



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

Preparación y caracterización de nanopartículas
poliméricas de clotrimazol por el método de
desplazamiento del solvente para aplicación vaginal.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

P R E S E N T A N:

OLIVA REYES GONZÁLEZ

MÓNICA RIVERA GARCÍA

ASESORA:

DRA. ELIZABETH PIÑÓN SEGUNDO



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES**

ASUNTO: VOTO APROBATORIO

**M. EN C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE**

**ATN: M. EN A. ISMAEL HERNÁNDEZ MAURICIO
Jefe del Departamento de Exámenes
Profesionales de la FES Cuautitlán.**

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos a comunicar a usted que revisamos el: Trabajo de Tesis

Preparación y caracterización de nanopartículas poliméricas de clotrimazol por el método de desplazamiento del solvente para aplicación vaginal

Que presenta la pasante: Oliva Reyes González

Con número de cuenta: 304033355 para obtener el Título de: Química Farmacéutica Bióloga

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

ATENTAMENTE

“POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU”

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 07 de abril de 2014.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Dr. David Quintanar Guerrero	
VOCAL	Dr. Rafael Villalobos García	
SECRETARIO	Dra. Elizabeth Piñón Segundo	
1er. SUPLENTE	M. en C. Miriam Aidé Castillo Rodríguez	
2do. SUPLENTE	M. en C. Ma. Guadalupe Nava Arzaluz	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES**

ASUNTO: VOTO APROBATORIO

FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES CUAUTITLÁN



**M. EN C. JORGE ALFREDO CUELLAR ORDAZ
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE**

**ATN: M. EN A. ISMAEL HERNANDEZ MAURICIO
Jefe del Departamento de Exámenes
Profesionales de la FES Cuautitlán.**

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos a comunicar a usted que revisamos el: Trabajo de Tesis

Preparación y caracterización de nanopartículas poliméricas de clotrimazol por el método de desplazamiento del solvente para aplicación vaginal

Que presenta la pasante: Mónica Rivera García

Con número de cuenta: 304033991 para obtener el Título de: Química Farmacéutica Bióloga

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

ATENTAMENTE

"POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 07 de Abril de 2014.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Dr. David Quintanar Guerrero	
VOCAL	Dr. Rafael Villalobos García	
SECRETARIO	Dra. Elizabeth Piñón Segundo	
1er. SUPLENTE	M. en C. Miriam Aidé Castillo Rodríguez	
2do. SUPLENTE	M. en C. Ma. Guadalupe Nava Arzaluz	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Sistemas Farmacéuticos de Liberación Modificada (L-13) de la Unidad de Investigación Multidisciplinaria y en el Laboratorio de Investigación y Posgrado en Tecnología Farmacéutica ubicados en la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, de la UNAM.

Investigación realizada gracias a los Programas:

UNAM-DGAPA-PAPIIT-IT 203614

UNAM-DGAPA-PAPIIT-IN 224111

CONACYT Ciencia Básica 128799

Cuando la muerte se precipita sobre el hombre,
la parte mortal se extingue,
pero el principio inmortal se retira y se aleja sano y salvo". Platón

A la familia Rivera García por ser un ejemplo de unión, amor y porque sé que este logro no solo es mío, detrás de todo lo que hago siempre están ustedes apoyando cada una de mis metas y pruebas en esta vida. Extiendo esta dedicatoria también a las personas que ya no están entre nosotros sé que en donde quiera que estén mi alegría también es la suya.

Mony

A la memoria de Edgar Jonathan Soto Júha
Por todas esas risas, los lindos detalles, el cariño y el apoyo,
Por motivarme cada día a ser mejor persona, más humana y mejor profesionalista.
Por la enorme lección que me dejó tu partida.

Oliva

AGRADECIMIENTOS

A **Díos** por darme la oportunidad de estar en este maravilloso mundo, porque cada mañana me das la fuerza necesaria para salir adelante. Gracias por permitirme terminar una de mis más anheladas metas por la vida, por mantener conmigo a mi familia, porque hasta el día de hoy me has llenado de bendiciones y haces que mi vida sea maravillosa.

A **mis padres** con admiración y respeto por ser el modelo de fortaleza y constancia, gracias por todo lo que me han dado, su amor y sus sacrificios y por haberme formado como mujer, profesionista y ser humano. Que afortunada soy de tenerlos conmigo.

A **mi papá Luis Rivera** porque eres un vivo ejemplo de un hombre trabajador, de sacrificio, que trata a su familia con mucho cariño. Gracias por guiarme por buen camino, por corregirme cuando he estado equivocada y por enseñarme y compartirme lo que tú sabes. **TE AMO**

A **mi mamá Ana María García** Por ser una mujer valiente, la única que me da el más puro e inalterable amor incondicional; no agotas nunca tus ganas de amarme y jamás, jamás me lo dejaras de demostrar. Gracias por creer siempre en mí, por compartir todas mis alegrías y ayudarme en mis tristezas. **TE AMO**

A **mi hermano Luis Antonio Rivera** gracias por apoyarme siempre, por tu cariño y porque me escuchas cuando lo necesito, te debo mucho de lo que he aprendido. Gracias por tus regaños me han hecho parte de lo que soy por siempre defenderme y darme protección al ser tu hermanita menor, además de todo eso eres mi amigo que a pesar de la diferencia de edad me entiendes a la perfección. Estoy muy orgullosa de ti y soy muy afortunada de tener alguien como tú a mi lado. **TE AMO**

A **Selene Cervantes** muchas gracias por soportar a mi hermano, bueno no, ya hablando en serio; muchas gracias por motivarme a cumplir mis metas, gracias por el gran regalo que nos diste, ese pequeñito que alegra la casa. Gracias por tener siempre una palabra de aliento, un consejo y el apoyo a mí y a toda la familia.

A **Ian Axel Rivera Cervantes** por regalarme día a día una sonrisa y ser una motivación más a mi vida. Llegaste justo en el momento indicado y nos cambiaste la vida a todos, quiero que sepas que tu "tía" está a tu disposición para cuando la necesites, cada duda, cada momento, cada decisión que debas discutir sabes que estaré ahí para ti, primero los consejos de tus padres y después los consejos de la tía Mony. **TE AMO**

A **Oliva Reyes**, gracias por tu amistad, por apoyarme y por escucharme, eres una persona admirable y dedicada, sé que podre confiar en ti siempre. Gracias por tu compañerismo y paciencia en este proyecto encaminado a un solo objetivo cumplir nuestra meta titularnos. Sabes que aquí siempre tendrás a una amiga para lo que necesites. Te quiero mucho.

A **toda mi familia**, abuelos, tíos, primos y sobrinos que de alguna manera siempre me alentaron a cumplir mis sueños. Gracias

A **mis amigos** no es necesario poner nombres y además no quiero que me falte ninguno, a los que me han acompañado por años, los que conocí durante mi desarrollo académico gracias por las lecciones de vida, por ser mi apoyo en todo momento, por brindarme una palabra de aliento y porque bien se dice que los amigos son los hermanos que elegimos nosotros mismos. A todos ellos muchas gracias.

En este momento quisiera poner a tanta gente que de una u otra forma estuvieron conmigo apoyándome, a toda esa gente que en mí confió. Gracias.

Con cariño Mónica.

AGRADECIMIENTOS

Primero que nada le doy gracias a **Dios** por permitirme llegar a este momento, por todas las bendiciones que me ha dado y por llenarme de fuerza para librar los obstáculos que se me han presentado a lo largo de la vida.

A las personas que hicieron todo en la vida para que yo pudiera lograr mis sueños. **A mi mamá Caty**, por tus desvelos, tu apoyo incondicional y los enormes sacrificios que hiciste para apoyarme y alentarme cada vez que todo iba mal, gracias por la confianza mami y por estar siempre para mí. **A mi papá Octaviano** por enseñarme a ser independiente, por inculcarme importantes valores y por enseñarme a luchar por mis metas. Este logro es tan mío como suyo. Ustedes son mi fortaleza y el motor de mi vida. Los amo inmensamente.

A mi hermano Billy, por ser como un segundo padre, además de amigo, por motivarme a ser mejor cada día y porque a pesar de la distancia siempre he sentido tu presencia.

A mi hermana Mariana y su esposo Juan José, por todo su apoyo en momentos difíciles. Ustedes son parte importante de este logro.

A mi hermana Gaby porque a pesar de llevar toda una vida de peleas y rivalidades, siempre te he admirado mucho, eres mi ejemplo a seguir, estoy orgullosa de lo que eres y lo que has logrado. Te quiero mucho sonzi.

A mis sobrinitos Andy, Majo, Danae, Alexander, Katy y Lalo por siempre estar ahí para regalarme una sonrisa y darme mil motivos para ver el lado positivo de las cosas.

A mis primos y amigos les doy las gracias por escuchar mis sueños, animarme a luchar por ellos y acompañarme en el camino. Por prestarme sus oídos, secar mis lágrimas y arrebatarme carcajadas. Ustedes fueron testigos de mis caídas y estuvieron ahí para ayudar a levantarme, los quiero infinitamente porque en determinado momento todos y cada uno ha fungido como un hermano más en mi vida.

A Mony, amiga y compañera en este camino, gracias por el apoyo, por los buenos momentos, porque a pesar de las situaciones difíciles pudimos concretar esto y salir bien libradas de las diferencias que tuvimos. Gracias por tu paciencia y comprensión. Te deseo mucho éxito en todo, siempre.

Con cariño y admiración, Oliva

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Agradecemos infinitamente a la institución, a la FESC y a sus profesores por formarnos humana y profesionalmente a lo largo de estos años.

A la **Doctora Elizabeth Piñón Segundo**, mujer admirable, íntegra y un ejemplo a seguir, que además de lo profesional nos permitió conocer su lado humano, le agradecemos los conocimientos que compartió con nosotros, el apoyo incondicional, la paciencia y su comprensión. Es un ejemplo para nosotros de dedicación, por eso hoy sabemos que con esmero y dedicación se cumplen los objetivos que uno se propone.

A la **Doctora Adriana Ganem Rondero** y al **Doctor David Quintanar** por abrirnos las puertas del laboratorio de posgrado y permitírnos hacer uso de sus equipos para realización de nuestro proyecto.

A **nuestros sínodales** los cuales nos apoyaron dándonos consejos para el mejoramiento de este proyecto.

Con Admiración Mónica y Oliva

ÍNDICE

Índice	I
Índice de figuras	IV
Índice de tablas	VI
Abreviaturas	VIII
Resumen	X
I. MARCO TEÓRICO	1
1. Sistemas de liberación modificada	1
2. Acarreadores farmacéuticos	2
3. Definición de nanotecnología	2
4. Definición y clasificación de nanopartículas	2
5. Métodos de preparación de nanopartículas	4
5.1. Emulsificación-evaporación del solvente	6
5.2. Nanoprecipitación (Desplazamiento del solvente)	8
5.3. <i>Salting-out</i>	10
5.4. Emulsificación-Difusión	12
5.5. <i>Spray-drying</i>	14
6. Caracterización de nanopartículas	15
6.1. Espectroscopía de correlación fotónica (PSC)	16
6.2. Microscopía electrónica de barrido (SEM)	17
6.3. Microscopía de transmisión electrónica (TEM)	17
6.4. Potencial Z	17
6.5. Calorimetría diferencial de barrido (DSC)	18
6.6. Difracción de rayos X	18
7. Sistema reproductor femenino	19
7.1. Órganos genitales externos	19
7.1.1. Vulva	19
7.1.2. Monte del pubis	19
7.1.3. Labios mayores	19

7.1.4. Labios menores	20
7.1.5. Himen	20
7.1.6. Clítoris	20
7.2. Órganos genitales internos	20
7.2.1. Ovarios	20
7.2.2. Trompas uterinas	20
7.2.3. Útero	21
7.2.4. Vagina	21
7.2.4.1. Vascularización	22
7.2.4.2. Flora vaginal y pH	23
7.3. Vaginitis	25
7.4. Vaginosis bacteriana	26
7.5. Candidiasis vaginal	26
7.6. Vaginosis por tricomonas	27
8. La vagina como vía de administración para formas farmacéuticas no convencionales	30
8.1. Bioadhesivos y Mucoadhesivos	30
9. Clotrimazol (1-((2-clorofenil)difenilmetil)-1H-imidazol)	32
9.1. Acción antimicrobiana	32
9.2. Indicaciones y administración	32
9.3. Mecanismo de acción	32
9.4. Farmacocinética	33
10. Acetato Ftalato de Celulosa (CAP)	33
II. OBJETIVOS	34
1. Objetivo general	34
2. Objetivos particulares	34
III. Materiales y métodos	35
1. Materiales	35
2. Determinaciones Previas	36

3. Preparación de nanopartículas con carga de principio activo	37
4. Preparación de la curva de calibración de clotrimazol	38
5. Determinación de clotrimazol en nanopartículas	38
6. Preparación de la curva de PVA	38
7. Determinación del PVA residual	38
8. Estudios de liberación <i>in-vitro</i>	39
IV. Resultados y discusión	40
V. Conclusiones	73
VI. Referencias	74
VII. Anexos	80

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Sistemas de liberación modificada	1
Figura 2. Representación esquemática de una nanocápsula y una nanoesfera	3
Figura 3. Métodos de preparación de nanopartículas	5
Figura 4. Preparación de una doble emulsión W/O/W	6
Figura 5. Representación esquemática del método de Emulsificación-Evaporación del solvente	7
Figura 6. Representación esquemática del método de Nanoprecipitación	9
Figura 7. Representación esquemática del método <i>salting-out</i>	11
Figura 8. Representación esquemática del método Emulsificación-Difusión	13
Figura 9. Representación esquemática del método de fluidos supercríticos	14
Figura 9. Órgano genital femenino	22
Figura 11. Estructura del clotrimazol	32
Figura 12. Estructura del Acetato ftalato de celulosa	33
Figura 13. Espectro de absorción ultravioleta de clotrimazol en solución amortiguadora de fosfatos pH=5.0.	40
Figura 14. Espectro de absorción ultravioleta de clotrimazol en solución amortiguadora de fosfatos pH=5.0 con 5 % p/v de Tween® 20	41
Figura 15. Gráficas del ajuste unimodal del tamaño de partícula usando como estabilizante Pluronic® F-68.	44
Figura 16. Gráficas del ajuste unimodal del tamaño de partícula usando como estabilizante Mowiol® 40-88	46
Figura 17. Gráficas del ajuste unimodal del tamaño de partícula usando como estabilizante Tween® 20	47
Figura 18. Gráficas del ajuste unimodal del tamaño de partícula usando como estabilizante Tween® 80	48
Figura 19. Gráficas del ajuste unimodal del tamaño de partícula utilizando como estabilizante Pluronic® F-68 al 1.5 % (p/v).	52
Figura 20. Graficas del ajuste unimodal del tamaño de partícula de los lotes de 75 mL utilizando como estabilizante Mowiol® 40-88 al 0.5 % (p/v)	53
Figura 21. Gráficas del ajuste unimodal del tamaño de partícula de los lotes de 375 mL utilizando como estabilizante Pluronic® F-68 al 1.5 % (p/v)	56

Figura 22. Gráficas del ajuste unimodal del tamaño de partícula de los lotes de 375 mL utilizando como estabilizante Mowiol® 40-88 al 0.5 % (p/v)	57
Figura 23. Gráficas del ajuste unimodal del tamaño de partícula modificando la fase orgánica.	59
Figura 24. Termograma de los componentes del lote de Mowiol® 40-88 usando 100 mL de fase orgánica.	60
Figura 25. Gráficas del ajuste unimodal del tamaño de partícula de las nanopartículas de 30 y 60 % p/p de principio activo.	62
Figura 26. Distribución del potencial Zeta del lote de 30 % p/p de principio activo.	64
Figura 27. Distribución del potencial Zeta del lote de 60 % p/p de principio activo.	64
Figura 28. Termograma de los lotes de 30 y 60 % p/p de principio activo y los componentes de la formulación.	67
Figura 29. Gráfica del porcentaje de clotrimazol liberado en función del tiempo. Lote de 30 % p/p de principio activo n=3.	68
Figura 30. Gráfica del porcentaje de clotrimazol liberado en función del tiempo. Lote de 60 % p/p de principio activo n=3.	68

ÍNDICE DE TABLAS.

Tabla 1. Formulaciones de nanopartículas poliméricas por el método de evaporación del disolvente	8
Tabla 2. Formulaciones de nanopartículas poliméricas por el método de Nanoprecipitación	10
Tabla 3. Formulaciones de nanopartículas poliméricas por el método de <i>salting-out</i>	12
Tabla 4. Métodos de caracterización de nanopartículas	16
Tabla 5. Flora vaginal normal en mujeres en edad reproductiva	25
Tabla 6. Tipos comunes de vaginitis	28
Tabla 7. Tratamiento de candidiasis vulvovaginal	29
Tabla 8. Tratamientos recomendados para vaginosis bacteriana	29
Tabla 9. Sistemas preparados para la elección del estabilizante y su concentración, así como la del polímero	37
Tabla 10. Solubilidades para evaluar principios activos y polímero	40
Tabla 11a. Tamaños de partícula de los diferentes sistemas variando las concentraciones de polímero y estabilizante (Análisis <i>Intensity Peak</i>).	42
Tabla 11b. Tamaños de partícula de los diferentes sistemas variando las concentraciones del polímero y estabilizante (Análisis <i>Intensity Peak</i>).	43
Tabla 12a. Observaciones físicas de cada sistema de Pluronic® F-68 y Tween® 20 (color, aspecto con o sin presencia de agregados) justo en el momento de su preparación	48
Tabla 12b. Observaciones físicas de cada sistema Tween® 80 y Mowiol 40-88 (color, aspecto, con o sin presencia de agregados) en el momento de la preparación.	49
Tabla 13. Tamaños de partícula usando como estabilizante Pluronic® F-68 y Mowiol® 40-88 (Analysis <i>Intensity Peak</i>)	51
Tabla 14. Resultados del tamaño de partícula para lotes de Pluronic® F-68 y Mowiol® 40-88	54
Tabla 15. Tamaños de partícula de los lotes modificando la cantidad de fase orgánica.	58
Tabla 16. Tamaños de partícula de los lotes con 30 y 40 % p/p de principio activo.	61
Tabla 17. Potencial zeta de los lotes de 30 y 60 % p/p de principio activo	63
Tabla 18. Cuantificación de los lotes de 30 y 60 % p/p de principio activo.	65
Tabla 19. Constantes de liberación y el coeficiente de correlación de las ecuaciones de los modelos aplicados del lote de 30 % p/p de principio activo (n=3).	68

Tabla 20. Constantes de liberación y el coeficiente de correlación de las ecuaciones de los modelos aplicados del lote de 60 % p/p de principio activo (n=3).	70
Tabla 21. Valores de “n” (Korsmeyer-Peppas).	71

ABREVIATURAS

CAP	Acetato ftalato de celulosa
CV	Coeficiente de variación
DE	Desviación estándar
DLS	Dispersión de luz dinámica
DPTP	Diámetro promedio del tamaño de partícula
DSC	Calorimetría diferencial de barrido
LD	Difracción de luz láser
mPEO	Polimonometoxi-(óxido de etileno)
NP	Nanopartículas
OP	Poliorganofosfaceno
PBCA	Polibutilcianoacrilato
PCA	Policianoacrilato
PCL	Poli (ϵ-caprolactona)
PDI	Índice de polidispersidad
PDLLA	Poli (D, L-Láctico)
PEG	Polietilenglicol
PEO	Polióxido de etileno
PEO- mPAE	Poli (óxido de etileno)-modificado-poli (β- aminoéster)
PHB	Polihidroxi butirato
PLA	Ácido poliláctico
PLGA	Ácido polilactico-co-glicólico

PS	Poliestireno
PSC	Espectroscopía de correlación fotónica
PTMC	Policarbonato de trimetileno
PVA	Alcohol polivinílico
SDS	Dodecil sulfato de sodio
SEM	Microscopía electrónica de barrido
TEM	Microscopía de transición electrónica
THF	Tetrahidrofurano
TP	Tamaño de partícula

RESUMEN

Las infecciones del aparato genital femenino son una de las principales causas de consulta médica, en mujeres en edad reproductiva. Algunas de estas infecciones son causadas por microorganismos de origen externo, en tanto que otras, se producen por gérmenes que forman parte de la flora habitual al producirse un cambio en las condiciones que mantienen el equilibrio de este microambiente. Para tratar este problema que inquieta a las mujeres existen diversos medicamentos, la mayoría antimicóticos y antibióticos en forma de pomada y óvulos vaginales y a su vez tabletas y cápsulas orales; para una administración convencional.

Hoy en día encontramos una nueva tecnología farmacéutica basada en nanosistemas y nanoacarreadores farmacéuticos, con los cuales se pretende liberar el principio activo en el sitio blanco y disminuir las desventajas de una administración convencional. Un ejemplo de estos sistemas son las nanopartículas poliméricas; las cuales se prepararan por diversos métodos, con la finalidad de disminuir la posibilidad de una liberación prematura del principio activo.

Con base en lo anterior, el objetivo de este trabajo fue preparar nanopartículas poliméricas usando como principio activo un antimicótico y a su vez caracterizarlas de acuerdo a tamaño, morfología, contenido de principio activo y la liberación del fármaco *in vitro*. El polímero utilizado posee una potente actividad microbica que puede ayudar a tratar con mayor eficiencia este tipo de problemas vaginales.

Con esta investigación se pretende tener una base sólida de estas nuevas tecnologías para mejorar la liberación de los principios activos incluidos en las nanopartículas, con respecto a las formas farmacéuticas convencionales de administración vaginal.

I. MARCO TEÓRICO

1. Sistemas farmacéuticos de liberación modificada.

Una forma farmacéutica de liberación modificada es aquella preparación farmacéutica cuya velocidad de liberación del principio activo es diferente a la de una forma farmacéutica convencional (RODRÍGUEZ, 2010). Teniendo en cuenta que la liberación de una forma farmacéutica convencional es aquella diseñada para liberar con rapidez toda la dosis de fármaco inmediatamente después de su administración.

En los sistemas de liberación modificada se incluyen todos aquellos cuyas modificaciones en el proceso tecnológico por el que son obtenidos determinan el lugar de liberación y la velocidad a la cual se libera el fármaco que contienen. Ejemplos:

Liberación retardada. Indica que el fármaco se libera global y masivamente, pero no de forma inmediata a su administración sino después de un tiempo prefijado; por ejemplo, comprimidos de revestimiento entérico (RODRÍGUEZ, 2000)

Liberación prolongada. Indica que el fármaco puede ser absorbido durante un tiempo más prolongado que cuando se administra con una forma farmacéutica convencional. Sin embargo, esto implica que la acción se retrasa ya que la liberación a partir de la forma farmacéutica es globalmente más lenta.

Liberación controlada. Son formas farmacéuticas que liberan el fármaco a velocidad constante y proporcionan concentraciones plasmáticas que permanecen invariables con el tiempo.

En la figura No. 1 se puede observar las diferencias en la concentración plasmática en función del tiempo para los diferentes sistemas de liberación de fármacos.

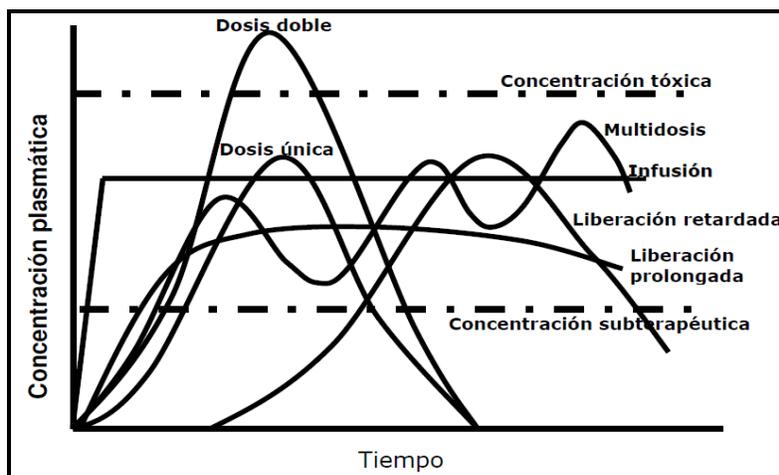


Figura 1. Sistemas de liberación modificada. Representación de la concentración plasmática (C_p) en función del tiempo de los sistemas de liberación de fármacos (ESTUDILLO, 2007)

2. Acarreadores farmacéuticos.

La idea de utilizar acarreadores farmacéuticos para liberar el principio activo en el sitio blanco surgió en 1906 por Paul Ehrlich, quien imaginó que pudieran desarrollarse sistemas que únicamente actuaran sobre un sitio específico depositando en él, la sustancia activa. Dentro de los sistemas acarreadores se encuentran los sistemas coloidales que por su pequeño tamaño de partícula, menor a una micra, facilitan el transporte de fármacos. Los sistemas coloidales incluyen los liposomas, sistemas micelares, microemulsiones, micropartículas y nanopartículas (RODRÍGUEZ, 2010). Todos estos son semejantes en tamaño y forma, no obstante debido a su estabilidad a largo plazo y su potencial escalamiento industrial, las nanopartículas se han posicionado como los acarreadores farmacéuticos más prometedores; muestra de ello es el elevado número de investigaciones destinadas a probar su efectividad (PIÑÓN, 2003).

Una de las aplicaciones de los sistemas coloidales es llevar el fármaco por las diferentes regiones del cuerpo en altas concentraciones hacia el lugar de infección, de la inflamación hacia tumores sólidos; por lo tanto se aumenta el tiempo de circulación y se disminuye la toxicidad del fármaco.

3. Definición de nanotecnología.

La Nanotecnología se define según la Iniciativa Nacional de Nanotecnología (NNI por sus siglas en inglés), como el estudio y el uso de estructuras más o menos en el rango de tamaño de 1 a 100 nm (MISHRA, 2009). El área farmacéutica incluye todo lo relacionado con el diseño, síntesis, manipulación y aplicación de formulaciones de agentes terapéuticos a nanoescala, para estos fines esta presenta un rango de 1- 1000 nm. Dentro de estos agentes terapéuticos encontramos las nanopartículas, soluciones micelares, dendrímeros, etc.; con los cuales se pretende suministrar fármacos hacia un tipo de células o tejidos específicos.

4. Definición y clasificación de nanopartículas poliméricas.

Las nanopartículas se definen como partículas sólidas coloidales que contienen una sustancia activa, pueden ser elaboradas por medios mecánicos o químicos. Hablando en términos de tamaño su límite inferior es de 5-10 nm y su límite superior de 1000 nm (QUINTANAR-GUERRERO, 1998).

Las características más importantes de las nanopartículas son su tamaño, la eficiencia de encapsulación, potencial zeta (carga superficial) y la liberación del fármaco (QUINTANAR-GUERRERO, 1998).

Dependiendo del proceso utilizado para su preparación, pueden obtenerse dos tipos de nanopartículas; las cuales se esquematizan en la fig. 2.

- Nanoesferas
- Nanocápsulas

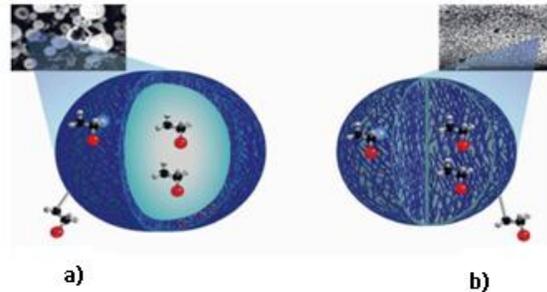


Figura 2. Representación esquemática de una a) nanocápsula y una b) nanoesfera (Piñón-Segundo *et al*, 2013)

Las nanoesferas tienen una estructura de tipo matricial en la que el fármaco se encuentra disperso, mientras que las nanocápsulas están compuestas de una membrana polimérica que rodea un núcleo oleoso el cual puede ser o contener el principio activo. Debido a que estos sistemas cuentan con áreas de superficie muy altas, el fármaco también puede ser adsorbido en la superficie de cualquiera de los dos tipos de nanopartículas.

Algunas de las propiedades de las nanopartículas para la administración de fármacos se enlistan a continuación:

- El proceso de fabricación debe ser sencillo y accesible. Para su consideración en el desarrollo de medicamentos, es preferible que el proceso de fabricación no incluya ingredientes potencialmente tóxicos. Todos los componentes de la formulación deben ser comercialmente disponibles, seguros, accesibles, no tóxicos y preferentemente biodegradables.
- Las nanopartículas deben ser estables con respecto al tamaño, morfología de la superficie, distribución de tamaño y otras propiedades físicas y químicas importantes como el potencial zeta, el contenido de principio activo, su liberación, etc. La formulación debe ser biocompatible.
- La formulación de nanopartículas debe asegurar una carga alta de fármaco y presentar muy baja posibilidad de una liberación prematura o fuga del fármaco.

5. Métodos de preparación de nanopartículas poliméricas.

Existen numerosos métodos para la fabricación de nanopartículas, lo que permite una amplia modulación de su estructura, composición y sus propiedades fisicoquímicas. La elección del método de fabricación depende esencialmente de la materia prima que se pretende usar y las características de solubilidad del principio activo que será asociado a las nanopartículas. Con respecto a la elección de la materia prima, deben tomarse en cuenta criterios tales como la biocompatibilidad, el comportamiento de la degradación, la elección de la vía de administración, el perfil de liberación deseado, y por último, el tipo de aplicación biomédica. A partir de estas consideraciones, es evidente que la formulación de nanopartículas requiere una definición inicial y muy precisa de las necesidades y objetivos a alcanzar. Históricamente, los primeros métodos usados para producir nanopartículas fueron derivados del campo de la ingeniería del látex desarrollado para polímeros químicos. Estos métodos estaban basados en la polimerización *in situ* de un monómero en diferentes medios. Los pioneros en este campo fueron Birrenbach y Speiser quienes produjeron en los años setenta las primeras nanopartículas polimerizadas para uso farmacéutico. Desde ese momento los métodos basados en la polimerización *in situ* han sido ampliamente desarrollados, lo que permite la obtención de una gran diversidad de formulaciones de nanopartículas, así como una mejor comprensión de los mecanismos implicados en estos procesos. A pesar de los avances tecnológicos reales en este campo, los métodos basados en la polimerización pueden presentar algunos inconvenientes y limitaciones, que han hecho necesario el desarrollo de nuevos métodos. Por lo tanto se han propuesto métodos alternativos basados en la dispersión de polímeros preformados bien caracterizados o macromoléculas naturales, ampliando el campo de posibilidades para las formulaciones de nanopartículas. Al igual que los métodos basados en la polimerización, estas nuevas técnicas permiten la producción de ambos sistemas: nanoesferas y nanocápsulas (JAEGHERE *et al*, 1999).

En nanotecnología los métodos sintéticos son los más desarrollados sobre la base de dos diseños, ya sea ingeniería de arriba hacia abajo o de abajo hacia arriba de los componentes individuales. El proceso de arriba hacia abajo implica empezar con un objeto más grande y dividirlo en nanoestructuras a través de grabado, pulido, o el molino de bolas. La técnica de abajo hacia arriba se refiere a la síntesis basada en el átomo por átomo o molécula por molécula de una manera controlada, que es regulada por medio termodinámico, el proceso se lleva a cabo a través de reacciones químicas controladas, ya sea en fase gaseosa o líquida, dando lugar a la nucleación y el crecimiento de las nanopartículas (MISHRA *et al*, 2009).

En general existen cuatro métodos para elaborar nanopartículas a partir de polímeros preformados; en la figura 3 se esquematizan estos métodos de preparación.

- Emulsificación- evaporación
- Desplazamiento del solvente o nanoprecipitación
- *Salting – out*
- Emulsificación- difusión

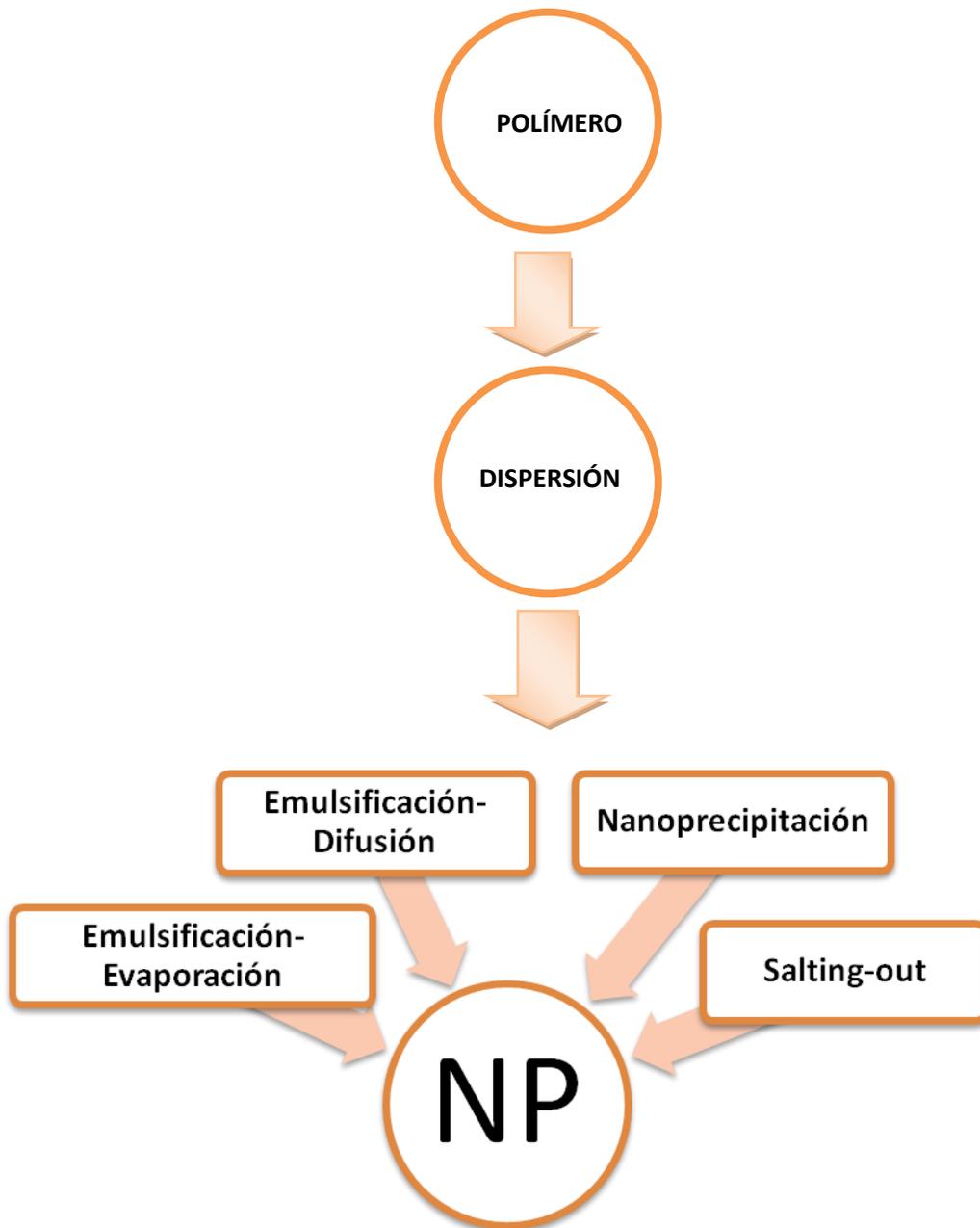


Figura 3. Métodos de preparación de nanopartículas.

