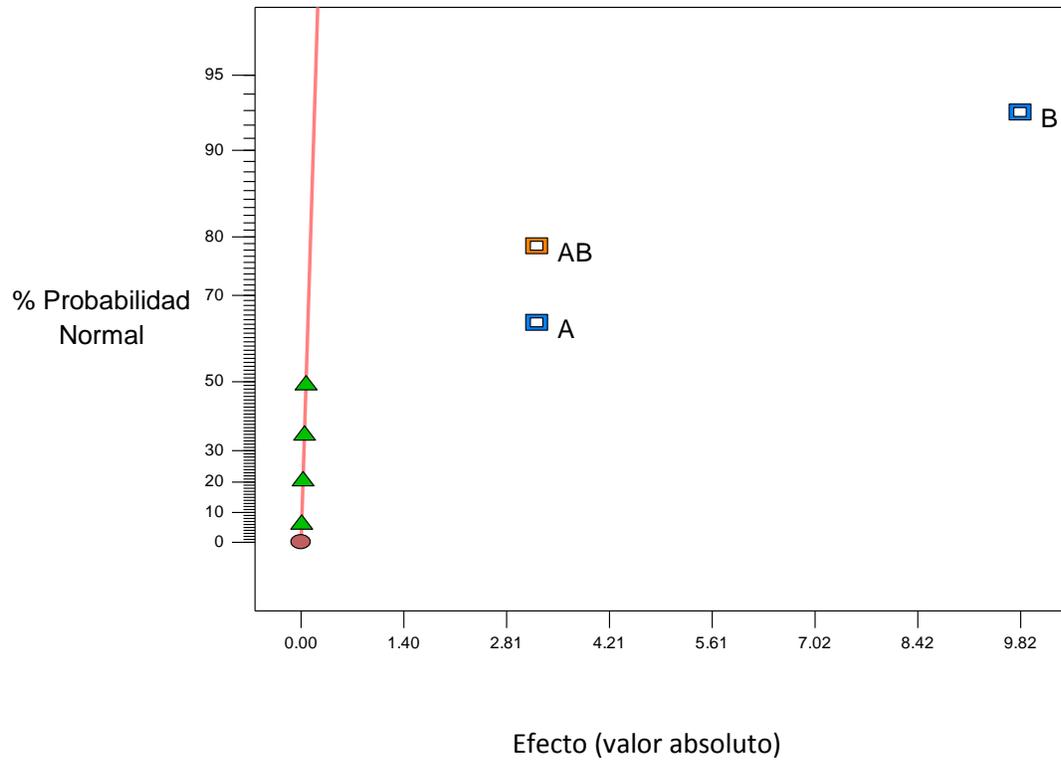


Fig. 12. Gráfica Normal. ■ Efecto negativo ■ Efecto positivo. ▲ Error estimado. Los términos fuera de la línea roja son estadísticamente significativos, los términos sobre la línea roja no son significativos.

En la Tabla 9 se observa que la interacción AB tiene un efecto sobre la respuesta, de la misma magnitud que A pero positivo. Para explicar mejor lo sucedido se muestra la Fig.13. En esta se observa que el %sf disminuye al aumentar la concentración del Polímero Pemulen™TR-1 NF cuando no está presente Tween 60, no obstante no se logra tener un %sf de cero, es decir una emulsión estable. De acuerdo a lo anterior no se cumple con la hipótesis que plantea que la estabilidad de CVC 2% no depende de la concentración de Pemulen™TR-1 NF y que sólo con este emulsionante se obtiene una formulación estable. Se esperaba que la inclusión de Tween 60 favoreciera la estabilidad de la emulsión, y se obtuvo que ésta depende principalmente de la presencia de Tween 60. Cuando este emulsionante está presente en un 0.5% w/w se obtienen una CVC 2% estable independientemente de la concentración de Polímero Pemulen™TR-1 NF.

En la gráfica de la Fig.13 también se observan los puntos del diseño, el punto central presentó separación de fases, esto implica que existe una concentración óptima de Tween 60 a la cual se tiene una emulsión estable, para determinar este valor sería necesario ampliar el diseño.

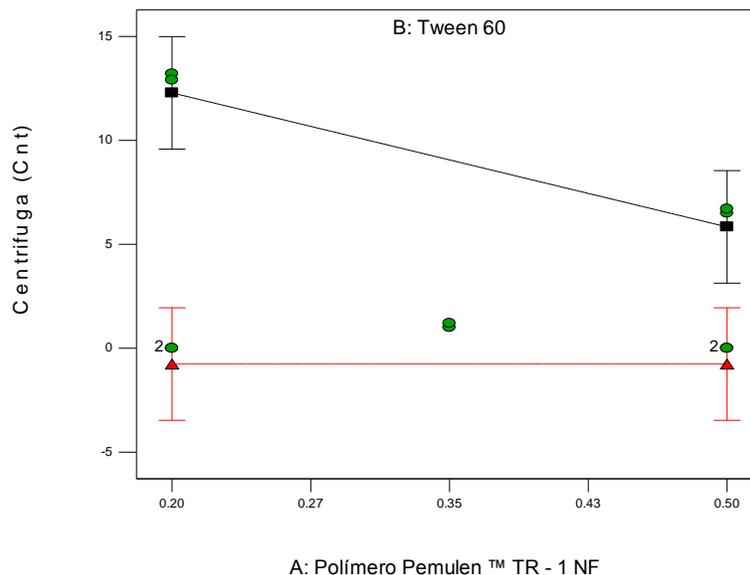


Fig.13 Interacción AB. ■ B 0.00 ▲ B 0.50 ◆ Puntos del diseño.

Análisis de varianza (ANOVA)

El ANOVA se presenta en dos formas: con la información del punto central incluida en el modelo (donde se evalúa la curvatura) véase Tabla 10, y con el punto central apartado del modelo véase Tabla 11.

Tabla 10. ANOVA para el modelo que ajusta la curvatura.

Término	SC	GL	CM	Valor F	Valor-p
Modelo	234.00	3	78.22	3724.82	<0.0001
A-Polímero Pemulen™	20.80	1	20.80	990.54	<0.0001
B-Tween 60	193.06	1	193.06	9193.39	<0.0001
AB	20.80	1	20.80	990.54	<0.0001
Curvatura	23.26	1	23.26	1107.44	<0.0001
Residual	0.084	4	0.021		
Total	258.00	9			

SC = Suma de cuadrados. GL = Grados de Libertad. CM = Cuadrados Medios.

Tabla 11. ANOVA para el modelo que no ajusta la curvatura.

Término	SC	GL	CM	Valor F	Valor-p
Modelo	234.66	3	78.22	16.76	0.0048
A-Polímero Pemulen™	20.80	1	20.80	4.46	0.0885
B-Tween 60	193.06	1	193.06	41.36	0.0014
AB	20.80	1	20.80	4.46	0.0885
Residual	23.34	5	4.67		
total	258.01	9			

SC = Suma de cuadrados. GL = Grados de Libertad. CM = Cuadrados Medios.

Los datos de " Valor-p " menores de 0.0500 indican que los términos del modelo son estadísticamente significativos.

Modelo que ajusta la curvatura

De acuerdo a los datos de la Tabla 10. Los términos A, B y AB son significativos. Es decir, producen un efecto estadísticamente importante en la respuesta %sf. La curvatura también es significativa, esto implica que el diseño podría ser aumentado para añadir corridas que permitan estimar los términos cuadráticos, con lo que se puede moldear la curvatura.

Modelo que no ajusta la curvatura

Debido a que la curvatura es significativa, este modelo sólo puede ser utilizado para la predicción de los puntos factoriales, pero no para cualquier otro punto. Como se observa en la Fig. 14 el %sf predicho para el punto central con este modelo, no corresponde con el valor obtenido experimentalmente. El comportamiento no es lineal.

