

## UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

## FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

# PREPARACIÓN Y EVALUACIÓN DE NANOESFERAS DE POLI (E-CAPROLACTONA) CARGADAS CON CLOTRIMAZOL

TESIS Y EXAMEN PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE: LICENCIADO EN FARMACIA

PRESENTA:

FABIOLA SARAI SÁNCHEZ CASTRO

ASESORA: DRA. ELIZABETH PIÑÓN SEGUNDO





UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

## DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



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

Vniver4dad Nacional AvPnºma de Mexico

ASUNTO: VOTO APROBATORIO

M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLAN 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 comunicar a usted que revisamos el: <u>Tesis y Examen Profesional</u>

Preparación y evaluación de nanoesferas de poli (ε-caprolactona) cargadas con clotrimazol.

Que presenta la pasante: Fabiola Sarai Sánchez Castro

Con número de cuenta: 410082014 para obtener el Título de la carrera: Licenciatura en Farmacia

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

#### **ATENTAMENTE**

#### "POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 14 de Abril de 2016.

#### PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

NOMBRE

PRESIDENTE

M.F.C. Ma. Eugenia R. Posada Galarza

VOCAL

Q.F.B. Olimpia R. Ponce Crippa

SECRETARIO

Dra. Elizabeth Piñón Segundo

1er. SUPLENTE

M.F.C. Beatriz de Jesús Maya Monroy

2do. SUPLENTE

Dra. Ma. Guadalupe Nava Arzaluz

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

Le dedicó este trabajo a mis padres María Judith Castro Ortiz y Jorge Alberto Sánchez Cedillo, quienes siempre me han apoyado incondicionalmente, les agradezco todo su cariño, trabajo, dedicación y consejos. Gracias por siempre alentarme a continuar cuando parecía que me iba a rendir.

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Sistemas Farmacéuticos de Liberación Modificada (L-13) de la unidad de investigación Multidisciplinaria ubicado en la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Universidad Nacional Autónoma de México.

Investigación realizada gracias a los programas

- ➤ UNAM-DGPA-PAPIIT-IT 203614
- UNAM-DGPA-PAPITT-IN 224111
- > PIAPI C-05, FES-Cuautitlan
- CONACYT Ciencia Básica 128799

Se agradece el apoyo del Técnico Académico Rodolfo Robles, de la FES-Cuautitlán, en los estudios de microscopia electrónica de barrido.

## **ÍNDICE DE CONTENIDO**

I.	Lista de abreviaturas	V
II.	Lista de figuras	vi
III.	Lista de tablas	vii
IV.	Lista de gráficos	viii
1.	Introducción	1
2.	Objetivos	2
2.	1. Objetivo General	2
2.:	2. Objetivos Particulares	2
3.	Marco teórico	3
3.	1. Generalidades de la vagina	3
	3.1.1. Flujo vaginal	4
	3.1.2. pH vaginal	5
3	<ol> <li>Epidemiología de infecciones ginecológicas en el tracto reproductivo inferior</li> </ol>	6
3.	3. Tratamiento de infecciones ginecológicas en el tracto reproductivo	7
	inferior	
	3.3.1. Clotrimazol	8
	3.3.1.1. Farmacodinamia	9
_	3.3.1.2. Farmacocinética	10
3.4	4. Sistemas farmacéuticos de aplicación vaginal	10
	3.4.1. Formas farmacéuticas convencionales	11
	3.4.2. Nanopartículas	11
	3.4.2.1. Definición	12
	3.4.2.2. Tamaño de partícula	13
	3.4.2.3. Características de las nanopartículas	14
	3.4.3. Nanopartículas poliméricas	14
	3.4.4. Métodos de preparación de nanopartículas a base de polímeros	16
	3.4.5. Caracterización de nanopartículas	21
4.	Materiales	25
5.	Metodología	27
5.	Determinaciones previas	28
	5.1.1. Estudio de solubilidad de CLOT	26
	5.1.2. Espectro de absorción de CLOT y solución de tensoactivo	29
	5.1.3. Espectro de absorción del complejo PVAL-H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> -KI-I <sub>2</sub>	29
	5.1.4. Cuantificación de CLOT	30

		5.1.5.	Cuantifica	ción del complejo PVAL-H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> -KI-I <sub>2</sub>	30
	5.2.	Prep	NPP	30	
		5.2.1.	Método de	esplazamiento de solvente convencional	30
		5.2.2.	Método de	esplazamiento de solvente modificado	31
		5	.2.2.1. Ev	valuación del efecto de ultrasonido	31
		5	.2.2.2. Pi	reparación bajo condiciones óptimas seleccionadas	32
	5.3.	Cara	cterización	de las NPP	34
		5.3.1.	Análisis de	e TP, PDI y potencial Z	34
		5.3.2.	Cuantifica	ción del estabilizante residual	35
		5.3.3.	Porcentaje	e de fármaco encapsulado en la matriz polimérica (%EE),	35
			porcentaje	e de fármaco cargado (%DL) y porcentaje de eficiencia del	
			proceso (%	6EP)	
		5.3.4.	Estado cris	stalino de las NPP	36
		5.3.5.	Morfología	a	37
			•	liberación <i>in vitro</i> de CLOT	37
6.			y análisis		38
	6.1.		erminacion	•	38
				e solubilidad de CLOT	38
			•	de absorción	40
				ción de CLOT y del complejo PVAL-H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> -KI-I <sub>2</sub>	40
	6.2.		paración de		42
				esplazamiento de solvente convencional	44
		6.2.2.		esplazamiento de solvente modificado	46
			6.2.2.1.	Evaluación del efecto de ultrasonido	46
			6.2.2.2.	Preparación bajo condiciones óptimas seleccionadas	57
	6.3.			n de las NPP	58
				el TP, PDI y potencial Z	58
				ción del estabilizante residual	61
		6.3.3.	-	e de fármaco encapsulado en la matriz polimérica (% EE),	
			•	e de fármaco cargado (% DL), porcentaje de eficiencia del	62
				6 EP) y cuantificación del estabilizante residual	
		6.3.4.		stalino de las NPP	63
		6.3.5.	J		65
	_			n de los perfiles de liberación <i>in vitro</i>	66
		Conclus			73
		Referer	cias		74
	9. /	Anexos			80

## I. LISTA DE ABREVIATURAS

FVS Fluido vaginal simulado

NPP Nanopartículas poliméricas

PCL Poli (ε-caprolactona)

**CLOT** Clotrimazol

PVAL Alcohol polivinílico

**NS** Nanoesferas

**TP** Tamaño de partícula

PDI Índice de polidispersión

**% DL** Porcentaje de fármaco cargado

**% EE** Porcentaje de fármaco encapsulado en la matriz polimérica

**% EP** Porcentaje de eficiencia del proceso

Límite de detección

LC Límite de cuantificación

Coeficiente de variación

C.V.

## II. LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Sistema reproductor femenino.	2		
Figura 2.	Representación esquemática de la histología de la vagina.	3		
Figura 3.	ra 3. pH vaginal en los distintos ciclos de la vida de una mujer 5			
Figura 4.	4. Estructura química del clotrimazol 8			
Figura 5.	Mecanismo de acción de los diferentes antifúngicos.	9		
Figura 6	Representación esquemática de la administración de fármacos de	11		
	aplicación vaginal			
Figura 7.	Cambio del área de superficie especifica de un cubo sólido	12		
Figura 8.	Representación esquemática de nanocápsulas y nanoesferas	14		
	poliméricas: a) fármaco disuelto en el núcleo oleoso o acuoso; d)			
	fármaco atrapado, disperso, adsorbido y/o unido en la matriz			
	polimérica.			
Figura 9.	Representación esquemática de las diversas técnicas para la	15		
	preparación de nanopartículas poliméricas			
Figura 10.	Procedimiento esquemático y variables para la preparación de	18		
	nanopartículas por el método emulsión-difusión.			
Figura 11.	Procedimiento esquemático y variables para la preparación de	19		
	nanopartículas por el método desplazamiento de solvente.			
Figura 12.	Homogeneizador ultrasónico portátil UP200Ht, Hielscher®	31		
Figura 13.	Representación esquemática de la preparación de NPP bajo	33		
	condiciones óptimas seleccionadas			
Figura 14.	Zetasiser ZS90, Malvern <sup>®</sup> . Equipo empleado para la determinación del	34		
	TP, PDI y potencial Z.			
Figura 15.	Distribución del TP de NPP preparadas por el método desplazamiento	45		
	de solvente convencional (n=3).			
Figura 16	Distribución del TP de lotes obtenidos por ultrasonido, antes y	49		
	después de eliminar el estabilizante residual (n=3).			

Figura 17.	<b>gura 17.</b> Análisis de varianza con dos factores (amplitud de onda y potencia			
	con tres muestras por grupo para los resultados de TP e PDI obtenidos			
	de NPP preparadas por ultrasonido.			
Figura 18.	Gráficas de Tukey, nivel de confianza de 95 %.	55		
Figura 19.	gura 19. Distribución del TP de NPP preparadas por ultrasonido con y sin			
	crioprotector, antes de eliminar el estabilizante residual y después			
del proceso de liofilización (n=3).				
F' 20	Micrografía electrónica de barrido de NPP preparadas bajo	65		
Figura 20.	condiciones óptimas seleccionadas con crioprotector.			

## III. LISTA DE TABLAS

Tabla 1.	Fármacos utilizados para el tratamiento de vulvovaginitis de acuerdo			
	al agente causal			
Tabla 2.	Condiciones para el estudio de solubilidad	28		
Tabla 3.	Barridos espectrofotométricos UV	29		
Tabla 4.	Condiciones para evaluar el efecto de ultrasonido en la preparación	32		
	de NPP por el método desplazamiento de solvente			
Tabla 5.	Cantidad de CLOT disuelto en solución de FVS con Gelucire® 44/14 y			
	Kolliphor® HS 15.			
Tabla 6.	Parámetros de validación de la curva de calibración	41		
Tabla 7.	NPP preparado por el método desplazamiento de solvente	44		
	convencional			
Tabla 8.	la 8. Evaluación del efecto de ultrasonido: Análisis de TP promedio, PDI y			
	potencial Z (antes de eliminar el exceso de estabilizante).			
Tabla 9.	la 9. Evaluación del efecto de ultrasonido: Análisis de TP promedio, PDI y			
	potencial Z (después de eliminar el exceso de estabilizante).			

- **Tabla 10.** Preparación de NPP bajo condiciones óptimas seleccionadas: Análisis **58** de TP, PDI y potencial Z
- **Tabla 11.** Preparación de NPP bajo condiciones óptimas seleccionadas: **61**Resultados del %EE, %DL y % EP (n=3)
- Tabla 12. Mecanismos de transporte y tipo de liberación de un principio activo 69 en base al exponente de difusión "n" de acuerdo al modelo de Krosmeyer-Peppas.
- **Tabla 13.** Resultados de las cinéticas de liberación de acuerdo a los modelos de **70** Krosmeyer-Peppas y Higuchi.

## IV. LISTA DE GRÁFICOS

- **Gráfico 1.** Estudio de solubilidad del CLOT en solución de FVS con Gelucire 39 44/14 y Kolliphor HS 15 en FVS
- Gráfico 2. Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC). Termogramas de CLOT, 64

  PCL, PVAL, manitol y de NPP biodegradables preparadas bajo condiciones óptimas de ultrasonidos.
- Gráfico 3. Perfiles de liberación de CLOT a partir de NPP de PCL por el método 67 de difusión con bolsas de diálisis. (•) Sistemas con crioprotector (n=3) y (◆) Sistemas sin crioprotector (n=3).
- Gráfico 4. Liberación de clotrimazol a partir de NPP bajo condiciones óptimas 70 seleccionadas (Modelo de Peppas): Lote sin manitol y ◆ Lote con manitol (n=3)
- Gráfico 5. Liberación de CLOT a partir de NPP bajo condiciones óptimas 71 seleccionadas (Modelo de Higuchi): Lote sin manitol y ◆ Lote con manitol (n=3).