5.1. Emulsificación- evaporación del solvente

Emulsificación-Evaporación del solvente fue el primer método desarrollado para preparar NP de un polímero preformado (VANDERHOFF *et al*, 1979). Consiste en la disolución del polímero en un solvente orgánico (diclorometano, cloruro de metileno, cloroformo o acetato de etilo). El agente terapéutico (PA) se disuelve o dispersa en la solución de polímero preformado para crear una emulsión aceite en agua (o/w), esta fase orgánica se adiciona a un medio acuoso que contienen un surfactante o agente emulsionante como alcohol polivinílico, polisorbato 80 o poloxámero 188 para estabilizarla, ya lograda la emulsión estable, el solvente orgánico es evaporado ya sea por el aumento de temperatura, presión o por agitación continua. En muchos casos, la formación de “nano-gotas” por parte del polímero es inducida por sonicación (ultrasonido) u homogeneización. Las nanopartículas solidifican y pueden ser recogidas por ultracentrifugación y se lavan con agua destilada para eliminar los aditivos tales como agentes estabilizantes. Finalmente, el producto se liofiliza. En la figura 4 se resume este método de preparación. Este mismo procedimiento también se realiza para emulsiones dobles por ejemplo, (agua en aceite) en agua, (w / o) / w que también son utilizadas para la preparación de nanopartículas poliméricas con fármacos con características hidrofílicas. En la figura 5 se muestra el método de preparación de una emulsión doble con sus respectivas fases para lograr la formación de nanopartículas.

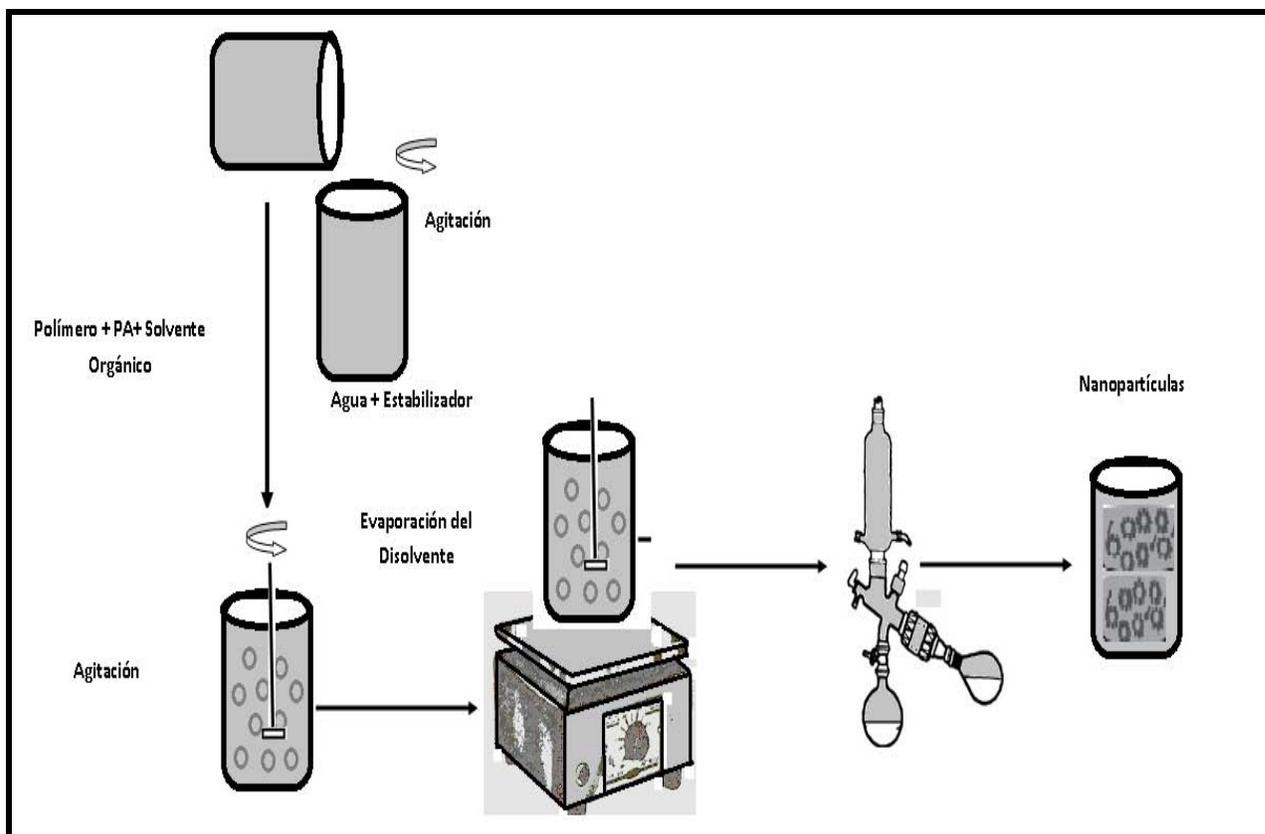


Figura 4. Representación esquemática del método de Emulsificación-Evaporación del solvente.

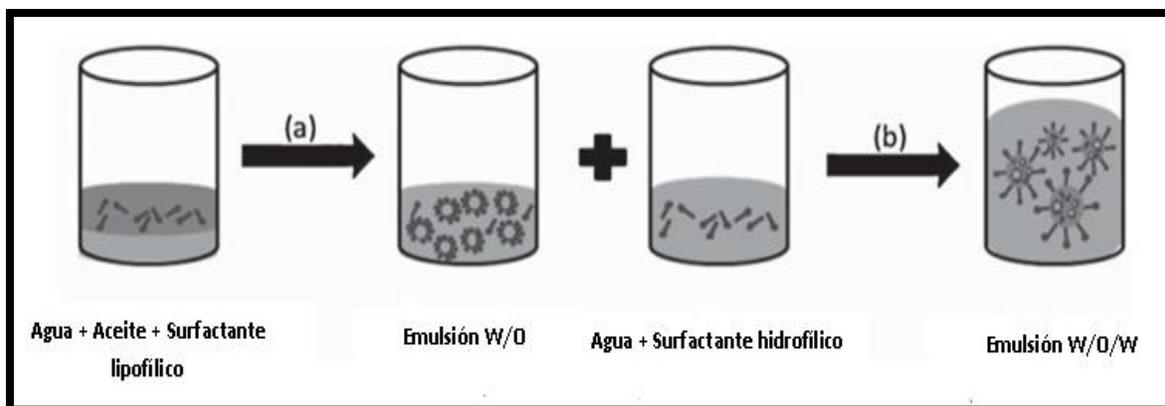


Figura 5. Preparación de una doble emulsión W/O/W. (PRASAD RAO *et al*, 2011)

Algunos ejemplos de nanopartículas obtenidas por emulsificación- evaporación se muestran en la tabla 1.

Tabla 1. Formulaciones de nanopartículas poliméricas por el método de emulsificación- evaporación. (PRASAD RAO *et al*, 2011)

Polímero	Solvente Orgánico	Estabilizador	Tipo De Emulsión	Tamaño De Partícula (nm)
PLGA	Diclorometano/Acetona	PVA	o/w	60-200
PLGA	Diclorometano	Span® 40	(w/o)/w	200
PLA	Cloruro de metileno	PVA	(w/o)/w	200
PEG-PLA	Cloruro de metileno	Colato de sodio	(w/o)/w	200
mPEO-PLA	Cloruro de metileno	Sucrosa	(w/o)/w	268±4
PLGA	Cloroformo	SDS	(w/o)/w	76
PEO-mPAE	Etanol	Pluronic® F-108	o/w	100-150
Copolimero PS	THF	-	o/w	300
PS	THF	-	o/w	300

5.2. Nanoprecipitación (Desplazamiento del solvente)

Este método también conocido como método de desplazamiento del solvente, fue descrito y patentado por Fessi *et. al*. De igual forma, consiste en dos fases una acuosa y otra orgánica, la primera es constituida por los estabilizantes de la emulsión disueltos en agua; y la segunda se compone de la sustancia activa y el polímero biodegradable disueltos en un solvente miscible con agua como la acetona, la fase orgánica es adicionada lenta y constantemente a la fase acuosa con agitación magnética constante y se forman instantáneamente las nanopartículas por la rápida difusión del solvente. La acetona es evaporada a presión reducida (QUINTANAR-GUERRERO *et al*, 1998). En la figura 6 se esquematiza de manera general el método de nanoprecipitación.

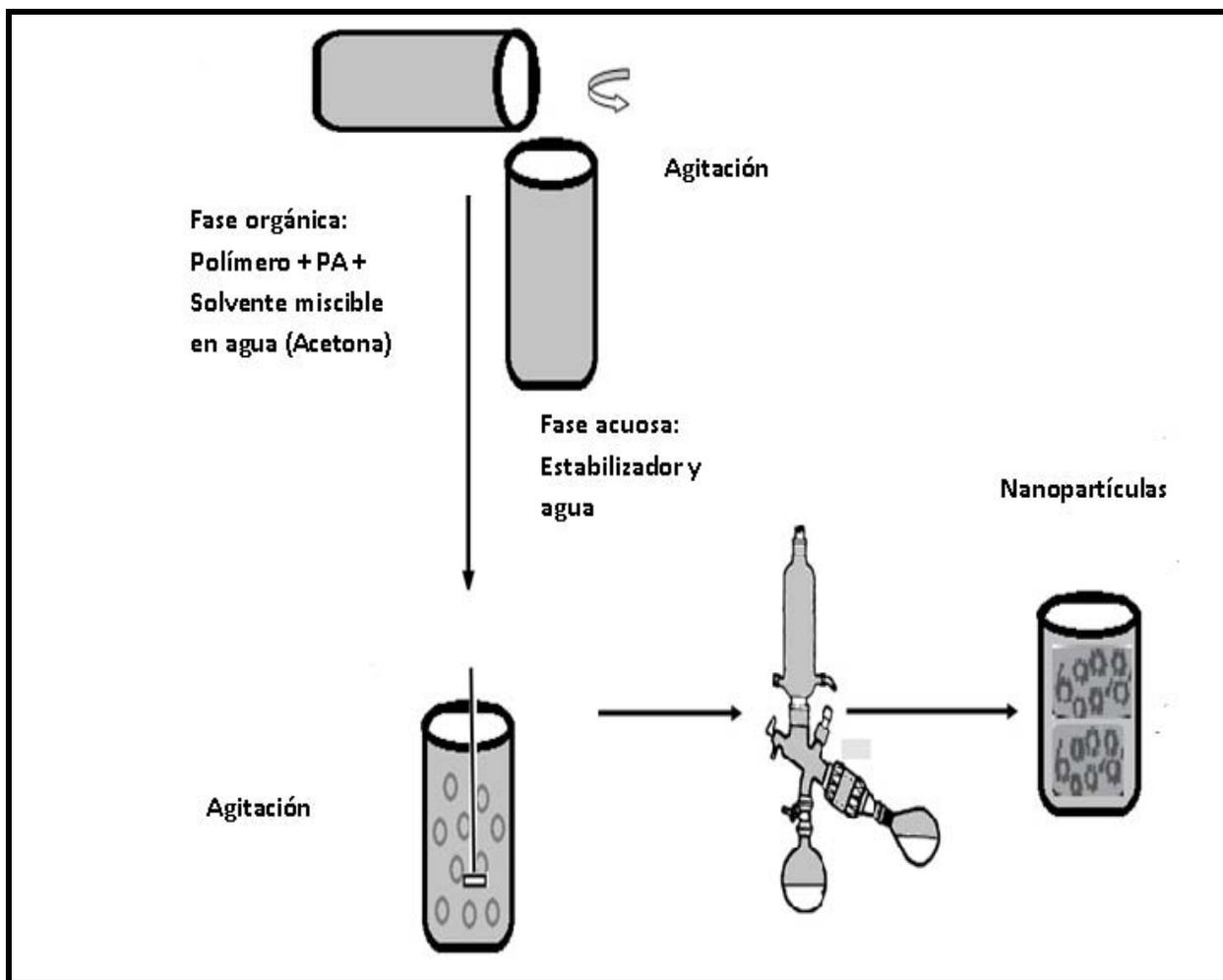


Figura 6. Representación esquemática del método de Nanoprecipitación

En la tabla 2 se presentan algunos ejemplos de nanopartículas obtenidas por el método de nanoprecipitación.

Tabla 2. Formulaciones de nanopartículas poliméricas por el método de nanoprecipitación.

(PRASAD RAO *et al*, 2011)

Polímero	Solvente Orgánico		Estabilizador	Tamaño De Partícula (nm)
PLGA	Acetona	Agua	PVA	95-560
PBCA	Acetona	Agua	Pluronic® F-68	269±4
			Polisorbato® 80	210±5
			Dextran®	238±5
Almidón Alílico	Acetona	Agua	-	270
PHB	Acetona	Agua	Tween® 80	100-125
Dextran Ester	Acetona	Agua	-	77
PLGA	Acetona/Etanol	Agua	Tween® 20	63-90
PCL diol	Cloroformo	Agua	Pluronic® F 127	17.4
Eudragit® L 100-55	Acetona/Etanol absoluto	Agua	-	120
PLGA	Acetona	Agua	-	165 ± 5
	Acetonitrilo			164 ± 4
PCL	Acetona	Agua	PVA	365 ± 5
PCA	Etanol/Agua	Agua	-	150
PLA	THF	Agua	-	100-300
PCL	Acetona	Agua	Span® 20	741-924
PCL	Acetona	Agua	Polisorbato® 80	266 ± 11
PLA	Acetona	Agua	Poloxamero® 188	250 ± 50
PCL	Acetona	Agua	PE/F68	308-352

5.3. Salting-out.

Esta técnica se utiliza ampliamente en la industria farmacéutica, debido a su alto rendimiento, la pureza y la velocidad y la simplicidad de la operación. El método no requiere tratamiento térmico en ninguna fase del proceso y por tanto, puede ser especialmente útil para la incorporación de los medicamentos termolábiles.

Este método se basa en la separación de un solvente miscible en agua a partir de soluciones acuosas a través de un efecto *salting-out*. El fármaco y el polímero soluble en agua se disuelven en acetona y esta solución se emulsiona con agitación mecánica vigorosa en un gel acuoso que contiene el agente salino y un estabilizador coloidal. Esta emulsión de aceite en agua (o/w) se diluye con un volumen suficiente de agua o soluciones acuosas para mejorar la difusión de la

acetona en la fase acuosa lo que induce la formación de nanoesferas. El solvente y el agente *salting-out* luego son eliminados por filtración tangencial (QUINTANAR –GUERRERO *et al*, 1998). Se puede utilizar como agente *salting-out* (solución saturada de electrolitos) cloruro de sodio, acetato de magnesio o cloruro de magnesio y muy a menudo, la acetona se usa como solvente debido a sus propiedades de solubilización y separación. Una desventaja de este procedimiento es que usa sales que son incompatibles con muchos compuestos bioactivos. En la figura 7 se observa la preparación de nanopartículas por este método.

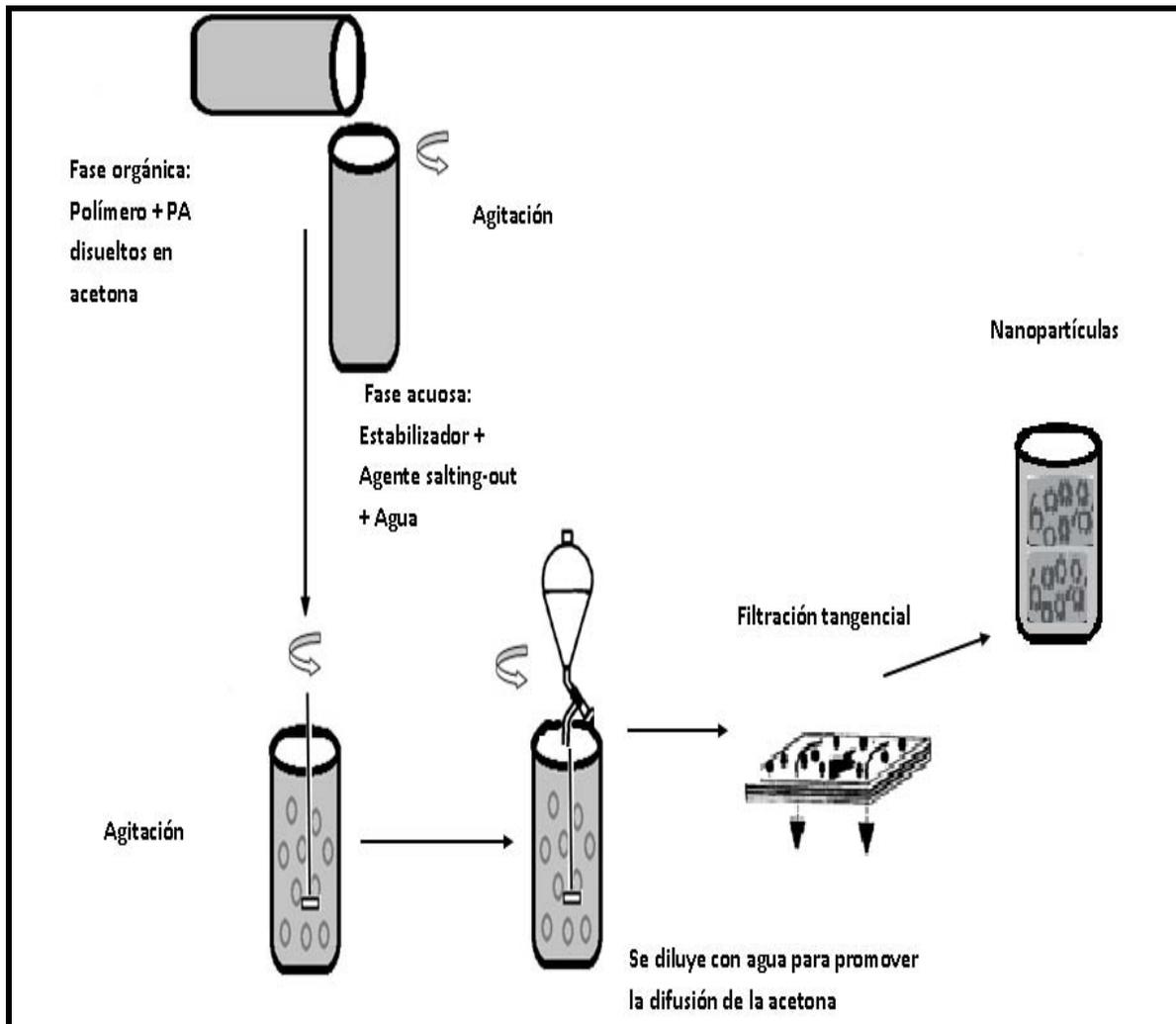


Figura 7. Representación esquemática del método *salting-out*.

En la tabla 3 se muestran algunos ejemplos de nanopartículas obtenidas por el método de *salting-out*.

Tabla 3. Formulaciones de nanopartículas poliméricas por el método de *salting-out*. (PRASAD RAO *et al*, 2011)

Polímero	Agente <i>salting-out</i>	Solvente Orgánico	Tamaño de partícula (nm)
PDLLA	Mg(CH ₃ COO) ₂ ·4H ₂ O	Acetona	295
PEO	MgCl ₂ ·6H ₂ O	Acetona	280 ± 03
PLGA	MgCl ₂ ·6H ₂ O	THF	>200
PLGA	CaCl ₂	Acetonitrilo	480
PDLLA	MgCl ₂ ·6H ₂ O		100-400
PDLLA	MgCl ₂ ·6H ₂ O	Acetona/ Acetato de Etilo	279±10
PDLLA	MgCl ₂ ·6H ₂ O	Acetona	248
EUDRAGIT® L 100-55	MgCl ₂ ·6H ₂ O	Acetona	174-557
PTMC	MgCl ₂ ·6H ₂ O	THF	183-251
PEO-PLGA	MgCl ₂ ·6H ₂ O	Acetona	190±70
PMA	NaCl	HCl diluido	100-250

5.4. Emulsificación-Difusión.

Este método puede considerarse como una modificación del procedimiento de *salting-out*, evitando el uso de sales y por lo tanto, las etapas de purificación intensiva.

Se utiliza un solvente parcialmente miscible en agua, el cual es previamente saturado en agua con el fin de asegurar el equilibrio termodinámico entre ambos líquidos. El polímero y los principios activos son disueltos en este solvente saturado, y esta fase es emulsificada en una fase acuosa que contiene el estabilizante. La posterior adición de agua al sistema hace que el solvente se difunda en la fase externa, provocando la formación de las nanopartículas, las cuales se centrifugan y/o puede eliminarse el solvente por diálisis, presión reducida, filtración o destilación de flujo cruzado. En la figura 8 se esquematiza el método antes mencionado.

En la producción de nanopartículas se deben de tener en cuenta muchos parámetros clave tales como: tipo de surfactante, concentración del surfactante, proceso de liofilización, concentración y peso del polímero.

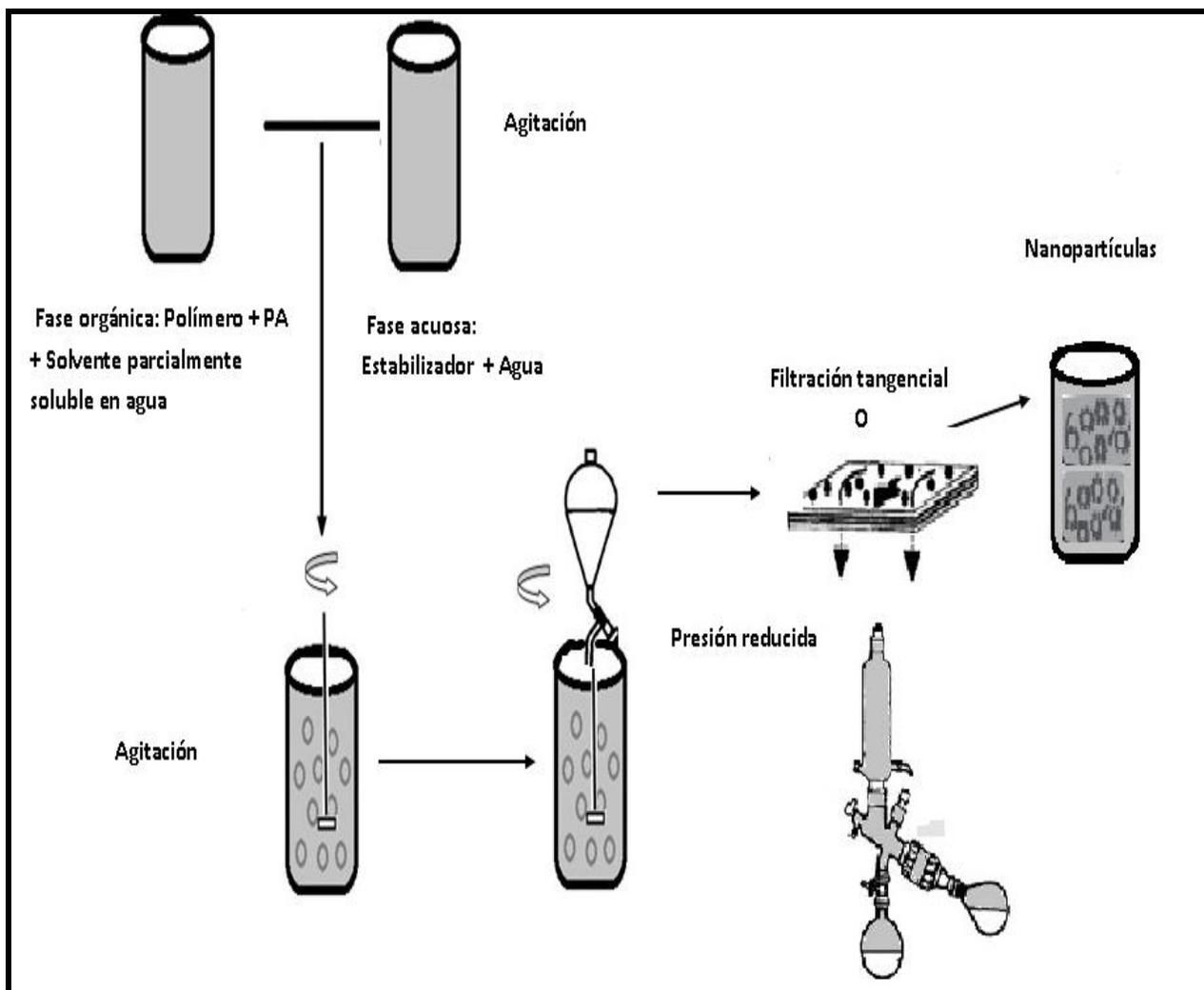


Figura 8. Representación esquemática del método Emulsificación-Difusión

Los métodos antes mencionados en algunos de los casos presentan diferentes desventajas como ejemplo tenemos que los productos obtenidos de estos poseen un contenido residual de solvente orgánico, una baja encapsulación, presentan degradación del principio activo o desnaturalización, una liberación del principio activo inadecuada, o propiedades físicas y morfológicas inadecuadas (RANDOLPH *et al*, 1993). Es por eso que algunos investigadores como Prasad Rao y colaboradores (2011), sugieren la técnica de fluidos supercríticos para desarrollar nanopartículas con mayor pureza y sin rastro de solvente, se espera que esta técnica pueda evitar la mayor parte de los inconvenientes de los métodos tradicionales.

La técnica de fluidos supercríticos consiste básicamente en solubilizar al fármaco y el polímero en un fluido supercrítico, esta solución se expande. El fluido supercrítico se evapora durante el proceso y las partículas de soluto finalmente precipitan y se recogen. Las principales ventajas que

ofrece esta técnica con la reducción en el uso de solventes orgánicos y la posibilidad de formar las nanopartículas sin recurrir a elevadas temperaturas (Ver figura 9). El fluido supercrítico más empleado es el CO₂ por su baja toxicidad (ROCHA *et al*, 2009).

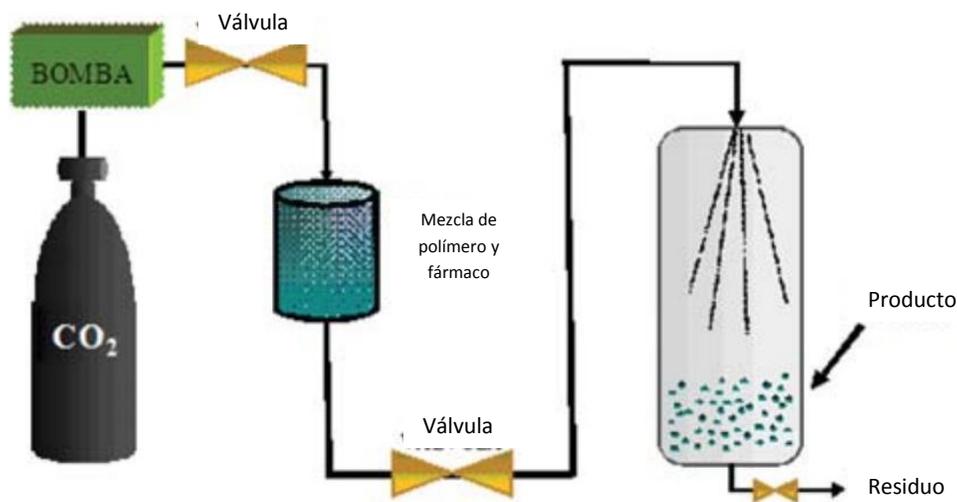


Figura 9. Representación esquemática del método de fluidos supercríticos. (ROCHA *et al*, 2009)

5. 5. *Spray-drying*

Desde los años 40, la técnica de atomización y secado también conocida como técnica del *spray-drying* es usada en la industria farmacéutica por ser una técnica adecuada para el secado de productos farmacéuticos sensibles al calor con una pérdida mínima de la actividad. A parte de ser utilizada en la industria farmacéutica, también se halla en la industria química, alimentaria y bioquímica.

Cuando se trata de sintetizar sistemas encapsulados mediante el método *spray-drying*, se pueden emplear una variedad de polímeros de origen natural, sintético o semisintético. En cuanto al fármaco, no importa si es termosensible, ya que esta técnica es aplicable a cualquier tipo de fármaco. Esto conduce a la gran importancia para el desarrollo en la industria farmacéutica sobre todo en la liberación de fármacos hidrófobos que representan uno de los mayores desafíos en el campo de la liberación de nuevos fármacos y de sus vías de administración.

La porosidad que presentan las partículas obtenidas por *spray-drying* es una característica importante que permite que el agua penetre en la partícula y así aumentar la velocidad de liberación del fármaco. Este tipo de partículas porosas ofrecen ventajas sobre las partículas no porosas, presentan efectos benéficos en la liberación del fármaco, por ejemplo en el tracto respiratorio por vía inhalatoria, y así mejoran la eficacia de administración.

Las características de las partículas, como el tamaño, la densidad y la forma se puede controlar con los parámetros del *spray-drying*: temperatura de entrada, viscosidad, atomizador y concentración de la disolución. El secado rápido puede llevar a la producción de material amorfo y puede ser inconveniente en el rendimiento biofarmacéutico de la formulación obtenida (LÓPEZ, 2011).

El secado por pulverización de suspensiones de nanopartículas, puede ser aplicado como una alternativa menos costosa a la liofilización. La aplicación de *spray-drying* en el desarrollo de nanopartículas requiere pequeñas modificaciones al proceso que es aplicado rutinariamente en las industrias alimentaria y farmacéutica. El secado por pulverización consiste en cuatro pasos: (a) atomización del fármaco dentro del spray; (b) contacto del polvo con el aire; (c) secado del polvo; (d) recolección del polvo seco del aire de secado. El principal inconveniente de la aplicación del *spray-drying* en la conversión de nanopartículas en suspensión a polvo es la aplicación de calor que puede causar agregación de partículas, y posible interferencia con el fármaco encapsulado en las nanopartículas.

6. Caracterización de las nanopartículas

Como cualquier otra forma de dosificación destinada a ser utilizada en la medicina, las formulaciones de nanopartículas se caracterizan en términos de tamaño, morfología, contenido de principio activo, y en la liberación del fármaco *in vitro*. La determinación de estas propiedades es de gran relevancia para el control de calidad, así como para evaluar la influencia de los parámetros del proceso en la formulación resultante (JAEGHERE *et al*, 1999). Existen una serie de métodos fisicoquímicos para la caracterización de las nanopartículas. El tamaño es la característica más prominente de las nanopartículas. Sin embargo, otros parámetros tales como la densidad, peso molecular, y la cristalinidad en gran medida influyen en sus propiedades de liberación y degradación, mientras que las características superficiales tales como carga superficial e hidrofobia e hidrofilia influyen significativamente en la interacción con el ambiente biológico después de la administración a humanos y animales, lo que influye en la distribución en el organismo (KREUTER, 1994). En la tabla 4 se muestran las principales técnicas de caracterización de nanopartículas.

Tabla 4. Métodos de caracterización de nanopartículas

Parámetro	Método de caracterización
Tamaño de partícula y morfología	Microscopía de Barrido Espectroscopía de Correlación Fotónica (PSC)
Contenido de Principio Activo Peso molecular	Cromatografía de Permeación en Gel
Cristalinidad	Difracción de rayos X Calorimetría Diferencial de Barrido
Carga de la superficie	Medición del Potencial Zeta Medición del Ángulo de Contacto

6.1. Espectroscopía de correlación fotónica (PSC por sus siglas en inglés) y Difracción de luz láser.

El tamaño medio de partícula y la distribución de tamaño de partículas se emplean especialmente y con frecuencia para caracterizar la estabilidad a largo plazo de nuevas formulaciones. Estos parámetros pueden ser determinados por técnicas de dispersión de luz óptica.

La PCS mide la fluctuación de la intensidad de luz esparcida, la cual es causada por el movimiento browniano de la partícula. Por consiguiente el tamaño de partícula está influenciado por el medio de dispersión en el que se encuentra. Es una de las técnicas más ampliamente utilizadas. (WOLFGANG *et al*, 2001).

Un método utilizado para la determinación del tamaño de partícula es la dispersión o difracción de luz láser. La difracción de luz láser (LD) puede aplicarse para las partículas mayores a 1 μm y se refiere a la proporcionalidad entre la intensidad de difracción y el cuadrado del diámetro de partícula de acuerdo con la teoría de difracción de Fraunhofer. Y por otro lado la teoría de Mie que afirma que la intensidad de dispersión depende del ángulo de dispersión, la absorción y el tamaño de las partículas así como los índices de refracción tanto de las partículas como el tamaño de dispersión (MULLER-GOYMANN, 2004).

La espectroscopía de correlación de fotones basada en la dispersión de luz dinámica (DLS) es frecuentemente empleado para la determinación de tamaño nanométrico. Entre los parámetros que pueden obtenerse con este método se encuentra el índice de polidispersidad (PDI), que caracteriza la anchura de la distribución de tamaño de las partículas y por lo tanto la homogeneidad de la formulación.

En el contexto de la caracterización y evaluación de la estabilidad de una suspensión de nanopartículas, DLS presenta ciertas limitaciones y pueden proporcionar información incompleta. En primer lugar, se puede dejar de reconocer la presencia de una pequeña población de gotas de

gran tamaño presentes en las nanoemulsiones. Del mismo modo, otros agregados de surfactante como vesículas liposomales o estructuras laminares no son detectados (KLANG, *et al* 2012).

6.2. Microscopía electrónica de barrido (SEM por sus siglas en inglés)

La caracterización de formulaciones farmacéuticas mediante técnicas microscópicas es esencial para obtener datos confiables acerca de la morfología actual del sistema. La microscopía de luz clásica ha sido sustituida por técnicas de microscopía electrónica que ofrecen la suficiente resolución para la visualización de estructuras de tamaño nanométrico.

En SEM se utiliza un haz de electrones en lugar de un haz de luz para obtener una imagen proporcionando información morfológica del material analizado. Los electrones primarios penetran la muestra sólida y son desviadas por un gran número de procesos de dispersión elástica. Varias señales se generan como resultado del impacto de los electrones incidentes, que se recogen para formar una imagen o para analizar la superficie de la muestra (BOGNER *et al*, 2007). La técnica proporciona información acerca del tamaño y aspectos superficiales de la muestra.

6.3. Microscopía de transmisión electrónica (TEM por sus siglas en inglés)

En esta técnica un haz de electrones es transmitido a través de la muestra, la técnica proporciona información sobre el tamaño, la forma y la integración de las nanopartículas y permite la observación de la estructura vesicular cuando se trata de nanocápsulas (SHICK, 1994).