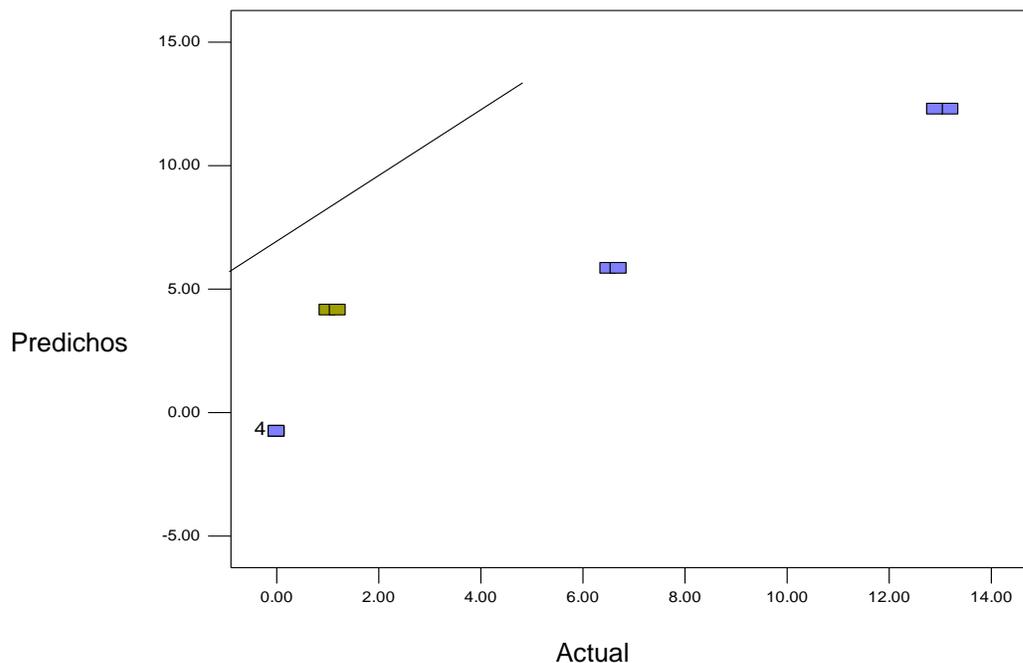


Fig.14. Predicción del modelo que no ajusta la curvatura. ■ Puntos Centrales ■ Puntos Factoriales.

Utilizando el modelo que no ajusta para la curvatura, se optimizó la respuesta para un mínimo de %sf, y la solución propuesta por el Software fue: con 0.5% w/w de Pemulen™ TR-1 NF y 0.5% de Tween 60 con lo que se obtiene un %sf = 0.

Siendo esta combinación el punto factorial +1,+1 del diseño, que experimentalmente no presentó separación de fases en la prueba de centrifuga y fue estable en las pruebas de C.C. y C.60°C, se eligieron estas concentraciones de emulsionantes para la fórmula.

Se decidió utilizar la concentración más alta de Pemulen™ TR-1 NF para favorecer la mucoadhesión.

Del diseño factorial estudiado se eligió el mejor tratamiento del área experimental, ya que con este punto se cumple el objetivo de encontrar una fórmula físicamente estable de CVC 2%. Debido a esto no se decidió seguir con la ampliación del diseño para encontrar la curvatura y optimizar las concentraciones.

Verificación de supuestos

Para confiar en los datos del ANOVA se deben verificar ciertos supuestos: que los errores siguen una distribución normal e independiente con media cero y varianza constante. Las violaciones de los supuestos pueden investigarse mediante el examen de los residuales (Gutiérrez Pulido, y otros, 2008).

Para el diagnóstico se incluyeron los datos centrales. El gráfico de probabilidad normal indica que los residuos siguen una distribución normal. Las gráficas de los residuos frente a los valores de respuesta previstos, tienen una dispersión aleatoria por lo que se cumple con el supuesto de varianza constante. Las gráficas de residuos contra el orden de ejecución experimental presentaron una dispersión aleatoria, por lo que no hubo otras variables que influenciaron la respuesta (véase anexos).

7.2 ESTUDIO DE MUCOADHESIÓN

En la Tabla 12 se muestran los resultados de Fuerza (F) y viscosidad (μ) obtenidos en el estudio. Los datos muestran que los valores de F y μ se correlacionan, a mayor F mayor μ . Tendencia representada en la Fig.15.

Tabla12. Valores de Fuerza (F) obtenidos en la prueba de mucoadhesión y Viscosidad (μ) de las formulaciones.

Corrida	Tipo de punto	Noveon AA-1 (A) (% w/w)	Carbopol 974 (B) (% w/w)	F (N)	%CV	μ (P)	%CV
1	Central	0.50	0.70	0.171	4.3	329.7	2.1
2	Axial	0.50	0.28	0.145	3.4	216.4	0.6
3	Axial	0.78	0.70	0.178	3.5	353.8	2.3
4	Axial	0.22	0.70	0.171	0.7	320.1	0.6
5	Factorial	0.70	1.00	0.182	4.0	411.9	0.8
6	Factorial	0.30	0.40	0.161	2.5	225.8	0.2
7	Central	0.50	0.70	0.171	3.3	349.0	1.6
8	Axial	0.50	1.12	0.194	1.6	441.3	2.2
9	Factorial	0.30	1.00	0.184	3.2	404.3	0.8
10	Factorial	0.70	0.40	0.159	4.9	279.4	0.2
11	Factorial	0.70	1.00	0.177	2.3	435.5	0.7
12	Factorial	0.30	0.40	0.159	3.3	224.8	0.3

F = Fuerza, N = Newton, %CV = porcentaje del coeficiente de variación, μ = Viscosidad P =Poise

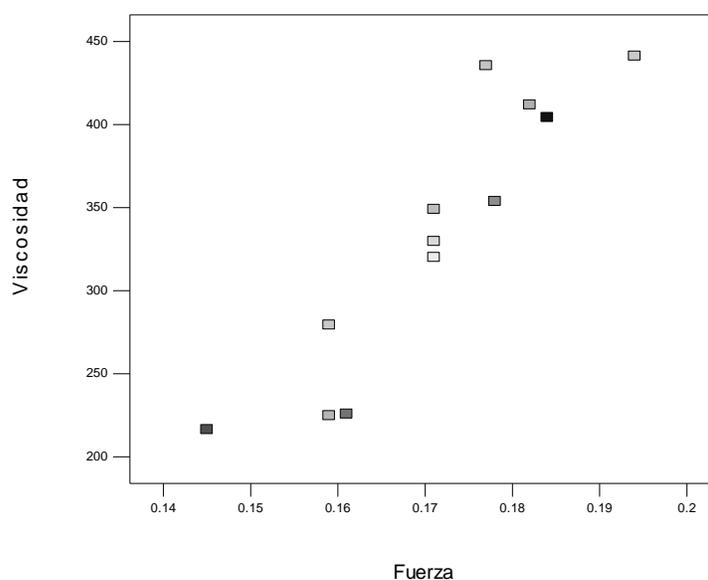
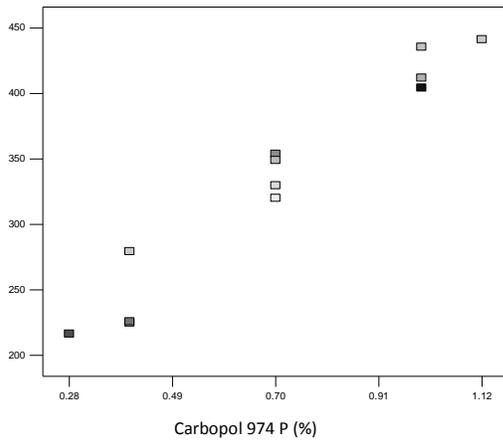


Fig. 15 Viscosidad vs Fuerza

A continuación se expone el efecto que tiene la concentración de los factores sobre las respuestas, las gráficas 1 de la Fig. 16 muestran que a mayor concentración de polímero Carbopol® 974P mayor μ y F. Respecto a las gráficas 3 y 4 no se observa una relación entre la concentración de Noveon® AA-1 con la μ o F.