## 1. INTRODUCCIÓN

Las infecciones ginecológicas es un problema recurrente en la población mexicana. La administración de fármacos empleando nanopartículas poliméricas biodegradables como vehículos prometedores con la capacidad de controlar la liberación de la molécula activa en el sitio de acción puede ser el tratamiento más eficaz para el combate de infecciones vaginales que afectan la salud de las mujeres como las infecciones causadas por hongos.

En México, el Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) tan sólo en 2007 otorgó 153,642 consultas en primer nivel de atención con diagnóstico de vulvovaginitis (http://www.saludbc.gob.mx). La vulvovaginitis es cualquier proceso inflamatorio de la vagina y la vulva. Puede producirse por causas infecciosas o no infecciosas. La vaginosis bacteriana y la candidiasis vulvovaginal son consideradas como las infecciones ginecológicas más comunes. Existen varios factores asociados con el crecimiento de estos padecimientos como: los cambios hormonales relacionados con la menstruación, el empleo de anticonceptivos orales, la administración de antibióticos, duchas intravaginales, ropa interior ajustada, entre otros (Cu, 2011).

La administración de imidazoles es considerado como el tratamiento de elección para combatir la vulvovaginitis causada por *Candida albicans, Gardnerella vaginalis y Trichomonas vaginalis*. De los antifúngicos locales el más utilizado sigue siendo el clotrimazol, su eficacia terapéutica sobrepasa el 85% y ha sido el patrón de referencia de nuevos imidazoles (Cararach, 2013). El clotrimazol altera la permeabilidad de la membrana celular del hongo por la unión con fosfolípidos. Tras su administración tópica es mínimamente absorbido, su acción es local (Carrillo, 2013).

Con este trabajo se pretende desarrollar nanopartículas biodegradables a base poli (ε-caprolactona) cargadas con clotrimazol por el método desplazamiento de solvente bajo acción de ultrasonido para que puedan ser una alternativa en el tratamiento eficaz de infecciones vaginales.

#### 2. OBJETIVOS

#### **2.1.** Objetivo General:

Obtener nanopartículas poliméricas biodegradables cargadas con clotrimazol aplicando el método modificado de desplazamiento de solvente bajo acción de ultrasonido para que puedan ser usadas en el tratamiento de vulvovaginitis.

## **2.2.** Objetivos Particulares:

- Obtener nanoesferas cargadas con clotrimazol como principio activo a partir del método desplazamiento de solvente bajo acción de ultrasonido para el posible tratamiento de candidiasis vulvovaginal.
- Determinar las condiciones óptimas de ultrasonido para la preparación de nanopartículas poliméricas a partir de la adecuación del método desplazamiento de solvente considerando como variables de respuesta el tamaño de partícula e índice de polidispersión para mejorar el proceso de elaboración.
- Obtener información sobre el comportamiento de las nanopartículas a partir de la caracterización de las mismas para conocer su morfología, tamaño de partícula, índice de polidispersión, potencial z, eficiencia de encapsulamiento, exceso de estabilizante y cristalinidad.
- Evaluación de los perfiles de liberación in vitro del clotrimazol (principio activo) a partir de las nanopartículas poliméricas, usando bolsas de diálisis para analizar y describir el mecanismo mediante el cual ocurre el proceso de liberación.

#### 3. MARCO TEÓRICO

#### 3.1. Generalidades de la vagina

La vagina es un órgano que pertenece al sistema reproductor femenino. Este sistema se clasifica de la siguiente manera (García, 2011):

- 1. Genitales internos: Ovarios, Útero, Trompas de Falopio y Vagina (Figura 1).
- 2. Genitales externos: Vulva y Glándulas mamarias.

La vagina consiste en un tubo plegable fibromuscular en forma de S de ente 6 y 10 cm de longitud, se extiende desde el cuello del útero hacia el exterior y, se encuentra entre la vejiga y el recto. Tiene funciones relacionadas con la descarga de fluido vaginal, la descarga de menstruación, la concepción y las relaciones sexuales (das Neves, 2006 y Hussain, 2005).

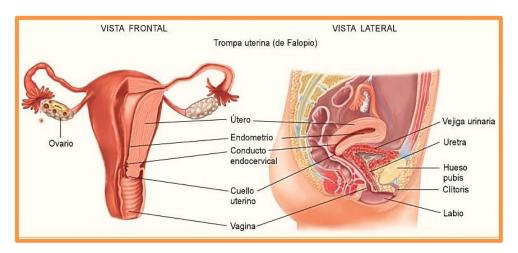


Figura 1. Sistema reproductor femenino (American Academy of Orthopaedic Surgeons, 2011).

La pared vaginal presenta una abundante red de vasos sanguíneos y vasos linfáticos, lo que hace que sea una excelente vía para la administración de medicamentos tanto para efectos locales como sistémicos (Yoo, 2011). La pared vaginal está compuesta por tres capas y la ubicación de estas se ilustra en la Figura 2.

- Capa adventicia o túnica fibrosa: consta de tejido conjuntivo elástico muy vascularizado.
- Capa muscular o túnica muscular: consta de dos capas de fibras musculares lisas. (1)
   Externa: fibras longitudinales e (2) Interna: fibras circulares
- Túnica mucosa o capa epitelial: De color rosado, tiene pliegues transversales llamados rugosidades que aumentan drásticamente su área superficial (Hussain, 2005 y Ross, 2008). El espesor del epitelio es de 200 a 300 µm aproximadamente (das Neves, 2006).

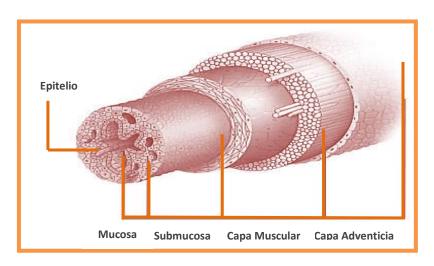


Figura 2. Representación esquemática de la histología de la vagina. (Rodríguez-Antolín, 2012).

#### 3.1.1. Flujo vaginal

Aunque la vagina no posee ninguna glándula, secreta gran cantidad de líquido llamado flujo vaginal. Este flujo está constituido principalmente por secreciones del útero, cérvix, trasudación de los vasos sanguíneos y secreciones menstruales. El flujo vaginal es expulsado a través del orificio vaginal, por la presión y movimientos abdominales que contraen las paredes de la vagina. Éste flujo tiene la función de barrera, no permite el paso de moléculas de gran tamaño y atrapa moléculas que contienen una carga superficial (Cu, 2011, Hussain, 2005 y Lai, 2009).

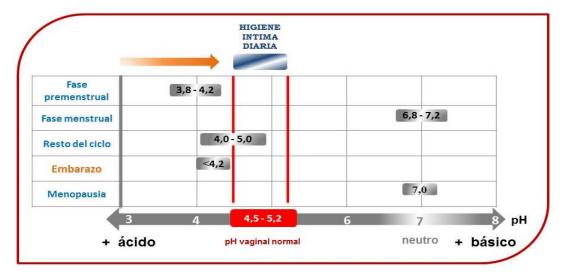
La cantidad y composición del flujo vaginal cambia durante el ciclo menstrual. Las mujeres en edad reproductiva producen aproximadamente 3.4 g de secreciones en un lapso de 4 horas, mientras que la descarga producida en mujeres posmenopáusicas se reduce al 50 %, la excitación sexual puede afectar el volumen y la composición del flujo vaginal. El espesor del flujo vaginal y el tiempo de eliminación son factores importantes para el desarrollo de partículas destinadas a penetrar y superar está barrera (Hussain, 2005 y Lai, 2009).

Debido a la cantidad limitada de fluido vaginal humano y su rápida degradación, ha hecho que una gran cantidad de investigadores desarrollaran un fluido vaginal simulado (FVS) compuesto esencialmente por NaCl, KOH, Ca(OH)<sub>2</sub>, ácido láctico, ácido acético, glicerol, urea y glucosa a un pH de 4.5, éste FVS es utilizado principalmente para pruebas *in vitro* (Aka-Any-Graha, 2010).

#### 3.1.2. pH vaginal

El pH varía en los distintos ciclos de la vida de una mujer. En la fase menstrual, el pH es de 6.8 a 7.2, en la fase premenstrual el pH es de 3.8 a 4.2 y durante el resto del ciclo el pH varía entre 4.0 y 5.0 como se representa en la Figura 3 (http://salud.bayer.es). En general, el pH de las secreciones vaginales varía entre 3.5 y 4.5 (Lai, 2009). Esto depende de la cantidad de glucógeno en la superficie de la capa epitelial (Hussain, 2005).

El epitelio sufre cambios que coinciden con el ciclo menstrual. La cantidad de glucógeno almacenado en las células epiteliales aumenta por la acción de los estrógenos mientras que el ritmo de exfoliación aumenta por la acción de la progesterona. El glucógeno liberado por las células exfoliadas es fermentado por los lactobacilos vaginales, con lo que, se forma ácido láctico que acidifica la superficie mucosa de la vagina e inhibe la colonización por levaduras y bacterias potencialmente dañinas (Ross, 2008).



**Figura 3.** pH vaginal en los distintos ciclos de la vida de una mujer (Modificado de http://salud.bayer.es).

#### 3.2. Epidemiología de infecciones ginecológicas en el tracto reproductivo inferior

Las infecciones del tracto reproductor femenino son causadas por microorganismos que normalmente están presentes o que son inducidos desde el exterior hacia el tracto vagina. Las infecciones ginecológicas se pueden originar en el tracto reproductivo inferior y superior las más comunes son: (Martín-Aragón, 2009)

- En el tracto reproductivo inferior: Vulvovaginitis
- En el tracto reproductivo superior: Cervicitis y enfermedad pélvica inflamatoria producidas por *Chlamydia trachomatis y Neisseria gonorrheae*.

En el año 2007, el Instituto Mexicano del Seguro Social otorgó 153,642 consultas en Primer Nivel de Atención con diagnóstico de vulvovaginitis (http://www.saludbc.gob.mx). La vulvovaginitis es un síndrome clínico caracterizado por un proceso inflamatorio de la vagina y/o la vulva que se manifiesta con leucorrea, prurito, escozor, disuria y/o dispareunia. Puede producirse por causas infecciosas o no infecciosas. Entre las causas infecciosas destacan las causadas por *Candida allbicans* (Candidiasis vulvovaginal), *Gardnerella vaginalis* (Vaginosis bacteriana) y *Trichomonas vaginalis* (Tricomoniasis) (Martín-Aragón, 2009).

La vaginosis bacteriana es considerada como una de las infecciones ginecológicas más comunes, es producida por diversas bacterias anaerobias entre las que destaca *Gardnerella vaginalis*. La vaginosis bacteriana es la causa más frecuente de flujo vaginal y mal olor. Hasta el 50% de las mujeres que padecen vaginosis bacteriana pueden no manifestar sintomatología (Cu, 2011 y Perea, 2010)

La candidiasis vulvovaginal es el segundo padecimiento más frecuente, estimándose que del 50 al 75% de las mujeres sufren al menos un episodio a lo largo de su vida y el 65% de ellas desarrollan candidiasis vulvovaginal recidivante, con más de cuatro episodios al año, es decir, que pasaran de una colonización asintomática a una colonización sintomática, cuando haya una pérdida del equilibrio en la flora lactobacilar normal, principalmente por variaciones del nivel de estrógenos. El 90% de los episodios de candidiasis vulvovaginal son causados por *Candida albicans* y el 10% restante se debe a otras especies menos frecuentes (Gonzales-Pedraza, 2007 y http://www.cadime.es)

La tricomoniasis es una enfermedad producida por el parásito *Trichomonas vaginalis*. Las mujeres con esta enfermedad presentan un rango amplio de manifestaciones clínicas como: prurito y una secreción vaginal profusa, blancuzca, verdosa o amarillenta y de olor fétido, aunque también el 40 % de los casos son asintomáticos (Martín-Aragón, 2009).