6.4. Potencial zeta

El potencial zeta (ζ) permite medir la carga eléctrica sobre la superficie de la partícula. Este parámetro permite predecir la estabilidad de almacenamiento de una dispersión coloidal (SURAJIT *et al*, 2011), en general la agregación de partículas es menos probable que ocurra cuando las partículas cargadas (un alto potencial zeta), debido a la repulsión eléctrica. Sin embargo, esta regla no se puede aplicar estrictamente para sistemas que contienen estabilizadores estéricos, debido a que la adsorción de los estabilizadores estéricos disminuiría el potencial zeta debido al cambio en el plano de corte de la partícula (WOLFGANG *et al*, 2001)

Las nanopartículas presentan una carga eléctrica debida a sus características iónicas y bipolares. Además, se rodean por otras partículas iónicas con carga opuesta, a estas últimas se les llama

capa difusa. Por fuera de la capa difusa hay una mezcla de partículas iónicas de diferentes cargas formando una especie de nube, por lo recibe el nombre de doble capa difusa (GARCÍA, 2011).

Existen numerosos métodos para la determinación de este parámetro incluyendo la examinación del movimiento ultramicroscópico del patrón de difracción de las nanopartículas bajo la luz del láser, anemometría de láser Doppler, estructuración fase pesado amplitud.

6.5. Calorimetría diferencial de barrido (DSC por sus siglas en ingles)

La calorimetría diferencial de barrido (DSC por sus siglas en inglés) es un método bien establecido de análisis térmico dentro de las ciencias farmacéuticas. Esta técnica permite medir la diferencia de flujo de calor que experimentan una muestra y un material de referencia cuando ambos son sometidos a un proceso térmico. Los resultados obtenidos mediante el empleo de esta técnica permiten observar cambios endotérmicos como la temperatura de fusión y cambios exotérmicos como la cristalización, así como la capacidad calorífica de la muestra. Esto ayuda a identificar puntos de interés como la temperatura de transición vítrea (T_g), en aquellos materiales susceptibles de sufrir cristalización, como polímeros.

En la técnica DSC La evolución de la muestra puede obtenerse en función de la temperatura o del tiempo, según el programa establecido.

6.6. Difracción de rayos X.

La difracción de rayos X es un método capaz de proporcionar información estructural sobre las partículas dispersas. Determina las propiedades cristalinas, modificaciones polimórficas e incorporación de los fármacos (QI WANG *et al*, 2011).

La difracción de rayos X por un cristal presenta un patrón de interferencia típico para una sustancia cristalina. La longitud de onda de los rayos X son comparables con el tamaño de distancia entre los átomos de muchos cristales y la repetición de los monómeros actúa como una red cristalina, donde los rayos X son difractados. De tal manera que el patrón de interferencia emitido es detectado en un difractómetro. El detector es un instrumento que convierte los rayos X en pulsos de corriente eléctrica (GARCÍA, 2011).

7. Sistema reproductor femenino.

El sistema reproductor femenino consta de ovarios, trompas uterinas, útero y vagina (órganos genitales internos), junto con el monte del pubis, la vulva y el clítoris (órganos genitales externos) (STEVENS, 2006).

7.1. Órganos genitales externos

7.1.1. Vulva

Se denomina vulva al conjunto de órganos genitales externos, situados por debajo de la pared abdominal anterior, en el periné anterior (región urogenital), por delante del ano, por dentro y arriba de la cara medial de los muslos. La vulva esta coronada por el monte del pubis e incluye a las formaciones labiales, entre las cuales se abren la uretra y la vagina (LATARJET, 2005).

7.1.2. Mote del pubis

El monte del pubis, también conocido como monte de venus es una saliente redondeada situada debajo de la pared abdominal, sobre la sínfisis del pubis. Se caracteriza por la presencia de folículos pilosos oblicuos que dan lugar al vello pubiano. Esta saliente está formada por piel sobre una almohadilla de grasa subcutánea (LATRAJET, 2006).

7.1.3. Labios mayores

Están formados por dos salientes o pliegues cutáneos que rodean la terminación inferior de la vagina. Por delante se continúan con el monte del pubis, y atrás fusionan entre sí. Histológicamente están formados por un tejido cutáneo con glándulas sebáceas, sudoríparas y folículo piloso, el vello es menos abundante que en el monte del pubis, particularmente en la cara interna de los labios mayores (GARCÍA, 2011).

La acumulación de grasa subcutánea y el desarrollo de los folículos pilosos oblicuos y del vello pubiano es hormonodependiente y comienza con la instauración de la madurez sexual, generalmente entre las edades de 10 -13 años (STEVENS, 2006).

7.1.4. Labios menores

Constituyen dos pliegues cutáneos situados por dentro de los labios mayores. Se originan por delante debajo de los labios mayores y forman un desdoblamiento que engloba al clítoris. Histológicamente está constituido por un epitelio plano estratificado, que contiene numerosos salientes y surcos, los cuales hacen la superficie muy irregular. Carecen de folículos pilosos pero en su lugar, contienen, abundantes glándulas sebáceas (GARCÍA, 2011). Están desprovistos de tejido adiposo, pero con abundantes vasos sanguíneos y fibras elásticas.

7.1.5. Himen

Es una fina membrana fibrosa que suele aparecer como un “volante” irregular en el revestimiento de la vagina inferior. En su superficie externa (vulvar), el himen está recubierto por epitelio escamoso estratificado queratinizado, y en su superficie interna (vaginal) por epitelio escamoso estratificado no queratinizado, rico en glucógeno, similar al del revestimiento de la vagina.

El himen puede ser considerado como la unión entre los genitales internos y externos (STEVENS, 2006).

7.1.6. Clítoris

Está formado por dos cuerpos cavernosos de tejido vascular eréctil, uno a cada lado y rodeados por una vaina fibrocolágena; un tabique central incompleto separa los dos cuerpos. Se encuentra recubierto por epidermis fina carente de folículos pilosos, glándulas sebáceas, glándulas ecrinas y apocrinas, pero ricamente innervado por nervios sensitivos y diversos receptores.

7.2. Órganos genitales internos

7.2.1. Ovarios

Los ovarios son las gónadas femeninas, con forma y tamaño de almendra, donde se desarrollan los ovocitos (gametos o células germinales femeninas). Son también glándulas endocrinas que producen hormonas reproductoras (MOORE, 2010).

7.2.2. Trompas uterinas

Antiguamente denominadas oviductos o trompas de Falopio, las trompas uterinas, son órganos tubulares, pares y simétricos que se extienden del ángulo del cuerpo uterino, el ovario, mide 10 a

12 cm de longitud por 2 mm de diámetro en su origen y 8 a 10 mm al nivel del pabellón (ALCARAZ DEL RÍO, 2010). Conducen al ovocito, liberado mensualmente desde un ovario durante la edad fértil, desde la cavidad peritoneal periovárica hasta la cavidad uterina. También son el lugar habitual donde tiene lugar la fertilización (MOORE, 2010).

7.2.3. Útero

Es un órgano hueco, único, destinado a alojar el huevo fecundado y a expulsarlo cuando ha llegado a su completo desarrollo. Tiene forma periforme, aplanada de adelante a atrás, situado en la línea media, detrás de la vejiga, adelante del recto, arriba de la vagina y debajo de las asas intestinales (ALCARAZ DEL RÍO, 2010). Es una estructura muy dinámica, cuyo tamaño y proporciones cambian con los diversos cambios vitales (MOORE, 2010).

El útero puede dividirse en tres partes: fondo, cuerpo y cérvix (cuello) (STEVENS, 2006).

7.2.4. Vagina

La vagina es un conducto musculo membranoso situado delante del recto, atrás de la vejiga y debajo del cuello uterino, atraviesa el periné fijándose a él por tractos conjuntivos que la mantienen en posición ; presenta un tamaño entre 7 a 14 cm con sus paredes planas (ALCARAZ DEL RÍO, 2010).

Su dirección es oblicua hacia abajo y adelante. Su forma es la de un cilindro aplanado de adelante hacia atrás; sus paredes están en contacto con, salvo en la parte superior, donde el cuello del útero las separa. Alrededor del cuello uterino se forma un canal circular que se denomina fondo del saco vaginal con sus porciones; anterior, posterior y laterales.

Por debajo, a nivel de la vulva, la vagina se aplanan en sentido transversal, abriéndose al exterior por una hendidura elíptica, cuyo eje mayor es anteposterior (LATARJET, 2005).

La vagina:

- Sirve como conducto para el flujo menstrual
- Forma la parte inferior del canal de parto.
- Recibe al pene y la eyaculación durante el coito.
- Se comunica superiormente con el conducto del cuello del útero e inferiormente con el vestíbulo de la vagina (MOORE, 2010).

7.2.4.1. Vascularización

Las arterias que irrigan la porción superior de la vagina derivan de las arterias uterinas; las que irrigan las porciones media e inferior de la vagina, derivan de las arterias vaginales y de la pudenda interna.

Las venas forman los plexos venosos vaginales a los lados de la vagina y en la mucosa vaginal. Estas venas comunican con el plexo venoso uterino como plexo uterovaginal, y drenan en las venas ilíacas a través de la vena uterina. Este plexo también se comunica con los plexos vesical y rectal (MOORE, 2010).

En la estructura de la pared vaginal pueden distinguirse tres capas:

- La primera capa, conjuntiva o profunda está constituida por fibras conjuntivas y elásticas irrigadas por un plexo venoso muy desarrollado.
- La segunda capa, muscular o media está formada por fibras musculares lisas.
- La tercera capa o superficial está constituida por un epitelio plano estratificado parecido al de la piel. Esta capa sufre modificaciones constantes bajo influencia de las hormonas ováricas, encontrándose una continua descamación en su cara más externa.

En la figura 10 se pueden observar los órganos antes descritos.

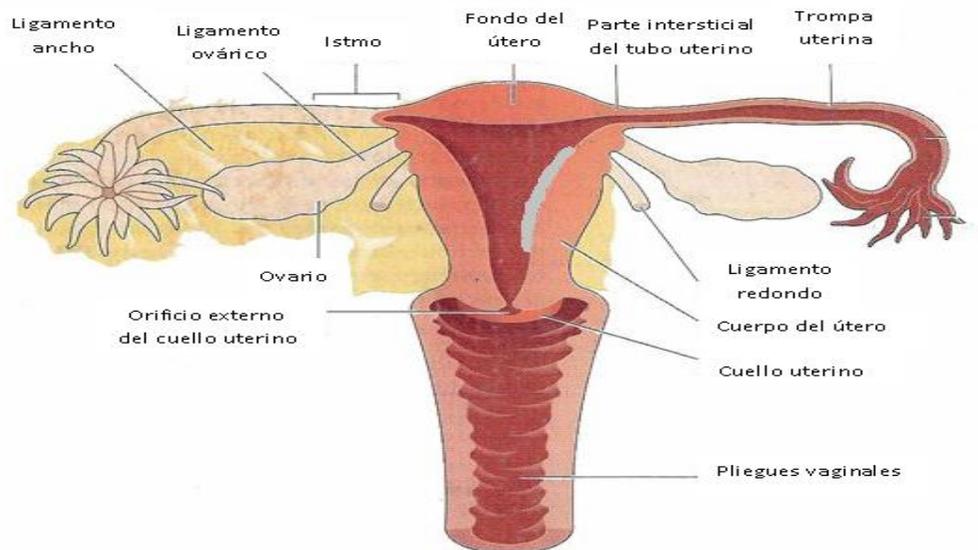


Figura 10. Órgano genital femenino. (Tomada de CHOUDHURY, *et al* 2011).

7.2.4.2. Flora vaginal y pH.

La vagina humana representa un ecosistema complejo de epitelios, sustratos, enzimas, secreciones y microflora. El número de bacterias en el ecosistema vaginal normal es de 100 000 a 1 000 000 de bacterias por cada gramo de secreción, ver tabla 5 (en las vaginosis bacterianas este recuento es mayor a 100 millones por gramo. Las secreciones se componen de agua en el 92-98%, contienen además glicoproteínas (mucina), azúcares (glucosamina, galactosamina) y ácido cítrico. Estos azúcares se constituyen en nutrientes de las múltiples colonias bacterianas que constituyen la flora vaginal. Tanto los trasudados serosos, como líquido menstrual, las secreciones de las glándulas endocervicales y otras fuentes pueden cubrir las necesidades nutritivas de las bacterias vaginales (ALARCÓN, 2005).

La flora vaginal fue estudiada por Johann Christoph Döderlein (1745-1792), cuyo trabajo inicial llevó a pensar que los organismos en mujeres jóvenes en edad reproductiva, asintomáticas, consistían en una sola entidad microbiana, conocida posteriormente como "bacilos de Döderlein". La microbiota del tracto genital inferior femenino se divide en transitoria y residente. La mayor parte de la microbiota transitoria proviene de fuentes exógenas, como el ano o la uretra (MOLINA *et al*, 2013).

La microbiota residente consiste de manera predominante de *Lactobacillus* spp., con las especies prevalentes *L. crispatus*, *L. jensenii*, *L. iners* y *L. acidophilus*, microorganismos que se consideran, en general, como una línea fundamental de defensa contra patógenos potenciales.

También se reportan dentro de la microbiota vaginal especies de *Bacteroides*, *Staphylococcus epidermidis*, especies de *Corynebacterium*, *Peptostreptococcus* y *Eubacterium*, así como otros géneros bacterianos: *Atopobiumvaginae*, *Megasphaera*, *Leptotrichia* y *Mycoplasma*. Existen, además, variaciones étnicas. El microbioma de la vagina es mucho más heterogéneo que lo que antes se consideraba (MOLINA *et al*, 2013).

La relación simbiótica entre lactobacilos/hospedero es regulada por las hormonas femeninas que estimulan a los epitelios para la producción de glucógeno, el cual, metabolizado a nivel vaginal, da lugar a ácido láctico, un responsable importante de mantener ácido el pH vaginal (<4.5). El ácido láctico, además de acidificar el ambiente vaginal para prevenir el crecimiento de algunos microorganismos no deseados, es capaz de inducir la producción de citocinas proinflamatorias en cultivo de células epiteliales vaginales e influye en otras funciones inmunes, lo cual aumenta la capacidad de estas células para reconocer y responder ante la presencia de patógenos potenciales (MOLINA *et al*, 2013).

El pH vaginal de las mujeres sanas en edad reproductiva es ácido (pH 3.5-4.5), este valor se mantiene por los lactobacilos que convierten el glucógeno por mediación de las enzimas del cérvix y de la vagina en ácido láctico suficiente para acidificar las secreciones. Los cambios de pH se modifican con la edad, las etapas del ciclo menstrual, las infecciones y la excitación sexual. El ciclo menstrual, las secreciones uterinas, y el semen son agentes alcalinizantes y aumentan el pH (KAVITA *et al*, 2000).

Una de las funciones del pH ácido es restringir el crecimiento de cepas bacterianas diferentes a la flora normal e impedir que las cepas normales aumenten su concentración por encima del porcentaje que rompa el equilibrio. Sin embargo esta función no es exclusiva del pH; algunas cepas de lactobacilos producen peróxido de hidrógeno y catalasas que impiden la sobrepoblación de estos gérmenes (ALARCÓN, 2005).

Además el pH juega un papel muy importante en la absorción de medicamentos y en los sistemas de liberación dado que la mayor parte de los fármacos son electrolitos débiles y el grado de ionización depende del pH que persista en la vagina (DOMÍNGUEZ, 2011).

Tabla 5. Flora vaginal normal en mujeres en edad reproductiva

GRUPO	MICROORGANISMO Y	PREVALENCIA
1. AEROBIOS		%
Bacilos Gram (+)	Lactobacilos de Döderlein difteroides <i>Gardnerella vaginalis</i>	45-88 14-72 2-5
Cocos Gram (+)	<i>Staphilococcus epidermidis</i> <i>Staphilococcus aureus</i> Estreptococos del grupo B Estreptococos del grupo D Estreptococos no hemolíticos Estreptococos alfa hemolíticos	34-92 1-32 6-22 32-36 14-33 17-33
Bacilos Gram (-)	<i>Escherichia coli</i>	20-28
Otros	Proteus, Klebsiella Enterobacter	2-10
2. MOLICUTES	<i>Mycoplasma hominis</i> <i>Ureoplasma urealyticum</i>	0-22 0-58
3. HONGOS	<i>Candida albicans</i>	10-55
4. LEVADURAS		15-30
5. ANAEROBIOS		10-43
Bacilos Gram (+)	Lactobacilos Eubacterias	10-43 0-7
Bacilos Gram (+)	Bifidobacterias Propionibacterias Clostridios Peptococos Pepto-Estreptococos Gafkya anaerobia	8-10 2-5 4-17 60-76 45-56 5-31
Bacilos Gram (-)	<i>Bacteroides bivius</i> <i>Bacteroides melaninogenicus</i> <i>Bacteroides fragilis</i> Fusobacterias	20-34 10-18 0-13 7-19
Cocos Gram (-)		2-27

7.3. Vaginitis

La vaginitis es uno de los trastornos ginecológicos más frecuentes, constituyendo uno de los problemas más comunes en la consulta médica de primer nivel. Se denomina vaginitis a la inflamación infecciosa o no infecciosa de la mucosa bacteriana.

Las causas de la vaginitis pueden variar de acuerdo a la edad, en las niñas puede originarse por escasa o incorrecta higiene perineal. En mujeres en edad fértil por lo general se debe a infecciones

que pueden ser causadas por bacterias (*Gardnerella* o *Haemophilus vaginalis*, *Prevotella*, *Mobiluncus*, *Mycoplasma*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Ureaplasma urealyticum*, *Chlamydia trachomatis*, etc); parásitos (*Trichomonas vaginalis*); virus (Virus herpético, virus del papiloma humano entre otros); u hongos (*Candida albicans*). Existe también la vaginitis trófica que está relacionada con la menopausia o la vaginitis senil, y la vaginitis traumática por cuerpos extraños que puede generarse por tampones olvidados, por ejemplo y que también engloba la vaginitis causada por violaciones.

Existen varios factores que predisponen a la vaginitis que pueden ser clasificados como endógenos y exógenos. Entre los endógenos se encuentran: enfermedades metabólicas como la diabetes, la anemia ferropénica, hipo e hipertiroidismo, Cushing y Addison; embarazo (más durante el tercer trimestre por el incremento de glucógeno debido a los niveles hormonales aumentados), enfermedades crónicas y VIH. Entre los factores exógenos se encuentran: el uso de prendas ajustadas, ropa interior sintética, obesidad, poca higiene, aerosoles y desodorantes vaginales, anticonceptivos orales, dispositivos intrauterinos, diafragma y duchas vaginales; el uso de antibióticos; radiaciones; inmunosupresores y citostáticos; gestágenos y corticoides; dieta rica en carbohidratos y tratamientos hormonales (GARCÍA, 2011).

7.4. Vaginosis bacteriana

La vaginosis bacteriana es una condición ginecológica de etiología desconocida, que se caracteriza por una disminución en los niveles de *Lactobacillus* spp. Y una sobrepoblación de microorganismos anaerobios entre los que se encuentran *Gardnerella vaginalis*, *Prevotella* spp., *Mobiluncus* spp., *Ureaplasma urealyticum* y *Mycoplasma hominis*. Los factores de riesgo incluyen los asociados a las enfermedades de transmisión sexual (BROTMAN, 2011).

7.5. Candidiasis vaginal

La mayoría de las infecciones vaginales fúngicas son originadas por *Cándida albicans*, durante el embarazo aumenta la frecuencia de la candidiasis por acción del glicógeno manifestándose después de las 20 semanas de gestación y suele desaparecer en el posparto, hasta un 55% de las mujeres embarazadas con leucorrea presentan *Cándida* en la secreción vaginal. *Cándida albicans* frecuentemente es flora normal de la boca de la vagina y del intestino delgado. La infección clínica

se relaciona en ocasiones con un trastorno sistémico como diabetes, sacarina glucosuria no diabética, inmunosupresión, uso de antibióticos, etc. (LÓPEZ, 2010).

7.6. Vaginitis por tricomonas.

La tricomoniasis es una infección de la vagina o del aparato genital masculino por *T. vaginalis*.

T. vaginalis es un protozoo flagelado de transmisión sexual que infecta a los hombres con una frecuencia menor que a las mujeres.

Las mujeres pueden presentar una serie de manifestaciones que comprende desde la ausencia de sintomatología hasta una secreción vaginal abundante espumosa de color amarillo verdosa con irritación de la vulva y el periné, dispareunia y disuria. La infección asintomática puede evolucionar a un cuadro sintomático en cualquier momento con inflamación de la vulva y el periné y edema de los labios. Las paredes vaginales y la superficie del cuello uterino pueden presentar manchas punteadas de color rojo fresa. Puede aparecer una uretritis y, posiblemente, cistitis (MANUAL MERCK).

En la tabla 6 se enlistan los tipos más comunes de vaginitis, así como la sintomatología, diagnóstico y tratamiento de cada uno de ellos.

Tabla 6. Tipos comunes de vaginitis (El Manual Merck de Diagnóstico y Tratamiento).

Trastorno	Síntomas y Signos	Criterios diagnósticos	Hallazgos microscópicos	Diagnóstico diferencial
Vaginitis inflamatoria	Secreción purulenta sequeada y adelgazamiento vaginal, dispareunia, disuria; generalmente en mujeres posmenopáusicas	pH > 6, prueba de olor negativa y hallazgos microscópicos característicos	Aumento de Polimorfonucleares y cocos; disminución de bacilos; células parabasales	Liquen plano erosivo
Vaginosis bacteriana	Secreción gris con olor a pescado generalmente con prurito e irritación; sin dispareunia	Secreción gris, pH > 4.5, olor a pescado y células clave	Células clave; disminución de bacilos; aumento de cocobacilos	Vaginitis por tricomonas
Candidiasis Vaginal	Secreción blanca espesa; prurito vaginal y , en ocasiones, vulvar con o sin escozor, irritación o dispareunia	Secreción típica pH > 4.5 y hallazgos microscópicos	Levaduras con yemas, pseudohifas o micelio; estudio mejor con dilución en KOH al 10 %	Vulvitis irritante por contacto o alérgica, irritación química vulvodinia.
Vaginitis por tricomonas	Con frecuencia secreción profusa maloliente de color amarillo-verdoso; disuria; dispareunia; eritema	Identificación de microorganismo causal mediante microscopía (en ocasiones por aislamiento)	Protozoos flagelos con motilidad aumento de Polimorfonucleares.	Vaginosis bacteriana inflamatoria y vaginitis.

Existen diversos tratamientos para la candidiasis vulvovaginal. De acuerdo con Sobel *et al* los tratamientos más comunes se ilustran en la tabla 7. De la misma manera el tratamiento para la vaginosis bacteriana se presenta en la tabla 8.

Tabla 7. Tratamiento de candidiasis vulvovaginal (SOBEL *et al*, 1998)

Principio Activo	Forma Farmacéutica	Duración del tratamiento (días)
Tratamiento tópico		
Butoconazol	2 % crema 5mg	3
Clotrimazol	1 % crema 5 mg	7-14
	100 mg óvulos; 1 óvulo	7
	100 mg óvulos; 2 óvulos	3
Miconazol	500 mg óvulos; 1 óvulo	Única dosis
	2% crema 5 mg	7
	100 mg óvulos; 1 óvulo	7
	200 mg óvulos; 1 óvulo	3
Econazol	1200 mg óvulos	Única dosis
	150 mg óvulos; 1 óvulo	3
Fenticonazol	2 % crema 5 mg	7
Tioconazol	2 % crema 5 mg	7
	6.5 % crema 5 mg	Única dosis
Terconazol	0.4 % crema 5 mg	7
	0.8 % crema 5 mg	3
Nistatina	100 000 unidades óvulos; 1 óvulo	14
Tratamiento oral		
Ketoconazol	200 mg	5
Itraconazol	200 mg	3
Fluconazol	150 mg	Única dosis

Tabla 8. Tratamientos recomendados para vaginosis bacteriana (PEREA, 2010)

Principio Activo	Forma Farmacéutica	Duración del Tratamiento
Metronidazol	Tabletas 500 mg	2 veces al día por 7 días
Metronidazol	Gel 0.75 %	Aplicar de forma intravaginal 1 vez al día por 7 días
Clindamicina	Ungüento 2 %	Aplicar de forma intravaginal antes de dormir por 7 días

8. La vagina como vía de administración para formas farmacéuticas no convencionales

La vagina además de ser un órgano importante del aparato reproductor femenino y que juega un papel importante en la reproducción, proporciona un buen sitio para la administración de medicamentos locales y sistémicos debido a la alta irrigación con la que cuenta.

Las principales ventajas de esta ruta incluyen accesibilidad, buen suministro de sangre, la capacidad para evitar metabolismo de primer paso hepático, y la permeabilidad de fármacos de gran peso molecular, tales como péptidos y proteínas. Los factores fisiológicos como cambios en el espesor de la capa del epitelio, los cambios cíclicos, los cambios en el estado de las enzimas, las hormonas, el volumen de líquido vaginal, alteraciones del pH vaginal y la excitación sexual, pueden afectar la liberación del fármaco desde cualquier sistema de entrega intravaginal y también alterar su velocidad de absorción (CHOUDHURY *et al*, 2011). Además es importante considerar los cambios de la membrana durante el ciclo menstrual y postmenopausia, en las mujeres postmenopáusicas el espesor del epitelio se reduce, lo que puede afectar la absorción de los medicamentos (DOMÍNGUEZ, 2011).

En la evaluación y administración de medicamentos por este medio, es importante tomar en cuenta el volumen, la viscosidad y el pH del líquido vaginal, dado que estos tienen una influencia considerable en la absorción del fármaco por esta vía. Un volumen elevado de líquido puede favorecer la absorción de un fármaco poco soluble en agua, mientras un exceso puede hacer que el medicamento se desprenda lo que ocasiona una mala absorción. Además, la presencia de moco cervical demasiado viscoso puede ocasionar que el fármaco no se absorba (DOMÍNGUEZ, 2011).

8.1. Sistemas bioadhesivos y mucoadhesivos

El término bioadhesión, describe la capacidad de ciertas macromoléculas, sintéticas o biológicas, de adherirse a los tejidos del organismo por un tiempo prolongado. Todo material puede adherirse a un tejido biológico sobre todo a las mucosas, gracias a la naturaleza viscosa de la capa que le recubre sin que en ello intervengan uniones específicas, propias del polímero y del tejido. Por lo tanto la bioadhesión sólo es posible al establecerse una interrelación entre algunas agrupaciones químicas concretas de los polímeros y los tejidos biológicos o interpenetración de cadenas. De modo que, teniendo en cuenta que la mayoría de las vías de administración de fármacos están revestidas de una capa de mucus, surgió la idea de adaptar el fenómeno de adhesión (unión durante un tiempo 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 libera el fármaco. Surge el término mucoadhesión dado que una de las superficies es una membrana mucosa (capa celular), o bien la capa de mucina que recubre esa capa superficial (RODRÍGUEZ *et al*, 2000).

La vía vaginal es muy adecuada para la administración de bioadhesivos y prolongar el tiempo de permanencia de estos en la cavidad vaginal, acción que no ocurre con las formas farmacéuticas convencionales dirigidas a esta vía de administración, estos sistemas terapéuticos son desarrollados en formas de dosificación semisólidas y sólidas y los principales polímeros utilizados son poliacrilatos sintéticos, policarbofilos, quitosano, derivados de celulosa (hidroxietilcelulosa, hidroxipropilcelulosa e hidroxipropilmetilcelulosa), derivados del ácido hialurónico, pectina, tragacanto, carragenina y alginato de sodio (ACARTÜRK, 2009).

Algunas de las ventajas de estos sistemas son:

- Incremento del tiempo de permanencia del medicamento en una región determinada.
- Optimización de la absorción por la incorporación de promotores de absorción, modificadores de pH, etc.
- Mejoría 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.
- Posibilidad de administrar sustancias de fácil degradación (péptidos, proteínas).
- Bajos costos de producción.
- Facilidad de autoadministración, sin necesidad de utilizar aplicadores.
- Evita los procesos de irritación local.

9. Clotrimazol (1-((2-clorofenil)difenilmetil)-1H-imidazol).

Polvo cristalino blanco o amarillo pálido, prácticamente insoluble en agua, soluble en alcohol, acetona y cloruro de metileno y poco soluble en éter (figura 11).

9.1. Acción antimicrobiana.

El clotrimazol es un antimicótico imidazólico que interfiere en la síntesis del ergosterol, alterando la permeabilidad de las membranas celulares de los hongos sensibles. La mayoría de los hongos sensibles al clotrimazol resultan inhibidos con concentraciones de 3 µg/mL. El protozoo *Trichomonas vaginalis* requiere una concentración superior para su inhibición, 100 µg/mL.

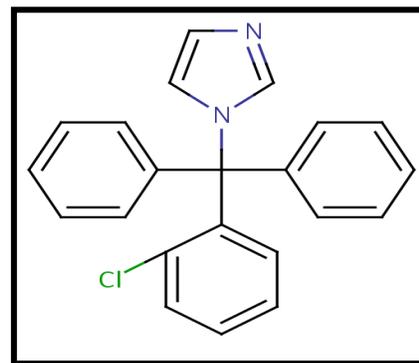


Figura 11. Estructura del clotrimazol
(Tomada de www.drugbank.ca)

9.2. Indicaciones y administración.

Se administra de forma tópica para el tratamiento de la candidiasis superficial y en las infecciones cutáneas como la pitiriasis versicolor y la dermatofitosis. Ocasionalmente, también puede emplearse en el tratamiento de la tricomoniasis, cuando los otros fármacos están contraindicados.

Para el tratamiento de las infecciones cutáneas, el clotrimazol se aplica por vía tópica 2 o 3 veces al día durante 2 o 4 semanas en forma de crema, loción o solución al 1 %; junto con la crema o solución pueden emplearse polvos al 1 % para prevenir posibles reinfecciones. La solución al 1 % se emplea por vía tópica en el tratamiento de la otitis externa por hongos. También puede aplicarse en forma de óvulos vaginales a la dosis de 100 mg durante 6 días, 200 mg durante 3 días o una dosis única de 500 mg en el tratamiento de la candidiasis vulvovaginal.

9.3. Mecanismo de acción.

El clotrimazol interactúa con la levadura 14- α desmetilasa, un citocromo P-450, enzima que convierte lanosterol a ergosterol, un componente esencial de la membrana. De esta manera, el clotrimazol inhibe la síntesis de ergosterol, lo que resulta en la permeabilidad celular aumentada. El clotrimazol también puede inhibir la respiración endógena, interactuar con los fosfolípidos de membrana, inhiben la transformación de levaduras a las formas miceliales y la captación de purina, perjudica la biosíntesis de triglicéridos

y/o fosfolípidos, e inhibe el movimiento de iones de calcio y potasio a través de la membrana celular mediante el bloqueo de la vía de transporte de iones conocido como el canal de Gardos.

9.4. Farmacocinética.

Cuando se aplica por vía tópica, el clotrimazol penetra en la epidermis, por la absorción sistémica, si se produce es baja o nula. Tras la administración vaginal se produce una absorción del 3 al 10 % de la dosis. El clotrimazol se metaboliza en el hígado a compuestos inactivos, que se excretan por las heces o la orina.

10. Acetato Ftalato de Celulosa (CAP)

Acetato ftalato de celulosa (CAP) se utiliza como un material de recubrimiento de película entérica, o como una matriz aglutinante para comprimidos y cápsulas. Estos revestimientos resisten el contacto prolongado con el fluido gástrico fuertemente ácido, pero se disuelven en el ambiente intestinal ligeramente ácido o neutro (ROWE *et al*, 2006).

Recientemente se ha demostrado que el CAP posee una potente actividad antiviral. El CAP es eficaz contra el virus del herpes, una amplia gama de cepas de VIH y sus subtipos. Además de la actividad antiviral, se ha encontrado que el CAP posee la capacidad de inactivar cepas como *Chlamydia Trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Haemophilus ducreyi* y *Trichomonas vaginalis*. Esto sin afectar la viabilidad de los lactobacilos que son componentes esenciales de la flora vaginal natural, contribuyendo así, a la resistencia contra las enfermedades de transmisión sexual (NEURATH *et al*, 1999).

El CAP es de bajo costo, dispersable en agua y no tóxico. El elevado peso molecular del CAP y el desarrollo de productos farmacéuticos de CAP en forma micronizada limita su difusión lejos de la zona de aplicación así que no requiere un dispositivo aplicador por separado (MAYHEW *et al*, 2009).

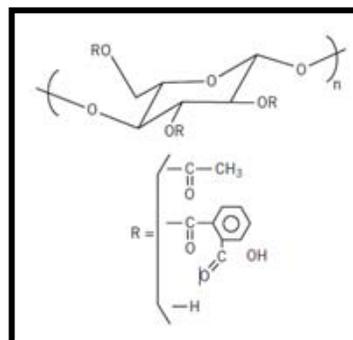


Figura 12. Estructura del Acetato Ftalato de Celulosa (CAP) (Tomada de www.eastman.com/Literature_Center/P/PCI104.pdf)

II. OBJETIVOS.**1. Objetivo general:**

Preparar y caracterizar nanopartículas poliméricas de acetato ftalato de celulosa (CAP) con clotrimazol utilizando el método de desplazamiento del solvente para una formulación de aplicación vaginal.

2. Objetivos particulares:

Determinar la concentración y proporciones óptimas de los componentes para la obtención de nanopartículas.

Caracterizar las nanopartículas mediante el tamaño de partícula, morfología, cristalinidad y potencial Z.

Evaluar los perfiles de liberación *in vitro* del principio activo (clotrimazol) a partir de las nanopartículas obtenidas usando bolsas de diálisis.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

1. Materiales

Principios activos:

- Clotrimazol USP; Globe Chemicals
- Itraconazol; Globe chemicals
- Fluconazol; USP Gelmark Pharmaceuticals Ltd.

Polímero

- Acetato ftalato de celulosa; Fluka Analytical

Estabilizantes

- Alcohol polivinílico (Mowiol 40-88); Glomarza, S.A. de C.V.
- Pluronic® F-68; Sigma-Aldrich
- Tween® 20; Droguería Cosmopolita
- Tween® 80; Droguería Cosmopolita

Reactivos en general

- Fosfato monobásico de potasio; Fermont
- Fosfato dibásico de potasio; Fermont
- Ácido clorhídrico; Fermont
- Metiletilcetona; Química Meyer
- Etanol; Fermont
- Metanol; Fermont
- Acetona Reactivos; Química Meyer
- Acetato de etilo; Fermont
- Iodo I₂; Sigma-Aldrich
- Ácido Bórico; Sigma-Aldrich

Aparatos y equipos

- Balanza (Velab VE-204), México.
- Multímetro pH mV/°C (Hanna Instruments HI 211), Rumania.
- Espectrofotómetro UV-VIS (Thermoscientific, Genesys 10s), USA
- Nanosizer® (Scientific Instruments, Coulter™ N4 PLUS Beckman), USA.
- Parrilla con agitación magnética

- Calorímetro Diferencial de Barrido (DSC Q10 TA Instruments), USA.
- Liofilizadora de mesa; (Labconco®), USA.
- Evaporador rotativo (Quimis Q344B1), Brasil.
- Evaporador rotativo (Büchi R-10), Suiza.