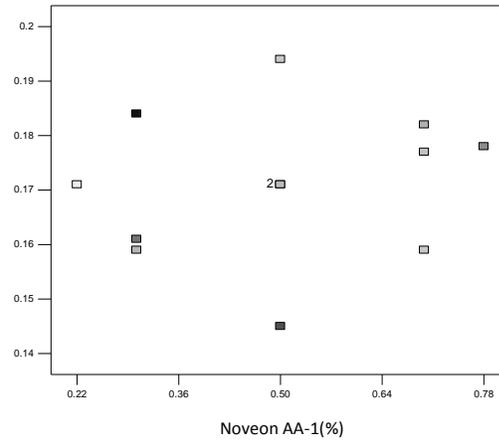
Gráfica 1

Viscosidad (P)



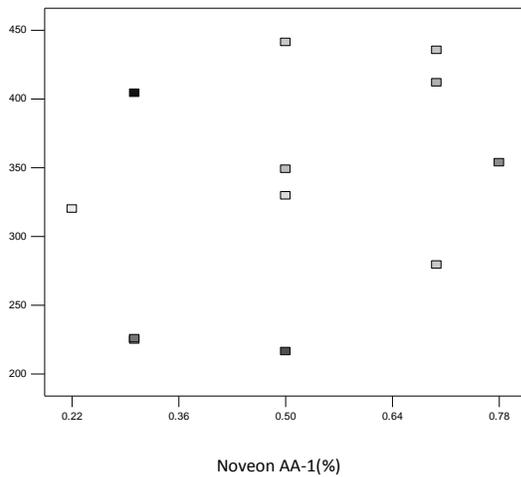
Gráfica 4

Fuerza (N)



Gráfica 3

Viscosidad (P)



Gráfica 2

Fuerza (N)

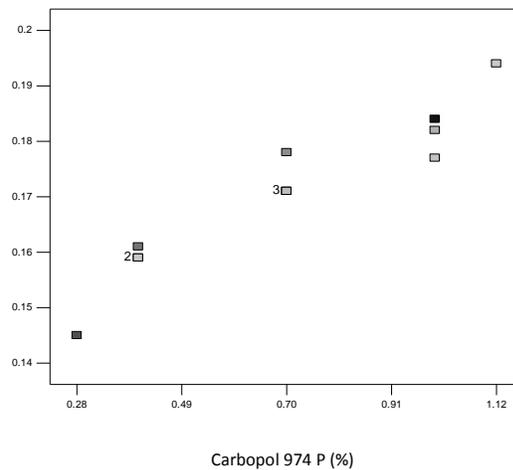


Fig.16. Relación F y μ con la concentración de Polímero Carbopol® 974 y Noveon® AA-1.

Análisis estadístico de Fuerza

Por medio de un análisis de regresión lineal múltiple se determinó que los datos de F se ajustan a un modelo tipo lineal con un valor de $R^2_{aj} = 0.8931$. Modelos con valores de R^2_{aj} mayores a 0.7 presentan buena calidad de predicción para fines de optimización (Gutiérrez Pulido, y otros, 2008).

Los resultados del análisis de varianza del modelo (véase Tabla 13) muestran que el modelo es significativo, así como la falta de ajuste, y que sólo la concentración de polímero Carbopol® 974P tiene influencia sobre el valor de fuerza (α 0.05).

Termino	SC	GL	CM	Valor F	Valor-p
Modelo lineal	1.809E-003	5	3.618E-004	13.65	<0.0032
A-Noveon®AA-1	7.934E-007	1	7.934E-007	0.030	<0.8683
B-Carbopol® 974	1.720E-003	1	1.720E-003	64.93	<0.0002
AB	6.429E-006	1	6.429E-006	0.24	<0.6398
A²	8.595E-006	1	8.595E-006	0.32	<0.5897
B²	6.095E-006	1	6.095E-006	0.23	<0.6485
Residual	1.590E-004	6	2.650E-005		
Bondad de Ajuste	1.445E-004	3	4.816E-005	9.96	<0.0455
Error Puro	1.450E-005	3	4.833E-006		
Total	1.968E-003	11			

Tabla 13. Anova modelo completo. SC =Suma de cuadrados. GL = Grados de Libertad. CM = Cuadrados Medios. Los datos en azul son estadísticamente significativos (Valor-p menores de 0.0500).

Para mejorar el modelo los términos que no fueron significativos se incluyeron en el error residual, para obtener un modelo reducido, el ANOVA de este modelo se muestra en la Tabla 14. Donde se observa que el nivel de significancia del modelo se mejora y es adecuado debido a que el término de bondad de ajuste ya no es significativo.

Termino	SC	GL	CM	Valor F	Valor-p
Modelo lineal	1.777E-003	1	1.777E-004	92.93	<0.0001
B-Carbopol 974	1.777E-003	1	1.777E-003	92.93	<0.0001
Residual	1.912E-004	10	1.912E-005		
Bondad de Ajuste	1.767E-004	7	2.524E-005	5.22	<0.1011
Error Puro	1.450E-005	3	4.833E-006		
Total	1.968E-003	11			

Tabla 14. ANOVA modelo reducido. SC = Suma de cuadrados. GL = Grados de Libertad. CM = Cuadrados Medios

Se cumple la hipótesis que plantea que el Carbopol® 974P tiene mayor efecto en mucoadhesión que Noveon® AA-1, coincidiendo esto con lo obtenido por otros investigadores (Tamburic, y otros, 1995) (Chopra, y otros, 2007). Sin embargo, no se esperaba que Noveon® AA-1 tuviera un efecto no significativo en la mucoadhesión de CVC 2%.

Como se planteó en la hipótesis la mucoadhesión se correlaciona directamente con la concentración de Carbopol® 974P, sin embargo, a las concentraciones evaluadas no se observó el cambio de esta tendencia como se había previsto, que a concentraciones altas de polímero la mucoadhesión disminuyera debido a una posible saturación del sistema que impidiera la interacción polímero-mucosa.

La representación matemática del modelo lineal reducido de fuerza en variables codificadas corresponde a la siguiente ecuación:

$$\text{Fuerza} = +0.17 + 0.013 * B$$

Tabla 15. Coeficientes del modelo.

Factor	Coefficiente estimado	G.L	Error Estándar	95% IC bajo	95% IC Alto
Intercepción	0.17	1	1.262E-003	0.17	0.17
B-Carbopol 974	0.013	1	1.383E-003	0.010	0.016

G.L = grados de libertad, IC = intervalo de confianza

Ecuación con valores reales: Fuerza = + 0.13990 + 0.044432* [Carbopol 974P]

En la fig. 17 se muestra la representación gráfica tridimensional, debido a que los datos se ajustan a un modelo de primer orden se tiene una superficie de respuesta plana. Donde se observa que a mayor concentración de polímero Carbopol® 974P existe un valor mayor de fuerza (indicativo de mucoadhesión) a cualquier concentración de Noveon® AA-1.