Otras enfermedades frecuentes a nivel vaginal son las enfermedades de transmisión sexual, estas enfermedades son adquiridas por la exposición de la mucosa vaginal al virus (por ejemplo el virus del herpes y del papiloma humano) durante el contacto sexual (Yoo, 2011). Por ello, la terapia antiviral pretende entregar los agentes directamente en la superficie de la mucosa vulnerable (Cu, 2011).

#### 3.3. Tratamiento de infecciones ginecológicas en el tracto reproductivo inferior

Como se mencionó anteriormente, uno de los padecimientos ginecológicos más comunes en el tracto reproductivo inferior es la vulvovaginitis, causada principalmente por *Candida albicans*, *Gardnerella vaginalis* y *Trichomonas vaginalis*.

La administración de imidazoles es considerado el tratamiento de elección para combatir este padecimiento. Entre los principales medicamentos administrados por vía vaginal, para el tratamiento de vulvovaginitis se encuentran los siguientes: clotrimazol, clindamicina y metronidazol. Los tratamientos se describen en la Tabla 1 (Martín-Aragón, 2009).

**Tabla 1.** Fármacos utilizados para el tratamiento de vulvovaginitis de acuerdo al agente causal.

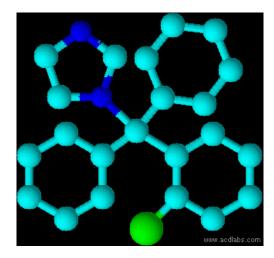
Agente Causal	Tratamiento	Presentación	Contenido de principio activo
	Clotrimazol	Comprimido vaginal	500 mg
Candida spp		Óvulos	100 mg
		Crema vaginal	2%
Gardnerella	Clindamicina	Crema vaginal	2%
vaginalis	Metronidazol	gel	0.75%
Trichomonas vaginalis	Clotrimazol	Comprimido vaginal	100 mg

#### 3.3.1. Clotrimazol

La mayoría de los fármacos antifúngicos utilizados en la actualidad son derivados imidazólicos. Estos fármacos tienen la desventaja de ser fungistáticos y no fungicidas, es decir, inhiben el crecimiento del hongo y no lo destruyen. Sin embargo, hay evidencia que el clotrimazol actúa como fungicida cuando es administrado de forma tópica a nivel vaginal en dosis mayores de 10 a 20 mg/L (Cararach, 2013 y http://mx.prvademecum.com/producto.php?producto=11245).

El clotrimazol es un fármaco que pertenece al grupo de los antifúngicos imidazólicos. El clotrimazol es una base débil prácticamente insoluble en agua, su solubilidad depende del pH. Al disminuir el pH, la solubilidad del fármaco aumenta, debido a la presencia de los átomos de nitrógeno en el anillo azol de su estructura química (Figura 4), es decir, los átomos de nitrógeno se encuentran protonados en pH ácido y le imparten naturaleza polar (Borhade, 2012).

De los antifúngicos locales el más utilizado sigue siendo el clotrimazol. Su eficacia terapéutica sobrepasa el 85% y es el patrón de referencia de los derivados de imidazol que han ido apareciendo en el mercado (Cararach, 2013). Sus propiedades fisicoquímicas se muestran en el anexo, sección 9.1.



**Figura 4.** Estructura química del clotrimazol (Vista 3D obtenida en ACD/ 3D Viewer).

#### 3.3.1.1. Farmacodinamia

Como derivado imidazólico inhibe la enzima lanosterol-14-desmetilasa, necesaria para la biosíntesis del ergosterol, componente fundamental de la membrana celular fúngica. Al inhibir la síntesis del ergosterol, se produce una deficiencia que provoca la alteración de la permeabilidad de la pared celular del hongo y finalmente la lisis celular (Martín-Aragón, 2009). El mecanismo de acción se representa en la Figura 5.

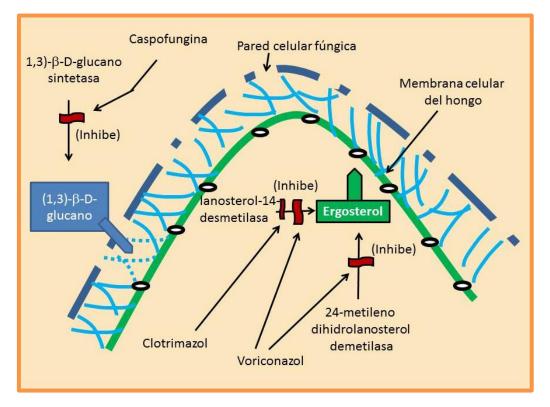


Figura 5. Mecanismo de acción de los diferentes antifúngicos (Modificado de Bidart, 2004).

#### 3.3.1.2. Farmacocinética

El clotrimazol no se administra sistémicamente y después de la aplicación tópica sobre la piel o vaginalmente las concentraciones plasmáticas son mínimas. Por vía vaginal, se absorbe entre el 5 y 10% de la dosis, la pequeña cantidad que se absorbe es metabolizada en el hígado y excretada en la bilis (http://www.iqb.es/).

#### 3.4. Sistemas farmacéuticos de aplicación vaginal

En los últimos años, se ha estudiado a la vagina humana como una ruta alternativa para la administración de diversas clases de fármacos, tales como antimicóticos, microbicidas, hormonas sexuales, entre otros (Yoo, 2011). Los fármacos administrados por vía vaginal no sufren el efecto de primer paso del metabolismo hepático y pueden tener un efecto local o sistémico (Hussain, 2005).

#### 3.4.1. Formas farmacéuticas convencionales

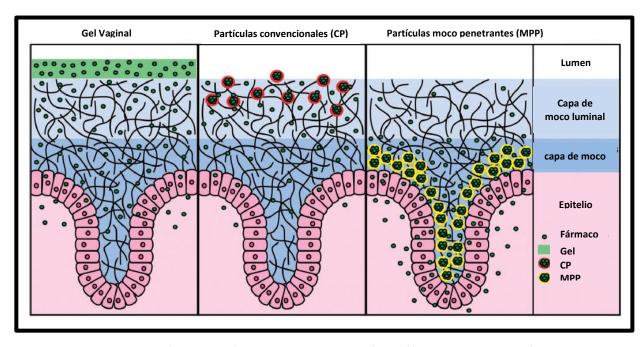
Actualmente, existen en el mercado mexicano diferentes formas farmacéuticas de aplicación vaginal, para el tratamiento de infecciones ginecológicas. Entre las formas farmacéuticas convencionales se encuentran los óvulos, geles, cremas y comprimidos vaginales. Estas formas farmacéuticas se caracterizan por residir corto tiempo en el sitio de acción, debido a la producción y desecho de las secreciones del cérvix.

Por otro lado, el uso de sistemas de liberación convencional y la distribución de los pliegues vaginales hacen que el fármaco no acceda a la superficie de estos pliegues, como se ilustra en la Figura 6 (Ensing, 2012).

También existen otros sistemas utilizados en la administración de fármacos de aplicación vaginal, como los sistemas bioadhesivos, principalmente tabletas y geles. Estos sistemas pueden adherirse a la capa de moco que recubre el epitelio, esperando permanecer el tiempo suficiente para ejercer un efecto terapéutico (Abruzoo, 2013). Sin embargo, para prevenir la expulsión del fármaco también se han estudiado nuevas formas farmacéuticas como pellets, micropartículas y nanopartículas con el fin de que el fármaco entre en contacto con toda la superficie del epitelio y pueda permanecer un período de tiempo más largo (Rodríguez, 2000).

#### 3.4.2. Nanopartículas

Las nanopartículas han sido consideradas como vehículos prometedores para la liberación de fármacos (Santos, 2014). En general, estos sistemas tienen la capacidad de: (Irache, 2008) Proteger el fármaco ante la degradación desde la administración hasta su lugar de acción, atravesar barreras biológicas, alcanzar las células diana donde ejercerá su acción, alcanzar compartimentos intracelulares y controlar la liberación de la molécula activa en su lugar de acción.



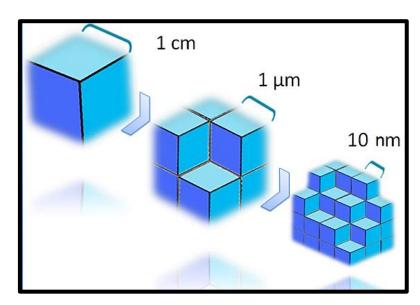
**Figura 6.** Representación esquemática de la administración de fármacos de aplicación vaginal (Modificado de Ensing, 2012)

#### 3.4.2.1. Definición

De acuerdo con la definición de la Sociedad Americana para Pruebas y Materiales (ASTM), son partículas con longitudes que van de 1 a 100 nanómetros (Lewinski, 2007). En el ámbito farmacéutico y médico se definen como "Partículas coloidales sólidas que varían en tamaño de 10 a 1000 nm compuestas de materiales macromoleculares en el que se disuelve el principio activo (sustancia biológicamente activa), quedando atrapado, encapsulado, adsorbido y/o unido". Esta definición fue adoptada por la enciclopedia de Tecnología Farmacéutica y la Enciclopedia de Nanotecnología. (Kreuter 2007).

#### 3.4.2.2. Tamaño de partícula

Como se mencionó anteriormente las nanopartículas son partículas de tamaño nanométrico. Un nanómetro presenta una longitud extremadamente pequeña correspondiente a la milésima parte de 1 µm. Por ejemplo como se muestra en la Figura 7, si un cubo con una longitud lateral de 1 cm se divide en cubos de 1 µm y posteriormente en cubos de 10 nm, el número de partículas aumenta y la fracción de átomos o moléculas situado en la superficie de las partículas son más activas que las que están dentro de las partículas sólidas, lo que conduce a la fácil unión al ponerse en contacto con otros materiales (Yokoyama, 2012).



**Figura 7.** Cambio del área de superficie específica de un cubo sólido (Modificado de Yokoyama, 2012)

A medida que se reduce el tamaño de partícula de una sustancia se afecta el comportamiento de los átomos y/o moléculas, presentando diferentes propiedades físicas comparadas con las propiedades del material macromolecular.

Por lo tanto, el tamaño de partícula influye en las características y propiedades de las nanopartículas por lo que es esencial conocer el tamaño exacto de éstas (Yokoyama, 2012).

#### 3.4.2.3. Características de las nanopartículas

Los materiales tienen diferentes propiedades físicas cuando se encuentra en tamaños mayores al nivel nanométrico. Por lo tanto, el tamaño de partícula influye de manera importante en las características de las nanopartículas.

Las características pueden variar conforme a lo siguiente:

#### I. Aumento de la superficie

El incremento del área superficial específica influye en la reacción de las partículas y en la velocidad de disolución (Yokoyama, 2012).