2. Determinaciones previas

- Pruebas de solubilidad

En un tubo de ensayo, se colocaron 5 mL de solvente (los solventes empleados fueron acetato de etilo, acetona, metanol, etanol, metiletilcetona y agua), se agregó la menor cantidad de principio activo posible, se agitó con un vortex, se dejó reposar. Se determinó visualmente si, el fármaco se disolvía o no en el medio.

- Barridos espectrofotométricos

Se realizó el barrido del clotrimazol y fluconazol por separado, utilizando solución amortiguadora de fosfatos como blanco. Para la muestra, se colocaron 5 mL de solución amortiguadora de fosfatos pH= 5.5, y se agregó la menor cantidad de principio activo. Se procedió a realizar la lectura

- Preparación de NP no cargadas con diferentes tipos y concentraciones de estabilizantes por el método de nanoprecipitación

Se preparó una solución al 0.5 % p/v de CAP en acetona pesando 100 mg de CAP y disolviéndolos en 10 mL de acetona. La solución anterior se agregó de manera constante, por goteo, con ayuda de una jeringa, a un vaso de precipitados que contenía 50 mL de agua sin estabilizante con agitación constante. Se procedió a eliminar el solvente con agitación magnética durante 2 horas. Finalmente se realizaron lecturas en el equipo Nanosizer® N4-Plus para determinar la dispersión del tamaño de partícula en el sistema.

Se repitió el mismo procedimiento para los sistemas indicados en la tabla 9:

Tabla 9. Sistemas preparados para la elección del estabilizante y su concentración, así como la del polímero.

Sistema	Concentración de CAP % (p/v)	Tipo y concentración de estabilizante
A	0.5	---
B	1	---
C	1.5	---
1	0.5	Tween® 80 al 0.5% p/v
2	1	
3	0.5	Tween® 20 al 0.5% p/v
4	1	
5	0.5	Mowiol® 40-88 0.1% p/v
6	0.5	Mowiol® 40-88 0.3% p/v
7	0.5	Mowiol® 40-88 0.5% p/v
8	1	Mowiol® 40-88 0.1% p/v
9	1	Mowiol® 40-88 0.3% p/v
10	1	Mowiol® 40-88 0.5% p/v
11	0.5	Pluronic® F-68 1% p/v
12	0.5	Pluronic® F-68 1.5% p/v
13	1	Pluronic® F-68 1% p/v
14	1	Pluronic® F-68 1.5% p/v

3. Preparación de nanopartículas con carga de principio activo.

Se prepararon 10 mL de una solución de acetona que contenía 100 mg de CAP y 40 mg de clotrimazol. Se agregó esta solución de manera constante por goteo por medio de una micropipeta a un vaso de precipitados que contenía 50 mL de una solución de Mowiol® 40-88 al 0.5 % de p/v con agitación constante. Se procedió a eliminar el solvente con agitación magnética durante 2 horas. Finalmente se realizaron lecturas en el equipo Nanosizer® N4-Plus para determinar la dispersión del tamaño de partícula en el sistema. Al resto del lote se le centrifugó y liofilizó.

La operación se realizó por triplicado

Se repitió el procedimiento usando como estabilizante Pluronic® F-68 al 1.5 % p/v.

4. Preparación de la curva de calibración de clotrimazol.

Se pesaron 0.0210 g de clotrimazol. Se hidrataron en la mínima cantidad de solución amortiguadora de fosfatos pH= 5.0 con 5 % p/v de Tween® 20. Para lograr disolverlos por completo se agitaron aproximadamente 12 hrs. Posteriormente se llevaron a volumen de 100 mL (210 µg/mL). De la solución anterior se tomaron alícuotas de 1, 3, 5 y 7 mL por triplicado y se llevaron a un volumen de 10 mL cada una. Los sistemas se agitaron y leyeron a una longitud de onda de 261 nm. Como blanco se utilizó la solución amortiguadora de fosfatos pH= 5.0 con 5 % p/v de Tween® 20 a las mismas condiciones.

5. Determinación de clotrimazol en nanopartículas.

Se pesaron aproximadamente 5 mg de nanopartículas liofilizadas, se disolvieron en una pequeña cantidad de metiletilcetona y se llevó a sequedad para eliminar el solvente. Posteriormente se disolvieron en 9 mL de solución amortiguadora de fosfatos pH= 5.0 con 5 % p/v de Tween® 20, y después se aforaron a 10 mL con la misma mezcla de Tween®. Finalmente se midió su absorbancia a 261 nm y se interpoló en la curva para conocer la cantidad de clotrimazol.

6. Preparación de la curva de calibración de PVA.

Se pesaron 0.1758 g de Mowiol® 40-88, se disolvieron en la mínima cantidad de agua, se agitó por un tiempo aproximado de 3 hrs. Se aforó a 250 mL. De la solución anterior se tomaron volúmenes de 1,2, 3, 4, 5, 6, 7 y 8 mL y se llevaron a un volumen de aforo de 10 mL con agua desionizada. De estas soluciones se hicieron diluciones 1mL / 5 mL con agua desionizada. A estos 5 mL se adicionaron 2 mL de solución de H₃BO₃ 0.65 M y 1 mL de solución I₂ 0.05 M / KI 0.15 M. Los sistemas se leyeron a una longitud de onda de 640 nm.

7. Determinación de PVA residual.

La prueba se realizó con base la medición espectrofotométrica de un complejo colorido entre el PVAL y I/KI con H₃BO₃.

Se disolvió una cantidad conocida de nanopartículas liofilizadas (5-10 mg) en 5 mL de metiletilcetona en un vaso de precipitados con agitación magnética. Posteriormente se llevó a sequedad. Se agregaron 5 mL de agua desionizada y se continuó con la agitación por 3 horas. Esta solución fue filtrada con una membrana Millipore® de 0.22 µm. El filtrado se llevó a un volumen de

10 mL. De este filtrado se tomó 1 mL y se llevó a 5 mL con agua desionizada. Estos 5 mL fueron mezclados con 2 mL de H_3BO_3 0.65 M y 1 mL de I_2 0.05M en KI 0.15 M formando un complejo colorido. La muestra se leyó en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 640 nm. La absorbancia fue interpolada en la curva de calibración para obtener la concentración de la muestra. Como blanco se utilizaron 5 mL de agua con 2 mL de H_3BO_3 y 1 mL de I_2 0.05 M en KI 0.15 M. Las determinaciones se realizaron por triplicado. La estructura del complejo formado se muestra en el anexo 5, figura 5.3.

8. Estudios de liberación *in-vitro*

Se hidrataron las bolsas de diálisis (Spectra/Por® MWCO: 6-8000) durante 15 horas con agua desionizada. Dentro de estas se colocó una cantidad conocida de nanopartículas dispersas en 3 mL de solución amortiguadora pH= 5.0 con Tween® 20 al 5 % p/v. Dichas bolsas fueron sumergidas en un matraz erlenmeyer que contenía 200 mL de solución amortiguadora pH=5.0 con Tween® 20 al 5% p/v, asegurando condiciones “sink”. Los sistemas se colocaron en un baño con agitación horizontal a una temperatura de $37 \pm 0.5^\circ\text{C}$.

Se tomaron muestras de 3 mL del medio de disolución de los matraces a los 5, 10, 15, 30, 60, 120, 180, 240, 300, 360, 420, 480 minutos, reponiendo el mismo volumen extraído con medio de disolución. Las muestras obtenidas se leyeron en el espectrofotómetro a una $\lambda=261$ nm. Las determinaciones se realizaron por triplicado.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se realizaron pruebas de solubilidad cualitativas para seleccionar el activo que cumpliera con las condiciones para poder ser utilizado en la elaboración de las nanopartículas por el método de nanoprecipitación. Se buscaba un principio activo capaz de solubilizarse en solventes orgánicos y que a su vez fuera insoluble en agua. De este modo, como puede observarse en la tabla No. 10, se encontró que el clotrimazol cumple con estas condiciones. De igual manera se evaluó la solubilidad del polímero a utilizar y se comprobó que esté fuera soluble en la fase orgánica y no en la acuosa.

Tabla 10. Solubilidades para evaluar principios activos y polímero

SOLUTO	Acetona	Metanol	Etanol	Metiletilcetona	Acetato de etilo	Agua
Itraconazol	+++	++	+++	+	-	-
Clotrimazol	+++++	+++	++++	++++	++++	-
Fluconazol	++++	++++	++++	++++	++++	+
CAP	++++	++	-	+	-	-

(-) No soluble; (+) Poco soluble; (++) Parcialmente soluble; (+++) Moderadamente soluble; (++++) Soluble; (+++++) Muy soluble.

Se procedió a realizar un barrido espectrofotométrico del clotrimazol en solución amortiguadora de fosfatos pH=5.0, para determinar la longitud de onda a la cual este compuesto presenta una mayor absorción. Para lo cual se pesaron 20 mg de clotrimazol y se adicionaron 100 mL de agua, se dejó en agitación aproximadamente 24 hrs. En la figura 13 se presenta el espectro de absorción obtenido para el principio activo bajo estas condiciones.

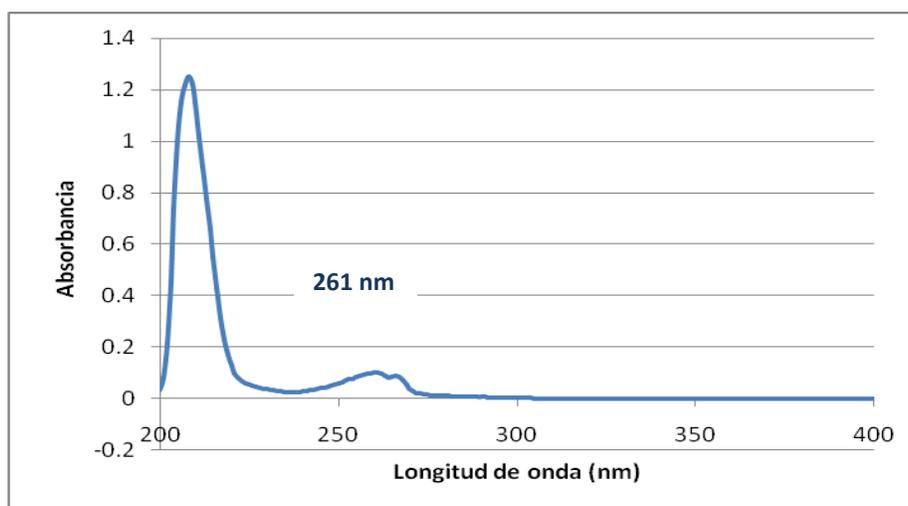


Figura 13. Espectro de absorción ultravioleta de clotrimazol en solución amortiguadora de fosfatos pH=5.0.

La longitud de máxima absorptividad para el clotrimazol, como se muestra en la figura No. 12, fue de 261 nm con una absorbancia de 0.1. Dado que el compuesto es prácticamente insoluble en agua, se procedió a la elección de un medio de disolución en el cual tuviera una mayor solubilidad para poder cuantificarlo. El medio seleccionado fue una solución amortiguadora de fosfatos pH=5.0 con 5 % p/v Tween® 20. En este barrido se obtuvo la misma longitud de onda (261 nm), con una absorbancia de 0.419 (figura 14) y fue la utilizada para la cuantificación del principio activo en las nanopartículas. La longitud de onda máxima obtenida coincide con la reportada en el libro Clarke's Analysis of Drugs and Poisons (2004) donde se reportan dos longitudes de máxima absorción para el clotrimazol, 254 y 260 nm, la variación se debe al medio empleado para correr los barridos, ya que el reportado en la literatura corresponde al metanol.

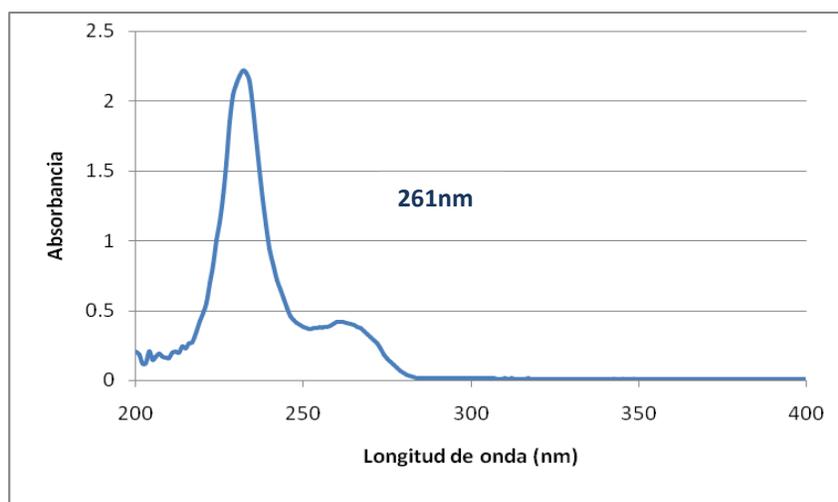


Figura 14. Espectro de absorción ultravioleta de clotrimazol en solución amortiguadora de fosfatos pH=5.0 con 5% p/v de Tween® 20

Uno de los principales retos en la obtención de nanopartículas por el método de desplazamiento del solvente es encontrar la concentración adecuada de polímero que permita generar sistemas submicrónicos con poblaciones unimodales. Dado que no se cuenta con antecedentes bibliohemerográficos de la preparación de nanopartículas utilizando CAP y clotrimazol por este método; se procedió a encontrar las condiciones óptimas para lograr la obtención de las nanopartículas. Para ello, se prepararon diferentes lotes de nanopartículas sin carga de principio activo; modificando el tipo y concentración de estabilizante y la concentración del polímero, como se muestra en la tabla 11a, y 11b. Se prepararon sistemas evaluando cuatro estabilizantes; en la

tabla 11a se presentan dos de ellos, Pluronic® F-68 al 1 y 1.5 % p/v y Tween® 20 al 0.5 % p/v. En la tabla 11b se presentan los otros dos estabilizantes Tween® 80 al 0.5 % p/v y Mowiol® 40-88 al 0.1, 0.3 y 0.5 % p/v. A esos mismos sistemas se les agregó el polímero al 0.5 y 1 % p/v, dando un total de catorce sistemas. A cada sistema se le determinó el tamaño de partícula por triplicado con el sistema en reposo y se realizó una cuarta lectura con el sistema resuspendido (esta lectura se representa sombreada en las tablas). El volumen de la fase orgánica para cada sistema fue de 10 mL y 75 mL de fase acuosa.

Mediante el análisis *intensity peak* se obtienen las diferentes poblaciones de partículas y el tamaño promedio para cada una de ellas.

Tabla 11a. Tamaños de partícula (nm) de los diferentes sistemas modificando las concentraciones de polímero y estabilizante (Análisis *Intensity Peak*).

		ESTABILIZANTE								
		Pluronic® F-68						Tween® 20		
		1 %			1.5 %			0.5 %		
C A P	0.5 %	%	TP	DE	%	TP	DE	%	TP	DE
		100.0	427.6	342.9	99.2 0.8	137.1 2.4	66.9 0.3	100.0	22.5	21.7
		100.0	73.9	72.3	70.1 29.9	1.0 725.8	0.2 158.6	50.4 49.6	177.8 1.0	20.8 0.2
		100.0	427.5	342.9	100.0	62.4	61.2	100.0	158.9	164.4
		78.6 21.4	1000 52.4	116.8 18.8	63.0	1000 85.2	116.8 29.6	100.0	416.6	342.4
	1 %	69.0 31.0	108.1 1.0	17.1 0.2	100.0	113.9	38.9	100.0	169.0	34.2
		52.2 34.1 13.8	81.7 393.9 1.0	20.3 63.3 0.2	100.0	104.0	20.0	100.0	162.3	42.1
		74.4 25.6	136.0 1.0	32.1 0.2	100.0	414.5	342.3	91.7 6.2 2.1	207.0 1.9 19.1	65.6 0.5 3.2
		100	424.1	339.7	100.0	122.8	22.0	97.6 2.4	206.4 1.5	48.1 0.2

% = Porcentaje de las poblaciones de partículas;
 TP = Tamaño de partícula; DE= Desviación estándar

Tabla 11b. Tamaños de partícula (nm) de los diferentes sistemas modificando las concentraciones del polímero y estabilizante (Análisis *Intensity Peak*).

		ESTABILIZANTE											
		Tween®80			Mowiol® 40-88								
		0.5 %			0.1 %			0.3 %			0.5 %		
C A P	0.5 %	%	TP	DE	%	TP	DE	%	TP	DE	%	TP	DE
		100.0	413.7	342.3	100.0	429.6	341.1	100.0	2.6	1.4	100.0	414.7	342.3
		100.0	97.4	22.0	100.0	11.4	8.9	86.1 13.9	295.3 1.6	80.4 0.2	100.0	127.8	130.0
		85.3 14.7	84.5 1.0	18.8 0.2	59.6 40.4	1.0 73.9	0.2 8.8	100.0	429.5	343.0	100.0	429.0	343.0
		100.0	81.8	20.2	100.0	429.1	343.0	78.6 19.0 2.4	1000 334.9 1.5	116.8 79.7 0.2	100.0	428.9	343.0
	1 %	77.7 22.3	103.2 325.5	25.9 115.3	100.0	427.7	342.8	96.8 3.2	187.0 1.5	30.9 0.2	94.8 5.2	186.2 1.5	29.7 0.2
		62.8 37.2	166.5 1.0	26.3 0.2	95.7 4.3	320.2 1.8	75.1 0.4	94.0 3.7 2.2	194.1 29.3 1.5	56.2 4.9 0.2	66.5 33.5	138.3 1.0	32.9 0.2
		60.3 39.7	92.3 1.0	21.9 0.2	100.0	428.5	342.9	98.9 1.1	220.9 2.6	97.1 0.5	69.1 21.4 9.5	185.7 1.0 50.0	28.9 0.2 6.3
		100.0	13.6	11.1	100.0	12.1	10.4	100.0	4.6	3.0	100.0	427.6	342.8

**% = Porcentaje de las poblaciones de partículas;
TP = Tamaño de partícula; DE= Desviación estándar**

La selección del mejor sistema se realizó tomando en cuenta la desviación estándar, el índice de polidispersidad (PDI) y el tipo de distribución monomodal (una población) o multimodal (varias poblaciones). Se pretendía encontrar un sistema con una población monomodal y estrecha.

De los resultados mostrados en la tabla 11a se seleccionó el lote de Pluronic® F-68 de concentración 1.5 % y CAP al 1 % debido a que presentaba una desviación estándar mejor y sólo presentaba una distribución monomodal, en comparación con los otros lotes.

El índice de polidispersidad (PDI), es un parámetro que nos indica que tan homogénea es la dispersión, un alto índice de polidispersidad nos indica que hay partículas con tamaños diferentes. El lote preparado con Pluronic® F-68 al 1.5 % p/v y CAP al 1 % p/v, presenta los valores del PD que van desde 0.11 hasta 0.37 y un coeficiente de variación (CV) de 0.34 a 0.43 (Ver anexo 1 tablaA1.1.). Lo cual nos indica que se trata de una distribución estrecha. Esto también se puede observar en la figura 15 donde se presentan las gráficas usando como estabilizante Pluronic® F-68 a las diferentes concentraciones; que a pesar de que al utilizar una concentración de 1.5 % p/v para el estabilizante y 0.5 % p/v de CAP las distribuciones son mucho más estrechas en comparación con el lote seleccionado, pero ese lote se descartó pues presentaba mayor

desviación estándar y una distribución multimodal. Además al elegir el lote con mayor proporción de polímero se intentaba obtener un mayor rendimiento de nanopartículas.

Para el caso de las gráficas del ajuste unimodal, los ejes se presentan de esta manera: Para el eje de la variable dependiente (y) intensidad de la lectura y para la variable independiente (x) tamaño de partícula en nm.

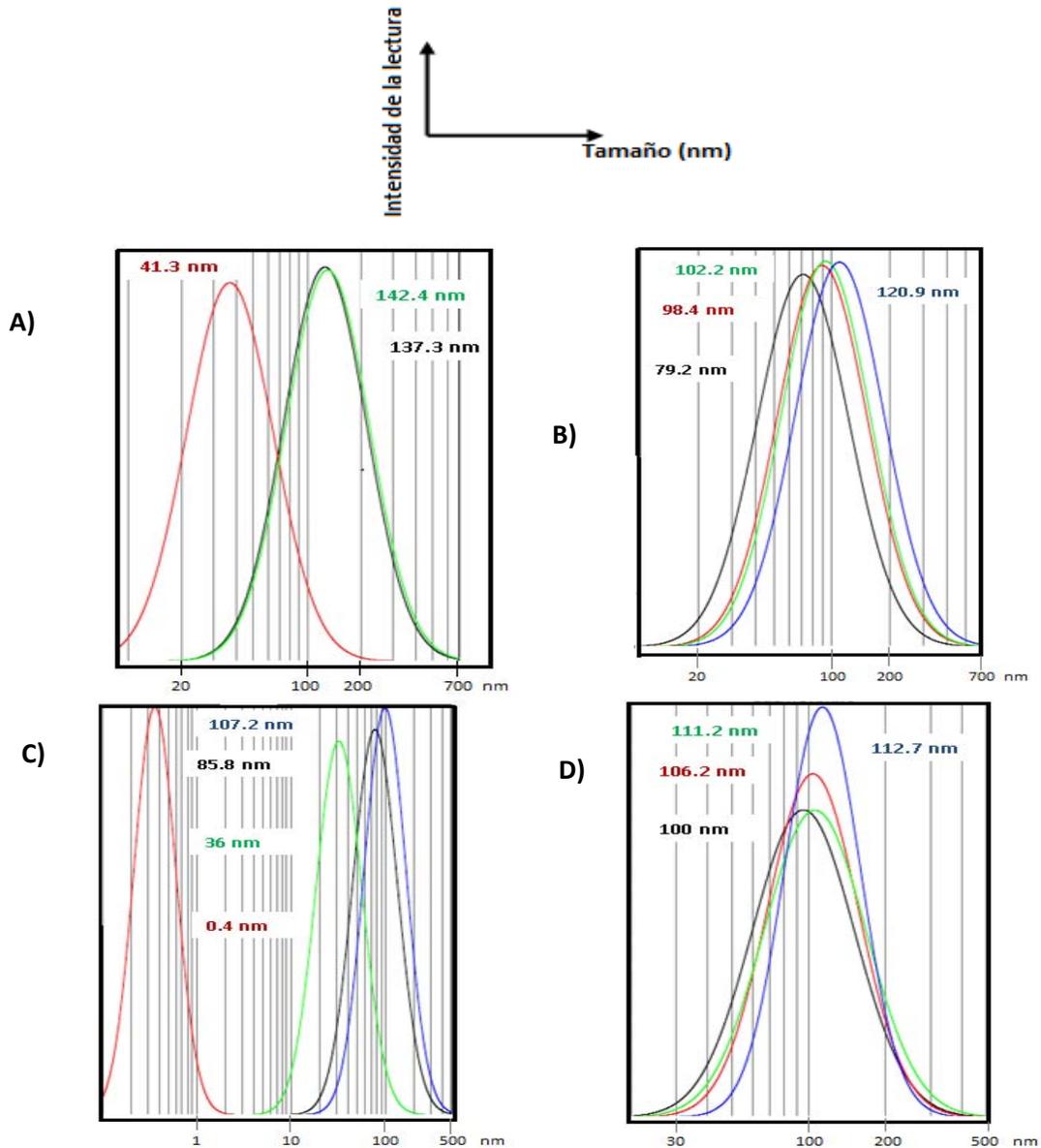


Figura 15. Gráficas del ajuste unimodal del tamaño de partícula usando como estabilizante Pluronic® F-68.

A) Pluronic® F-68 al 1 % y CAP al 0.5 %; B) Pluronic® F-68 al 1 % CAP al 1 % ; C) Pluronic® F-68 al 1.5 % CAP al 0.5 % y D) Pluronic® F-68 al 1.5 % CAP al 1 %; la concentración está expresada % (p/v) para todos los casos

De acuerdo con los resultados mostrados en la tabla 11b, se seleccionó el lote preparado con Mowiol® 40-88 de concentración 0.5 % p/v y CAP al 1 % p/v, a pesar de que no presentaba una distribución monomodal sino una multimodal (más de una población), pero en comparación con los otros lotes presenta una menor desviación estándar. El PDI presenta valores de 1.53 a 2.58 y con respecto al CV, se obtuvieron valores de 0.48 a 0.51 (Ver anexo 1 tabla A1.2). En la figura 16 se presentan las gráficas de todos los lotes preparados con Mowiol® 40-88. Estos resultados son mayores a los valores de Pluronic® F-68; sin embargo, se decidió trabajar con ambos y de ahí seleccionar el más adecuado para la formulación de nanopartículas. Además para la selección del lote de Mowiol® 40-88 también se tomó en cuenta que aún con concentraciones elevadas de polímero se obtenían mejores rendimientos en el proceso de obtención de nanopartículas.

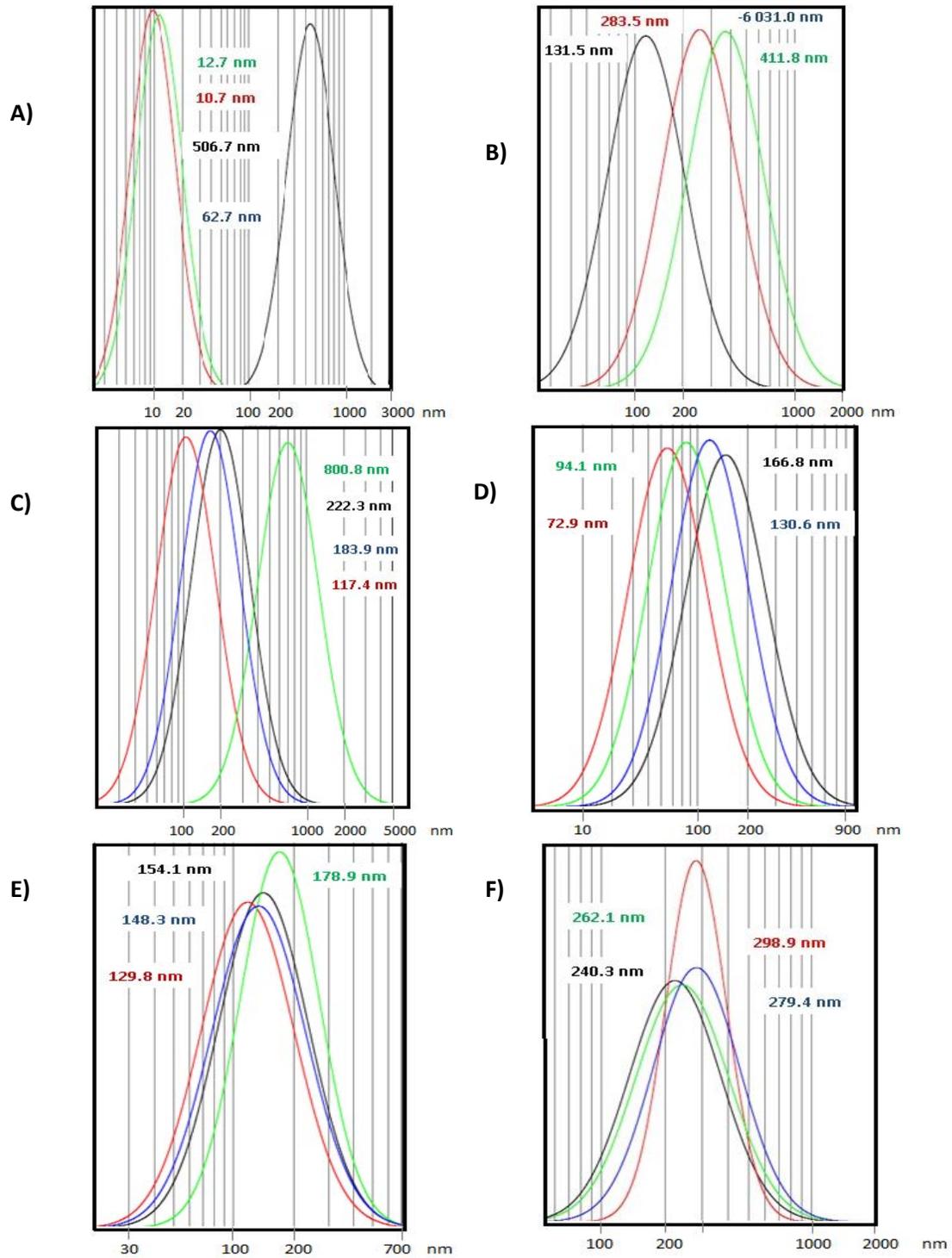


Figura 16. Gráficas del ajuste unimodal del tamaño de partícula usando como estabilizante Mowiol® 40-88.

A) Mowiol® 40-88 al 0.1 % y CAP al 0.5 %, B) Mowiol® 40-88 al 0.3 % y CAP al 0.5 %, C) Mowiol® 40-88 al 0.5 % y CAP al 0.5%, D) Mowiol® 40-88 al 0.5 % y CAP al 1 %, E) Mowiol® 40-88 al 0.3 % y CAP al 1 %, F) Mowiol® 40-88 al 0.1 % y CAP al 1 %; la concentración está expresada % (p/v) para todos los casos.

En la figura 16, se muestran las distribuciones unimodales del Mowiol® 40-88; se observa como en el caso del Pluronic® F-68 que la distribución no es muy estrecha pero presenta desviación estándar menor a los otros lotes.

En la figura 17 y 18 se presentan las gráficas de los lotes que no fueron seleccionados debido a que presentaban distribuciones multimodales y los parámetros estadísticos evaluados no fueron favorables.

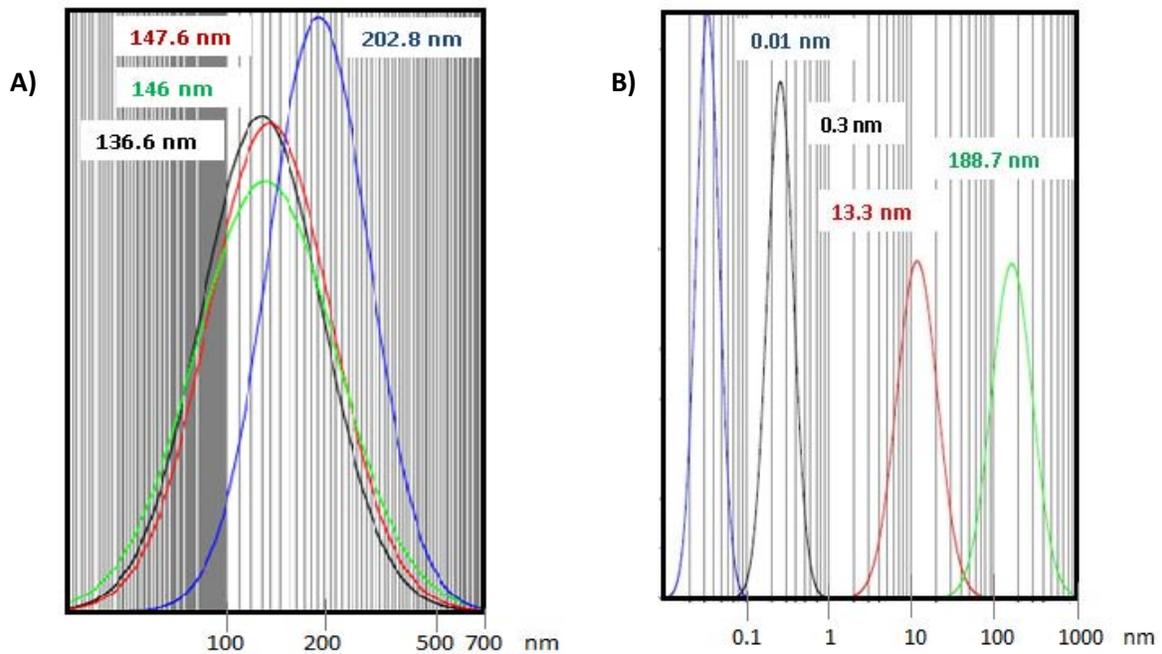


Figura 17. Gráficas del ajuste unimodal del tamaño de partícula usando como estabilizante Tween® 20.

A) Tween® 20 al 0.5 % y CAP al 1 %, B) Tween® 20 al 0.5 % y CAP al 0.5 %; la concentración está expresada % (p/v) para los dos casos

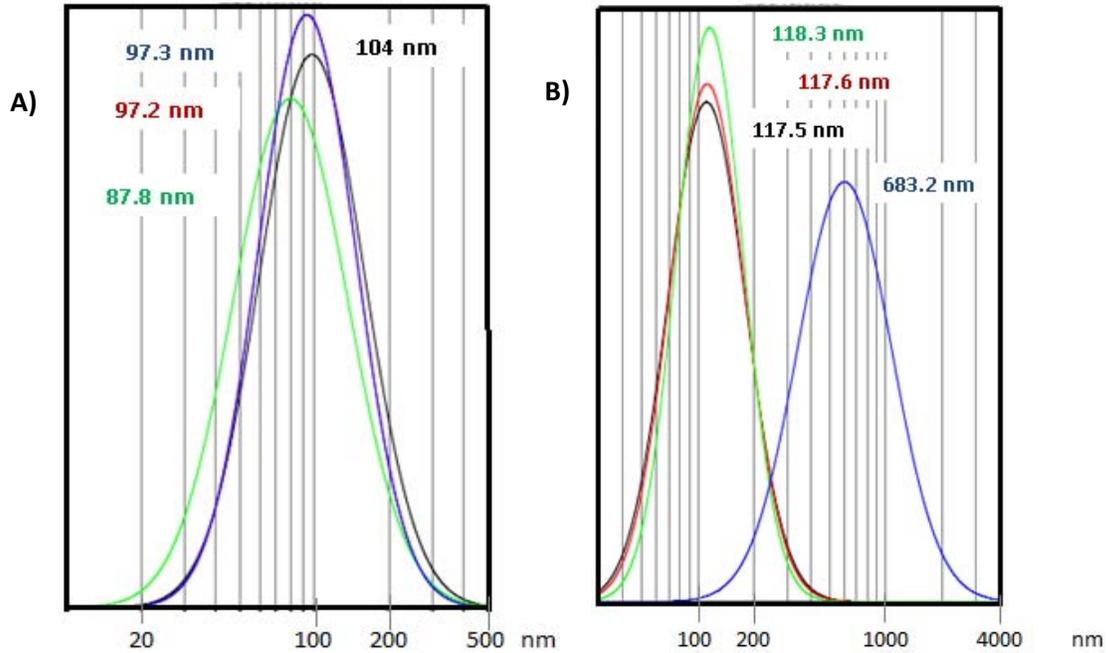


Figura 18. Gráficas del ajuste unimodal del tamaño de partícula usando como estabilizante Tween® 80.