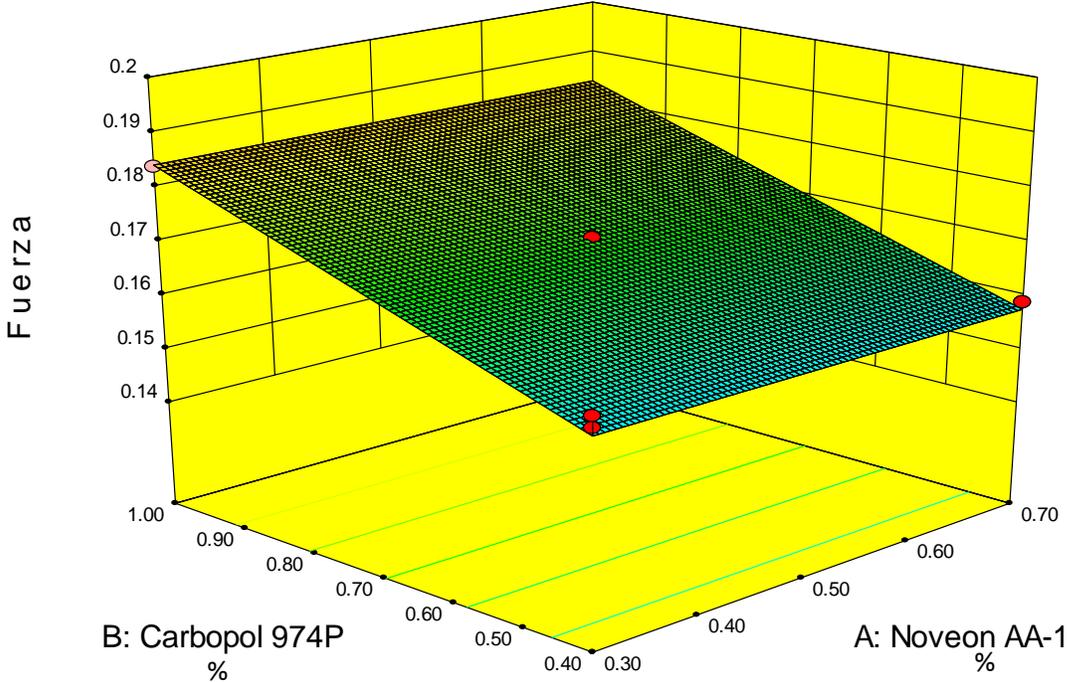


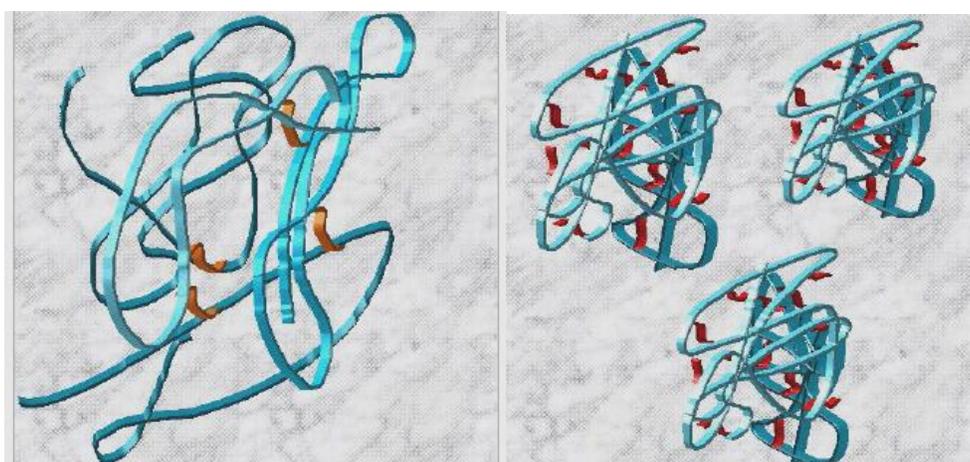
Fig. 17. Superficie tridimensional del modelo de Fuerza. Los puntos rojos representan los valores experimentales de fuerza que se encuentran por arriba de la superficie de respuesta y el punto rosa el valor por debajo. La superficie presenta un color degradado de acuerdo a sus valores de fuerza.



El mecanismo de mucoadhesión por el cual actúan los polímeros de ácido acrílico Carbopol® 974P y Noveon® AA-1 se describió en el marco teórico. La interpenetración de los polímeros en la mucosa se favorece por la flexibilidad de las cadenas y su hinchamiento proporciona una gran superficie adhesiva que favorece el contacto con la mucina. Debido a que CVC 2% tiene un pH alcalino, las moléculas de mucina se cargan negativamente y se repelen con los iones carboxilato de los polímeros. Sin embargo, estos iones interactúan con el calcio, magnesio y otros iones polivalentes de las proteínas y polisacáridos del fluido vaginal.

De acuerdo a los mecanismos y características químicas/estructurales de los polímeros, que intervienen en la mucoadhesión, se infiere que las diferencias entre Polímero Carbopol® 974P y Noveon® AA-1 que se muestran a continuación, (véase Fig. 18 y Tabla 16) determinaron que para CVC 2% sólo Carbopol® 974P favoreciera la mucoadhesión.

Fig. 18 Entrecruzamiento de los polímeros de ácido acrílico



Noveon® AA-1

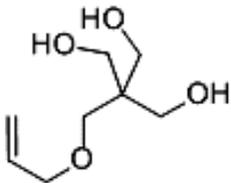
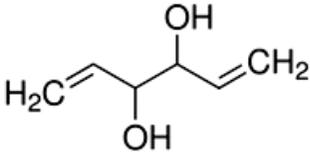
Carbopol® 974P

Polímero ligeramente entrecruzado.

Polímero altamente entrecruzado

Referencia: (Lubrizon, 2013).

Tabla 16. Diferencias y características propias de cada polímero involucradas en mucoadhesión.

Polímero Carbopol® 974P	Policarbófilo Noveon® AA-1
<p>-Tiene mayor peso molecular, lo que favorece los enredos con la mucina.</p> <p>-Presenta mayores sitios de interacción .</p> <p>-Polímero entrecruzado con alil éter de pentaeritritol</p> <div style="text-align: center;">  <p>Alil éter de pentaeritritol</p> </div>	<p>-Presenta menor entrecruzamiento, por lo tanto es más flexible.</p> <p>-Tiene menor peso molecular, lo que favorece la interpenetración en la mucosa.</p> <p>-Presenta mayor hinchamiento exponiéndose al máximo los sitios mucoadhesivos. (sin embargo un exceso de hinchamiento produce un mucilago resbaladizo fácil de desprender de la mucosa)</p> <p>-Polímero entrecruzado con divinil glicol</p> <div style="text-align: center;">  <p>Divinil Glicol</p> </div>

No se cumple con la hipótesis que plantea una posible interacción entre los polímeros, se creía que los mecanismos de ambos producirían un efecto sinérgico en la mucoadhesión, sin embargo, para CVC 2% la mucoadhesión solo depende de la concentración de Carbopol® 974P.

Análisis estadístico de la viscosidad (μ)

Por medio de un análisis de regresión lineal múltiple se determinó que los datos de viscosidad ajustan a un modelo lineal con un valor de $R^2_{aj} = 0.9808$.

El análisis de varianza del modelo (véase tabla 17) muestra que el modelo es significativo, y que Noveon® AA-1 y Carbopol® 974P tienen un efecto significativo sobre la viscosidad ($\alpha 0.05$). Sin embargo, los valores de SC muestran que B tiene mayor influencia sobre la respuesta aproximadamente 2.6 veces más.

Tabla 17 ANOVA modelo completo

Termino	SC	GL	CM	Valor F	Valor-p
Modelo	73503.81	5	14700.76	154.09	<0.0001
A-Noveon AA-1	2394.26	1	2394.26	25.10	<0.0024
B-Carbopol 974	62701.58	1	62701.58	657.21	<0.0001
AB	417.62	1	417.62	4.38	<0.0813
A²	5.87	1	5.87	0.062	<0.8124
B²	124.80	1	124.80	1.31	<0.2963

SC =Suma de cuadrados. GL = Grados de Libertad. CM = Cuadrados Medios. Los datos en azul son estadísticamente significativos (Valor-p menores de 0.0500).

Se mejora el modelo incluyendo los términos no significativos en el error residual, para obtener un modelo reducido, el ANOVA de este modelo se muestra en la Tabla 18, donde se observa que el nivel de significancia del modelo se mejora y resulta ser adecuado debido a que el término de bondad de ajuste no es significativo.

Tabla 18. ANOVA modelo reducido.

Termino	SC	GL	CM	Valor F	Valor-p
Modelo	72913.38	2	36456.69	282.16	<0.0001
A-Noveon AA-1	2394.26	1	2394.26	18.53	<0.0020
B-Carbopol 974	62701.58	1	62701.58	485.28	<0.0001
Residual	1162.87	9	129.21		
Ajuste	697.64	6	116.27	0.75	<0.6515

SC =Suma de cuadrados. GL = Grados de Libertad. CM = Cuadrados Medios. Los datos en azul son estadísticamente significativos (Valor-p menores de 0.0500).

La representación matemática del modelo lineal reducido para viscosidad en variables codificadas, corresponde a la siguiente ecuación:

$$\text{Viscosidad} = +332.67 + 15.79 * A + 80.82 * B$$

Tabla 19. Coeficientes del modelo.

Factor	Coefficiente estimado	G.L	Error Estándar	95% IC bajo	95% IC alto
Intercepción	332.67	1	3.28	325.24	340.09
A-Noveon AA-1	15.79	1	3.67	7.49	24.09
B-Carbopol 974	80.82	1	3.67	72.52	89.12

G.L = grados de libertad, CI = intervalo de confianza.

Ecuación valores reales:

$$\text{Viscosidad} = + 104.61211 + 78.96233 * \text{Noveon AA-1} + 269.39057 * [\text{Carbopol 974P}]$$

En la fig.19 se muestra la representación gráfica tridimensional, debido a que los datos ajustan a un modelo de primer orden se tiene una superficie de respuesta plana, donde se observa que a mayor concentración de polímero Carbopol® 974P se obtienen valores mayores de viscosidad, lo mismo sucede con Noveon® AA-1, a mayor concentración mayor viscosidad, sin embargo, la pendiente de B está más inclinada debido a que este factor tiene mayor efecto sobre la respuesta.