## II. Activación de la superficie de la partícula

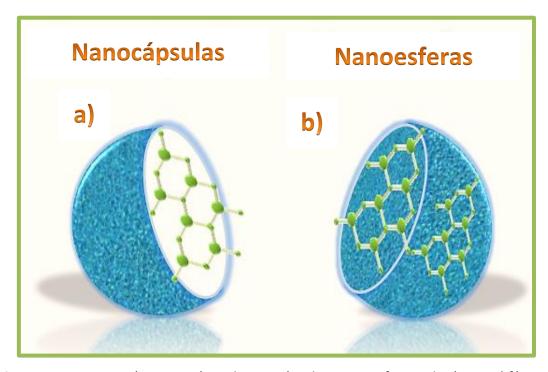
Al reducir el tamaño de la partícula de una sustancia se aumenta la superficie de contacto. Los átomos o moléculas situadas en la superficie serán más activos que aquellos átomos o moléculas situados dentro de la partícula. Se facilita la unión con otros materiales y provocan diversos cambios en las propiedades de la partícula (Yokoyama, 2012).

La activación de superficie de una partícula será proporcional al aumento de la superficie, es decir, ambas características dependerán del tamaño de partícula (Bensebaa, 2013).

#### 3.4.3. Nanopartículas poliméricas

El término nanopartículas poliméricas (NPP) es un término colectivo dado a cualquier tipo de nanopartículas a base de polímero (Rao, 2011). Una característica importante de este tipo de nanopartículas es que pueden encapsular fármacos de manera simple y el material base utilizado para la preparación puede ser un polímero biodegradables (Romero, 2012).

Las nanopartículas poliméricas (NPP) pueden distinguirse en dos subtipos de nanoestructuras como se muestra en la Figura 8 (Santos, 2014). De acuerdo con el proceso empleado en la preparación pueden obtenerse nanocápsulas o nanoesferas (Sáez, 2004).



**Figura 8.** Representación esquemática de nanocápsulas y nanoesferas poliméricas: a) fármaco disuelto en el núcleo oleoso o acuoso; d) fármaco atrapado, disperso, adsorbido y/o unido en la matriz polimérica.

Los términos de nanocápsulas y nanoesferas son usados específicamente para definir estos dos subtipos de nanoestructuras poliméricas (Rao, 2011). Las nanocápsulas difieren de las nanoesferas porque en su interior contienen un depósito, es decir, un núcleo líquido o semisólido a temperatura ambiente (15-25 °C) este núcleo se encuentra rodeado por un material sólido (polímero). El núcleo de las nanocápsulas puede ser un núcleo acuoso o un núcleo oleoso, por tanto, permite encapsular compuestos solubles en agua o fármacos liposolubles (Vauthier, 2008). Por otro lado, las nanoesferas son partículas cuya masa es sólida, el fármaco puede quedar atrapado, disperso, adsorbido y/o unido en la esfera (Rao, 2011).

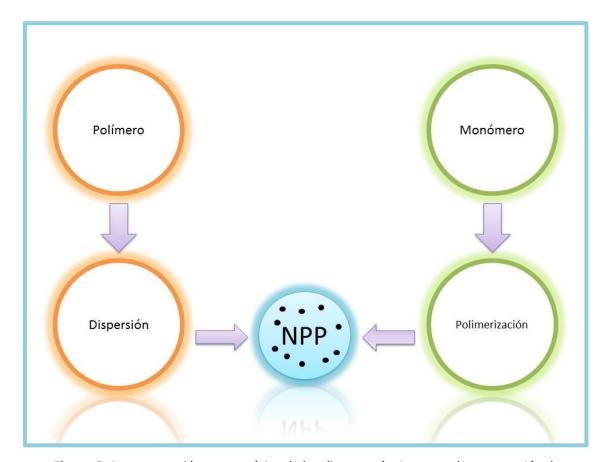
#### 3.4.4. Métodos de preparación de nanopartículas a base de polímeros.

Se han utilizado diferentes técnicas para preparar NPP. Las propiedades deben ser optimizadas dependiendo de la aplicación. Con este fin, el modo de preparación juega un papel fundamental (Rao, 2011).

Existen dos procesos para la preparación de nanopartículas poliméricas:

- 1. A partir de monómeros, que se polimerizan durante la preparación
- 2. A partir de polímeros preformados.

Los métodos a partir de monómeros y polímeros preformados se esquematizan en la Figura 9 y a continuación se describirán los métodos más relevantes.



**Figura 9.** Representación esquemática de las diversas técnicas para la preparación de nanopartículas poliméricas (Modificado de Rao, 2011)

Hoy en día, para preparar nanopartículas poliméricas se da prioridad al uso de polímeros preformados en lugar de monómeros (Wachsmann, 2012). Los métodos desplazamiento de solvente y emulsión-difusión son los más utilizados, los procedimientos esquemáticos se representan en las Figuras 10 y 11. Además, se caracterizan por la sencillez del procedimiento, alta eficiencia de encapsulamiento, alta reproducibilidad, bajo contenido de contaminantes y bajo costo. (Mora-Huertas, 2011). Ambos métodos requieren la mezcla de dos fases, orgánica y acuosa. La migración del solvente orgánico en agua conduce a la formación de partículas submicrónicas instantáneamente. (Mora-Huertas, 2011).

Los dos métodos permiten obtener eficiencias de encapsulamiento superior al 70% y carga del fármaco mayor a 10%; sin embargo, la técnica desplazamiento de solvente presenta ventajas en comparación con el método emulsión-difusión, debido a que requiere menor energía, tiempo y cantidad de agua (Mora-Huertas, 2011).

#### a) Método Emulsión-difusión

El método evaporación de solvente fue el primer método desarrollado a partir de polímeros preformados (Rao, 2011). En el campo farmacéutico encuentra su principal desarrollo gracias al trabajo pionero de Gurny et al., quien lo aplicó para producir vehículos biodegradables para el transporte del fármacos (Vauthier, 2008).

En 1995 Leroux et al. desarrollaron un nuevo método llamado emulsión-difusión, obtuvieron nanopartículas utilizando alcohol polivinílico como estabilizante y alcohol bencílico como solvente, pero encontró inconvenientes tales como la no biodegradabilidad del alcohol polivinílico, el requerir altas concentraciones de estabilizante y obtener un bajo rendimiento (Lee, 2013).

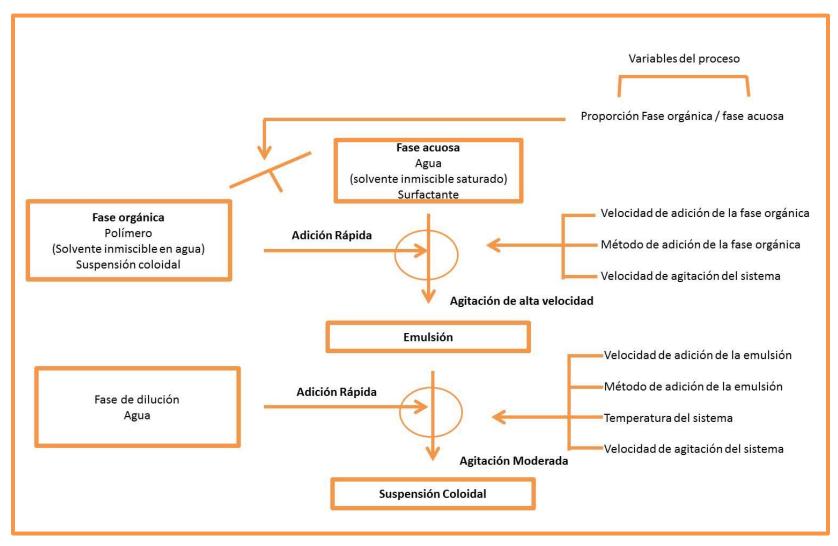
En 1996, Quintanar-Guerrero introdujo una modificación en la metodología (Romero, 2012). El método emulsión-difusión para preparar nanopartículas consistía en tres fases: orgánica, acuosa y de dilución. La fase orgánica es la solución del polímero y el fármaco en un disolvente orgánico parcialmente miscible en agua, que ha sido previamente saturado.

La fase acuosa es la solución de un agente estabilizante, mientras que la fase de dilución es normalmente agua. La fase orgánica se añade rápidamente a la fase acuosa (en máximo 5 segundos) (Mora-Huertas, 2011). Las fases se emulsionan por agitación vigorosa. Posteriormente, se diluye con exceso de agua para provocar la difusión del disolvente hacia la fase externa, provocando la formación de nanopartículas (Noriega, 2011). El disolvente orgánico se puede eliminar por destilación (Romero, 2012).

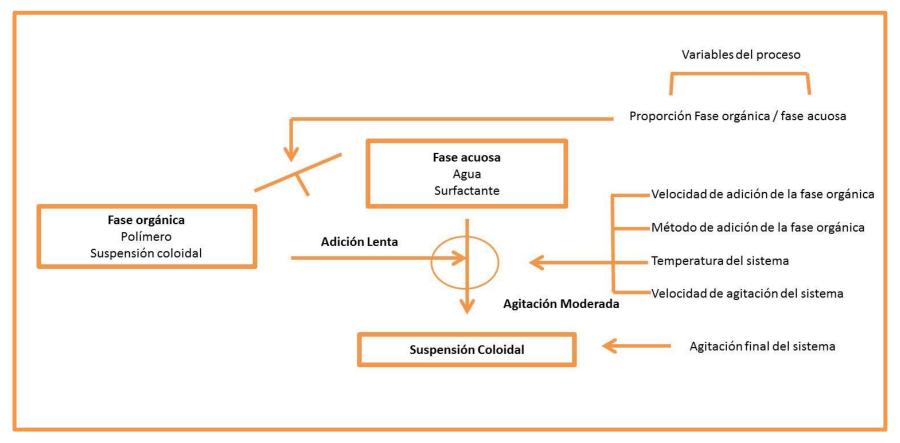
El tamaño y la forma de las nanocápsulas dependerá de: La velocidad de cizallamiento de emulsificación, la concentración del polímero y la relación de dilución (Romero, 2012). Las desventajas de este método es el uso de gran cantidad de agua, necesaria para eliminar el solvente orgánico y la fuga de fármaco soluble en agua durante la emulsificación (Xiao-Yun Lu, 2011).

#### b) Método desplazamiento de solvente

El método desplazamiento de solvente fue descrito y patentado por Fessi et al. El método involucra una fase orgánica y una fase acuosa. La fase orgánica consiste en disolver el polímero y el fármaco en un solvente polar miscible en agua (la acetona se elige generalmente como el solvente debido a su propiedad solubilizante), esta solución (fase orgánica) se adiciona por inyección a la fase acuosa bajo agitación magnética. Generalmente, la fase acuosa está constituida por un agente estabilizante (por ejemplo alcohol polivinílico). A medida que se adiciona la fase orgánica a la fase acuosa, las nanopartículas se forman instantáneamente por la difusión del solvente al medio acuoso provocando la insolubilidad del polímero el cual precipita. El solvente es eliminado de la suspensión a presión reducida (Mora-Huertas, 2011). Muchos investigadores han demostrado que el método desplazamiento de solvente es útil para preparar nanopartículas. Sin embargo, Boom et al. (2015) menciona que en la actualidad las investigaciones se centran en la adecuación del método desplazamiento de solvente para mejorar la carga de fármaco y la eficiencia de encapsulamiento, sin que ninguno muestre interés en el efecto sobre el tamaño de partícula e índice de polidispersión.



**Figura 10.** Procedimiento esquemático y variables para la preparación de nanopartículas por el método emulsión-difusión (Modificado de Mora-Huertas, 2011).



**Figura 11.** Procedimiento esquemático y variables para la preparación de nanopartículas por el método desplazamiento de solvente (Modificado de Mora-Huertas, 2011).

En el estudio reportado por Quintanar-Guerrero, et al., demostraron que el tamaño de partícula está influenciado por la velocidad de agitación, es decir, que al aumentar la velocidad de agitación se producen partículas de menor tamaño. El estudio se realizó utilizando como estabilizante poloxámero 188 a 1000, 1480, 2000 y 2460 rpm. Otras variables son el tiempo de agitación, lo que sugiere que la formación también depende del tiempo, es decir, el tamaño de partícula puede variar si el tiempo de difusión es insuficiente debido a la velocidad de inyección de la fase orgánica.