A) Tween® 80 al 0.5 % y CAP al 0.5 %, B) Tween® 80 al 0.5 % y CAP al 1%; la concentración está expresada % (p/v) para dos casos.

En la tabla 12a y 12b se presentan las observaciones realizadas al momento de preparar los lotes con diferente estabilizante y a diferente concentración. Usando concentraciones de polímero de 0.5 y 1 % p/v.

Tabla 12a. Observaciones físicas de cada sistema de Pluronic® F-68 y Tween® 20 (color, aspecto con o sin presencia de agregados) justo en el momento de su preparación.

		ESTABILIZANTE		
		Pluronic® F-68		Tween® 20
CAP	OBSERVACIONES FÍSICAS			
	0.5 %	1 %	1.5 %	0.5 %
		Solución lechosa, formación de agregados tipo hebras y espuma	Solución lechosa, ligera formación de nata en la superficie	Solución blanca, formación de agregados
	1 %	Solución blanca, formación de agregados	Solución lechosa, ligera formación de nata (película), formación de agregados	Casi inmediata formación de nata al agregar la fase orgánica, solución lechosa con agregados

Tabla 12b. Observaciones físicas de cada sistema Tween® 80 y Mowiol® 40-88 (color, aspecto, con o sin presencia de agregados) en el momento de la preparación.

		ESTABILIZANTE			
		Tween® 80	Mowiol® 40-88		
C A P	OBSERVACIONES FÍSICAS				
		0.5 %	0.1 %	0.3 %	0.5 %
	0.5 %	Ligeramente opalescente	Solución opalescente con agregados	Solución turbia con agregados tipo hebras	Solución turbia, formación de nata gruesa y agregados
1 %	Solución opalescente con agregados	Solución lechosa, formación de agregados tipo hebras	Solución opalescente, formación de agregados	Solución lechosa, formación de nata gruesa y agregados	

Otro parametro que influyó en la elección de los lotes, fueron las observaciones al momento de preparar los lotes . La mayoría de los lotes se tornaban de un colo blanco lechoso con presencia de agregados.En el caso del sistema preparado con Pluronic® F-68, este era más inestable debido a que al momento de agregar la fase orgánica de inmediato se observaban agregados y al finalizar la preparación de esté se resuspendía obteniendo un sistema aparentemente homogéneo pero pasados unos minutos volvían aparecer los agregados. Por el contrario, para el sistema preparado con Mowiol®40-88 presentaban un color blanco lechoso con agregados pero al resuspender el sistema permanecía sin cambios aparentes (ver tablas 12a y 12b). Esto debido a que el Mowiol®40-88 (PVA) funciona como un coloide protector para los glóbulos de la emulsión formada durante la preparación de las nanoesferas; las moléculas de PVA son absorbidas en las superficie de los glóbulos lo cual previene su coalescencia (GARCÍA, 2011).

La selección de las concentraciones de los estabilizantes se hizo con base en estudios realizados con anterioridad. Generalmente se manejan concentraciones muy bajas de estabilizantes; como en el trabajo de Sin Cheow-Hadinoto que menciona que el PVA se ha utilizado al 2 % (p/v fase acuosa) para preparación de nanopartículas. Otro ejemplo es el de Garay-Jiménez que utilizo 3 % (en peso) de dodecil sulfato de sodio para nanopartículas de poliacrilato. Raphaël Labruère *et al* utilizó Pluronic® F-68 al 0.5 % (p/v) para preparar nanopartículas de poli (vinil benzoato) por el método de nanoprecipitación. La formulación de nanopartículas se realiza usando bajas

concentraciones de polímero en fase orgánica (< 1% p/v) ya que a concentraciones elevadas se forman agregados y se obtienen rendimientos bajos (PIÑÓN-SEGUNDO, 2003).

Con base en los resultados anteriores de los lotes seleccionados se decidió reproducirlos para elegir el mejor estabilizante. Se prepararon a las mismas condiciones, 75 mL de fase acuosa y 10 mL de fase orgánica; pero esta vez incorporando el principio activo de concentración 4 % p/v con respecto a la fase orgánica; y al 40 % p/p con respecto al polímero. Los lotes fueron preparados por triplicado.

En la tabla 13 se presentan los resultados del tamaño de partícula usando un análisis *intensity peak*, para los dos estabilizantes Pluronic® F-68 al 1.5% (p/v) y Mowiol® 40-88 al 0.5 % (p/v). La concentración del polímero empleada para estos sistemas fue de 1% (p/v). Las determinaciones del tamaño de partícula se hicieron por triplicado con el sistema en reposo y una cuarta con el sistema resuspendido (este resultado se encuentra sombreado en la tabla). Estas cuatro determinaciones se hicieron para cada lote preparado.

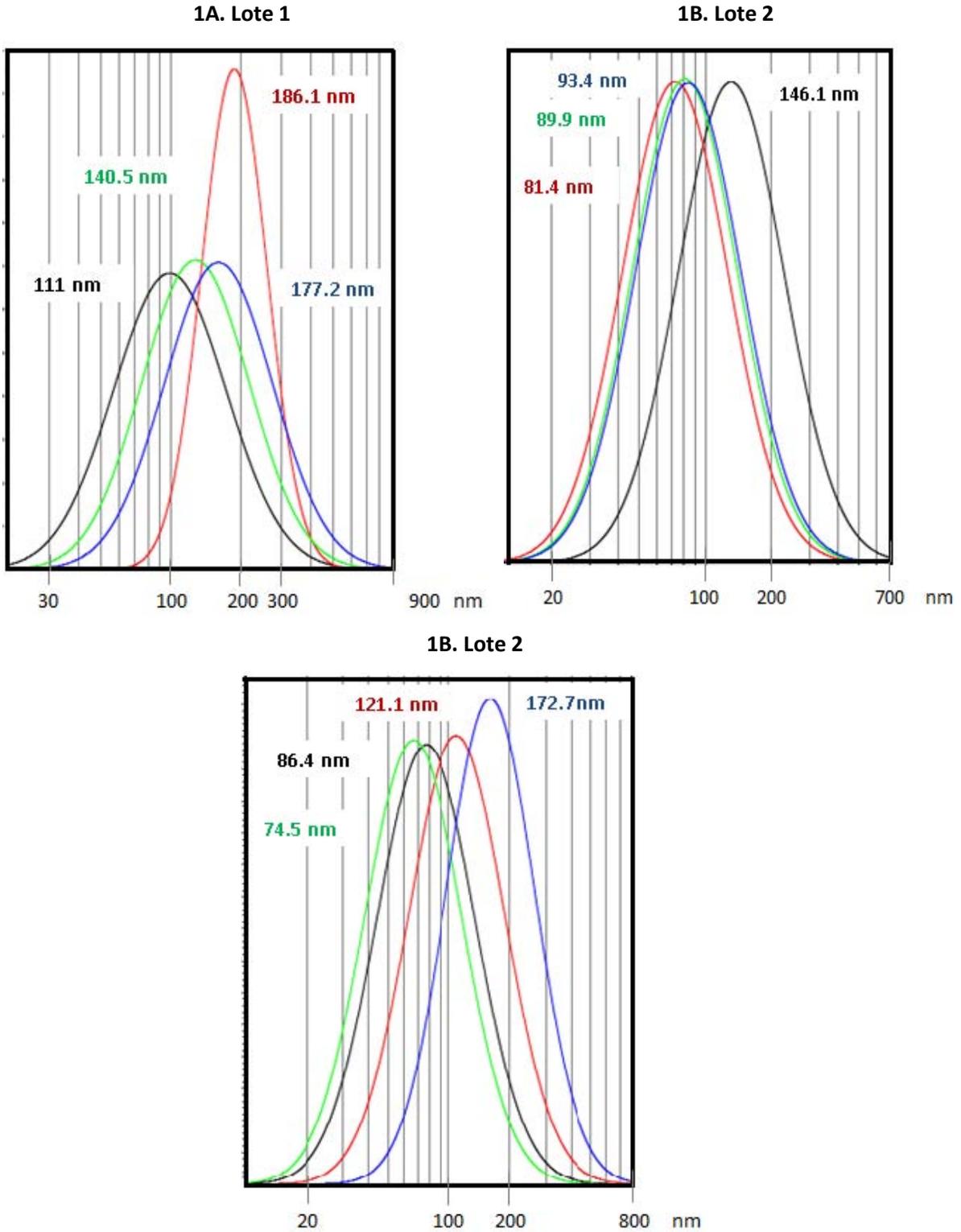
Tabla 13. Tamaños de partícula (nm) usando como estabilizante Pluronic® F-68 y Mowiol® 40-88 (Analysis Intensity Peak)

		ESTABILIZANTE						
		Pluronic® F-68			Mowiol® 40-88			
		1.5 %			0.5 %			
		LOTE	%	TP	DE	%	TP	DE
C A P	1 %	1	69.3	182.6	22.8	97.2	181.4	20.8
			30.7	1.0	0.2	2.8	1.5	0.2
			100.0	4.0	2.3	77.7	198.5	52.9
						22.3	1.0	0.2
			85.1	174.1	20.8	98.9	187.7	31.9
			14.9	1.0	0.2	1.1	5.6	0.7
		100.0	429.2	343.0	100.0	13.4	11.8	
		2	94.2	159.7	31.0	100.0	426.9	342.8
			5.8	1.5	0.2			
			91.8	124.7	40	65.0	163.9	28.5
			7.9	1.8	0.4	35.0	1.0	0.2
			0.3	5.6	0.7			
	55.4		113.8	13.5	95.1	206.5	48.2	
	44.6	1.0	0.2	4.9	1.5	0.2		
	100.0	426.6	342.8	92.9	206.5	48.1		
				7.1	1.5	0.2		
	3	100.0	426.2	342.7	100.0	427.6	342.8	
		69.0	107.3	17.8	100.0	160.5	30.6	
31.0		1.0	0.2					
92.2		179.2	20.8	96.5	208.2	61.1		
7.8		1.5	0.2	3.5	8.2	3.3		
58.0		999.4	116.8	49.8	169.2	23.6		
21.8		110.9	21.0	26.0	1.0	0.2		
20.1		1.0	0.2	24.2	978.9	116.8		

**% = Porcentaje de las poblaciones de partículas;
TP = Tamaño de partícula; DE= Desviación estándar**

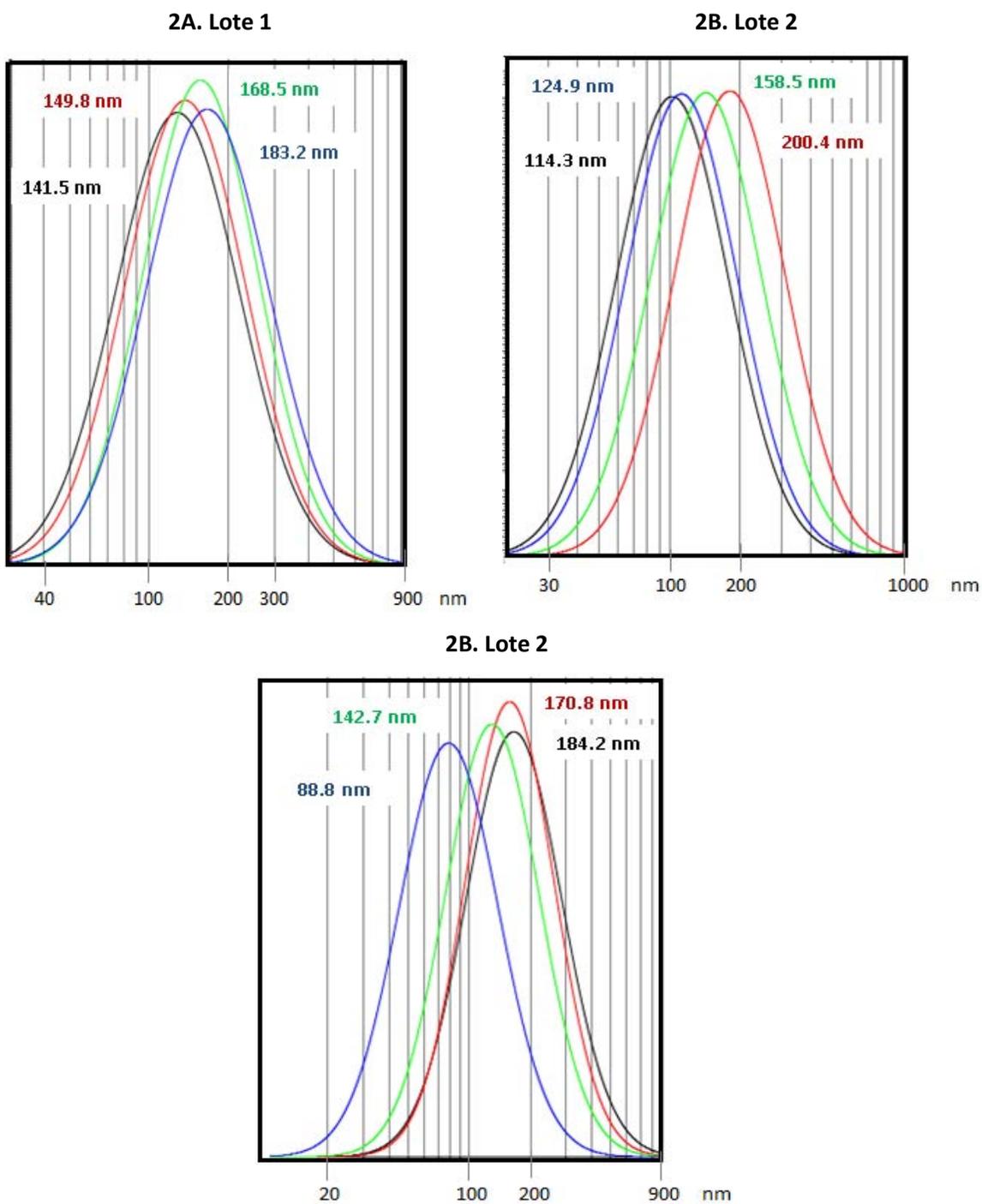
Para estos mismos lotes se observa que presentan distribuciones multimodales, los resultados son muy similares con respecto a las desviación estándar, aunque los lotes con Mowiol® 40-88 tiene medidas ligeramente menores con respecto a ese parámetro estadístico. Con respecto al PDI de igual forma son similares para el Pluronic® F-68 con un rango de 0.009-3.97, con un CV de 0.49-0.56 y para el Mowiol® 40-88 un PDI 0.63-4.62 y un CV de 0.46-0.52 (Ver anexo 1 tabla A1.3).

En la figura 19 y 20 se presentan las gráficas del ajuste unimodal para los tres lotes preparados con Pluronic® F-68 y Mowiol® 40-88 respectivamente.



Lotes preparados con 75 mL de fase acuosa y 10 mL de fase orgánica. Concentración del principio activo de 0.4% p/v.

Figura 19. Gráficas del ajuste unimodal del tamaño de partícula utilizando como estabilizante Pluronic® F-68 al 1.5 % (p/v).



Lotes preprados con 75 mL de fase acuosa y 10 mL de fase orgánica. Concentración del principio activo de 0.4% p/v.

Figura 20. Gráficas del ajuste unimodal del tamaño de partícula utilizando como estabilizante Mowiol® 40-88 al 0.5 % (p/v)

Debido a que los resultados eran similares entre los dos estabilizantes y el Pluronic® F-68® al momento de prepararlo seguía siendo inestable se decidió preparar los lotes aumentando el volumen de las fases para observar si el comportamiento era el mismo. Los dos estabilizantes presentaban distribuciones multimodales.

En la tabla 14 se presentan los resultados del tamaño de partícula de los lotes preparados con Pluronic® F-68 1.5 % p/v y Mowiol® 40-88 al 0.5 % p/v, aumentando 5 veces el volumen del lote para obtener 375 mL de fase acuosa y 50 mL de fase orgánica. La concentración del polímero fue de 1 % p/v y la del clotrimazol 40% p/p con respecto al polímero. Los lotes se prepararon por triplicado y las determinaciones del tamaño de partícula se hicieron por triplicado con el sistema en reposo y una cuarta con el sistema resuspendido.

Tabla 14. Resultados del tamaño de partícula (nm) para lotes de Pluronic® F-68 y Mowiol® 40-88

		ESTABILIZANTE						
		Pluronic® F-68 1.5 %			Mowiol® 40-88 0.5 %			
		LOTE	%	TP	DE	%	TP	DE
C A P	1 %	1	70.6	255.2	41.6	100.0	427.1	342.8
			17.5	69.1	12.0			
			11.9	1.0	0.2			
			97.7	183.4	24.6	94.5	170.6	21.8
			2.3	1.5	0.2	2.8	1.5	0.2
						2.7	20.5	2.4
			98.4	239.3	116.6	52.4	111.1	13.8
			1.6	2.4	0.3	47.6	1.0	0.2
			70.5	172.3	20.8	95.7	606.5	310.0
		29.5	1000	116.8	4.3	6.2	3.7	
		2	62.2	199.1	43.6	99.3	216.4	61.6
			33.8	1.0	0.2	0.7	15.1	3.4
			87.8	175.2	60.3	97.7	199.8	44.2
			12.2	2.6	1.1	2.3	1.5	0.2
			69.8	171.5	20.8	98.5	258.4	126.3
30.2	1.0		0.2	1.5	2.8	0.7		
100.0	428.4	342.9	96.6	223.5	68.4			
			2.7	13.1	3.5			
			0.7	2.4	0.3			
3	40.1	104.0	20	100.0	225.5	57.3		
	38.8	1.0	0.2					
	21.0	649.4	75.8					
	73.3	166.4	42.3	97.5	199.5	44.0		
	26.7	1.0	0.2	2.5	1.5	0.2		
	42.2	93.6	22.1	100.0	283.6	155.9		
	37.0	1.0	0.2					
	20.8	421.7	49.2					
100.0	430.5	343.1	96.8	198.5	58.4			
			3.2	1.5	0.2			

En la tabla 14 podemos observar que las desviaciones estándar de ambos estabilizantes variaban mucho de lote a lote, pero en el anexo 1 en la tabla A1.4 se presentan los PDI y podemos ver que los valores de este parámetro para el Mowiol® 40-88 son ligeramente menores a los del Pluronic® F-68, ya que estos presentan valores que van desde 0.005 a 2.56 y en el caso de Pluronic® F-68 de 0.032 a 3.45. Por este motivo se decidió trabajar con Mowiol® 40-88 además los lotes preparados con este estabilizante se observaban homogéneos o con menor presencia de agregados, que los lotes preparados con Pluronic® F-68.

En las figuras 21 y 22 se presentan las gráficas del ajuste unimodal para los tres lotes preparados con Pluronic® F-68 y Mowiol® 40-88 respectivamente.

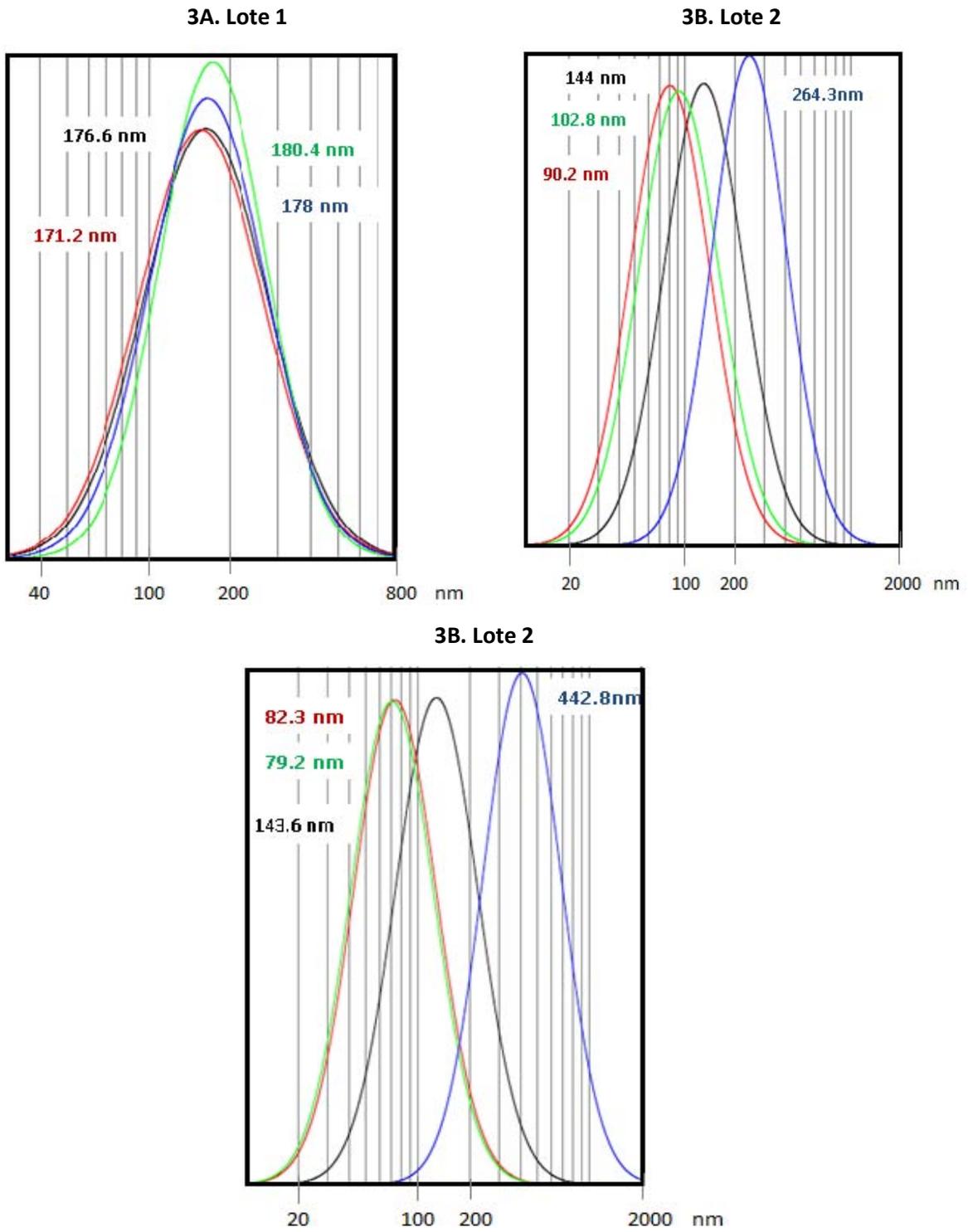


Figura 21. Gráficas del ajuste unimodal del tamaño de partícula, lotes de 375 mL utilizando como estabilizante Pluronic® F-68 al 1.5 % (p/v)

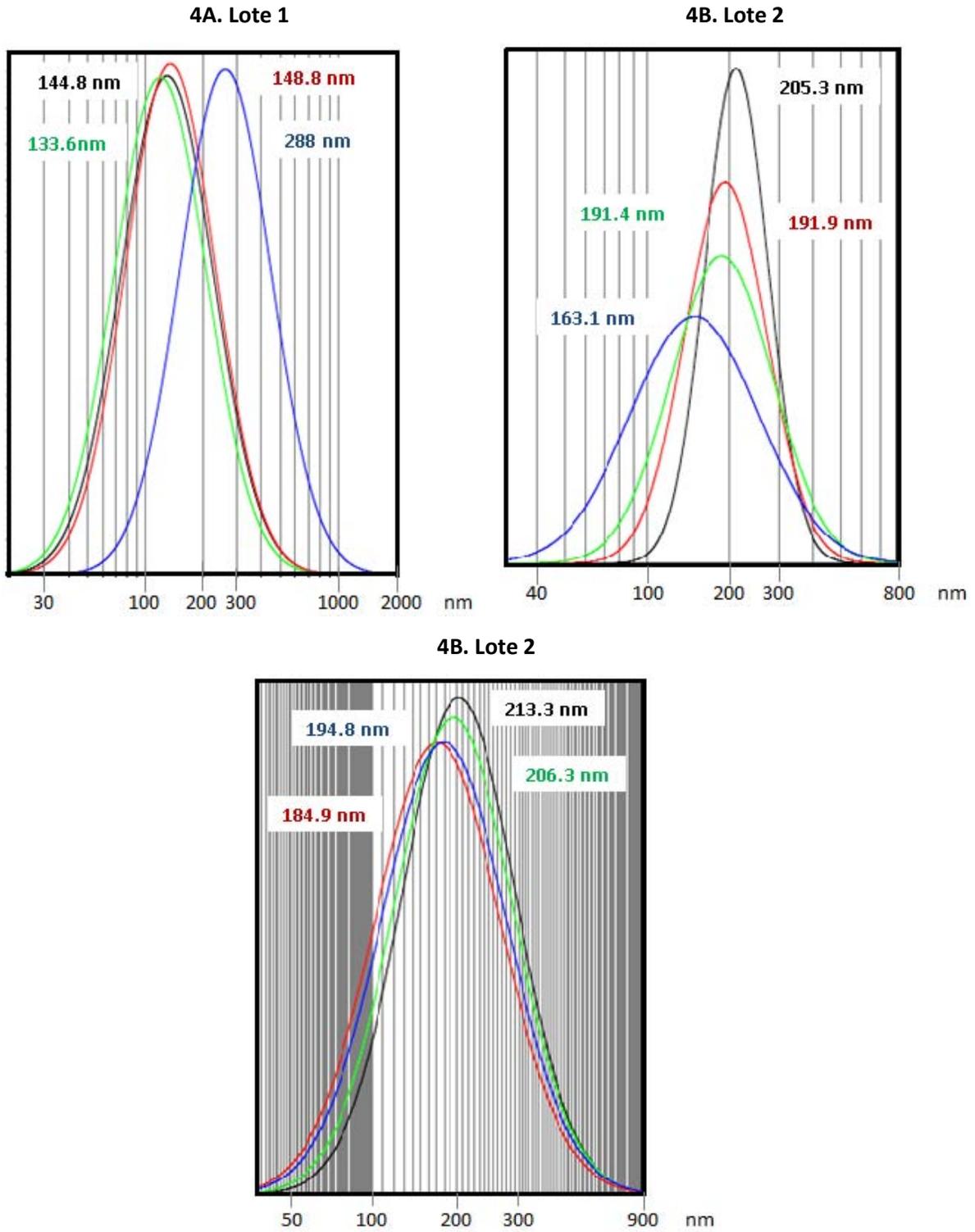


Figura 22. Gráficas del ajuste unimodal del tamaño de partícula, lotes de 375 mL utilizando como estabilizante Mowiol® 40-88 al 0.5 % (p/v)

Una vez seleccionado el estabilizante y su concentración, se prepararon lotes usando distintos volúmenes de fase orgánica (50, 75 y 100 mL) y manteniendo fija la concentración de polímero en la fase orgánica (1% p/v) y la concentración de clotrimazol (40 mg clotrimazol/100 mg de CAP). Lo anterior con la finalidad de verificar si era posible obtener más nanopartículas y si se lograba incorporar mayores cantidades de principio activo en ellas. En la tabla 15 se presentan los tamaños de partícula de los lotes modificando la fase orgánica, los volúmenes utilizados fueron 50, 75 y 100 mL, utilizando Mowiol® 40-88 al 0.5 % de p/v. Se hicieron dos determinaciones para cada lote, con el sistema en reposo antes y después de centrifugar.

Tabla 15. Tamaños de partícula (nm) de los lotes modificando la cantidad de fase orgánica.

		ESTABILIZANTE							
		Mowiol® 40-88							
		0.5 %							
C A P	1 %	Antes de centrifugar					Después de centrifugar		
		Lote	Vol. FO (mL)	%	TP	DE	%	TP	DE
		1	50	59.3	975.4	116.8	100.0	430.2	343.1
				40.7	151.0	43.8			
				94.8	269.2	32.0	100.0	432.5	343.4
				5.2	1.5	0.2			
		2	75	98.8	407.2	49.2	100.0	462.9	96.0
				1.2	48.7	5.7			
				100.0	430.8	343.3	98.5	480.2	109.0
				1.5	2.4	0.3			
3	100	94.8	617.1	306.5	100.0	516.1	122.9		
		5.2	8.0	5.5					
		100.0	507.0	120.7	94.6	585.4	112.1		
		0.5	13.3	1.6	4.9	2.2	0.8		
					0.5	13.3	1.6		

En los resultados mostrados en la tabla 15 podemos observar que para cada volumen de fase orgánica las desviaciones estándar son altas y difieren mucho entre ellas y para el caso del índice de polidispersidad ocurrió lo mismo; pero la mayor eficiencia del proceso se obtuvo con Mowiol® 40-88 0.5 % p/v y CAP a 1 % p/v con 100 mL de fase orgánica, obteniéndose nanopartículas de tamaño submicrónico <700 nm (ver anexo 1 tabla A1.5). Debido a que el sistema se observaba más homogéneo sin tantos agregados además de que a pesar de que aumentaba la cantidad de los componentes en comparación con los otros dos lotes se esperaba obtener que la cantidad de

los liofilizados fueran proporcionales entre los 3 lotes lo cual no sucedió, el tamaño del liofilizado para el lote de 100 mL era mucho mayor, con lo cual podemos decir que hubo menos pérdida durante el proceso. Para el lote de 50, 75 y 100 mL de fase orgánica la cantidad de liofilizado que se obtuvo fue de 0.0861 g, 0.3488 g y 0.8795 g respectivamente. En la figura 23 se presentan las Gráficas del ajuste unimodal de los lotes variando el volumen de fase orgánica utilizando Mowiol® 40-88.

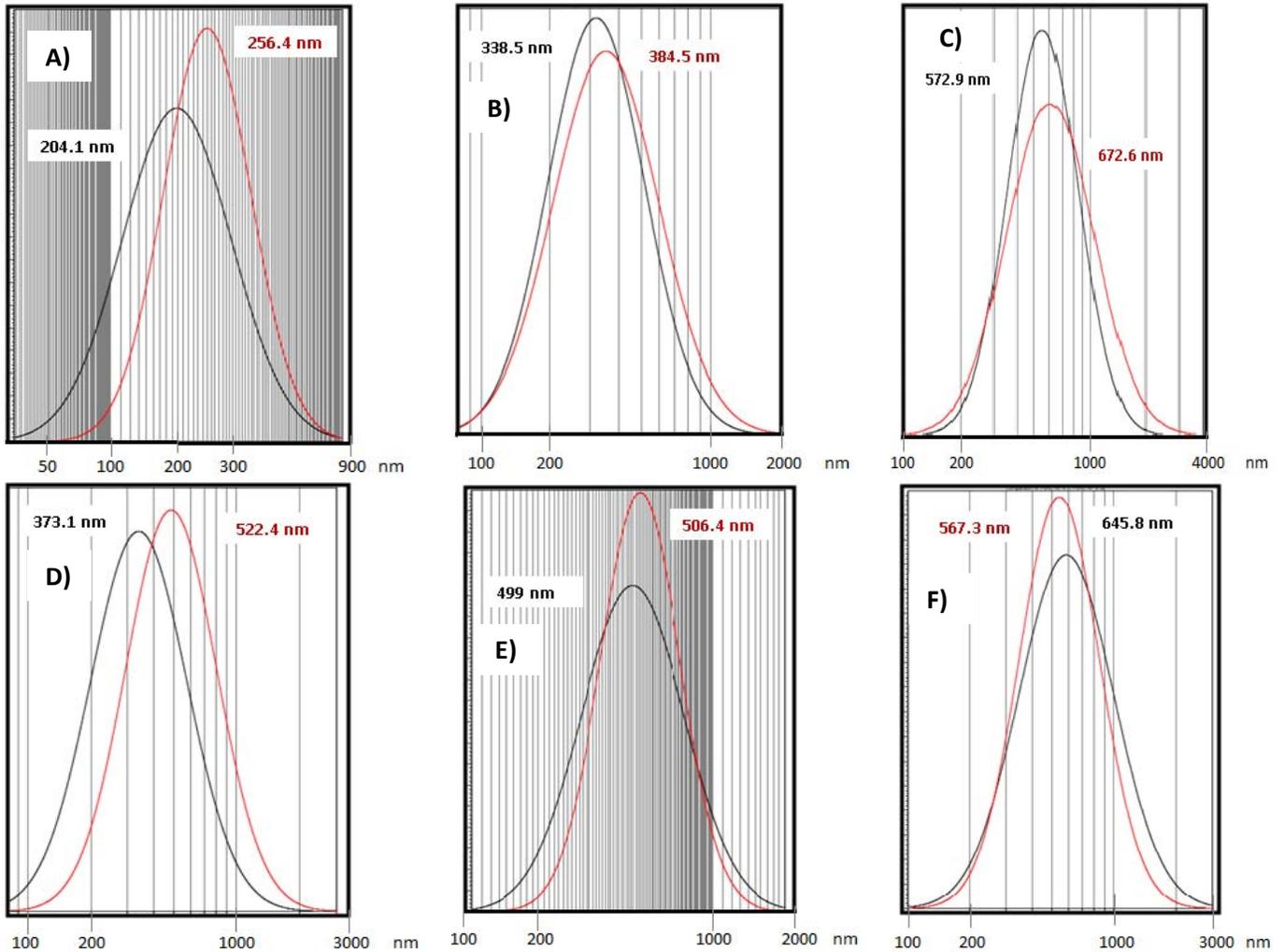


Figura 23. Gráficas del ajuste unimodal del tamaño de partícula modificando la fase orgánica.

A) Lote 1 vol. de fase orgánica 50 mL antes de centrifugar; B) Lote 2 vol. de fase orgánica 75 mL antes de centrifugar; C) Lote 3 vol. de fase orgánica 100 mL antes de centrifugar; D) Lote 1 vol. de fase orgánica 50 mL después de centrifugar; E) Lote 2 vol. de fase orgánica 75 mL después de centrifugar y F) Lote 3 vol. de fase orgánica 100 mL después de centrifugar.

Una vez que se seleccionó el lote de Mowiol® 40-88 0.5 % p/v y CAP a 1% p/v con 100 mL de fase orgánica, se llevó a cabo un análisis por calorimetría diferencial de barrido (DSC). Con este estudio se descartan posibles interacciones entre los componentes de las nanopartículas y se comprueba

si el principio activo se encuentra encapsulado dentro de ellas. En la figura 24 se muestran los termogramas obtenidos. El clotrimazol muestra un pico endotérmico en 147° C que indica la fusión del compuesto, esto coincide con lo reportado en el libro Clarke's Analysis of Drugs and Poisons, que menciona un punto de fusión teórico de 147 a 149° C y un exoterma que se le atribuye a una temperatura de cristalización a 316° C. Por otro lado, el CAP presenta dos temperaturas de transición vítrea experimental (Tg) en 154.70 y 205.13°C. En literatura la Tg teórica para el CAP fluctúa entre 170-205°C (GARCÍA, 2011). En el termograma del lote de nanopartículas estos picos no fueron detectados, la ausencia de estas señales confirman que el clotrimazol se encuentra disperso molecularmente en las nanopartículas.