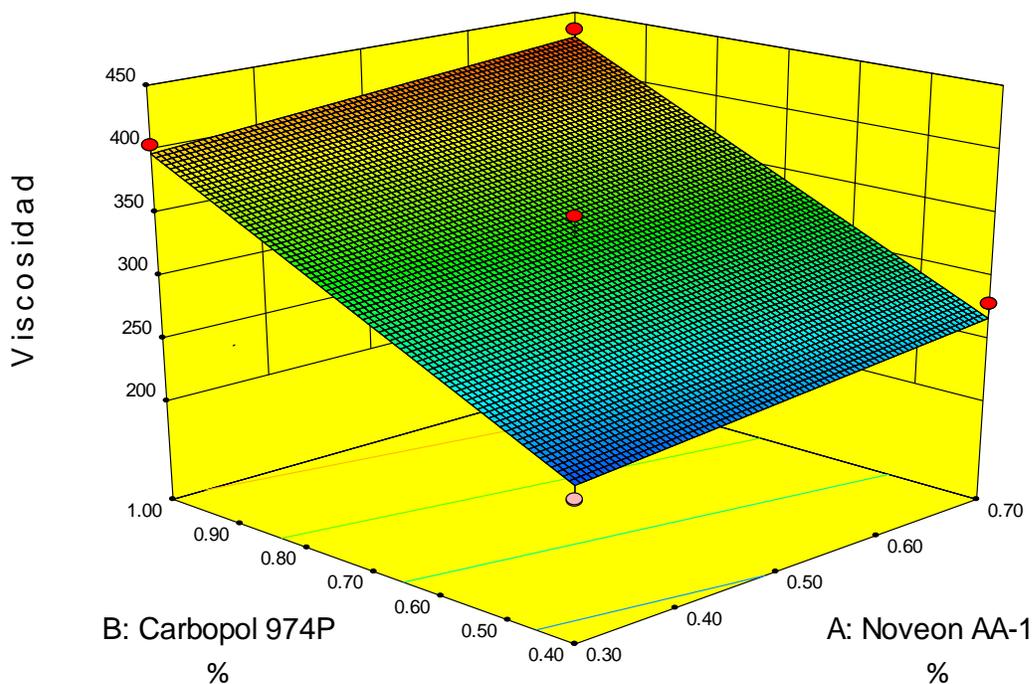


Fig. 19. Superficie tridimensional del modelo de viscosidad. Los puntos rojos representan los valores experimentales de viscosidad que se encuentran por arriba de la superficie de respuesta y el punto rosa el valor por debajo. La superficie presenta un color degradado de acuerdo a sus valores de viscosidad.

Se esperaban los resultados obtenidos, ya que es bien conocido que el Carbopol® 974P al estar altamente entrecruzado proporciona mayor viscosidad que Noveon AA-1 polímero ligeramente entrecruzado.

Verificación de supuestos

Para confiar en los datos del análisis de varianza de los modelos de F y μ se verificaron los supuestos de que los errores siguen una distribución normal e independiente con media cero y varianza constante.

Para ambas respuestas el gráfico de probabilidad normal indica que los residuos siguen una distribución normal. Las gráficas de los residuos frente a los valores de respuesta previstos, tienen una dispersión aleatoria por lo que se cumple con el supuesto de varianza constante. Las gráficas de residuos contra el orden de ejecución experimental presentaron una dispersión aleatoria, por lo que no hubo otras variables que influenciaran la respuesta (véase anexos).

Optimización

Para realizar la optimización de las concentraciones de A y B se consideraron los siguientes criterios.

Tabla 20 Criterios de optimización.

Nombre	Objetivo	Limite bajo	Limite alto
A-Noveon®AA-1	Mínimo	0.3	0.7
B-Carbopol®974	En el rango	0.4	1.0
Fuerza	Máximo	0.145	0.194
Viscosidad	En el rango	216.4	400

Debido a que Noveon® AA-1 no favorece la mucoadhesión de CVC 2% el objetivo fue minimizar su concentración. El valor de fuerza fue maximizado para obtener la formulación de CVC 2% con mayor potencial mucoadhesivo. El Carbopol® 974P y la viscosidad se dejaron en el intervalo.

A continuación se muestra la formulación propuesta:

Policarbófilo Noveon® AA-1 0.3% w/w

Polímero Carbopol® 974P 1% w/w

Para obtener los siguientes valores

Fuerza 0.184 N

Viscosidad 397.7 P

Deseabilidad 0.896

Estos valores se proponen como las concentraciones óptimas para CVC 2%, faltando realizar las corridas confirmatorias del modelo.

Tabla 21. Predicción de las respuestas

Respuesta	Predicción	95% CI bajo	95% CI alto	95% PI bajo	95% PI alto	95% TI bajo	95% TI alto
Fuerza (N)	0.184	0.180	0.188	0.174	0.195	0.163	0.206
Viscosidad (P)	397.7	382.8	412.5	368.0	427.4	337.5	457.9

No se obtuvo un valor de F mayor al de Canesten® $V F = 0.1915$, $\sigma = 0.007104$

Canesten® V es el medicamento innovador, tiene como excipientes: alcohol bencílico palmitato de cetilo, alcohol cetoestearílico, polisorbato 60, monoestearato de sorbitán, 2-octildodecanol y agua. Su formulación no presenta polímeros mucoadhesivos. Sin embargo, en el estudio de mucoadhesión realizado, la interacción que esta fórmula presenta con la mucosa no es superada por CVC 2%, que tiene polímeros de ácido acrílico Carbopol® 974P y Noveon® AA-1 como agentes de mucoadhesión. Por lo que, no se cumple con la hipótesis que plantea que los polímeros evaluados permitirían obtener una fórmula con un valor de fuerza mayor al de Canesten V en el estudio de mucoadhesión.

8 CONCLUSIONES.

Con el polímero Pemulen™ TR-1 NF como único emulsionante, no se obtiene una formulación de CVC2% estable, sin separación de fases en la prueba de centrifuga. Al aumentar la concentración de Pemulen™ TR-1NF, la separación de fases, disminuye, sin embargo no se evita ni con la máxima concentración del emulsionante recomendada por los fabricantes (0.5%)(Lubrizol, 2013).

Se obtiene una formulación de CVC 2% estable, con Tween 60 al 0.5% w/w independientemente de la concentración de Polímero Pemulen®TR-1 NF.

Con el estudio de estabilidad realizado, se cumple con el objetivo de obtener una fórmula físicamente estable de CVC2%, que contiene Pemulen™TR-1NF (0.5% w/w) y Tween 60 (0.5% w/w).

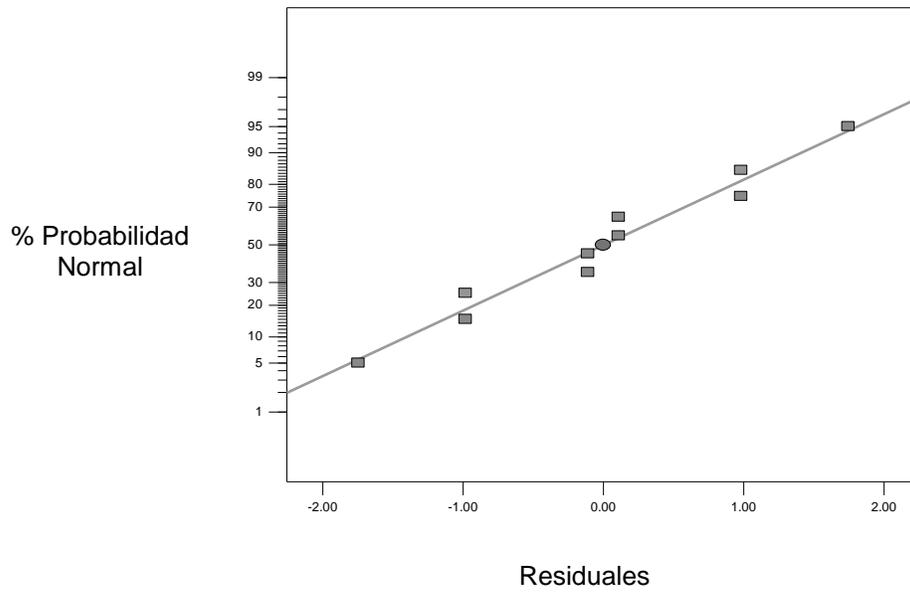
Del estudio de mucoadhesión se obtuvo, que a mayor concentración de polímero Carbopol® 974P mayor valor de fuerza a cualquier concentración de Noveon ® AA-1. Se desarrolló una fórmula de Clotrimazol 2% Crema Vaginal, con las concentraciones óptimas de Carbopol® 974P (1% w/w) y Noveon ® AA-1 (0.3% w/w) a las cuales se obtiene un valor máximo de fuerza en el estudio de mucoadhesión realizado y con un valor de viscosidad predicho.