Aubry y colaboradores también determinaron que el tamaño de partícula puede ser influenciado por el método de adición, es decir, el orden en el que se adicionan las fases: fase orgánica en la fase acuosa o viceversa (Mora-Huertas, 2011). Otros factores que influyen en el tamaño de partícula son la velocidad de agitación del sistema, la temperatura del sistema, el tiempo de agitación final y la relación de la fase orgánica y acuosa.

## 3.4.5. Caracterización de nanopartículas

Las nanopartículas deben ser caracterizadas, para obtener información sobre el comportamiento de las partículas, ya que pequeñas modificaciones en las características y superficie pueden ocasionar cambios drásticos sobre el comportamiento *in vivo*. Entre las principales pruebas se encuentran:

#### > Tamaño de partícula

El tamaño de partícula es un parámetro crítico, ya que está directamente relacionado con la estabilidad y la liberación del fármaco (Mora-Huertas, 2011). Los métodos para medir el tamaño de partícula son: microscopia electrónica de barrido, difracción de rayos X, espectroscopia de correlación cruzada de fotones, espectrometría de difracción por rayos láser.

## Índice de polidispersión

La distribución del tamaño de partícula está representada por el índice de polidispersión (PDI), en el que se desea el valor más cercano a 0 porque representa una distribución estrecha, mientras que un valor cercano a 1 representa una muestra polidispersa (Boon, 2015).

#### Potencial Z

Un punto de particular interés es el potencial donde se une la capa difusa (Una atmosfera cargada rodeando al coloide) y de la capa de Stern (capa de contra-iones alrededor de la superficie del coloide).

El potencial Z es determinado por la técnica de Laser Doppler Micro-electrophoresis, donde un campo eléctrico se aplica a una solución o dispersión de partículas que se mueve con una velocidad relacionada con su potencial Z. Esta velocidad se mide usando una técnica patentada llamada movilidad electroforética. Esto permite el cálculo de la movilidad electroforética, y desde este, el potencial zeta para la medición precisa de una amplia gama de tipos de muestras y medios de dispersión (http://www.malvern.com/).

Porcentaje de fármaco encapsulado en la matriz polimérica (%EE), porcentaje de fármaco cargado (%DL, por sus siglas en inglés) y porcentaje de eficiencia del proceso (%EP).

El %EE mide la cantidad de fármaco encapsulado en la matriz polimérica con respecto a la cantidad inicial. Por tanto, es un indicador de las pérdidas de fármaco durante el proceso. Es muy importante diseñar procesos en los cuales se pierda el mínimo de fármaco, esto significa valores cercanos a 100% para la eficiencia de encapsulación.

EL %DL indica la proporción de fármaco respecto a la masa total de nanopartículas, por otra parte, el %EP mide la eficiencia del procesó considerando la cantidad de materia prima empleada durante la elaboración de nanopartículas y la cantidad de nanopartículas que es posible recuperar una vez que éstas han sido elaboradas.

#### > Estado cristalino

La calorimetría diferencial de barrido (DSC) es una técnica experimental dinámica que nos permite determinar la cantidad de calor que absorbe o libera una sustancia, cuando es mantenida a temperatura constante, durante un tiempo determinado, o cuando es calentada o enfriada a velocidad constante, en un determinado intervalo de temperaturas (Suriñach, 1992)

Los estudios de calorimetría diferencial de barrido son útiles para evaluar y determinar la forma en que se encuentra el fármaco dentro de las nanopartículas y, de esta manera, saber si este está disperso molecularmente o en forma de cristales. Cuando el fármaco se encuentra disperso en el sistema, no se detecta el pico endotérmico característico de la fusión del fármaco en el termograma.

#### Morfología

El uso de microscopía electrónica de barrido es una técnica utilizada para demostrar que las nanopartículas presentan una estructura de matriz sólida homogénea (Piñón-Segundo, 2005).

#### Cinética de liberación in vitro

Un ensayo de disolución consiste en medir el porcentaje de fármaco liberado después de un determinado tiempo. En el caso de las formas farmacéuticas de liberación prolongada, el ensayo implica la medición del porcentaje de fármaco disuelto en el medio de disolución en intervalos sucesivos de tiempo, lo que permite obtener el perfil de liberación del fármaco (http://www.argos-tsp.com/).

La ley de Noyes-Whitney ofrece un sencillo modelo para describir la velocidad de disolución de una forma farmacéutica:

$$dM/dt = -k.A[Cs - C(t)]$$

#### Dónde:

- dM/dt = velocidad de disolución
- k = constante de disolución
- A = área de la forma farmacéutica expuesta al medio de disolución
- Cs = concentración de saturación (solubilidad)
- C(t) = concentración del fármaco en el medio de disolución en el tiempo t

En consecuencia, para realizar un ensayo de disolución válido, es muy importante mantener una concentración C(t) muy baja con respecto a la concentración de saturación Cs y esta situación es precisamente la que describe el término sink conditions. La manera más fácil de garantizar estas condiciones consiste en utilizar un exceso de medio de disolución, por lo que, en la práctica, sink conditions se refiere simplemente al volumen de medio de disolución que se utilizará para llevar a cabo el ensayo. Este volumen tiene que ser suficiente para mantener una concentración C(t) muy alejada de la concentración de saturación, a pesar de la cantidad de fármaco que se va disolviendo en el medio durante el ensayo (http://www.argos-tsp.com/).

El proceso de liberación de un fármaco ocluido dentro de un sistema de liberación puede llevarse a cabo mediante diversos mecanismos: difusión y relajación o hinchamiento de las cadenas poliméricas. La difusión ocurre cuando un fármaco atraviesa el polímero que forma el sistema de liberación, estimulado por el gradiente de concentración que existe entre el sistema de liberación compuesto y el medio circundante (Aragón Fernández, 2010). Entre los modelos matemáticos más utilizados para analizar y describir el mecanismo mediante el cual ocurre el proceso de liberación se encuentran los propuestos por Higuchi en 1963 y Korsmeyer y Peppas en 1983 (Suvakanta, 2010). En 1961, Higuchi fue el primer en proponer un modelo matemático para describir la liberación de un fármaco a partir de un sistema matricial (Saéz, 2004).

#### 4. MATERIALES

## **Principio activo:**

• Clotrimazol (CLOT)

## **Polímero:**

• Poli (ε-caprolactona) (PCL)

#### **Estabilizante:**

• Alcohol polivinílico (PVAL)

#### **Tensoactivos:**

- Gelucire® 44/14 (Lauroyl Polyoxylglycerides)
- Kolliphor® HS 15 (Polyethylene glycol-15-hydroxystearate)

## **Crioprotector:**

Manitol

## Reactivos en general:

- Cloruro de sodio
- Hidróxido de potasio
- Hidróxido de calcio
- Ácido láctico
- Ácido acético
- Glicerina
- Urea
- Glucosa
- Ácido clorhídrico
- Yoduro de potasio
- Yodo metálico
- Acetona
- Acetato de etilo

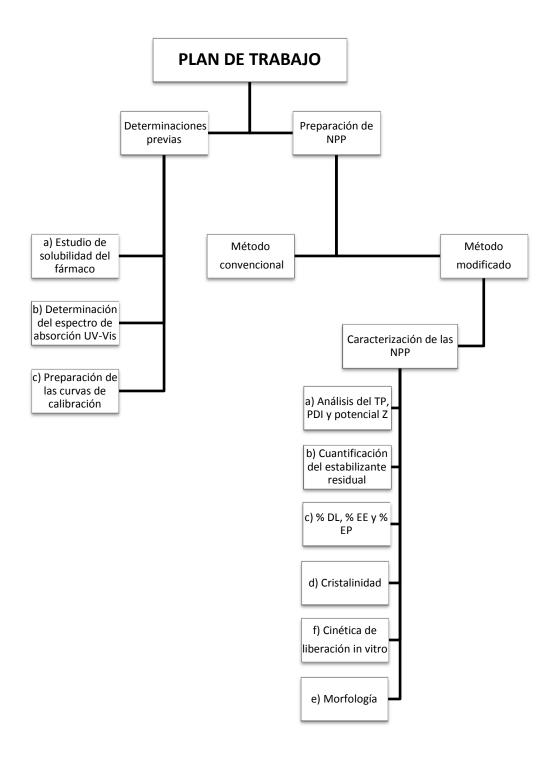
## **Membrana:**

• Membranas de diálisis SPECTRA/POR® (6-8000)

## Aparatos y equipos:

- Homogeneizador ultrasónico portátil UP200Ht, Hielscher®
- Rotavapor R-210, Büchi®
- Zetasiser ZS90, Malvern®
- Liofilizador de Mesa, Labconco®
- Espectrofotómetro UV-Vis Génesis 10S, Thermo Fisher Scientific®
- Calorímetro diferencial de barrido DSC Q10, TA Instruments®
- Balanza analítica VE-204, VELAB®
- Multímetro pH mV/°C HI 211, Hanna Instruments®
- Parrilla multiplaza con agitación mecánica RO 15, IKA
- Centrífuga universal 320, Hettich®
- Baño Dubnoff, QUIMIS®

# 5. METODOLOGÍA



## 5.1. Determinaciones previas

#### 5.1.1. Estudio de solubilidad de CLOT

El estudio de solubilidad de clotrimazol (CLOT) se realizó en solución de fluido vaginal simulado a pH de 4.5 (FVS) con dos diferentes tensoactivos a diferentes concentraciones. Los tensoactivos utilizados fueron Gelucire® 44/14 (Lauroyl Polyoxylglycerides) y Kolliphor® HS 15 (Polyethylene glycol-15-hydroxystearate) y las concentraciones fueron 1, 3, 5 y 10 % p/v. Para esta prueba se prepararon 8 sistemas de acuerdo a la Tabla 2.

Tabla 2. Condiciones para el estudio de solubilidad.

Concentración (% p/v)	Tenso	activo		
concentration (70 p) v)	Gelucire® 44/14	Kolliphor® HS 15		
1	Sistema 1	Sistema 5		
3	Sistema 2	Sistema 6		
5	Sistema 3	Sistema 7		
10	Sistema 4	Sistema 8		

Los sistemas se prepararon de acuerdo al procedimiento descrito a continuación. Se disolvieron 0.0095 g de CLOT en 10 mL de solución de FVS con tensoactivos (ver Tabla 2) mediante sonicación durante 20 min. Posteriormente, los sistemas se colocaron en un Baño Dubnoff con agitación a 37 °C por 48 horas, transcurrido el tiempo, cada sistema se filtró a través de una membrana Millipore $^*$  de 0.22  $\mu$ m y el filtrado se llevó a un volumen final de 10 mL. Las muestras y los blancos se trataron bajo las mismas condiciones. Los sistemas se leyeron en el espectrofotómetro a una  $\lambda$  = 260 nm (longitud de onda de máxima absorción del clotrimazol, reportado en el libro "Clarke's Analysis of Drugs and Poisons: in pharmaceuticals, body fluids and postmortem material"). Con este estudio se seleccionó el tensoactivo y la concentración donde el CLOT tuvo su máxima solubilidad para preparar las soluciones necesarias en los ensayos posteriores.

#### 5.1.2. Espectros de absorción de CLOT y solución de tensoactivo

Se hicieron barridos espectrofotométricos de CLOT en solución de FVS con Gelucire 44/14 al 3 % p/v (Tensoactivo y concentración seleccionada de acuerdo al estudio anterior) y de los componentes del medio de disolución, como se describe en la Tabla 3. Estos barridos se realizaron con la finalidad de determinar la longitud de máxima absorbancia del CLOT y para descartar interferencias entre el fármaco y los componentes del medio de disolución. Los barridos se leyeron en un espectrofotómetro en la región UV de 200 a 400 nm.