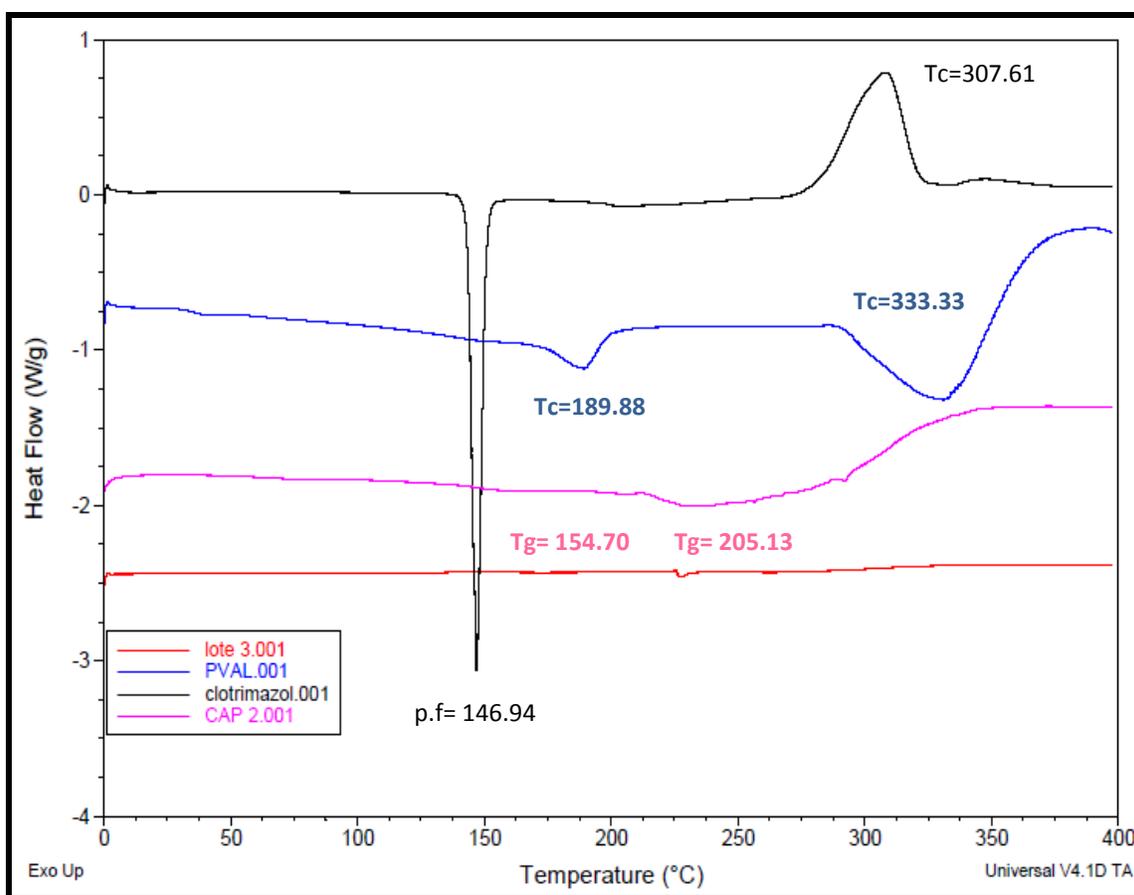


Figura 24. Termograma de los componentes del lote Mowiol® 40-88 0.5 % p/v y CAP a 1% p/v usando 100 mL de fase orgánica.

De acuerdo con los resultados obtenidos modificando la cantidad de fase orgánica se procedió a la preparación de nuevos lotes tomando como referencia el lote de 100 mL de fase orgánica; solo que estos nuevos lotes se prepararon con el doble de fase acuosa (750 mL) y sólo se aumentó la

mitad de fase orgánica (150 mL), modificando las proporciones de principio activo con respecto al polímero; las proporciones de fármaco usadas fueron de 30 y 60 % p/p con respecto al polímero y la concentración de éste en fase orgánica fue de 0.3 y 0.6 % p/v respectivamente. El estabilizante utilizado fue el Mowliol® 40-88 0.5% p/v. Los resultados del tamaño de partícula para éstos lotes se muestran en la tabla 16. Las determinaciones se hicieron por duplicado con el sistema en reposo y una tercera con el sistema resuspendido (se encuentra sombreada en la tabla) para antes y después de centrifugar.

Tabla 16. Tamaños de partícula (nm) de los lotes con 30 y 40 % p/p de principio activo.

		ESTABILIZANTE									
		Mowiol® 40-88									
		0.5 %									
C A P	1 %	Antes de centrifugar			Después de centrifugar			Después de liofilizar			
		P.A (%)	%	TP	DE	%	TP	DE	%	TP	DE
		30	83.4	409.9	49.2	100.0	502.5	333.7	100	429.4	343.0
			16.6	70.8	10.5						
			100.0	413.6	342.3						
		60	67.1	350.0	80.9	97.3	397.6	174.5			
			17.6	1.0	0.2						
			15.3	727.0	8.8						
		60	92.1	590.0	109.5	99.6	650.9	265.5			
			7.7	31.9	9.7						
0.2	3.7		0.4								
60	100.0	398.0	114.0	99.0	531.3	124.6					
	0.7	2.4	0.3								
	0.3	20.5	2.4								
100.0	428.6	342.9	100.0	559.3	322.2						

Las gráficas del ajuste unimodal para los lotes preparados a estas condiciones se muestran en la figura 25 antes y después de centrifugar. Las determinaciones se hicieron antes y después de este proceso para verificar que el tamaño de partícula no se modifica significativamente, se siguen obteniendo tamaños submicrónicos.

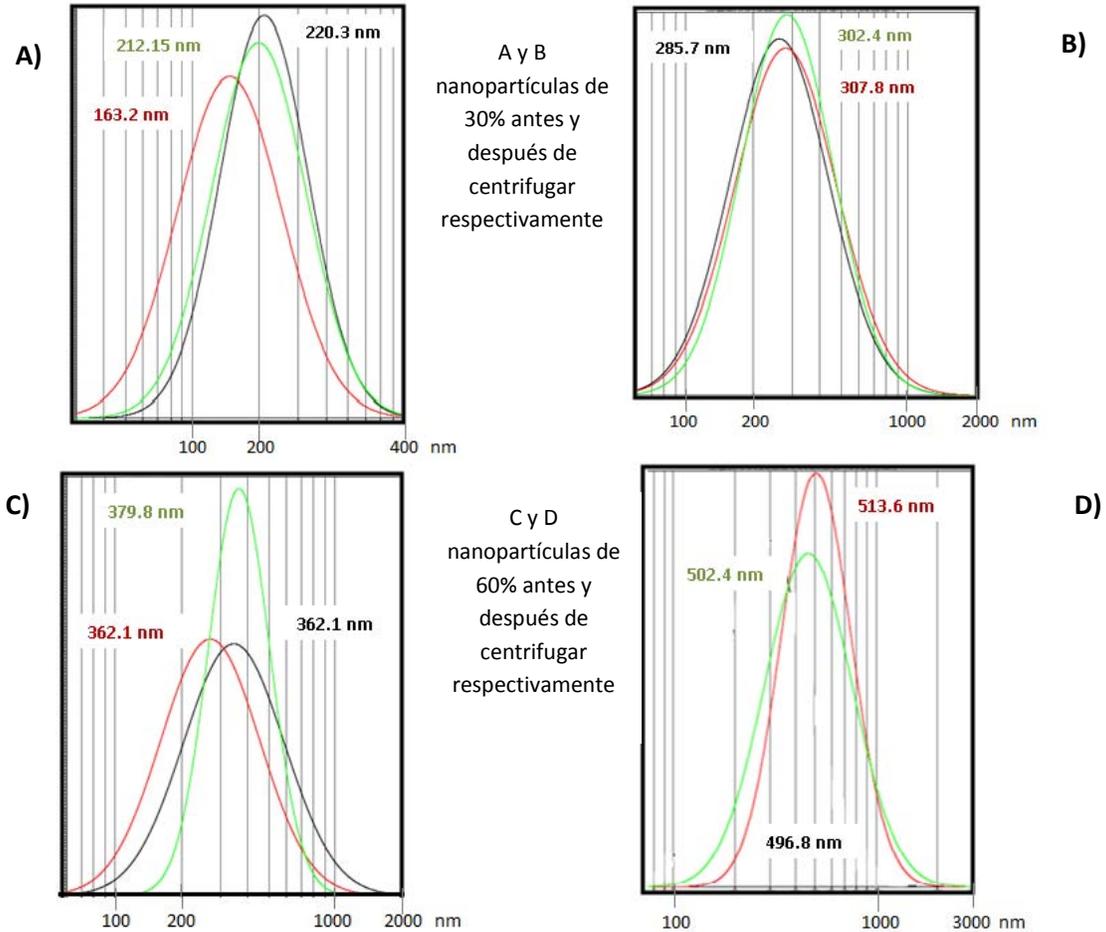


Figura 25. Gráficas del ajuste unimodal del tamaño de partícula de las nanopartículas de 30 y 60 % p/p de principio activo.

Analizando la tabla 16 se observa que todos los lotes preparados presentan un tamaño de partícula submicrónico ya que todas las partículas son menores a 700 nm. Al aumentar la proporción de principio activo se observó un ligero incremento en el tamaño de partícula. En trabajos anteriores se ha comprobado que al aumentar la proporción de principio activo, las nanopartículas incrementan su tamaño debido a que el principio activo se encapsula en mayor cantidad. Como es el caso de Piñón-Segundo (2003) que trabajó con nanopartículas de triclosán y García (2011) quien preparó nanopartículas con miconazol; en los dos casos se modificó la proporción de principio activo y se observó que al incrementar ésta, el tamaño de las nanopartículas aumentó.

A estos lotes preparados con 30 y 60 % p/p de clotrimazol (30 mg de clotrimazol/100 mg de CAP y 60 mg de clotrimazol/100 mg de CAP), se les determino el potencial Z, así como otras pruebas

entre ellas calorimetría diferencial de barrido (DSC), cuantificación y perfiles de liberación “*in vitro*” del principio activo.

El potencial Z o por su símbolo ζ , es una medida de la magnitud de la repulsión electrostática, de carga o atracción entre las partículas, y es uno de los parámetros fundamentales que se sabe afectan la estabilidad física de un sistema disperso. Esta medida aporta una visión detallada de las causas de la dispersión, la agregación o floculación, y se puede aplicar para mejorar la formulación de dispersiones, emulsiones y suspensiones. Este parámetro está relacionado con la carga de la superficie, una propiedad que poseen todos los materiales, o adquieren, cuando se suspenden en un fluido (FAIRHURST *et al*, 2011).

El potencial Z medido en un sistema en particular depende de la química de la superficie y también en la forma en que interacciona con su entorno circundante. Este parámetro siempre debe ser estudiado en ambientes bien definidos de pH y fuerza iónica (MALVERN® 2005). Por tal motivo, las determinaciones del potencial Z de los lotes preparados se hicieron en agua ya que era el medio de la formulación y en una solución amortiguadora de fosfatos pH 5.0 con Tween® 20 para observar cual sería el comportamiento de las nanopartículas durante los perfiles de liberación “*in vitro*”. Los valores de potencial Z para las nanopartículas en agua y solución amortiguadora con Tween® se encuentran en la tabla 17.

Tabla 17. Potencial zeta de los lotes de 30 y 60 % de principio activo

Lote (% de P.A)	Potencial Z (agua) (mV)	Potencial Z (pH=5.0) (mV)
30	-11.2	-1.42
60	-15.1	-1.24

Las nanopartículas con un potencial zeta por encima de ± 30 mV han demostrado ser estables en suspensión (OROPESA-NUÑEZ *et al*, 2012). Los valores obtenidos son menores a 30 mV, lo cual implica problemas de estabilidad física si las nanopartículas se mantienen en suspensión. Todos los materiales pueden adquirir de forma espontánea una carga eléctrica de la superficie cuando se pone en contacto con un medio polar (agua) existen diferentes mecanismos para que se carguen. Uno de ellos es la ionización de grupos de superficie, se observa comúnmente en materiales que contienen grupos funcionales ácido carboxílico y grupos que contienen amina. En esta última categoría son proteínas, polímeros iónicos, y polielectrolitos; adquieren su carga principalmente a

través de la ionización y / o disociación. La ionización de estos grupos (grado de desarrollo de carga) y la carga molecular neta (FAIRHURST *et al*, 2011).

Analizando la tabla 17 puede observarse que el potencial zeta siempre permanece negativo y su valor absoluto aumentó en el agua (pH=5.5). Los valores del potencial zeta están relacionados con la carga superficial generada por los grupos acetato del CAP, cuya disociación puede producir cargas negativas en las partículas. Al incrementar el pH, una fracción mayor de estos grupos funcionales se disocia provocando un incremento en la densidad de carga y en el potencial zeta (VERA *et al*, 1997). Las lecturas de potencial Z fueron realizadas por triplicado y en la figura 26 y 27 se observan las distribuciones obtenidas.

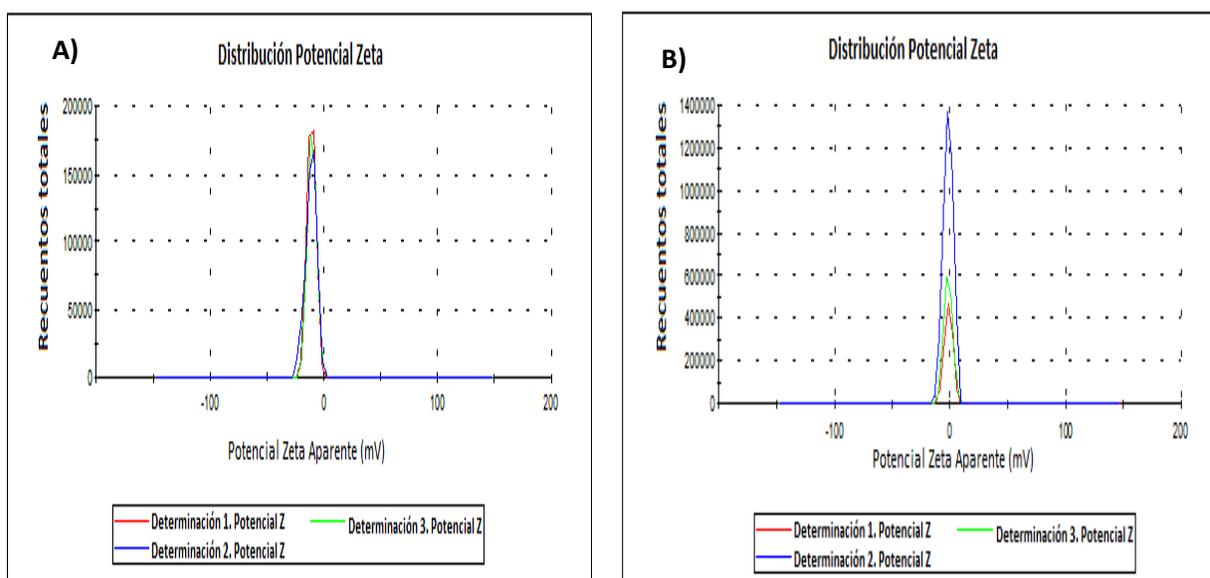


Figura 26. Distribución del potencial Zeta del lote de 30 % p/p de principio activo.
Se realizaron 2 determinaciones por triplicado variando el medio A) Agua desionizada y B) Solución amortiguadora de fosfatos pH 5.0 con Tween® 20.

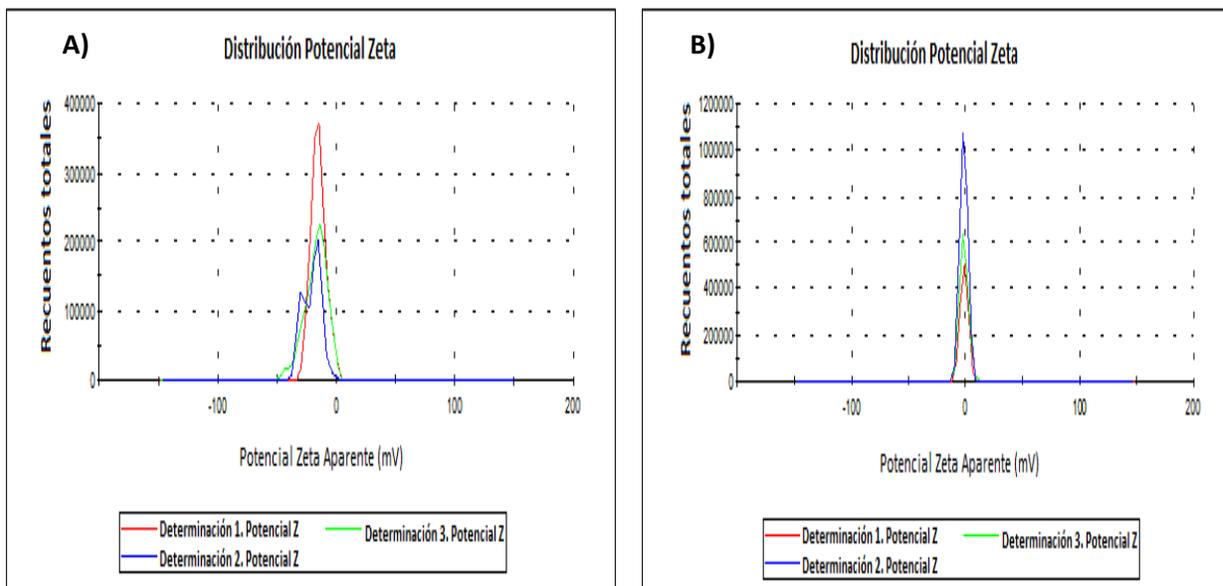


Figura 27. Distribución del potencial Zeta del lote de 60 % p/p de principio activo.

Se realizaron 2 determinaciones por triplicado variando el medio A) Agua desionizada y B) Solución amortiguadora de fosfatos pH 5.0 con Tween® 20.

La eficiencia de encapsulamiento se determinó mediante los cálculos propuestos en el año 1994 por Leroux y colaboradores (PIÑÓN-SEGUNDO, 2003).

$$\text{Clotrimazol cargado (\%)} = \frac{\text{Cantidad de clotrimazol en nanoesferas (g)}}{\text{Cantidad de nanoesferas (g)}} \times 100$$

$$E.E (\%) = \frac{\% \text{ de clotrimazol cargado}}{\% \text{ de clotrimazol inicial (1 - fracción del PVA)}} \times 100$$

La cuantificación de activo cargado, porcentaje de eficiencia de encapsulación y el porcentaje de PVA residual para los lotes de 30 y 60 % p/p de principio activo se muestran en la tabla 18.

Tabla 18. Cuantificación de los lotes de 30 y 60 % p/p de principio activo.

Lotes (% p/p P.A.)	Polímero (g)	Clotrimazol (g)	% E.E	% Clotrimazol cargado	Cantidad activo cargado (g)	% PVA Residual
30	1.5	0.45	68.83	15.76	0.2630	0.4237
	1.5	0.45	58.17	13.32		
	1.5	0.45	47.39	10.85		
Promedio			58.13	13.31		
60	1.5	0.9	44.57	16.57	0.3665	0.8018
	1.5	0.9	37.97	14.12		
	1.5	0.9	39.41	14.65		
Promedio			40.65	15.11		

El % de principio activo es conforme a la cantidad de polímero para cada lote.

El porcentaje de estabilizante residual para los lotes fue muy bajo, 0.4 y 0.8 % lo cual nos indica que el proceso para eliminar el PVA (Mowiol® 40-88) es adecuado, el cual se realizó mediante lavados y centrifugando para poder obtener las partículas sin estabilizante. En trabajos anteriores como los de Quintanar y colaboradores (1998) y Piñón-Segundo (2003), reportaron porcentajes de 6-8 y menor a 4 respectivamente. García (2011) reportó porcentajes de 1-4 % usando el mismo método para eliminar y cuantificar el PVA.

También se llevó a cabo un análisis por calorimetría diferencial de barrido para corroborar si existía o no, interacción entre los componentes de la formulación. En la figura 28 se presenta el termograma de estos lotes con 30 y 60 % p/p de principio activo.

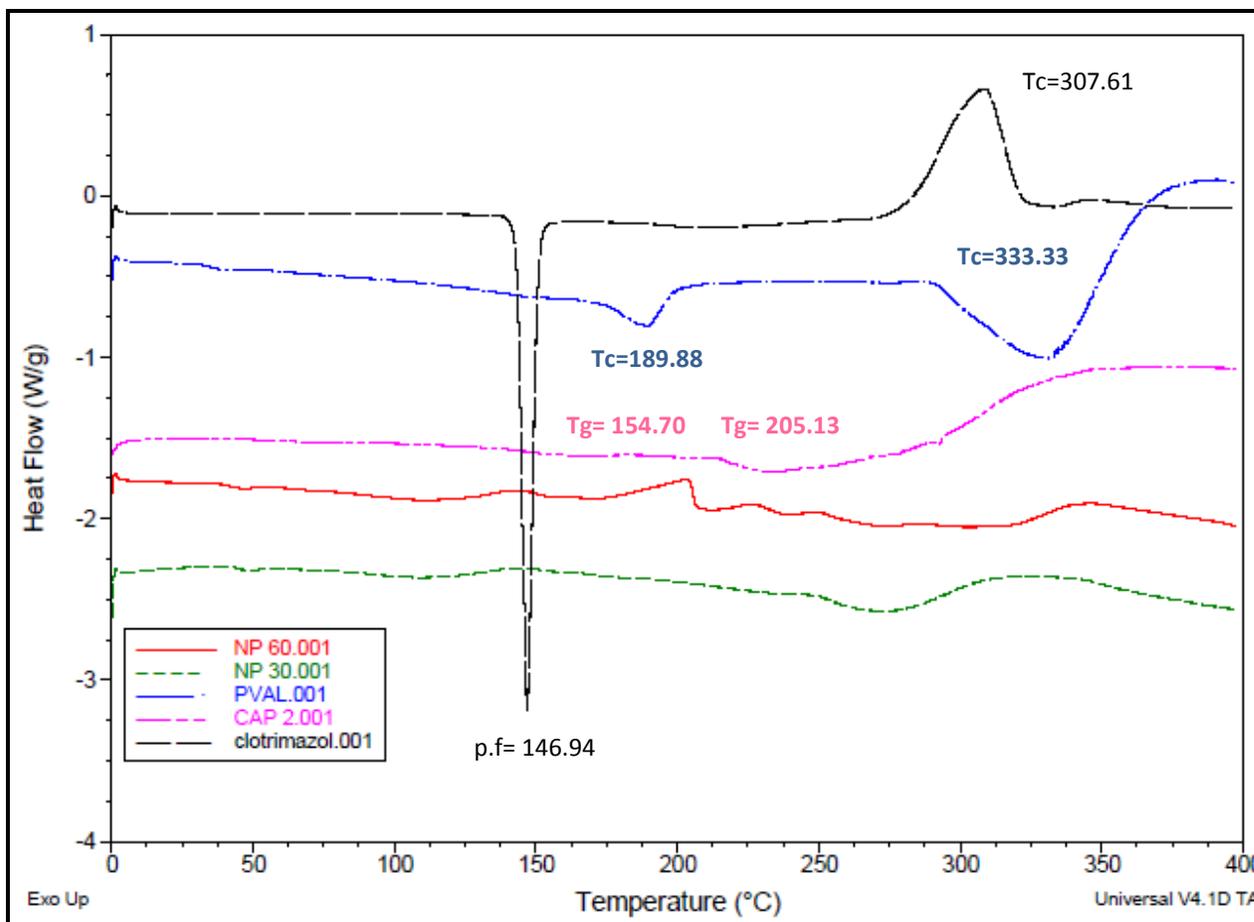


Figura 28. Termograma de los lotes de 30 y 60 % p/p de principio activo y los componentes de la formulación.

Como podemos observar en los termogramas de los lotes de nanopartículas no se observa los picos característicos de fusión (146.94°C) y cristalización (307.61°C) del clotrimazol, ni hay señal de algún cambio considerable en las temperaturas de transición vítrea del CAP, lo cual nos indica que el clotrimazol se encuentra disperso molecularmente en el polímero.

Para el análisis de la liberación *in vitro* del clotrimazol a partir de las nanopartículas obtenidas, se realizaron estudios empleando bolsas de diálisis en las que una cantidad conocida de nanopartículas se suspendieron en 3 ml de solución amortiguadora pH=5 con 5% de Tween® 20 y fueron sumergidas en 100 ml del mismo medio de disolución, manteniendo condiciones “sink”.

Se procedió a calcular los porcentajes liberados a diferentes tiempos, tomando en cuenta la cantidad máxima liberada al equilibrio como el 100 %. Estos porcentajes y las cantidades que participan en el proceso de liberación se muestran en el anexo 4. En las figuras 29 y 30 se pueden

observar los perfiles de liberación, representados en términos de porcentaje de clotrimazol liberado en función del tiempo para las nanopartículas cargadas con un 30% de activo y las preparadas con un 60% de activo respectivamente.

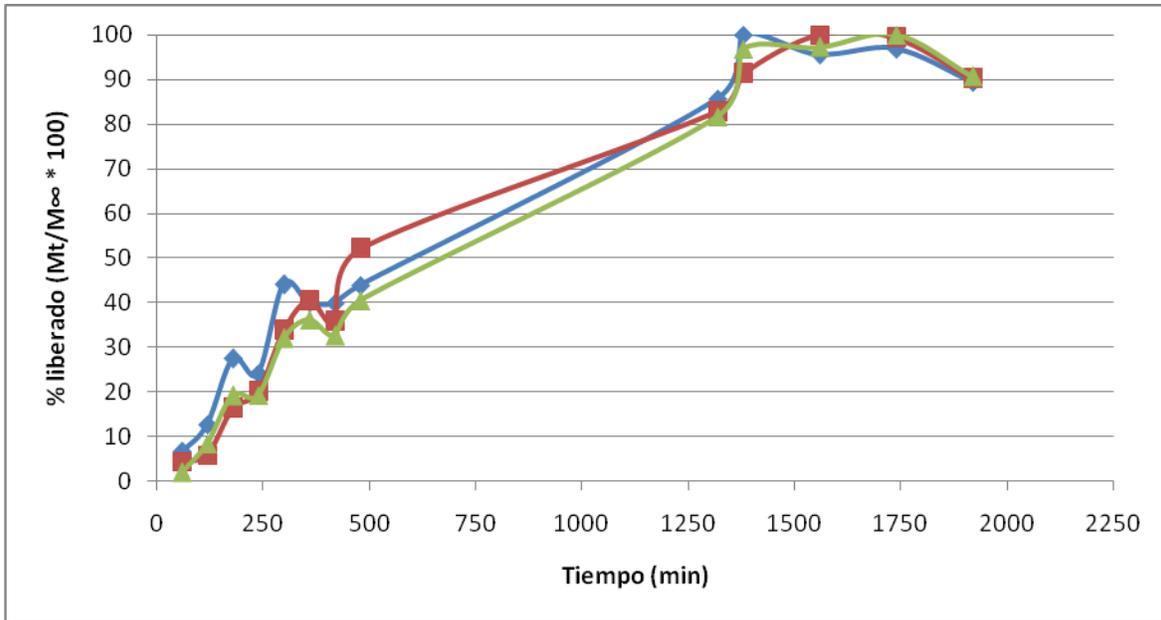


Figura 29. Gráfica del porcentaje de clotrimazol liberado en función del tiempo. Lote de 30 % p/p de principio activo, n=3.

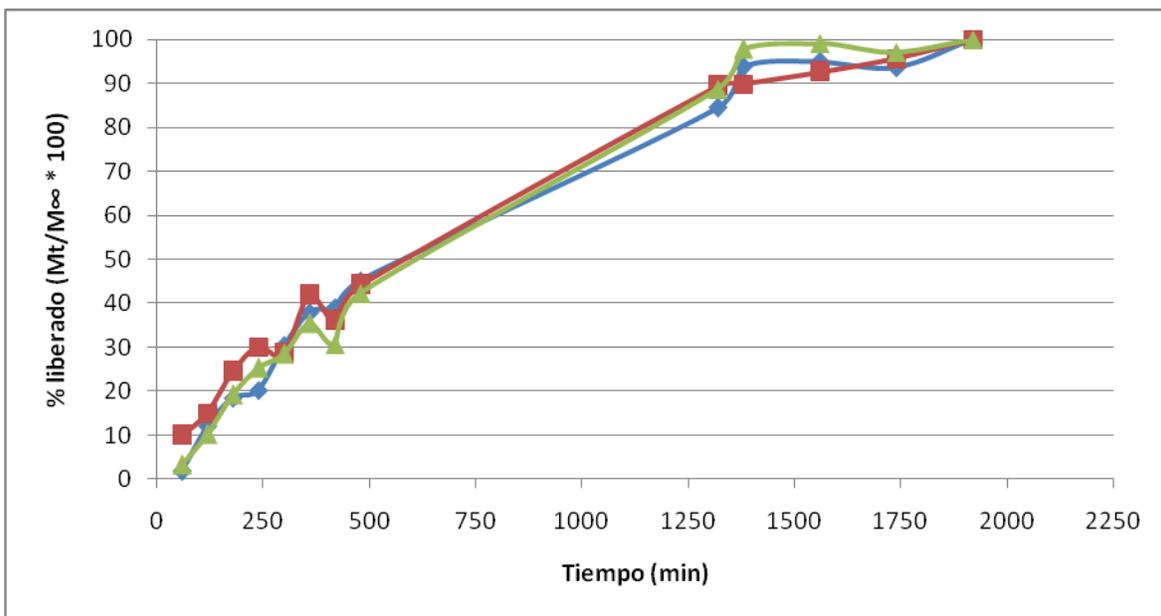


Figura 30. Gráfica del porcentaje de clotrimazol liberado en función del tiempo. Lote de 60 % p/p de principio activo, n=3.

Los perfiles de liberación son similares a los obtenidos en otros estudios en donde se han usado bolsas de diálisis para evaluar la liberación de activos a partir de nanoesferas por ejemplo: Gandhi y colaboradores (2014), quienes estudiaron la liberación de Aciclovir cargado en nanopartículas de Eudragit® RLPO; Teixeira y colaboradores (2005) trabajaron con nanopartículas de xanonas y 3-metoxixantona usando como polímero PLGA y estabilizante Pluronic® F-68, específicamente, trabajaron con nanoesferas preparadas por el método de desplazamiento del solvente y nanocápsulas preparadas por el método de deposición polimérica interfacial. Por último, Harivardhan-Reddy L, Murthy RSR (2004), estudiaron la influencia de los factores de polimerización en la formulación de nanopartículas de polibutil-cianoacrilato y la cinética de liberación de clorhidrato de doxorrubicina *in vitro*, también trabajaron con la misma técnica empleando bolsas de diálisis.

Los datos obtenidos a partir de los perfiles de liberación fueron analizados usando cinco modelos matemáticos para predecir el comportamiento de liberación del fármaco y su velocidad de liberación. Se hicieron los siguientes gráficos que se representan en el anexo 4: Mt vs t (cinética de orden cero), ln Mt vs t (cinética de primer orden), Mt/ M ∞ vs t^{1/2} (Higuchi), ln (Mt / M ∞) vs ln (t) (Korsmeyer-Peppas [K-P]) y Mt^{1/3} vs t (Hixson-Crowell), donde Mt es la cantidad de fármaco liberado en el tiempo t y M ∞ es la cantidad máxima liberada. Los resultados obtenidos para cada modelo matemático se presentan en las tablas 19 y 20.

Tabla 19. Constantes de liberación y el coeficiente de correlación de las ecuaciones de los modelos aplicados del lote de 30 % p/p de principio activo (n=3).

Orden cero		Primer orden		K-P		Higuchi		Hixson-Crowell	
K ₀	r ²	K ₁	r ²	n	r ²	K _H	r ²	K _{HC}	r ²
1.824	0.911	0.001	0.708	0.9392	0.99	0.0278	0.9817	1.2723	0.98
1.855	0.921	0.001	0.681	1.2122	0.9904	0.0296	0.9852	1.7675	0.9783
1.866	0.941	0.001	0.649	1.146	0.9735	0.028	0.9841	1.4	0.9854

K-P= Korsmeyer Peppas

Tabla 20. Constantes de liberación y el coeficiente de correlación de las ecuaciones de los modelos aplicados del lote de 60 % p/p de principio activo (n=3).

Orden cero		Primer orden		K-P		Higuchi		Hixon-Crowell	
K_0	r^2	K_1	r^2	n	r^2	K_H	r^2	K_{HC}	r^2
2.827	0.954	0.001	0.618	0.9791	0.9925	0.0304	0.9954	1.6554	0.9967
2.473	0.966	0.001	0.825	0.8234	0.9865	0.025	0.9874	1.3309	0.9718
2.501	0.958	0.001	0.715	1.091	0.9694	0.0283	0.9944	1.1926	0.9852

El modelo matemático de orden cero es utilizado frecuentemente para describir la disolución del fármaco de varios tipos de formas de dosificación farmacéutica de liberación modificada, como en el caso de algunas sistemas transdérmicos, así como tabletas matriciales con fármacos de baja solubilidad, formas recubiertas, sistemas osmóticos, etc. (COSTA, *et al*, 2000). Los resultados obtenidos para las liberaciones de nanopartículas de los dos lotes finales preparados en este trabajo de tesis no mostraron una buena correlación al modelo cinético de orden cero, lo cual se evidenció con los valores del coeficiente de determinación que están por debajo de 0.96. Por lo anterior, la velocidad de liberación del fármaco incluido en las nanopartículas no es independiente de la concentración de fármaco en el sistema.

Con relación al modelo matemático de orden uno que indica que la velocidad de liberación del fármaco es proporcional a la concentración, tampoco se obtuvo un ajuste adecuado pues los valores de r^2 fueron menores a 0.82.

Analizando los resultados obtenidos al aplicar el modelo de Korsmeyer-Peppas encontramos una mejor correlación presentando coeficientes de determinación por arriba de 0.96 y hasta 0.99. Este modelo explica el posible mecanismo de liberación del fármaco en función de la geometría del sistema y del exponente de difusión "n"; es útil para determinar si en el proceso de liberación tiene lugar o no un proceso que obedezca la ley de Fick. Para este modelo sólo se contemplan los resultados hasta donde se ha efectuado el 60 % de la liberación y el valor de "n" se interpreta de acuerdo a la tabla 21.

Tabla 21. Valores de “n” (Korsmeyer-Peppas) (SIEPMANN *et al*, 2012; GARCÍA, 2011).