No se logró obtener una fórmula con un valor de fuerza mayor al de Canesten V.

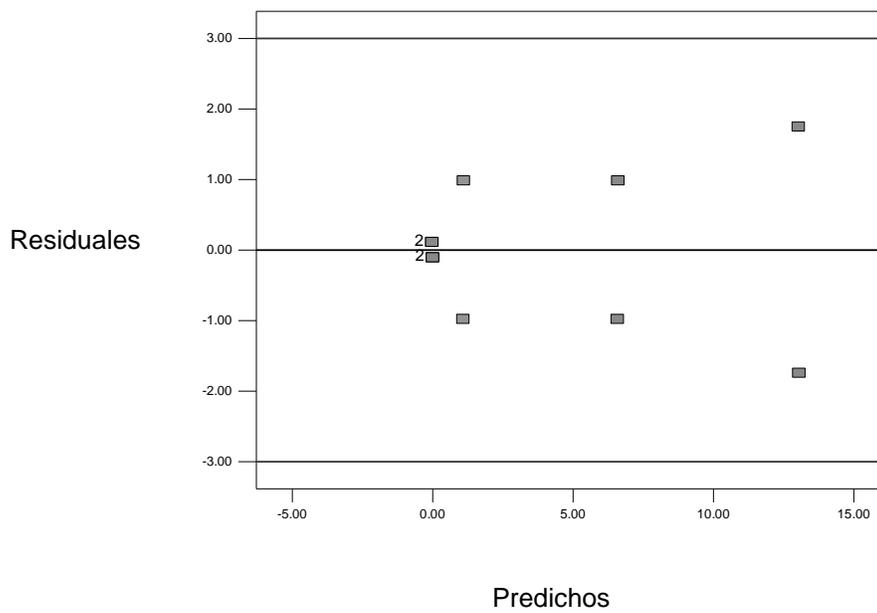
9 ANEXOS

9.1 VERIFICACIÓN DE SUPUESTOS ESTUDIO DE ESTABILIDAD

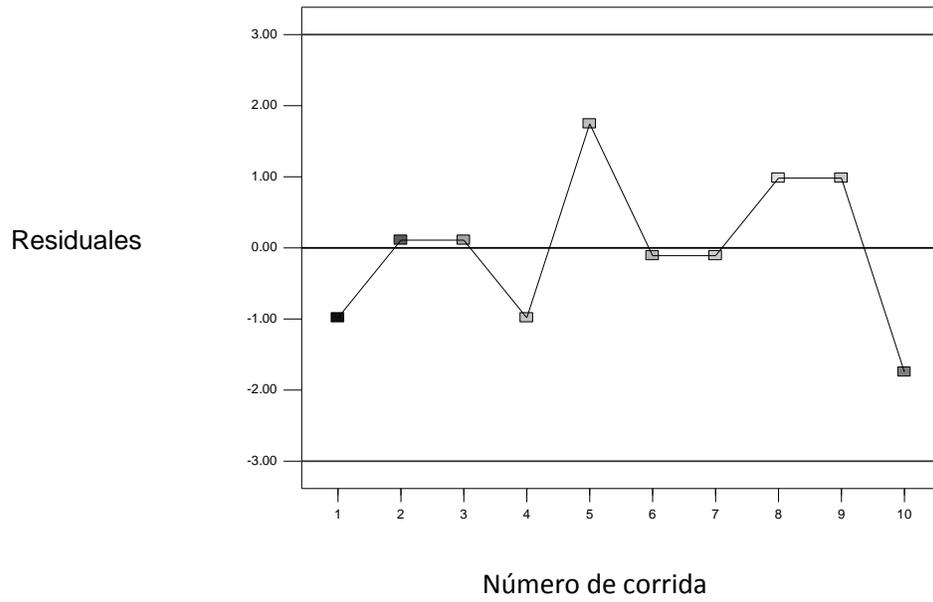
Gráfico de probabilidad normal.



Residuales vs. Predichos.

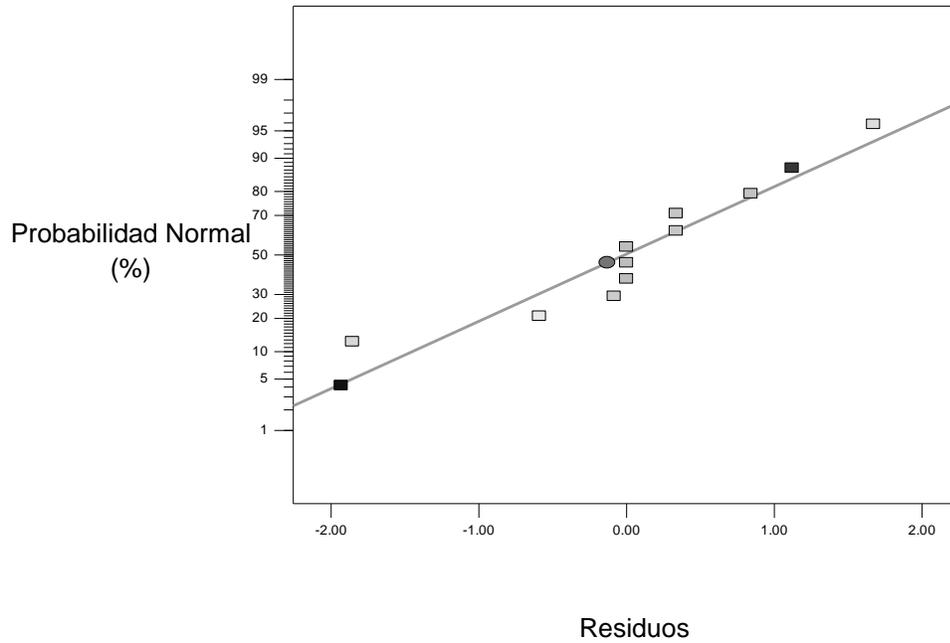


Residuos vs corrida.