Tabla 3. Barridos espectrofotométricos UV.

No.	Solución	Blanco
Solución	Solution	DIUIICO
1	Solución de FVS	Agua
2	Solución de FVS con Gelucire® 44/14 al 3 % p/v	Solución de FVS
3	Solución de CLOT en FVS con Gelucire® 44/14 al	Solución de FVS con
J	3 % p/v	Gelucire® 44/14 al 3 % p/v

## 5.1.3. Espectro de absorción del complejo PVAL-H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>-KI-I<sub>2</sub>

Para cuantificar el estabilizante residual (alcohol polivinílico, PVAL) en las nanopartículas poliméricas (NPP) se estableció la longitud de onda de máxima absorción del complejo colorido formado por PVAL- $H_3BO_3$ -KI- $I_2$ . El complejo se formó tomando 1 mL a partir de una solución acuosa de PVAL [560 µg/mL] y llevándolo a un volumen de 5 mL con agua desionizada en un tubo de ensayo. Al tubo se le adicionaron 2 mL de  $H_3BO_3$  0.65 M y 1 mL de KI 0.15 M y  $I_2$  0.05 M, finalizando así la formación del complejo. El sistema se leyó en el espectrofotómetro a una a longitud de onda de 400 a 800 nm. Como blanco se utilizó un sistema conformado por 5 mL de agua desionizada con 2 mL de  $H_3BO_3$  0.65 M y 1 mL de KI 0.15 M y  $I_2$  0.05 M.

#### 5.1.4. Cuantificación de CLOT

Para cuantificar el CLOT presente en las NPP se preparó una curva de calibración a partir de una solución stock de CLOT [436  $\mu$ g/mL] en solución de FVS con Gelucire 44/14 al 3% p/v. De la solución anterior se prepararon 5 sistemas a diferente concentración, por triplicado, utilizando alícuotas de 1, 2, 3, 4 y 5 mL y llevándolo a un volumen de 10 mL con solución de FVS con Gelucire 44/14 al 3% p/v. Los sistemas se leyeron con un espectrofotómetro a una  $\lambda$  = 260 nm, como blanco se utilizó solución de FVS con Gelucire 44/14 al 3% p/v. Se realizó la validación parcial del método analítico y se evaluó la selectividad, linealidad del sistema, precisión del sistema, exactitud, repetibilidad, límites de detección y cuantificación.

## 5.1.5. Cuantificación del complejo PVAL-H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>-KI-I<sub>2</sub>

La curva de calibración del complejo PVAL-  $H_3BO_3$ - KI- $I_2$  se preparó a partir de una solución stock de PVAL [700 µg/mL] en solución acuosa. De la solución anterior se prepararon 5 sistemas a diferente concentración utilizando alícuotas de 1, 2, 4, 6 y 8 mL y llevándolo a un volumen de 10 mL con agua desionizada. Una vez preparados los sistemas, se tomó 1 mL de cada sistema y se formó el complejo colorido (PVAL-  $H_3BO_3$ - KI- $I_2$ ) como se describe en la metodología, sección 5.1.3. Los sistemas se leyeron en el espectrofotómetro a una  $\lambda$  = 644nm (longitud de máxima absorción del complejo colorido). Como blanco se utilizó un sistema conformado por PVAL-  $H_3BO_3$ - KI- $I_2$ .

#### 5.2. Preparación de NPP

#### 5.2.1. Método desplazamiento de solvente convencional

Se prepararon NPP a base de poli (ε-caprolactona) (PCL) cargadas con CLOT por el método desplazamiento de solvente convencional. Primero, se prepararon la fase orgánica y la fase acuosa. La fase orgánica consistió en disolver 40 mg de PCL y 13 mg de CLOT en 10 mL de acetona y la fase acuosa consistió en 25 mL de solución acuosa de PVAL al 0.5 % p/v como estabilizante. Posteriormente, la fase orgánica se adiciono por goteo con el uso de una jeringa de plástico desechable de 0.8 mm de diámetro a la fase acuosa, la cual se

mantuvo en agitación magnética durante la adición. La suspensión de NPP obtenida se concentró en un rotavapor para eliminar la mayor cantidad de solvente (acetona) y agua presentes. La preparación se hizo por triplicado.

## 5.2.2. Método desplazamiento de solvente modificado

El método desplazamiento de solvente convencional es un método sencillo para elaborar NPP y fue descrito y patentado por Fessi et al. Sin embargo, existen reportes por hielsher (Ultrasound Technology) de que el implemento de ultrasonido permite obtener partículas más homogéneas y de menor tamaño. La modificación del proceso consistió en sustituir la agitación magnética por ultrasonido seleccionando las condiciones de amplitud de onda (%) y potencia (W). En este estudio se utilizó un homogeneizador ultrasónico portátil, el cual se muestra en la Figura 12.



Figura 12. Homogeneizador ultrasónico portátil UP200Ht, Hielscher®

#### 5.2.2.1. Evaluación del efecto de ultrasonido

Para seleccionar las condiciones óptimas de ultrasonido primero se evaluó el efecto de ultrasonido sobre el tamaño de partícula (TP) e índice de polidispersión (PDI, por sus siglas en inglés). Para ello, se prepararon 12 lotes bajo acción de ultrasonido a diferentes amplitudes de onda (70, 75, 80 y 85 %) y potencias (100, 150 y 200 W) durante 3 minutos, como se describen en la Tabla 4.

**Tabla 4.** Condiciones para evaluar el efecto de ultrasonido en la preparación de NPP por el método desplazamiento de solvente.

	AM	PLITUD DE OI	NDA (%)		
		70	75	80	85
POTENCIA (W)	100	Lote 1	Lote 4	Lote 7	Lote 10
	150	Lote 2	Lote 5	Lote 8	Lote 11
	200	Lote 3	Lote 6	Lote 9	Lote 12

Los lotes se prepararon como se describe en la metodología, sección 5.2.1., utilizando las mismas cantidad de polímero y fármaco, así como los mismos volúmenes de solvente y fase, sustituyendo el uso de agitación magnética por acción de ultrasonido. La suspensión de NPP obtenida se centrifugó a 16,000 rpm durante 20 minutos para eliminar el exceso de estabilizante residual (PVAL), el sobrenadante fue desechado y la pastilla formada se resuspendió en agua desionizada mediante agitación. Se realizó el análisis de TP antes y después de eliminar el estabilizante residual en las condiciones descritas en la metodología, sección 5.3.1.

#### 5.2.2.2. Preparación bajo condiciones óptimas seleccionadas

Una vez seleccionadas las condiciones óptimas de ultrasonido, se prepararon 2 lotes siguiendo los pasos en la metodología, sección 5.2.2. Para la preparación se utilizaron 150 mg de PCL, 50 mg de CLOT, 40 mL de acetona y 100 mL de solución acuosa de PVAL al 0.5%, bajo acción de ultrasonido a 70% de amplitud de onda y 150 w de potencia durante 12 minutos. La suspensión de NPP obtenida se centrifugó a 20,000 rpm durante 20 minutos a una temperatura de 25°C, el sobrenadante fue desechado y la pastilla formada se resuspendió en agua desionizada mediante agitación, nuevamente, se centrifugó a las mismas condiciones y la pastilla formada se resuspendió con agua desionizada en menos de 5 mL. Enseguida, solo a uno de los dos lotes se le adicionó manitol (crioprotector) al 15 % p/p con relación al peso del fármaco y polímero. Posteriormente, ambos lotes se dejaron en congelación a -10°C y se liofilizaron por 72 horas. El procedimiento descrito anteriormente se representa en la Figura 13.

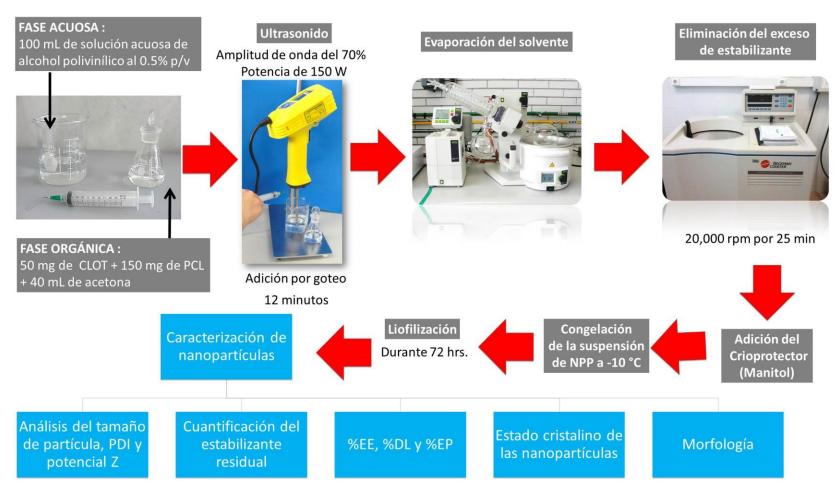
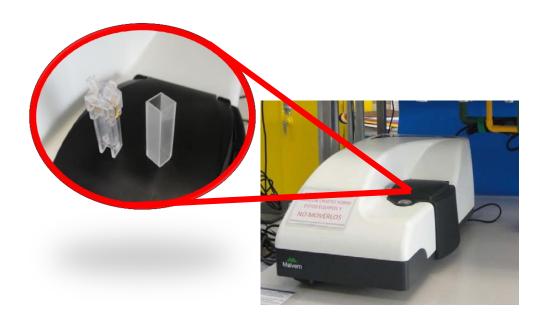


Figura 13. Representación esquemática de la preparación de NPP bajo condiciones óptimas seleccionadas.

## 5.3. Caracterización de las NPP

## 5.3.1. Análisis del TP, PDI y potencial Z

El TP, PDI y potencial Z se leyeron directamente en el equipo Zetasizer ZS90, Malvern<sup>®</sup>. El análisis se realizó a todos lotes. Primero, se tomó una muestra de cada uno y se dispersó en agua desionizada, hasta lograr la concentración de partícula adecuada para ser analizada. Las lecturas se realizaron por triplicado a 25°C a un ángulo de incidencia de 90° y el tiempo entre cada lectura fue de 1 minuto. En este estudio, se utilizaron dos tipos de celdas, para el análisis de TP y PDI se utilizó una celda de vidrio cuadrada con apertura y tapa, para el análisis del potencial Z se utilizó una celda capilar desechable, como se ilustra en la Figura 14.



**Figura 14.** Zetasiser ZS90, Malvern<sup>®</sup>. Equipo empleado para la determinación del TP, PDI y potencial Z.

#### 5.3.2. Cuantificación del estabilizante residual.

Se cuantificó la cantidad de estabilizante residual únicamente en los lotes preparados bajo condiciones óptimas seleccionadas (ver metodología, sección 5.2.2.2.). Primero, se disolvieron 19 mg de NPP liofilizadas con 5 ml de NaOH 0.1 M (para romper las partículas) con agitación magnética durante 48 horas. Pasado el tiempo, las muestras se neutralizaron con HCl 1 N y se filtraron a través de membranas Millipore $^{*}$  de 0.22  $\mu$ m, cada filtrado se llevó a un volumen de 10 mL con agua desionizada. Del sistema anterior se tomaron 1 mL y se formó el complejo colorido (PVAL-  $H_3BO_3$ - KI- $I_2$ ) como se describe en la metodología, sección 5.1.3. El sistema se preparó por triplicado para cada lote. Una vez obtenidos los sistemas se leyeron en el espectrofotómetro a una  $\lambda$  = 644nm y la absorbancia obtenida se interpoló en la curva de calibración para obtener la concentración del sistema.