Exponente de liberación (n)		Mecanismo de transporte del fármaco	Tipo de liberación
	Cilindro	Esfera	
0.5	0.45	0.43	Difusión según Fick Dependiente del tiempo $f(t^{1/2})$
0.5<n<1.0	0.45<n<0.89	0.43<n<0.85	Transporte anómalo Dependiente del tiempo $f(t^{n-1})$
1.0	0.89	0.85	Transporte Caso II Independiente del tiempo
n>1.0			Transporte súper caso II Dependiente del tiempo $f(t^{n-1})$

Los valores obtenidos para n son cercanos a 1, lo cual indica que la salida del fármaco se da por un proceso no fickiano y puede ser que el mecanismo de liberación sea un transporte caso II (independiente del tiempo) para el lote que contiene 30% p/v de principio activo, mientras que el lote con el 60 % p/v de principio activo presenta valores de n que se ajustan más a un mecanismo de transporte anómalo (dependiente del tiempo). La diferencia en los mecanismos de liberación puede explicarse por la diferencia en contenido de principio activo, pues se ha encontrado que un alto contenido de fármaco en nanoesferas puede incrementar la porosidad del sistema conforme el activo se disuelve y, además, puede reducirse la cantidad relativa de polímero que actúa como barrera difusional (PIÑÓN,2003).

Del mismo modo, los datos obtenidos de las liberaciones fueron tratados con el modelo matemático de Higuchi. El cual fue publicado en 1961 y es probablemente el más utilizado para describir la velocidad de liberación de fármacos de los sistemas matriciales. Inicialmente, este modelo, sólo era válido sólo para sistemas planos, posteriormente fue modificado y ampliado para considerar diferentes geometrías y características de la matriz, incluyendo estructuras porosas (SIEPMANN *et al*, 2012). Se encontró que los intervalos de tiempo se ajustan a una línea recta y los valores de los coeficientes de determinación son mayores a 0.97 para ambos lotes, lo que nos indica que el modelo puede describir el proceso de liberación del clotrimazol a partir de las nanopartículas.

El modelo de Hixson-Crowell asume que la liberación está controlada por la velocidad de disolución de las partículas del fármaco y no por la difusión a través de la matriz polimérica.

Entendiéndose que la disolución se realiza en planos paralelos a la superficie del fármaco si la forma geométrica del sistema a partir del cual se libera, se mantiene constante todo el tiempo (COSTA *et al*, 2000) Este modelo relaciona el tiempo de liberación con la raíz cubica de la masa (VISERAS, 2008). Los valores de los coeficientes de determinación obtenidos en el análisis de los datos son mayores a 0.97. Por lo que el mejor ajuste se obtuvo con el modelo de Higuchi. En resultados anteriores se encontró que nanopartículas de CAP que contenían triclosán mostraron una buena adecuación al modelo de Higuchi (PIÑÓN-SEGUNDO, 2005).

Generalmente los datos obtenidos de los estudios de liberación *in vitro* son evaluados de acuerdo a los modelos cinéticos de orden cero y uno, al modelo de Korsmeyer-Peppas y al modelo de Higuchi; todas estas ecuaciones fueron empleadas en este trabajo de tesis. De acuerdo con la revisión bibliográfica realizada, el modelo de Higuchi puede describir la liberación de diferentes fármacos incluidos en nanoesferas poliméricas. Por ejemplo, Gandhi y colaboradores que analizaron la liberación de aciclovir cargado en nanopartículas de Eudragit® RLPO, preparadas por el método de nanoprecipitación, encontraron que la liberación del fármaco sigue un mecanismo de difusión no fickiano que se ajusta al modelo de Higuchi.

También existen publicaciones que evidencian la posibilidad de que un fármaco contenido en nanopartículas pueda ser liberado por diferentes mecanismos; por ejemplo, trabajos realizados por Khoee y colaboradores (2012), quienes estudiaron los perfiles de liberación de nanopartículas poliméricas que contienen cisplatino como fármaco contra el cáncer. Los perfiles fueron estudiados modificando la concentración de polímero, el volumen de la fase externa y la concentración de glicerina. Los datos obtenidos de la liberación se analizaron utilizando los modelos matemáticos de Korsmeyer-Peppas y Higuchi. Los perfiles de liberación indicaron que la concentración de polímero en la fase interna y la concentración de estabilizante en la fase externa tiene un papel crítico en la liberación del fármaco a partir de las nanopartículas. Dando por resultado que las liberaciones se ajustaran a diferentes modelos matemáticos. Debido a que se obtuvieron liberaciones por difusión de nanoporos de acuerdo al modelo de Higuchi; fickiana que se describe como el transporte de moléculas por un gradiente de concentración; no fickiana o anómala que muestra que la liberación del fármaco varía con el tiempo y super caso II que es el mecanismo de transporte del fármaco asociado con el estrés y el estado de transición en polímeros que se hinchan en agua o fluidos biológicos. Esta variedad de resultados para

ajustarse a los diferentes modelos surgió por la modificación de la composición de las formulaciones.

V. CONCLUSIONES

Durante la realización de este trabajo de investigación se logró obtener nanopartículas poliméricas conteniendo clotrimazol de tamaños alrededor de 700 nm, utilizando el método de desplazamiento del solvente.

Se prepararon diferentes lotes de nanopartículas sin carga de principio activo variando el tipo y la concentración de estabilizante en la fase acuosa y la concentración de polímero en la fase orgánica. Se determinó que los mejores lotes se obtuvieron usando como estabilizante Mowiol® 40-88 al 0.5 % p/v y una fase orgánica con 1 % de CAP p/v.

Una vez determinadas estas condiciones se prepararon lotes cargados con principio activo, esta vez variando la cantidad de principio activo adicionado. Se encontró que al aumentar la cantidad de principio activo encapsulado, el tamaño de partícula aumenta. Se prepararon lotes de 30 y 60 % (p/p) de principio activo con respecto al polímero. La eficiencia de encapsulamiento fue de 58.13 % y 40.65 % para los lotes preparados con 30 y 60 % de fármaco respectivamente. Los porcentajes de PVA residual fueron de 0.4 % para el lote cargado con 30 % de principio activo y de 0.8 % para el lote cargado con 60 % de principio activo.

Del mismo modo se realizó un análisis por calorimetría diferencial de barrido para ambos lotes, y se demostró por medio de este que el principio activo se encontraba encapsulado dentro del polímero.

Se obtuvieron valores de potencial zeta de -11.2 mV para el lote cargado con 30 % de principio activo y -15.1 mV para el lote cargado con 60 % de principio activo.

Es de esta manera que se concluye que el lote preparado con un 30 % de principio activo con respecto al polímero, presenta características más favorables para la obtención de un sistema nanoparticulado más estable.

VI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Álvarez JC. (2008). "Frecuencia de infecciones del tracto genital femenino en mujeres con vida sexual activa, en el consultorio No.3 del Hospital General de Subzona No. 23 de Nacozari de García, Sonora en periodo 2005-2006". Universidad Nacional Autónoma de México, trabajo para obtener el Diplomado de Especialidad en Medicina Familiar. Hermosillo Sonora.
2. Brotman R. M. (2011). "Vaginal microbiome and sexually transmitted infections: an epidemiologic perspective". *The Journal of Clinical Investigation*, 121: 4610-4617.
3. Costa P; Sousa J.M. (2001). "Modeling comparison of dissolution profiles". *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 13:123-133.
4. Choudhury A., Das S., Kar M. (2011). "A review on Novelty and potentiality of vaginal drug delivery". *International Journal of Pharmaceutical Research*, 1033-1044.
5. Debrassi A., Bürguer C., Rodríguez C.A, Nedelko N., Slawskar W.A., Dluzewski P., Sobczak K., Greneche J-M. (2011). "Synthesis, characterization and in vitro drug release of magnetic N-benzyl-O-carboxymethylchitosan nanoparticles loaded with indomethacin". *Acta Biomaterialia* 7: 3078-3085.
6. Domínguez H.R. (2011). "Evaluación de matrices poliméricas pH sensibles para la liberación vaginal de nitrato de miconazol y metronidazol". Tesis de Licenciatura, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Universidad Nacional Autónoma de México, México.
7. Estudillo D.G., (2007). "Escalamiento farmacéutico en la fabricación de nanopartículas". Tesis de Licenciatura, Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México, México.
8. Fairhurst D, Lee R.W. (2011). "The zeta potential & its use in pharmaceutical applications – Part 1. Charged interfaces in polar & non-polar media & the concept of the zeta potential". *Drug Development & Delivery*. 11: 60-64

9. Gandhi A., Jana S., Sen K., (2014). "In vitro release of acyclovir loaded Eudragit® RLPO nanoparticles for sustained drug delivery". *International Journal of Biological Macromolecules*. 67: 478-482.
10. Garay-Jiménez J.C., Turos E. (2011). "A convenient method to prepare emulsified polyacrylate nanoparticles from for drug delivery applications". *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 21:4589-4591.
11. García G. N. (2011). "Desarrollo de un sistema nanoparticulado de aplicación vaginal". Tesis de Licenciatura, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Universidad Nacional Autónoma de México, México.
12. Harivardham-Reddy L., Murphy RSR. (2004). "Estudio de la influencia de los factores de polimerización en la formación de nanopartículas de polibutilcianoacrilato y la cinética de liberación de fármaco in vitro". *Ars Pharmaceutica* 45:3: 211-234.
13. Jaeghere F., Doelker E., Gurny R. (1999). "Encyclopedia of controlled drug delivery". Jhon Wilen & Sons Inc. 2: 641-661.
14. Jose S., Fsnqueiro J. F., Smitha J., Cinu T. A., Chacko A. J., Premaletha K., Souto E. B. (2013). "Predictive modeling of insulin release profile from cross-linked chitosan microspheres". *European Journal of Medicinal Chemistry*. 60:249-253.
15. Klang V., Nadejda B.M., Valenta C., Hofer F. (2012). "Electron microscopy of nanoemulsions: An essential tool for characterization and stability assessment". *Micron* 43: 85-103.
16. Kreuter J. (1994). "Drug and pharmaceutical sciences". *Colloidal drug delivery systems*. Marcel Dekker Inc. 66: 353

17. López I. (2010). "Cervico vaginitis en el primer nivel de atención Diagnóstico y Tratamiento Acertado". Trabajo para obtener el Diploma de Especialista en Medicina Familiar. Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F.
18. Latarjet M, Ruiz A. (2005). "Anatomía humana". 4ª ed. Editorial Panamericana, México. 1637, 1643
19. Mayhew, James W., Gideon L.T., Ericksen, B., Hlavaty, J., Yeh, S., Chavdarian, C. Strick., Neurath. (2009). "Development of a gel permeation chromatographic assay to achieve mass balance in cellulose acetate phthalate stability studies". *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 49:240–246.
20. Mishra B., Bhavesh B., Sanjay Tiwari. (2010). "Colloidal nanocarriers: a review on formulation technology, types and applications toward targeted drug delivery". *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*. 6:9-24.
21. Moffat A. C., Osseltan D., Widdop B. (2004). "Clark's Analysis of Drugs and Poisons. In pharmaceuticals, body fluids and postmortem material. 3ed.
22. Moore Keith L; Dalley Arthur F; Agur Anne M.R. (2010). "Anatomía con orientación clínica". 6ª ed. Molkersklower. 382.
23. Müller-Goyman. (2004). "Physicochemical characterization or colloidal drug delivery systems such as reverse micelles, vesicles, liquid crystals and nanoparticles for topical administration". *European Journal of Pharmaceutic and Biopharmaceutics*, 58:343-356.
24. Neurath A.R. ; Strick N; Li, Y; Lin K; Jiang S. (1999). "Design of a Microbicide for Prevention of Sexually Transmitted Diseases Using 'Inactive' Pharmaceutical Excipients". *Biologicals* 27:11–21.
25. Oropesa-Nuñez R, Jauregui-Haza U.J. (2012). "Nanoparticles as drug carriers: Characteristics and perspectives". *Centro Nacional de las Investigaciones Científicas. Ciencias Biológicas*. 43

-
26. Perea E.J. (2010). "Infecciones del aparato genital femenino: Vaginitis, Vaginosis y Cervicitis". *Medicine* 10:3910-3914.
27. Piñón-Segundo E. (2003). "Desarrollo tecnológico y caracterización de partículas submicrónicas poliméricas con vectores terapéuticos para el tratamiento de enfermedades periodontales". Tesis para obtener el grado de Maestro en Ciencias, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Universidad Nacional Autónoma de México, México.
28. Piñón-Segundo E, Ganem-Quintanar A., Alonso-Pérez V., Quintanar-Guerrero D. (2005). "Preparation and characterization of triclosan nanoparticles for periodontal treatment". *International Journal of Pharmaceutics*. 294: 217–232.
29. Prasad Rao, J. Kurt E.G. (2011). "Polymer nanoparticles: Preparation techniques and size-control parameters". *Progress in Polymer Science*. 39:887-913.
30. Quintanar D., Allémann E., Fessi H., Doelker E. (1998). "Preparation Techniques and Mechanisms of formation of Biodegradable Nanoparticles from preformed polymers". *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 24, 1113-1128.
31. Randolph, T.W., Randolph, A.D., Mebes, M. & Yeung, S. (1993). "Sub-micrometer-sized biodegradable particles of poly (L-lactic acid) via the gas antisolvent spray precipitation process". *Biotechnology. Progress*. 9: 429-35.
32. Raygoza T.D. (1995). "Estudio de la liberación de clorhidrato de pseudoefedrina en matrices hidrofílicas de PVA 5222 y su relación con el hinchamiento". Tesis de Licenciatura, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Universidad Nacional Autónoma de México, México.
33. Rocha F.F., Ansorena E., De Mendoza E.A., Imbuluzqueta E., González D., Blanco P. MJ. (2009). "Nanosistemas a base de poliésteres". Departamento de farmacia y tecnología. Facultad de Farmacia. Universidad de Navarra. España 41-101.

-
34. Rodríguez I. M. (2010). "Desarrollo y evaluación de sistemas de liberación de fármacos por infiltración de nanopartículas." Tesis para obtener el grado de Doctor en Ciencias. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. Universidad Nacional Autónoma de México, México.
35. Rodríguez I. C., Cerezo A., Salem, I. I. (2000). "Sistemas de liberación bioadhesivos". Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica, Facultad de Farmacia Universidad de Granada. España. *Ars Pharmaceutica*. 41:115-128.
36. Roxin P., Karlsson A., Singh S.K. (1998). "Characterization of cellulose acetate phthalate (CAP)". *Drug Development and Industrial Pharmacy*. 24:1025-1041.
37. Rowe R., Sheshkley, P., Owen, S. (2006). "Handbook of Pharmaceutical Excipients". 5 ed. APhA (Pharmaceutical Press). Washington.
38. Siepmann J., Peppas N.A. (2012). "Modeling of drug release from delivery systems based on hydroxypropyl methylcellulose (HPMC)". *Advanced Drug Delivery Reviews*. 64:163-174.
39. Sin Cheow W., Hadinoto K. (2011). "Factors affecting drug encapsulation and stability of lipid-polymer hybrid nanoparticles". *Colloids and surfaces B: biointerfaces*. 85:214-220.
40. Sophie-Dorothée C., Dalton C. R., Hancock B. C. (1999). "Differential scanning calorimetry: Applications in drug development". 311-320.
41. Sobel J.D., Faro S., Force, R.W., Foxman B., Ledger WL., Nyirjesy PR., Reed B., Summers PR. (1998). "Vulvovaginal candidiasis: Epidemiologic, diagnostic and therapeutic considerations". *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. 78:203-2011.
42. Stevens A., Lowe J S. (2006). "Histología humana". 3ª ed. Elsevier, Madrid, España. 345.
43. Subramany K., Ahmed W., James K., Hartsfield Jr. Piñón-Segundo E., Mendoza-Muñoz N., Quintanar Guerrero. (2013). "Nanoparticles as Dental Drug-Delivery Systems". *Nanobiomaterials in Clinica Dentistry*. (23) 475-495.

-
44. Surajit Das, Wai Kiong Ng, Parijat Kanaujia, Sanggu Kim, Reginald B. H. (2011). "Formulation design, preparation and physicochemical characterizations of solid lipid nanoparticles containing a hydrophobic drug: Effects of process variables". *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 88:483-489.
 45. Teixeira M., Alonso M.J., Pinto M., Barbosa C.M. (2005). "Development and characterization of PLGA nanospheres and nanocapsules containing Xanthone and 3-methoxyxanthone". *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutis*. 59: 491-500.
 46. Vera P., Gallardo V., Salcedo J., Ruiz M.A., Delgado A.V. (1997). "Electrokinetics and stability of cellulose Acetato phthalate Latex". *Journal of Applied Polymer Science*. 65: 2721-2726.
 47. Vermani, K., Garg, S. (2000). "The scope and potential of vaginal drug delivery". 3:359-364.
 48. Wang, Q., Gong T., Sun X., Zhang Z. (2011). "Structural characterization of novel phospholipid lipid nanoparticles for controlled drug delivery". *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 84:406-412.
 49. Wolfgang, M., Karsten M. (2001). "Solid lipid nanoparticles, characterization and applications". *Advanced Drug Delivery Reviews*. 47:165-1

VII. ANEXOS

Anexo 1

RESULTADOS DEL ANÁLISIS DEL AJUSTE UNIMODAL PARA CADA UNO DE LOS LOTES PREPARADOS PARA ESTE PROYECTO.

En las siguientes dos tablas se muestran los resultados de los 14 lotes preparados variando el tipo y concentración de estabilizante y concentración de polímero.

Los tamaños de partícula y los datos mostrados se obtuvieron utilizando un N4 Plus y el coeficiente variación se obtuvo mediante la siguiente fórmula:

$$CV = \frac{1}{\sqrt{\frac{1}{(2)(IP)} + 4}}$$

Esta fórmula es proporcionada por el manual del equipo utilizado.

Tabla A1.1. Análisis unimodal del tamaño de partícula (nm) usando como estabilizante Pluronic® F-68 al 1 y 1.5 % (p/v) y Tween® 20 al 0.5 % (p/v).

		ESTABILIZANTE									
		Pluronic® F-68						Tween®20			
		1%			1.5%			0.5%			
C A P	0.5 %	DPTP	PDI	CV	DPTP	PDI	CV	DPTP	PDI	CV	
		137.3	-1.19	0.53	85.8	1.67	0.48	0.3	0.13	0.36	
		41.3	2.92	0.49	0.4	-0.74	0.55	13.3	8.86	0.50	
		-67.3	-15.32	0.50	36.0	4.13	0.49	188.7	-45.23	0.50	
		142.4	1.34	0.48	107.2	0.76	0.46	0.0	-0.09	-	
		1 %	79.2	2.68	0.49	100.0	0.37	0.43	136.6	0.36	0.43
			98.4	1.51	0.48	106.2	0.21	0.40	146.0	0.39	0.44
			102.2	1.24	0.48	111.2	0.37	0.43	147.6	1.36	0.48
	120.9		1.29	0.48	112.7	0.11	0.34	202.8	-0.15	0.37	

DPTP= Diámetro promedio del tamaño de partícula;
PDI= Índice de polidispersidad CV= Coeficiente de variación

Tabla A1.2. Análisis unimodal del tamaño de partícula (nm) usando como estabilizante Tween® 80 al 0.5 % (p/v) y Mowiol® 40-88 al 1,3 y 5 % (p/v).

		ESTABILIZANTE											
		Tween®80			Mowiol® 40-88								
		0.5 %			0.1 %			0.3 %			0.5 %		
C A P	0.5 %	DPTP	PDI	CV	DPTP	PDI	CV	DPTP	PDI	CV	DPTP	PDI	CV
		104.0	0.50	0.45	506.7	-58.10	0.50	131.5	2.86	0.49	223.3	2.31	0.49
		97.2	0.32	0.42	10.7	2.29	0.49	-6031.0	-8545.35	0.50	117.4	5.03	0.49
		87.8	1.19	0.48	62.7	5.18	0.49	283.5	1.78	0.48	800.8	-41.84	0.50
	1 %	97.3	0.32	0.42	12.7	3.50	0.49	411.8	2.00	0.49	183.9	2.53	0.49
		117.6	0.43	0.44	240.3	0.65	0.46	154.1	0.94	0.47	168.8	-6.16	0.51
		294.8	-53.68	0.50	279.4	-0.10	-	129.8	1.42	0.48	72.9	2.58	0.49
		683.2	-207.07	0.50	262.1	0.78	0.46	178.9	0.36	0.43	94.1	1.74	0.48
123.0	2.38	0.49	298.9	-0.43	0.59	148.3	1.80	0.48	130.6	1.53	0.48		

DPTP= Diámetro promedio del tamaño de partícula;
PDI= Índice de polidispersidad CV= Coeficiente de variación

Tabla A1.3. Análisis unimodal del tamaño de partícula (nm) usando como estabilizante Pluronic® F-68 y Mowiol® 40-88 de concentración 1.5 y 0.5 p/v respectivamente en 75 mL de fase acuosa y CAP al 1% (p/v) y clotrimazol al 0.4 % (p/v) en 10 mL de fase orgánica.

		ESTABILIZANTE						
		Pluronic® F-68			Mowiol® 40-88			
		1.5 %			0.5 %			
C A P	1 %	LOTE	DPTP	PDI	CV	DPTP	PDI	CV
		1	111.0	3.97	0.49	141.5	1.51	0.48
			186.1	-0.09	-	149.8	1.00	0.47
			140.5	1.29	0.48	168.5	0.63	0.46
			177.2	1.47	0.48	183.2	1.32	0.48
		2	146.1	-2.44	0.51	114.3	2.57	0.49
			81.4	2.41	0.49	200.4	-1.87	0.52
			89.9	2.09	0.49	158.5	2.05	0.49
			93.4	2.58	0.49	124.9	2.22	0.49
		3	86.4	3.24	0.49	184.2	1.84	0.48
			121.1	1.83	0.48	170.8	0.70	0.46
			74.5	2.36	0.49	142.7	1.32	0.48
			172.7	-0.63	0.56	88.8	4.62	0.49

DPTP= Diámetro promedio del tamaño de partícula;
PDI= Índice de polidispersidad CV= Coeficiente de variación

Tabla A1.4. Análisis unimodal del tamaño de partícula (nm) como estabilizante Pluronic® F-68 y Mowiol® 40-88 de concentración 1.5 y 0.5 p/v respectivamente en 375 mL de fase acuosa y CAP al 1% (p/v) y clotrimazol al 0.4 % (p/v) en 50 mL de fase orgánica.

		ESTABILIZANTE						
		Pluronic® F-68			Mowiol® 40-88			
		1.5 %			0.5 %			
CAP	1 %	LOTE	DPTP	PDI	CV	DPTP	PDI	CV
		1	178.0	1.08	0.47	144.8	2.34	0.49
			171.2	1.12	0.47	148.8	1.38	0.48
			180.4	0.32	0.42	133.6	2.56	0.49
			176.6	0.54	0.45	288.0	1.69	0.48
		2	144.0	2.06	0.49	205.3	-005	-
			90.2	2.29	0.49	191.4	0.10	0.33
			102.8	3.45	0.49	191.9	0.23	0.40
			263.3	0.80	0.46	163.1	1.19	0.48
		3	143.6	2.54	0.49	213.3	0.36	0.43
			82.3	2.95	0.49	184.9	0.74	0.46
			79.2	3.30	0.49	206.3	0.47	0.44
442.8	0.99		0.47	194.8	0.73	0.46		

DPTP= Diámetro promedio del tamaño de partícula;
PDI= Índice de polidispersidad CV= Coeficiente de variación

Tabla A1.5. Análisis unimodal del tamaño de partícula (nm) de los lotes variando la cantidad de fase orgánica, concentración de polímero (CAP) 1 % p/v y concentración de estabilizante (Mowiol® 40-88) 0.5% p/v.

		ESTABILIZANTE						
		Mowiol® 40-88						
		0.5 %						
C A P	1 %	Antes de centrifugar			Después de centrifugar			
		Vol. FO (mL)	DPTP	PDI	CV	DPTP	PDI	CV
		50	204.1	0.92	0.47	373.1	1.22	0.48
			256.4	-0.21	0.79	522.4	0.65	0.46
		75	338.5	0.50	0.45	499.0	-0.54	0.57
			384.5	1.19	0.48	506.4	-0.15	1.22
		100	572.9	-0.29	0.66	645.8	-1.21	0.53
672.6	-2.03		0.52	567.3	0.32	0.42		

DPTP= Diámetro promedio del tamaño de partícula;
PDI= Índice de polidispersidad CV= Coeficiente de variación

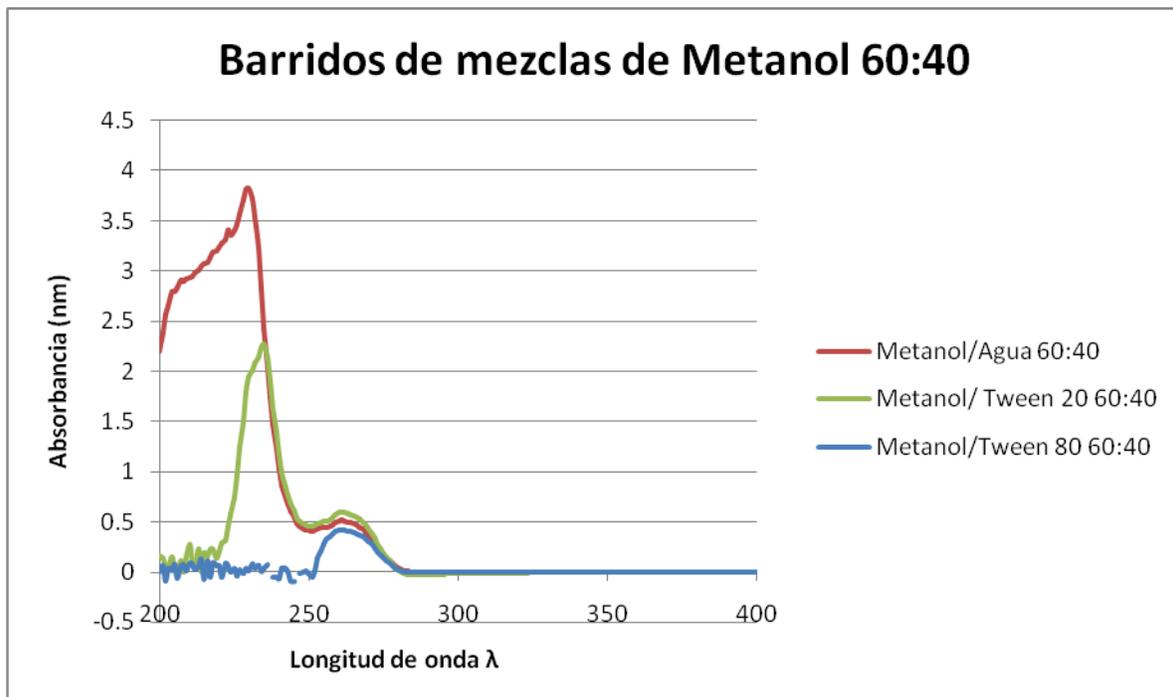
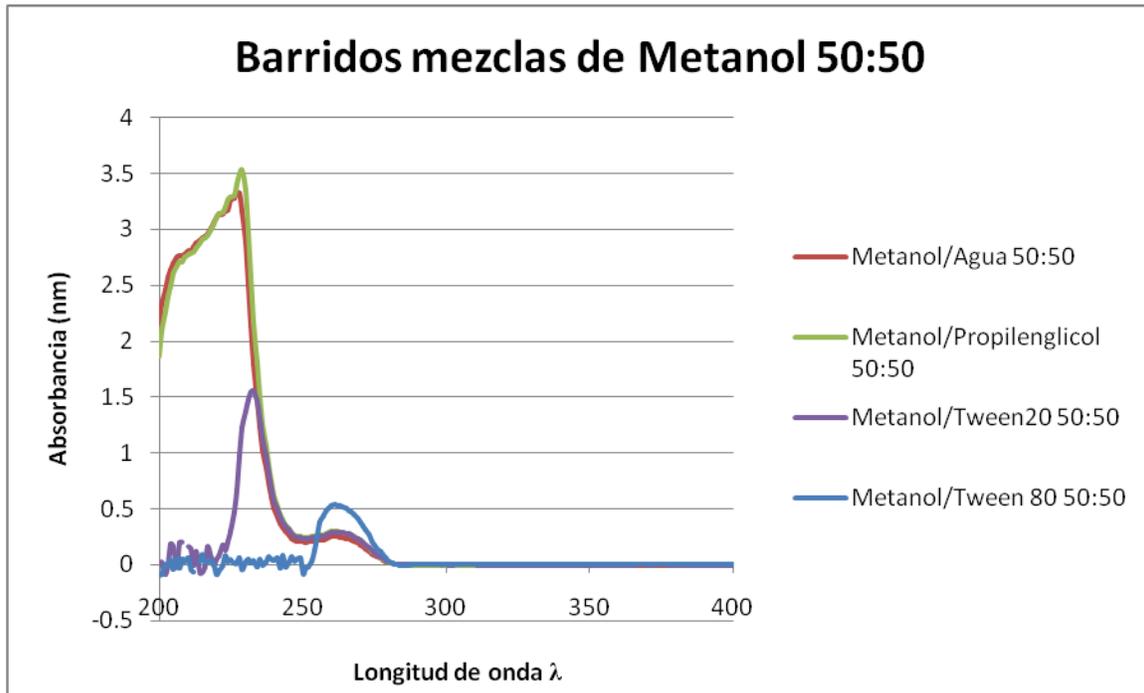
Tabla A1.6. Análisis unimodal del tamaño de partícula (nm) de los lotes con 30 y 40 % p/p de principio activo, Mowiol® 40-88 al 0.5 % (p/v) y la cantidad de fase orgánica 150 fue de y fase acuosa de 750 mL.

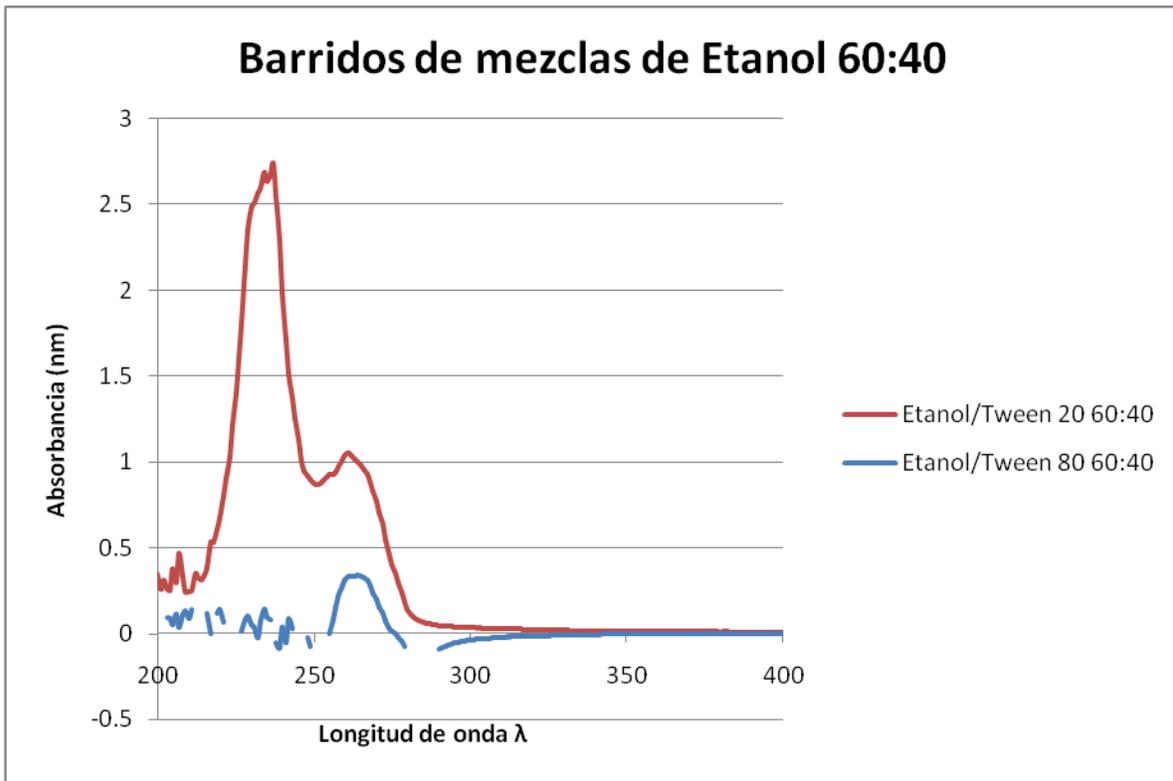
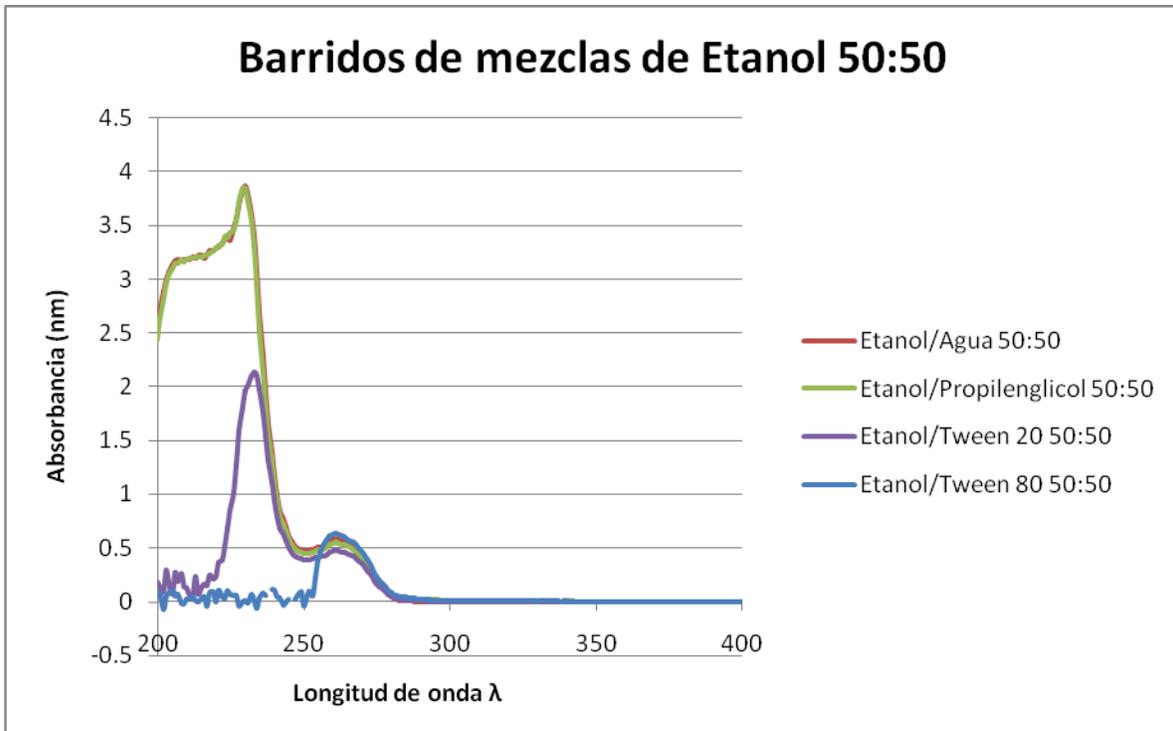
		ESTABILIZANTE									
		Mowiol® 40-88									
		0.5 %									
C A P	1 %	Antes de centrifugar			Después de centrifugar			Después de liofilizar			
		P.A (%)	DPTP	PDI	CV	DPTP	PDI	CV	DPTP	PDI	CV
		30	220.3	0.33	0.43	285.7	0.77	0.46	248.1	2.92	0.49
			163.2	1.72	0.48	307.8	1.06	0.47			
			212.5	0.53	0.45	302.4	0.44	0.44			
		60	379.8	1.14	0.47	513.6	0.18	0.38	420.0	0.84	0.47
			294.5	0.89	0.47	496.8	0.62	0.46			
362.1	-0.09		-	502.4	0.57	0.45					

DPTP= Diámetro promedio del tamaño de partícula;
PDI= Índice de polidispersidad CV= Coeficiente de variación

Anexo 2

BARRIDOS ESPECTROFOTOMÉTRICOS DE LOS COMPONENTES DE LA FORMULACIÓN Y MEZCLAS DE TENSOACTIVOS Y SOLVENTES PARA LA ELECCIÓN DEL MEJOR MEDIO DE DISOLUCIÓN DEL ACTIVO.