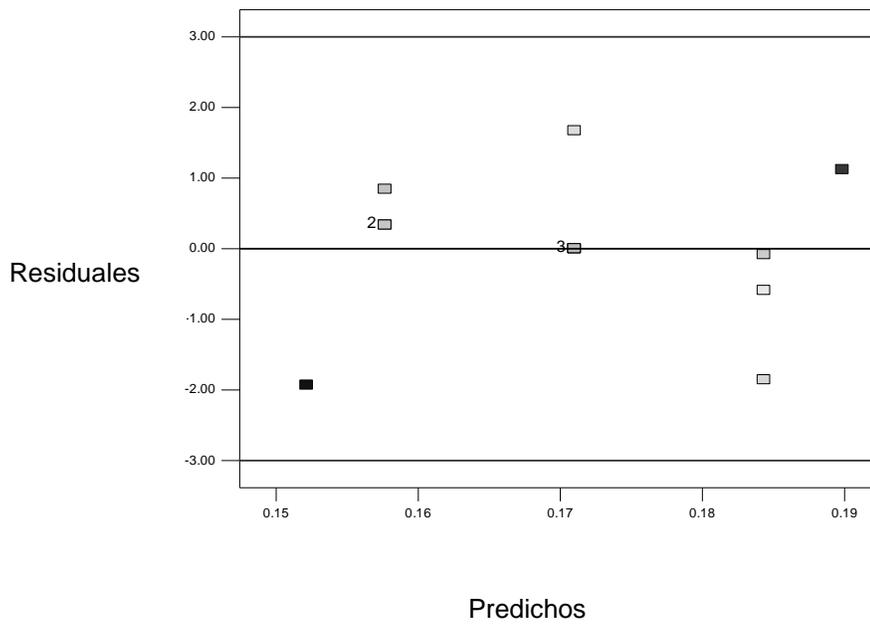


9.2 VERIFICACIÓN DE SUPUESTOS ESTUDIO DE MUCOADHESIÓN

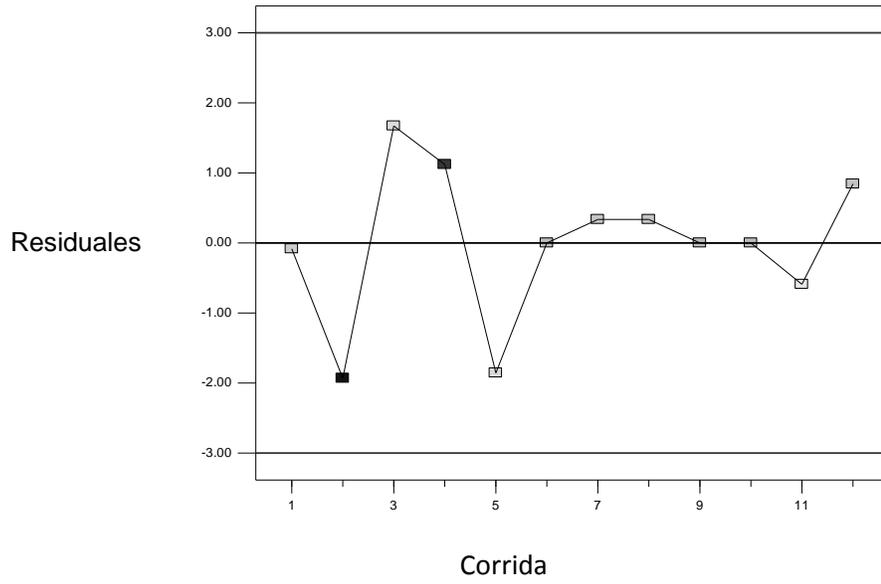
Gráfica Normal de Residuales.



Residuales vs. Predichos.

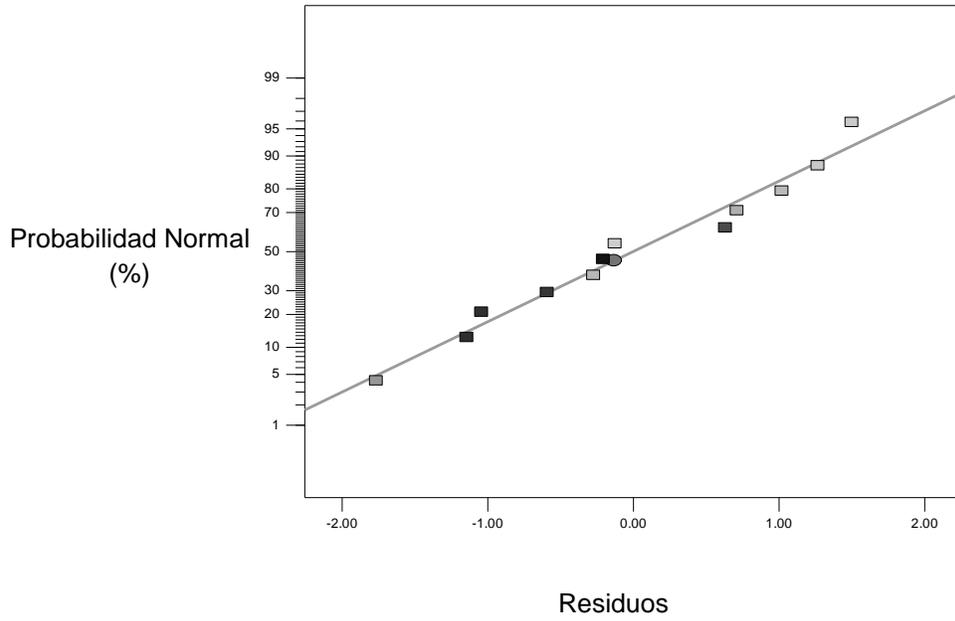


Residuales vs. Corrida.

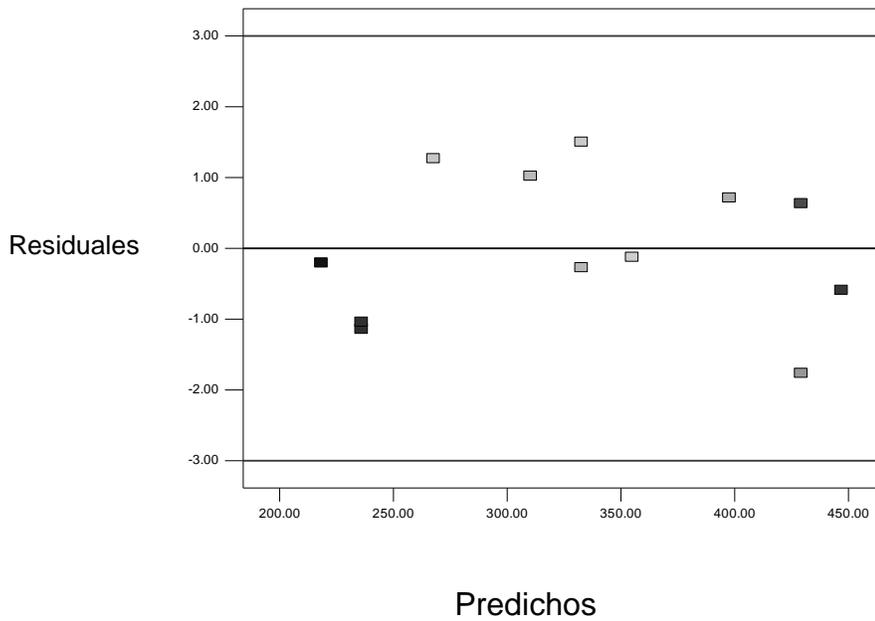


9.3 VERIFICACIÓN DE SUPUESTOS ESTUDIO DE VISCOSIDAD

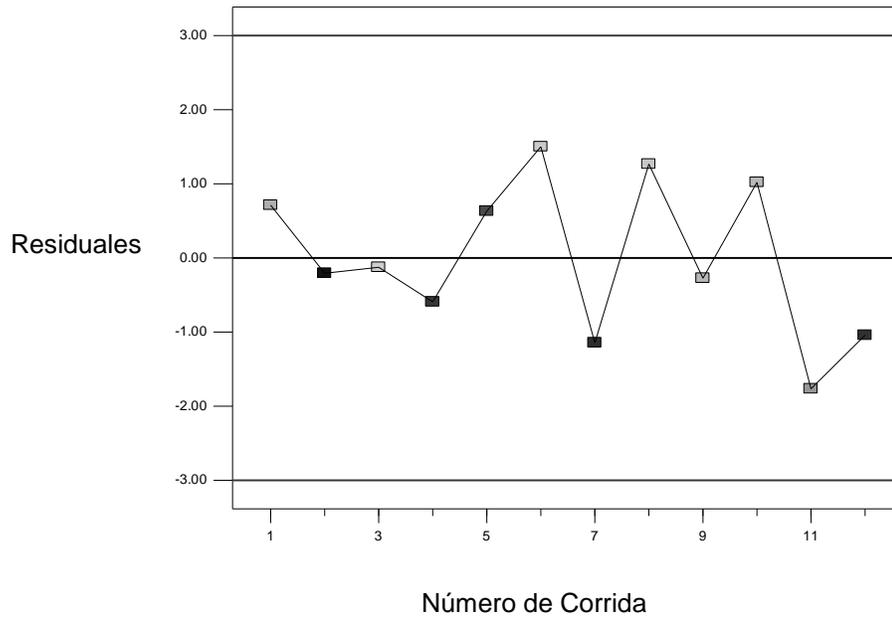
Gráfica Normal de Residuales.



Residuales vs. Predichos.



Residuales vs. Corrida.