# 5.3.3. Porcentaje de fármaco encapsulado en la matriz polimérica (%EE), porcentaje de fármaco cargado (%DL) y porcentaje de eficiencia del proceso (%EP).

Se pesaron 9 mg de NPP liofilizadas en un matraz Erlenmeyer con boca esmerilada, y se le añadieron 10 mL de acetato de etilo para disolver el polímero y permitir la salida del fármaco. Posteriormente, las muestras se taparon y agitaron magnéticamente durante 4 horas en baño de agua a 50 °C. Después, las muestras se destaparon y se llevaron a la campana de extracción, donde se colocaron en una parrilla multiplaza manteniéndose en agitación magnética hasta la evaporación del solvente. Una vez evaporado el solvente, se les adicionaron 10 mL de solución de Gelucire 44/14 al 3% p/v, en el cual el CLOT es soluble, mientras que el polímero es insoluble y se agitaron magnéticamente durante 20 horas. Transcurrido el tiempo, las muestras se filtraron por gravedad con papel filtro con la finalidad de separar el polímero de la solución, el filtrado se colocó en un matraz volumétrico de 10 mL y se llevó a la marca de aforo con Gelucire 44/14 al 3% p/v. Las muestras se leyeron directamente en un espectrofotómetro a una  $\lambda = 260$  nm. Las absorbancias se interpolaron en la curva de calibración.

Los porcentajes de fármaco encapsulado en la matriz polimérica (%EE), porcentaje de fármaco cargado (%DL) y porcentaje de eficiencia del proceso (%EP) de los lotes preparados bajo condiciones óptimas seleccionadas fueron determinados de acuerdo con Piñón-Segundo et al. 2005, utilizando las siguientes ecuaciones:

• Ecuación 1

% 
$$DL = \frac{peso \ de \ f\'{a}rmaco \ en \ las \ nanopart\'{i}culas}{peso \ recuperado \ de \ las \ nanopart\'{i}culas} x \ 100$$

Ecuación 2

% 
$$EE = \frac{Cantidad\ de\ farmaco\ cargado\ en\ las\ nanopartículas\ (\%)}{Porcentaje\ inicial\ de\ farmaco\ x\ (1-fracción\ de\ PVAL\ residual)} x\ 100$$

Ecuación 3

% 
$$EP = \frac{peso\ recuperado\ de\ nanopartículas}{peso\ del\ fármaco + peso\ del\ polímero - peso\ del\ PVAL\ residual}\ x\ 100$$

En la ecuación 2, se introduce un factor de corrección (1-% de PVAL residual) para evitar una subestimación, debido a la adsorción de una cierta cantidad de PVAL sobre la superficie de las partículas durante el proceso de obtención. La eficiencia del proceso se calcula a partir de la ecuación 3. Las determinaciones se realizaron por triplicado.

#### 5.3.4. Estado cristalino de las NPP

Para evaluar la cristalinidad del CLOT, PCL, manitol, PVAL y de las NPP de los lotes preparados bajo condiciones óptimas seleccionadas, se tomaron muestras secas de 3-5 mg y se analizaron a través de la técnica de calorimetría diferencial de barrido en el equipo DSC Q10, TA Intstrument, USA. Las muestras se analizaran de 0 a 400 °C, con una velocidad de calentamiento de 10°C/min con flujo de nitrógeno de 50 ml/min.

## 5.3.5. Morfología.

La morfología de las NPP presentes en los lotes preparados bajo las condiciones óptimas seleccionadas fue observada por microscopía electrónica de barrido. Primero, se preparó una dispersión de NPP liofilizadas en 3 mL de agua desionizada, de esta se tomó una gota y se colocó en un cubreobjetos, posteriormente se recubrió con una película fina de oro en un evaporador catódico y finalmente se observaron en un microscopio electrónico de barrido JMS-25SII, JEOL®.

## 5.3.6. Ensayo de liberación in vitro de CLOT

Se evaluó la cinética de liberación del fármaco a partir de NPP, preparadas bajo las condiciones óptimas seleccionadas. El estudio se realizó por el método de difusión con el uso de membranas de diálisis (previamente hidratadas), bajo condiciones sink, usando como medio solución de FVS con Gelucire<sup>®</sup> 44/14 al 3% p/v. Primero, se pesaron 15 mg de NPP liofilizadas y se dispersaron en 3 mL de agua desionizada bajo acción de ultrasonido durante 2 minutos. Cada muestra se depositó dentro de una membrana de diálisis SPECTRA/POR<sup>®</sup> (6-8000) y se colocó en 30 mL de solución de FVS con Gelucire<sup>®</sup> 44/14 al 3% p/v. Las muestras se mantuvieron en agitación en un baño Dubnoff a 37°C ± 0.5 °C durante 8 horas. Durante el estudio, se tomaron alícuotas de 3 mL a diferentes tiempos, reponiendo el mismo volumen con solución de Gelucire<sup>®</sup> 44/14 al 3% p/v en FVS.

## 6. RESULTADOS Y ANÁLISIS

## 6.1. Determinaciones previas

#### 6.1.1. Estudio de solubilidad de CLOT

Se realizó el estudio de solubilidad de clotrimazol (CLOT) en solución de fluido vaginal simulado a pH de 4.5 (FVS) con dos diferentes tensoactivos, para promover la solubilidad del fármaco, ya que el CLOT es una base débil y se dice que es prácticamente insoluble en agua, aunque tiene buena solubilidad en codisolventes tales como etanol y transcutol, al mezclarse con agua se vuelve inmediatamente turbia (Borhade, 2012).

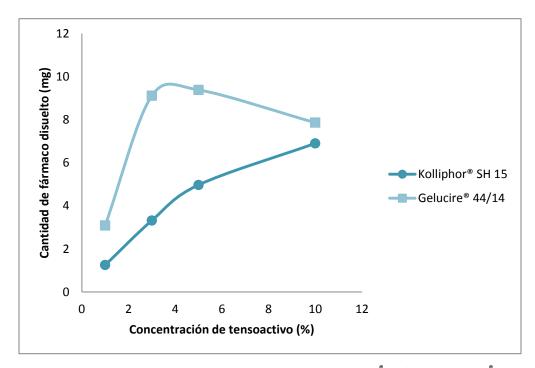
Para aumentar la solubilidad del fármaco en este estudio se utilizó como tensoactivos Gelucire<sup>®</sup> 44/14 y Kolliphor<sup>®</sup> HS 15 en solución de FVS. Estos tensoactivos no iónicos son menos irritantes y citotóxicos, comparados con los tensoactivos anicónicos y catiónicos (Borhade, 2012). La selección de los tensoactivos se apoyó en el trabajo de investigación reportado por Borharde, et al., 2012, el cual identificó la solubilidad de CLOT en diversos tensoactivos y cotensoactivos, encontrando que el CLOT exhibió una solubilidad en el orden siguiente: Gelucire<sup>®</sup> 44/14> Kolliphor<sup>®</sup> HS 15> Tween 20> Cremophor<sup>®</sup>

La solubilidad del CLOT se determinó en solución de FVS con tensoactivos (Gelucire® 44/14 y Kolliphor® HS 15) a las siguientes concentraciones: 1, 3, 5 y 10% p/v como se describe en la metodología, sección 5.1.1. Las muestras se leyeron a 260 nm (longitud de onda de máxima absorción del clotrimazol) para cuantificar el fármaco disuelto. Las muestras de CLOT disueltas en Gelucire® 44/14 presentaron mayor solubilidad comparadas con las muestras de Kolliphor® HS 15. Los resultados se representan en el Gráfico 1. La cantidad máxima disuelta del fármaco en Gelucire® 44/14 fue a la concentración de 5 % p/v. Sin embargo, al aumentar la concentración del tensoactivo, aumenta la formación de micelas lo que provoca la formación de una emulsión. Por lo anterior, se decidió trabajar a la concentración de 3 % p/v, ya que existe una diferencia mínima de fármaco disuelto en comparación con la cantidad disuelta al 5% p/v, como se muestra en la Tabla 5.

Tabla 5. Cantidad de CLOT disuelto en solución de FVS con Gelucire® 44/14 y Kolliphor® HS 15.

Porcentaje de tensoactivo	Cantidad de fá	rmaco disuelto
en solución con FVS	Gelucire® 44/14	Kolliphor® HS 15
(%p/v)	(g)*	(g)*
1	0.0030	0.0012
3	0.0091	0.0033
5	0.0093	0.0049
10	0.0078	0.0069

<sup>\*</sup> en 10 mL de en solución de fluido vaginal simulado a pH de 4.5 (FVS) con Gelucire® 44/14



**Gráfico 1.** Solubilidad de CLOT en solución de FVS con Gelucire 44/14 y Kolliphor HS 15.

## 6.1.2. Espectros de absorción

Dado que la absorción de luz es característica de cada sustancia se determinó la longitud de onda de máxima absorción de CLOT en el medio de disolución (solución de FVS con Gelucire® 44/14 al 3 % p/v, tensoactivo y concentración seleccionados de acuerdo a los resultados obtenidos en el estudio anterior). Los espectros de absorción de CLOT y del medio de disolución se muestran en el anexo, sección 9.2.

Los espectros de absorción también se realizaron con la finalidad de descartar interferencias que pudieran afectar la respuesta del método, como resultado de esto se observó que la presencia del tensoactivo Gelucire® 44/14 en la solución de FVS dio una señal menor a 0.302 nm a la longitud de onda de 250 a 400 nm, sin embargo, al realizar el espectro de absorción de CLOT la señal fue eliminada utilizando esta solución como blanco.

La longitud de onda seleccionada para cuantificar CLOT de acuerdo al espectro de absorción fue a una  $\lambda$ = 260 nm (ver anexo, sección 9.2.), ya que esta es la longitud de onda de máxima absorción del fármaco. Este dato coincide con lo reportado en el libro "Clarke's Analysis of Drugs and Poisons: in pharmaceuticals, body fluids and postmortem material".

## 6.1.3. Cuantificación de CLOT y del complejo PVAL-H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>-KI-I<sub>2</sub>

Se preparó una curva de calibración y se cuantifico el CLOT por espectrofotometría UV a una  $\lambda$ = 260 nm. En el anexo, sección 9.3., se incluyen las concentraciones y las correspondientes absorbancias, así como la representación gráfica de la curva de calibración y el análisis estadístico. La curva de calibración se validó parcialmente y los parámetros fueron evaluados de acuerdo a la Guía de Validación de Métodos Analíticos del Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos México. Como se observa en la Tabla 6, todos los parámetros evaluados cumplieron conforme a la especificación establecida en la guia de validación.

Tabla 6. Parámetros de validación de la curva de calibración.