Anexo 3

TERMOGRAMAS DEL CLOTRIMAZOL, ACETATO FTALATO DE CELULOSA (CAP) Y MOWIOL® 40-88 (PVA)

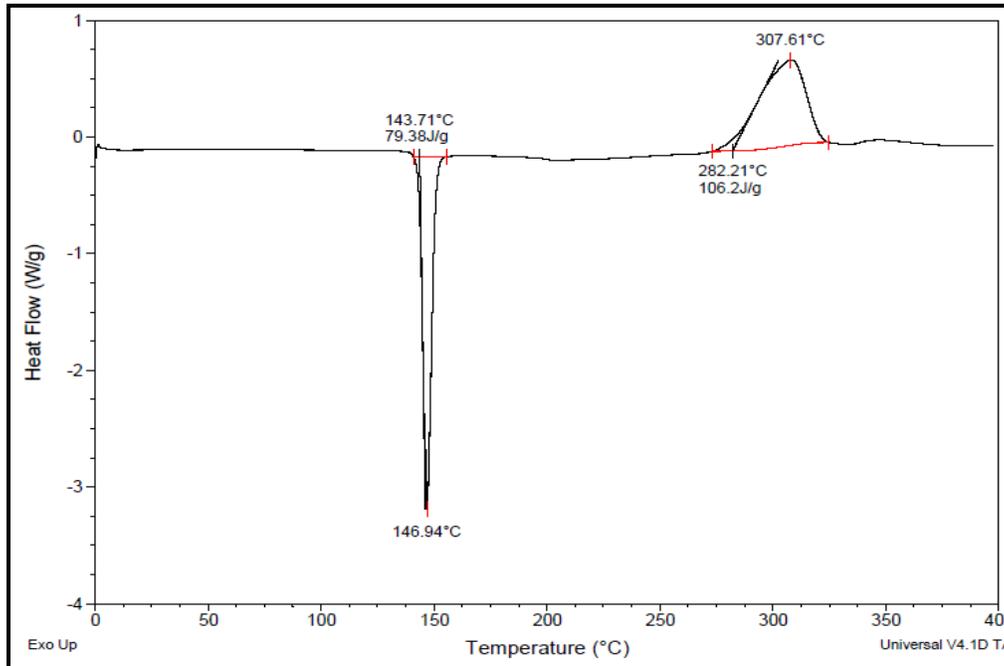


Figura 1. Termograma del clotrimazol mostrando el punto de fusión y la temperatura de cristalización

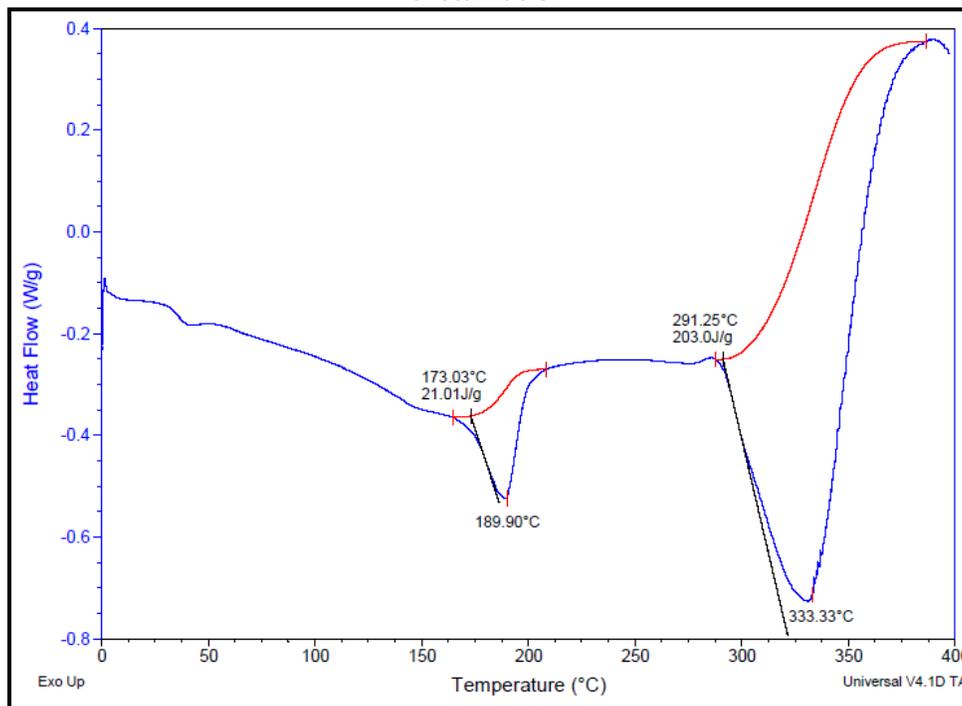


Figura 2. Termograma del Mowiol® 40-88 (PVA) mostrando sus temperaturas de cristalización.

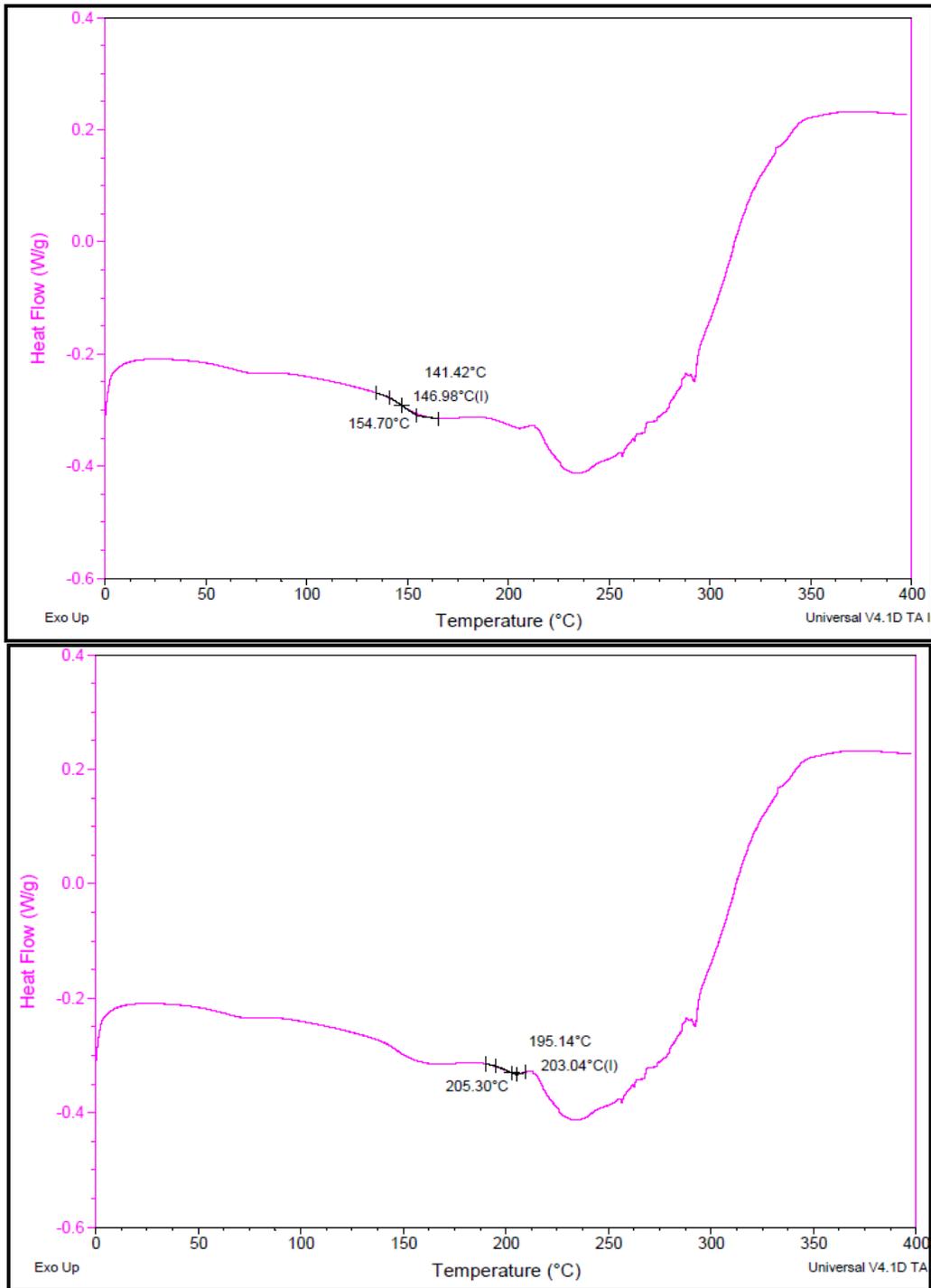


Figura 3. Termogramas del CAP con sus respectivas Tg's

Anexo 4

TABLAS Y GRÁFICOS CORRESPONDIENTES A LOS PERFILES DE LIBERACIÓN "IN VITRO"

**Tabla A4.1. Resultados de la liberación de clotrimazol para el lote de 30 % de principio activo
n=1**

t (min)	t _½	Ln t	Mt	Ln Mt	Mt/M _∞	Ln Mt/M _∞ *100	Ln Mt/M _∞	(Mt/M _∞) ^{1/3}
60	7.74596669	4.09434456	252.690909	5.53216704	0.06564493	6.56449287	-2.72349493	84.230303
120	10.9544512	4.78749174	487.385273	6.18905492	0.12661465	12.6614652	-2.06660704	162.461758
180	13.4164079	5.19295685	1057.80323	6.96394961	0.27479982	27.4799825	-1.29171236	352.601076
240	15.4919334	5.48063892	929.193182	6.83431666	0.24138906	24.1389057	-1.4213453	309.731061
300	17.3205081	5.70378247	1697.55491	7.43694421	0.44099676	44.0996755	-0.81871776	565.851636
360	18.973666	5.88610403	1538.91855	7.33883521	0.39978565	39.9785646	-0.91682676	512.972848
420	20.4939015	6.04025471	1536.40945	7.33720345	0.39913383	39.9133825	-0.91845852	512.136485
480	21.9089023	6.1737861	1688.066	7.43133877	0.43853169	43.8531693	-0.82432319	562.688667
1320	36.3318042	7.18538702	3298.09032	8.10109889	0.85678945	85.6789446	-0.15456308	1099.36344
1380	37.1483512	7.22983878	3849.35918	8.25566197	1	100	4.7233E-10	1283.11973
1560	39.4968353	7.3524411	3679.52959	8.21054019	0.95588107	95.5881075	-0.04512177	1226.50986
1740	41.7133072	7.46164039	3728.43191	8.22374302	0.96858509	96.858509	-0.03191894	1242.81064
1920	43.8178046	7.56008047	3439.02905	8.14294446	0.893403	89.3403002	-0.11271751	1146.34302

**Tabla A4.2. Resultados de la liberación de clotrimazol para el lote de 30 % de principio activo
n=2**

t (min)	t _½	Ln t	Mt	Ln Mt	Mt/M _∞	Ln Mt/M _∞ *100	Ln Mt/M _∞	(Mt/M _∞) ^{1/3}
60	7.74596669	4.09434456	161.781818	5.08624863	0.04414805	4.41480453	0.04414805	53.9272727
120	10.9544512	4.78749174	211.930727	5.35625946	0.057833	5.78329966	0.057833	70.6435758
180	13.4164079	5.19295685	595.075955	6.38868905	0.16238809	16.2388088	0.16238809	198.358652
240	15.4919334	5.48063892	733.738636	6.59815288	0.20022724	20.0227237	0.20022724	244.579545
300	17.3205081	5.70378247	1237.55491	7.12089286	0.33771181	33.7711807	0.33771181	412.518303
360	18.973666	5.88610403	1479.82764	7.2996809	0.40382472	40.382472	0.40382472	493.275879
420	20.4939015	6.04025471	1307.77309	7.17608104	0.35687339	35.6873388	0.35687339	435.924364
480	21.9089023	6.1737861	1908.52055	7.55408364	0.52080915	52.0809151	0.52080915	636.173515
1320	36.3318042	7.18538702	3032.18123	8.01703752	0.82744078	82.7440781	0.82744078	1010.72708
1380	37.1483512	7.22983878	3341.17736	8.11407853	0.9117616	91.17616	0.9117616	1113.72579
1560	39.4968353	7.3524411	3664.52959	8.20645525	1	100	1	1221.50986
1740	41.7133072	7.46164039	3637.52282	8.19905818	0.99263022	99.2630221	0.99263022	1212.50761
1920	43.8178046	7.56008047	3299.93814	8.101659	0.90050798	90.0507979	0.90050798	1099.97938

**Tabla A4.3. Resultados de la liberación de clotrimazol para el lote de 30 % de principio activo
n=3**

t (min)	t _½	Ln t	Mt	Ln Mt	Mt/M _∞	Ln Mt/M _∞ *100	Ln Mt/M _∞	(Mt/M _∞) ^{1/3}
60	7.74596669	4.09434456	70.8727273	4.26088569	0.01976035	1.97603457	-3.92407809	23.6242424
120	10.9544512	4.78749174	300.112545	5.70415756	0.08367574	8.36757365	-2.48080623	100.037515
180	13.4164079	5.19295685	688.712318	6.53482365	0.192023	19.2022997	-1.65014014	229.570773
240	15.4919334	5.48063892	691.011364	6.53815627	0.192664	19.2664004	-1.64680752	230.337121
300	17.3205081	5.70378247	1145.28218	7.04340633	0.31932131	31.9321306	-1.14155745	381.760727
360	18.973666	5.88610403	1295.28218	7.16648385	0.36114349	36.1143485	-1.01847993	431.760727
420	20.4939015	6.04025471	1165.95491	7.06129569	0.32508516	32.5085163	-1.12366809	388.651636
480	21.9089023	6.1737861	1449.88418	7.27923896	0.40424877	40.4248768	-0.90572483	483.294727
1320	36.3318042	7.18538702	2927.63577	7.98195047	0.81626737	81.6267374	-0.20301331	975.878591
1380	37.1483512	7.22983878	3474.81373	8.15329615	0.96882854	96.8828535	-0.03166763	1158.27124
1560	39.4968353	7.3524411	3486.80232	8.15674035	0.97217113	97.2171129	-0.02822343	1162.26744
1740	41.7133072	7.46164039	3586.61373	8.18496378	1	100	-7.604E-10	1195.53791
1920	43.8178046	7.56008047	3253.11995	8.0873698	0.90701709	90.7017092	-0.09759398	1084.37332

**Tabla A4.4. Resultados de la liberación de clotrimazol para el lote de 60 % de principio activo
n=1**

t (min)	t _½	Ln t	Mt	Ln Mt	Mt/M _∞	Ln Mt/M _∞ *100	Ln Mt/M _∞	(Mt/M _∞) ^{1/3}
60	7.74596669	4.09434456	97.1272727	4.57602221	0.01765921	1.76592132	-4.03649764	32.3757576
120	10.9544512	4.78749174	657.643364	6.48866278	0.11956955	11.9569551	-2.12385706	219.214455
180	13.4164079	5.19295685	1013.16461	6.92083399	0.18420871	18.4208713	-1.69168585	337.721538
240	15.4919334	5.48063892	1110.00568	7.01212041	0.20181589	20.181589	-1.60039943	370.001894
300	17.3205081	5.70378247	1658.06055	7.41340385	0.30146059	30.1460587	-1.19911599	552.686848
360	18.973666	5.88610403	2083.51509	7.64181169	0.37881468	37.8814685	-0.97070815	694.50503
420	20.4939015	6.04025471	2150.75145	7.67357257	0.39103928	39.1039277	-0.93894727	716.917152
480	21.9089023	6.1737861	2481.68445	7.81669282	0.45120792	45.1207922	-0.79582702	827.228152
1320	36.3318042	7.18538702	4642.16525	8.44293619	0.84401614	84.4016141	-0.16958366	1547.38842
1380	37.1483512	7.22983878	5158.59014	8.54841859	0.93791003	93.7910028	-0.06410125	1719.53005
1560	39.4968353	7.3524411	5220.24052	8.56029876	0.949119	94.9119004	-0.05222109	1740.08017
1740	41.7133072	7.46164039	5147.15377	8.54619918	0.93583072	93.5830723	-0.06632067	1715.71792
1920	43.8178046	7.56008047	5500.09061	8.61251985	1	100	6.6115E-10	1833.36354

**Tabla A4.5. Resultados de la liberación de clotrimazol para el lote de 60 % de principio activo
n=2**

t (min)	t _½	Ln t	Mt	Ln Mt	Mt/M _∞	Ln Mt/M _∞ *100	Ln Mt/M _∞	(Mt/M _∞) ^{1/3}
60	7.74596669	4.09434456	506.218182	6.22696777	0.099594	9.95940033	-2.30665332	168.739394
120	10.9544512	4.78749174	760.825182	6.63440361	0.14968571	14.9685706	-1.89921748	253.608394
180	13.4164079	5.19295685	1243.16461	7.12541552	0.24458177	24.4581773	-1.40820557	414.388205
240	15.4919334	5.48063892	1525.91477	7.33034936	0.3002104	30.0210396	-1.20327173	508.638258
300	17.3205081	5.70378247	1443.06055	7.27452152	0.28390955	28.3909551	-1.25909957	481.020182
360	18.973666	5.88610403	2122.15145	7.66018569	0.41751475	41.7514753	-0.8734354	707.383818
420	20.4939015	6.04025471	1833.93327	7.51421827	0.36081034	36.0810344	-1.01940282	611.311091
480	21.9089023	6.1737861	2244.86627	7.71640123	0.44165782	44.1657821	-0.81721986	748.288758
1320	36.3318042	7.18538702	4544.43798	8.42165934	0.89407846	89.4078457	-0.11196175	1514.81266
1380	37.1483512	7.22983878	4564.95377	8.42616367	0.89811476	89.8114761	-0.10745742	1521.65126
1560	39.4968353	7.3524411	4702.51325	8.45585238	0.92517839	92.5178386	-0.07776871	1567.50442
1740	41.7133072	7.46164039	4859.4265	8.48867571	0.9560497	95.6049696	-0.04494538	1619.80883
1920	43.8178046	7.56008047	5082.81789	8.53362109	1	100	-7.1542E-10	1694.27263

**Tabla A4.6. Resultados de la liberación de clotrimazol para el lote de 60 % de principio activo
n=3**

t (min)	t _½	Ln t	Mt	Ln Mt	Mt/M _∞	Ln Mt/M _∞ *100	Ln Mt/M _∞	(Mt/M _∞) ^{1/3}
60	7.74596669	4.09434456	150	0.0322931	0.0322931	3.22931039	-3.43290157	50
120	10.9544512	4.78749174	472.681818	0.10176242	0.10176242	10.1762421	-2.28511439	157.560606
180	13.4164079	5.19295685	891.318182	0.19188954	0.19188954	19.1889538	-1.6508354	297.106061
240	15.4919334	5.48063892	1176.31818	0.25324644	0.25324644	25.3246435	-1.37339221	392.106061
300	17.3205081	5.70378247	1320.86364	0.28436524	0.28436524	28.4365245	-1.25749579	440.287879
360	18.973666	5.88610403	1643.13636	0.35374649	0.35374649	35.3746489	-1.03917476	547.712121
420	20.4939015	6.04025471	1425.40909	0.30687256	0.30687256	30.6872559	-1.18132273	475.136364
480	21.9089023	6.1737861	1964.04545	0.42283416	0.42283416	42.283416	-0.86077523	654.681818
1320	36.3318042	7.18538702	4116.77273	0.88628913	0.88628913	88.628913	-0.12071205	1372.25758
1380	37.1483512	7.22983878	4544.5	0.97837341	0.97837341	97.8373405	-0.02186388	1514.83333
1560	39.4968353	7.3524411	4600.86364	0.99050778	0.99050778	99.0507784	-0.00953755	1533.62121
1740	41.7133072	7.46164039	4511.31818	0.97122978	0.97122978	97.1229779	-0.0291922	1503.77273
1920	43.8178046	7.56008047	4644.95455	1	1	100	-9.7858E-10	1548.31818

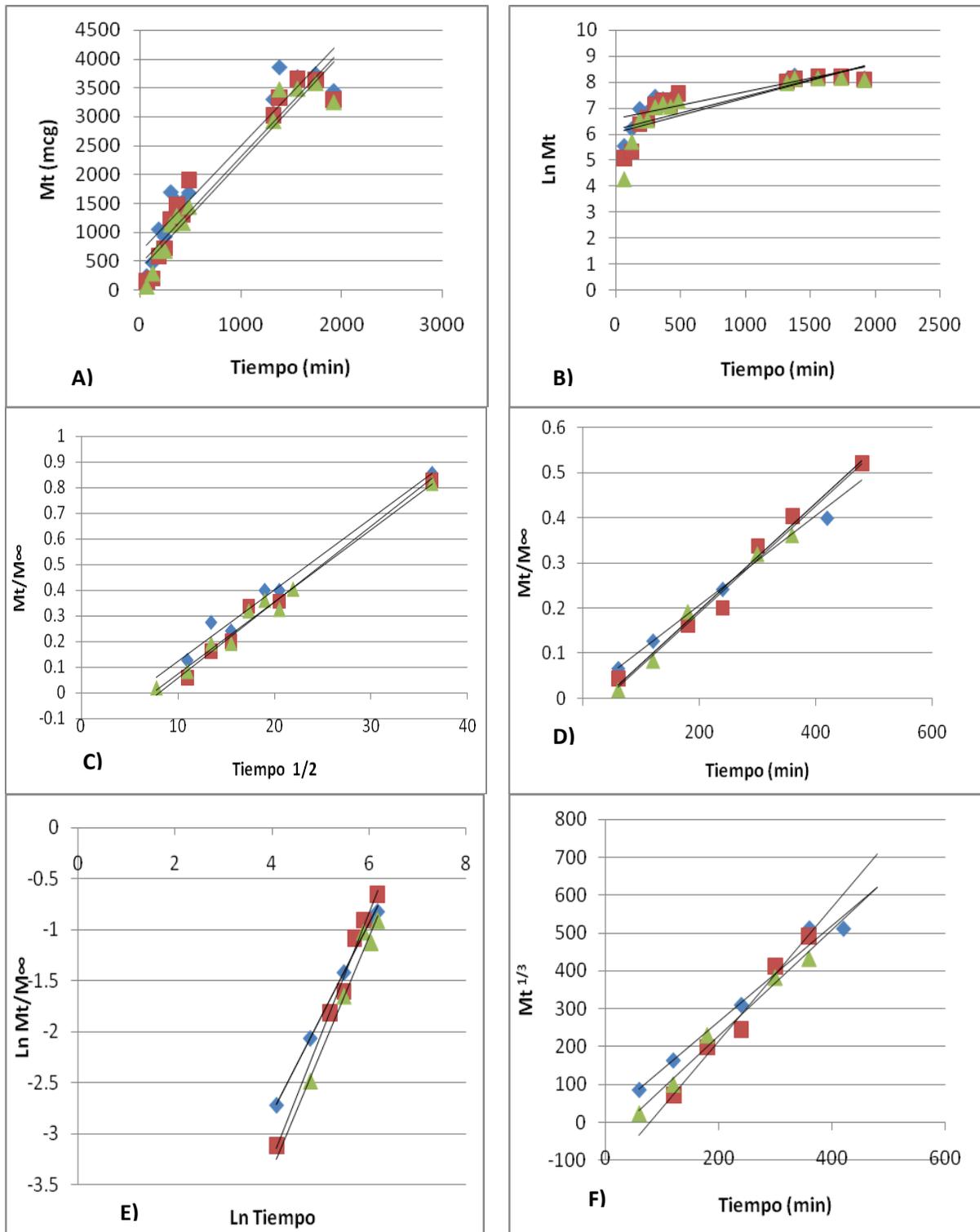


Figura 1. Gráficas de los modelos matemáticos de la velocidad de liberación del clotrimazol para el lote de 30% de principio activo. A) Orden cero, B) Primer orden, C) Higuchi, D) Korsmeyer-Peppas no lineal, E) Korsmeyer-Peppas, y F) Hixson-Crowell. El valor de las constantes para cada modelo se muestran en la tabla 19 Para cada replica.

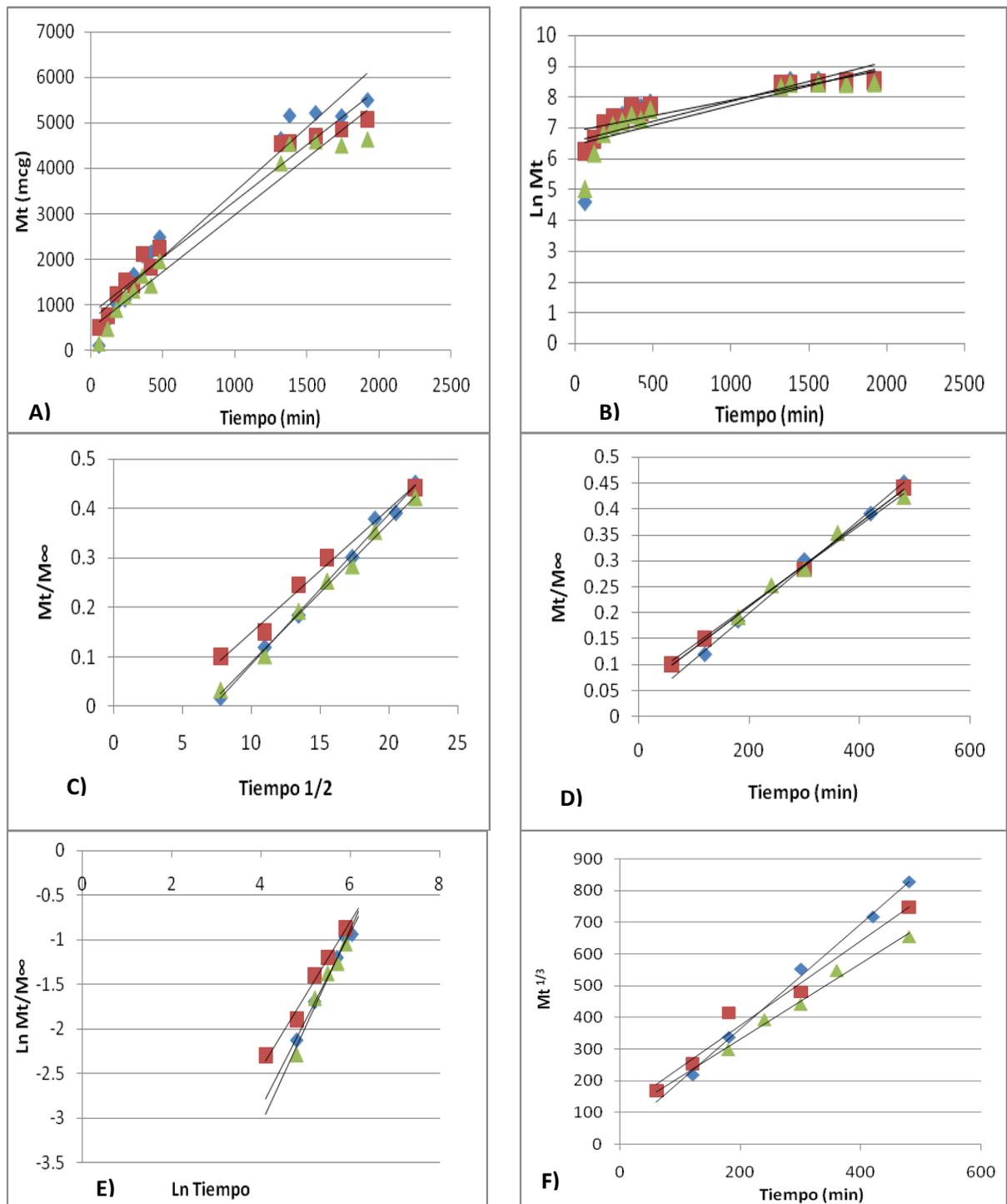


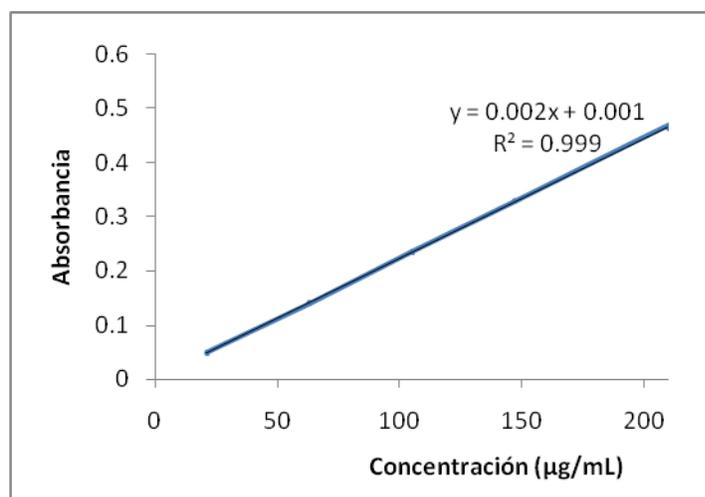
Figura 2. Gráficas de los modelos matemáticos de la velocidad de liberación del clotrimazol para el lote de 60% de principio activo. A) Orden cero, B) Primer orden, C) Higuchi, D) Korsmeyer-Peppas no lineal, E) Korsmeyer-Peppas, y F) Hixson-Crowell. El valor de las constantes para cada modelo se muestran en la tabla 20 Para cada replica.

Anexo 5

CURVAS DE CALIBRACIÓN PARA LA CUANTIFICACIÓN DEL PRINCIPIO ACTIVO (CLOTRIMAZOL) Y DEL PVA RESIDUAL.

Figura 5.1. Curva de calibración de clotrimazol empleada para su cuantificación en las nanopartículas.

Concentración (µg/mL)	ABS	ABS/CONC
21	0.049	0.002333333
21	0.047	0.002238095
21	0.05	0.002380952
63	0.139	0.002206349
63	0.141	0.002238095
63	0.139	0.002206349
105	0.235	0.002238095
105	0.234	0.002228571
105	0.235	0.002238095
147	0.329	0.002238095
147	0.327	0.00222449
147	0.328	0.002231293
210	0.469	0.002233333
210	0.462	0.0022
210	0.467	0.00222381
	Promedio	0.00224393
	DE	4.85382E-05
	CV	2.163089348



Resumen

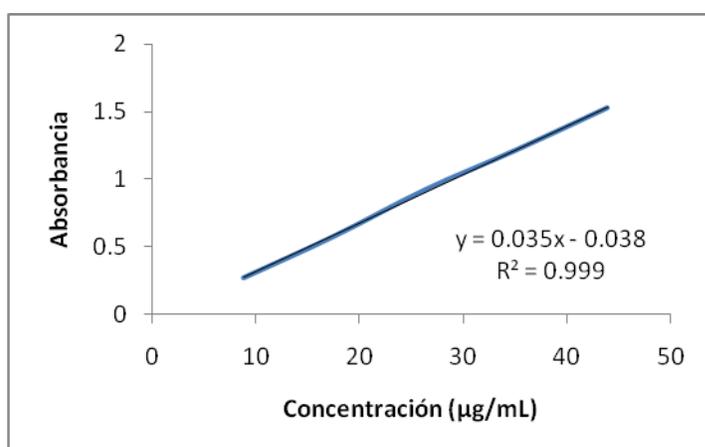
Estadísticas de la regresión

Coefficiente de correlación múltiple	Coefficiente de determinación R^2	R^2 ajustado	Error típico	Observaciones
0.99992482	0.99984964	0.99983808	0.00191307	15

ANÁLISIS DE VARIANZA					
	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F	Valor crítico de F
Regresión	1	0.31638602	0.31638602	86448.1404	3.0757E-26
Residuos	13	4.7578E-05	3.6598E-06		
Total	14	0.3164336			

	Coefficientes	Error típico	Estadístico t	Probabilidad	Inferior 95%	Superior 95%	Inferior 95.0%	Superior 95.0%
Intercepción	0.00166393	0.00095914	1.73481041	0.10640369	-0.00040817	0.00373604	-0.00040817	0.00373604
Conc. [µg/mL]	0.0022137	7.5291E-06	294.020646	3.0757E-26	0.00219743	0.00222997	0.00219743	0.00222997

Figura 5.2 Curva de calibración de PVA



Concentración (µg/mL)	Abs	Abs/con
8.785	0.273	0.0310757
17.57	0.581	0.03306773
26.35	0.923	0.03502846
35.14	1.216	0.03460444
43.92	1.526	0.03474499
PROMEDIO		0.03370426
DE		0.00165541
CV		4.91156145

Resumen

Estadísticas de la regresión

Coefficiente de correlación múltiple	Coefficiente de determinación R ²	R ² ajustado	Error típico	Observaciones
0.999749	0.99949807	0.99933076	0.01285101	5

ANÁLISIS DE VARIANZA								
	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F	Valor crítico de F			
Regresión	1	0.98658335	0.98658335	5973.91473	4.7733E-06			
Residuos	3	0.00049545	0.00016515					
Total	4	0.9870788						
	Coeficientes	Error típico	Estadístico t	Probabilidad	Inferior 95%	Superior 95%	Inferior 95.0%	Superior 95.0%
Intercepción	-0.0385334	0.0134786	-2.8588477	0.064638	-0.0814286	0.0043616	-0.0814286	0.0043616
Conc. [µg/mL]	0.03575811	0.00046264	77.2911038	4.7733E-06	0.0342857	0.0372304	0.03428578	0.03723044

Figura 5.3. Estructura Helicoidal del complejo formado entre PVA-Ácido Bórico-Iodo (RAYGOZA, (1995).