10 REFERENCIAS

1. **Armiñana E. L.** Docvadis [En línea]. - 2013. - 12 de Septiembre de 2013. - <http://www.docvadis.es>.
2. **Aulton M. E.** Farmacia la ciencia del diseño de las formas farmacéuticas [Libro]. - España : Elsevier, 2004.
3. **BAYER** [En línea]// Canesten V. - 2009. - 10 de Marzo de 2014. - <http://www.canestenv.com.mx/scripts/pages/es/inicio/index.php>.
4. **Brown J. [y otros]** Spreading and retention of vaginal formulations in post-menopausal women as assessed by gamma scintigraphy [Publicación periódica]. Pharm Res., 1997. - Vol. 14.
5. **Buhse L. [y otros]** Topical drug classification [Publicación periódica]. International Journal of Pharmaceutical Sciences, 2005.
6. **Carvalho F. C. [y otros]** Mucoadhesive drug delivery systems [Publicación periódica]. Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences , 2010. - Vol. 46.
7. **Chang J. Y. [y otros]** Prolonged antifungal effects of clotrimazole-containing mucoadhesive thermosensitive gels on vaginitis [Publicación periódica]. - Corea del Sur : Journal of Controlled Release, 2002. - Vol. 82.
8. **Chopra S. [y otros]** Optimisation of polyherbal gels for vaginal drug delivery by Box-Behnken statistical design [Publicación periódica]. - India : European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics , 2007. - Vol. 67.
9. **Clarke's, Widdop B. y Osselton D.** Analysis of drugs an poisons [Libro]. Pharmaceutical Press, 2004.
10. **Crescenti J. V.** Crescenti [En línea]. - 2013. - 8 de Octubre de 2013. - <http://www.crescenti.com.ar/>.
11. **Fernández A. y Fernández M.** El pH y su importancia clínica [Publicación periódica]. - Barcelona : Ginecología y Obstreticia Clínica, 2004. - Vol. 5.
12. **Food and Drug Administration FDA** [En línea]. - 23 de Octubre de 2013. - 9 de Noviembre de 2013. - www.accessdata.fda.gov.
13. **Garg S. [y otros]** Compendium of Pharmaceutical Excipients for Vaginal Formulations [Publicación periódica]. - India : Pharmaceutical Technology Drug Delivery, 2001.
14. **Goodman y Gilman** Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica [Libro]. Mc Graw Hill, 2011.

15. **Gutiérrez Pulido H. y De la Vara Salazar R.** [Sección del libro] Análisis y Diseño de Experimentos. - México : Mc Graw Hill, 2008.
16. **Han I. K. [y otros]** Thermosensitive and mucoadhesive delivery systems [Publicación periódica]. - Corea , 2006. - Vol. 38.
17. **Hussain A. y Ahsan F.** The vagina as a route for systemic drug delivery [Publicación periódica]. Journal of Controlled Release, 2005. - Vol. 103.
18. **Ibrahim Salama isalama** [En línea]. - 17 de mayo de 2011. - 17 de marzo de 2014. - [http://isalama.wordpress.com/article/corrosion-inhibitors-in-the-oilfield-3uf3kbflInswt-4/..](http://isalama.wordpress.com/article/corrosion-inhibitors-in-the-oilfield-3uf3kbflInswt-4/)
19. **Ivarsson David y Wahlgren Marie** Comparison of in vitro methods of measuring mucoadhesion: Ellipsometry,tensile strength and rheological measurements [Publicación periódica]. - Suecia : Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2012. - Vol. 92.
20. **Junginger H. E., Verhoef J. y Thanou M.** Encyclopedia of Pharmaceutical Technology [Publicación periódica]. - E.U.A : Informa Healthcare USA, 2007.
21. **Kast C. E., Valenta C. y Leop M.** Design and in vitro evaluation of a novel bioadhesive vaginal [Publicación periódica]. - Austria : Institute of Pharmaceutical Technology and Biopharmaceutics University of Vienna, 2002. - Vol. 81.
22. **Koda Kimble Mary Anne [y otros]** Applied Therapeutics [Libro]. The Point, 2008.
23. **Lewis G. A., Mathieu D. y Phan-Tan-Luu R.** Pharmaceutical Experimental Design [Publicación periódica]. - Nueva York : Marcel Dekker Inc, 1999.
24. **Lubrizol** Pharmaceutical Literature Bulletins [En línea]. - 2013. - 11 de Septiembre de 2013. - <http://www.lubrizol.com/Pharmaceutical/Literature/Bulletins.html>.
25. **Mertha S. [y otros]** Vaginal distribution and retention of a multiparticulate drug delivery system,assessed by gamma scintigraphy and magnetic resonance imaging [Publicación periódica]. International Journal of Pharmaceutics , 2012. - Vol. 426.
26. **Muñoz Martinez E. y García X.** Fisiología células, órganos y sistemas [Libro]. - México : Fondo de Cultura Económica, 1997.
27. **Neves J. D., Amaral M. H. y Bahia M. F.** Performance of an in vitro mucoadhesion testing method for vaginal semisolids: influence of different testing conditions and instrumental parameters [Publicación periódica]. - Portugal : Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 2008. - Vol. 69.
28. **Nielloud Françoise y Marti-Mestres Gilberte** Pharmaceutical Emulsions and Suspensions [Libro]. - EUA : Drugs and the pharmaceutical sciences, 2000.

29. **Nyirjesy Paul y Sobel Jack D.** Vulvovaginal candidiasis [Publicación periódica] // Obstet Gynecol Clin N Am 30. Obstet Gynecol Clin, 2003. - Vol. 30. - págs. 671– 684.
30. **Owen D. H. y Katz A.** Vaginal Fluid Simulant [Publicación periódica]. - EUA : Elsevier Science Inc., 1999.
31. **Pliszczaka b,, D. [y otros]** Mucoadhesion evaluation of polysaccharide gels for vaginal application by using rheological and indentation measurements [Publicación periódica. - Francia : Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2012. - Vol. 92. - págs. 168– 174.
32. **Poelvoorde N. [y otros]** In vivo evaluation of the vaginal distribution and retention of a multi-particulate pellet formulation [Publicación periódica]. - Belgica : Eur J Pharm Biopharm, 2009. - 73 : Vol. 2.
33. **Remington** The Science and Practice of Pharmacy [Libro]. Pharmaceutical Press, 2013.
34. **Rivera Sánchez Roberto, Flores Paz Rocío y Arriaga Alba Myriam** Identificación de especies de Candida causantes de vaginitis en la población mexicana [Publicación periódica]. - México : Enfermedades Infecciosas Microbiología Clínica , 2006. - Vol. 24. - págs. 634-6.
35. **Rodríguez I., Cerezo A. y Salem I.** Sistemas de liberación Bioadhesivos [Publicación periódica]. - Granada : Ars Pharmaceutica, 2000.
36. **Rosa María I. [y otros]** Weekly fluconazole therapy for recurrent vulvovaginal candidiasis: a systematic review and meta-analysis [Publicación periódica]. European Journal of Obstetrics and Gynecology and Reproductive Biology, 2013. - Vol. 167.
37. **Rowe M. I, Sheskey P. J. y Quinn M. E.** Handbook of Pharmaceutical Excipients [Publicación periódica]. - Londres : Pharmaceutical Press and American Pharmacists Association, 2009.
38. **Santos Ramos B. y Guerrero Aznar M. D.** Administración de Medicamentos Teoría y Práctica [Libro]. - España : Ediciones Díaz de Santos, 1994.
39. **Santos Sara S. [y otros]** Formulation and in vitro evaluation of coconut oil-core cationicnanocapsules intended for vaginal delivery of clotrimazole [Publicación periódica]. Colloids and Surfaces B:Biointerfaces, 2014. - Vol. 116. - págs. 270– 276.
40. **Secretaría de Salud** Diagnostico y Tratamiento de Candidosis Vulvovaginal en mujeres mayores a 12 años de edad [En línea].- 2010.- 9 de Enero de 2014. - www.cenetec.salud.gob.mx/interior/gcp.html.
41. **Secretaría de Salud** Dirección General de Epidemiología [En línea]. - 21 de Marzo de 2013. - 20 de Enero de 2014. - www.epidemiologia.salud.gob.mx.
42. **Secretaría de Salud** Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos [Libro]. - México, 2013.

43. **Shaikh R. [y otros]** Mucoadhesive drug delivery systems [Publicación periódica]. Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences, 2011.
44. **Tamburic S. y Craig D. Q.** An investigation into the rheological, dielectric and mucoadhesive properties of poly(acrylic acid) gel systems [Publicación periódica]. - Londres : Journal of Controlled Release, 1995. - Vol. 37.
45. **Valenta C.** The use of mucoadhesive polymers in vaginal delivery [Publicación periódica]. - Austria : Advanced Drug Delivery Reviews, 2005. - Vol. 57.
46. **Walewijka A., Cooper White J. y Dunstan D.** Adhesion measurements between alginate gel surfaces via texture analysis [Publicación periódica]. Food Hydrocolloids, 2008. - Vol. 22.
47. **Wells James** The Physicochemical Properties of Drug Substances [Libro]. - EUA : John Willey & Sons, 1990.
48. **Wolf D. P. y Sokoloski J. E.** Composition and Funtion of Human Cervical Mucus [Publicación periódica]. Biochimica et Biophysica Aeta, 1980. - Vol. 630.