Parámetro	Especificaciones	Resultado	Conclusión
Selectividad	La respuesta del	La respuesta del método	Conforme a la
	método solo se deberá	es proporcionada	especificación
	al analito	únicamente al analíto	
		de interés	
Linealidad del	r ≥ 0.98	r <u>&gt;</u> 0.99998	Conforme a la
Sistema	r <sup>2</sup> ≥ <u></u> 0.98	r <sup>2</sup> <u>&gt;</u> 0.99997	especificación
	C.V. ≤ <u></u> 2 %	0.86 %	
Precisión del	S	0.003162	Conforme a la
sistema	C.V. ≤1.5 %	0.63 %	especificación
Exactitud	C.V. del porcentaje de	0.64 %	Conforme a la
	recobro ≤ 3 %		especificación
	% de recobro 97-103	100.29 %	Conforme a la
	método		especificación
	espectrofotométrico		
Repetibilidad	C.V. ≤2 %	Día 1 0.96 %	Conforme a la
			especificación
Límites de		L.D.=2.054 mg/mL	Conforme a la
detección (LD) y	r <sup>2</sup> ≥0.98	L.C.=0.661 mg/mL	especificación
cuantificación (LC)		r <sup>2</sup> <u>&gt;</u> 0.99997	

De acuerdo a los resultados de los parámetros de validación para la linealidad del sistema, se obtuvo un coeficiente de determinación (r²) de 0.99997 y un coeficiente de variación (C.V.) de 0.86 %, estos valores se ajustan a una línea recta e indican que la dispersión entre los datos es baja, también se demostró la selectividad, es decir, que la respuesta del método es proporcionada únicamente por el CLOT (analito de interés), para la precisión del sistema y exactitud se obtuvo un C.V. menor a 1.5 %, lo que indica que existe poca variación entre las muestras, en cuanto a la repetibilidad se realizó en dos días obteniendo un C.V. menor a 2 %, el límites de detección fue de 2.054 mg/mL y el límite de cuantificación fue de 0.661 mg/mL. De la misma forma, se determinó la longitud de onda de máxima absorción del complejo colorido PVA-H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>-KI-I<sub>2</sub> formado de acuerdo a la metodología en la sección 5.1.3., y se cuantificó el alcohol polivinílico (PVAL) residual a una longitud de onda de 644 nm.

## 6.2. Preparación de NPP

Las nanopartículas poliméricas (NPP) se prepararon a base de Poli (ε-caprolactona) (PCL) con CLOT (fármaco) por el método desplazamiento de solvente, al cual, llamaremos de aquí en adelante método convencional. Este método se caracteriza por el uso de agitación magnética durante la preparación de NPP y es considerado un método de baja energía ya que impide la generación de un mínimo de energía, lo que impide la pérdida o degradación del fármaco sobre todo si es sensible al calor (Boon, 2015).

En general, el desplazamiento de solvente es un método muy simple de dos pasos que implica la mezcla de una fase orgánica (polímero y el fármaco en un solvente polar miscible en agua, generalmente acetona debido a su propiedad solubilizante) con una fase acuosa (constituida por un agente estabilizante como PVAL al 0.5 % p/v) con agitación magnética seguida de la evaporación del solvente a presión reducida. Es importante mencionar que a medida que se adiciona la fase orgánica a la fase acuosa, se provoca la insolubilidad del polímero el cual precipita formando las NPP (Piñón-Segundo, 2006).

El mecanismo de formación de las NPP ha sido explicado por la turbulencia interacial generada durante el desplazamiento de la acetona a la solución acuosa de PVAL. La miscibilidad entre el solvente de la fase orgánica y la fase acuosos provoca una violenta separación del mismo presente en las minúsculas gotas durante el proceso de difusión y las partículas son rápidamente estabilizadas por el PVAL. El proceso de estabilización se debe a la afinidad del PVAL hacia la superficie de las NPP uniéndose fuertemente y formando una capa estable. Posteriormente, el estabilizante residual, es decir, la cantidad de PVAL que no se unió a la superficie de las partículas es eliminado de la suspensión de NPP por centrifugación (Quintanar-Guerrero, 2005).

En la mayoría de los estudios relacionados con la preparación de nanodispersiones por el método desplazamiento de solvente se emplea principalmente PVAL como estabilizante (Boon, 2015). Quintanar-Guerrero, et al., (1996) realizaron un estudio para la adaptación y optimización de la técnica de emulsificación-difusión en la preparación de nanoesferas lipídicas, donde utilizó como estabilizantes polivinilpirrolidona, poloxamer 188, poloxamer 407, polisorbato 80, albúmina de suero bovino, PVAL y gelatina, encontrando que sólo el PVAL fue capaz de preservar la estabilidad física de la dispersión durante períodos prolongados después de la preparación (Quintanar-Guerrero, 2005). Por otro lado, la concentración de PVAL determina la forma, características de la superficie y uniformidad en el tamaño de las NPP (Boon, 2015).

La mayoría de los estudios revisados están centrados en la adecuación del método desplazamiento de solvente para obtener mejores eficiencias de encapsulamiento, y no en el estudio de las variables del proceso que pueden afectar la distribución y tamaños de las NPP. Por ello, con este estudio, se pretende comparar el efecto del método de baja energía (método convencional) en la preparación de NPP considerando como variables de respuesta el TP y PDI, con el mismo método pero sustituyendo el enfoque de baja energía por un enfoque de alta energía, es decir, sustituyendo la agitación magnética por ultrasonido, el cual, es capaz de generar grandes cantidades de energía necesaria para romper las partículas (método modificado).

Este trabajo se basó en la investigación realizada por Piñón, et al. (2006), y se propone el empleo de ultrasonido para disminuir el TP promedio y la dispersión entre los tamaño para obtener así lotes más homogéneos.

## 6.2.1. Método desplazamiento de solvente convencional

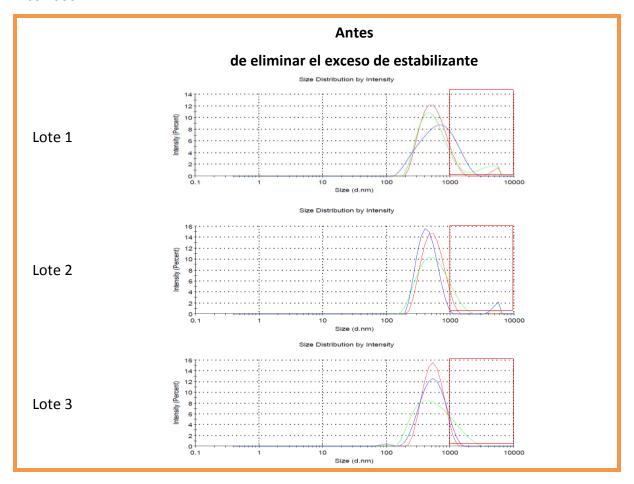
Se prepararon NPP de CLOT por el método convencional como se describió en la metodología, sección 5.2.1., para evaluar el TP y PDI de las partículas. El análisis de TP y PDI se realizó inmediatamente después de la preparación, es decir, antes de eliminar el estabilizante residual. Como ya se explicó anteriormente, se utilizó PVAL al 0.5 % p/v como estabilizante para prevenir la agregación de las partículas. Estos parámetros se determinaron para cada lote en el equipo Zetasiser ZS90, Malvern® a las condiciones descritas en la metodología, sección 5.3.1. Los resultados se muestran en la Tabla 7 y en la Figura 15 la representación gráfica de la distribución de los tamaños de partícula.

**Tabla 7.** NPP preparadas por el método desplazamiento de solvente convencional

Lote	Promedio	TP (nm)	PDI	Potencial Z (mV)
		728.2	0.226	-2.1
		917.3	0.27	-1.56
1		731.4	0.245	-1.17
	$\bar{x}$	792.3	0.247	-1.61
	C.V.	13.6	8.9	-29.0
		550.8	0.178	-2.53
2		686.2	0.229	-2.74
2		656.2	0.244	-3.76
	$\bar{x}$	631.1	0.217	-3.01
	C.V.	11.2	15.9	-21.8
		560.9	0.161	-3.75
		662.2	0.238	-1.84
3		561.7	0.181	-2.31
	$\bar{x}$	594.9	0.193	-2.63
	C.V.	9.7	20.6	-37.7

En la Tabla 7, se observa el efecto del uso de agitación magnética (Método convencional) sobre el TP y PDI de las NPP de CLOT. Los TP promedio fueron de 594.9 a 792.3 nm, lo cual indica que el tiempo de difusión y la velocidad de agitación fueron insuficientes para generar partículas de menor tamaño.

Por otra parte, la distribución del TP está representada por el PDI en el que se desean valores cercanos a 0, ya que representaría una distribución estrecha, mientras que un valor más cercano a 1 representa una muestra polidispersa (Boon, 2015), y de acuerdo a nuestros resultados podemos decir que los tres lotes preparados presentan una amplia distribución del TP, ya que se obtuvieron valores de PDI de 0.193 a 0.247. Esto se puede comprobar en el Figura 15, en el cual, se observar que la campana de gauss amplia, lo que indica una amplia distribución, también se observa que una fracción del gráfico sobrepasa los 1000 nm, es decir, que una parte de la población de NPP tiene tamaños superiores a los 1000 nm.



**Figura 15.** Distribución del TP de NPP preparadas por el método desplazamiento de solvente convencional (n=3).

## 6.2.2. Método desplazamiento de solvente modificado

Como se mencionó anteriormente se empleó el método desplazamiento de solvente sustituyendo el uso de agitación magnética (método convencional) por ultrasonido (método modificado) para obtener TP menores y una distribución estrecha. Aunque el método de desplazamiento de solvente convencional es sencillo y no necesita de equipos sofisticados para la elaboración de NPP, requiere de tiempos prolongados y altas velocidades de agitación, lo que hace que sea un procedimiento lento y con poca posibilidad de ser escalable.

Se empleó ultrasonido, debido a que la cavitación permite la formación de partículas de menor tamaño. Este método es muy efectivo, no solo para reducir el TP, sino también para homogeneizar su tamaño, es de fácil manejo y ampliamente utilizado en la elaboración de NPP (Garzón, 2008).

#### 6.2.2.1. Evaluación del efecto de ultrasonido

Para evaluar el efecto de ultrasonido en la preparación de NPP, se eligieron diferentes amplitudes de onda (70, 75, 80 y 85 %) y potencias (100, 150 y 200 W) (ver metodología, sección 5.2.2.1.) considerando como variables de respuesta: el TP y PDI. Estos parámetros se determinaron de acuerdo a la metodología en la sección 5.3.1., y fueron evaluados antes y después de eliminar el exceso de estabilizante. Es importante recordar, que en la preparación se utilizó como estabilizante, PVAL al 0.5 % p/v para prevenir la agregación de las partículas.

Los resultados de TP y PDI obtenidos en este estudio se encuentran en las Tablas 8 y 9 y se ilustra la distribución de los TP en la Figura 16, antes y después de eliminar el estabilizante residual, sin liofilizar las muestras.

**Tabla 8.** Evaluación del efecto de ultrasonido: Análisis de TP promedio, PDI y potencial Z (antes de eliminar el exceso de estabilizante).

							Amplitud o	le Onda	(%)				
			70	)		75	;		80	)		85	
Potencia (W)		TP (nm)	PDI	Potencial Z (mV)	TP (nm)	PDI	Potencial Z (mV)	TP (nm)	PDI	Potencial Z (mV)	TP (nm)	PDI	Potencial Z (mV)
		385.2	0.066	-1.83	382.6	0.138	-3.34	383.8	0.099	-2.53	328.6	0.053	-2.39
100		421.7	0.126	-2.01	376.8	0.089	-3.28	401.1	0.139	-2.67	328.6	0.031	-2.51
100		443.4	0.157	-2	373.6	0.016	-3.56	391.8	0.107	-2.74	345	0.067	-2.49
	$\bar{x}$	416.8	0.116	-1.95	377.7	0.081	-3.39	392.2	0.115	-2.65	334.1	0.05	-2.46
	C.V.	7.06	39.88	-5.19	1.21	75.79	-4.35	2.21	18.41	-4.03	2.83	36.30	-2.61
		409.1	0.083	-2.37	429.1	0.115	-2.28	394.6	0.117	-2.19	328.7	0.06	-3.28
150		418.7	0.163	-2.56	414.3	0.065	-3.43	379	0.018	-1.81	333.4	0.002	-3.2
150		409.4	0.082	-2.96	423.7	0.113	-3.42	383.6	0.094	-2.06	344.3	0.002	-3.59
	$\bar{x}$	412.4	0.109	-2.63	422.4	0.098	-3.04	385.7	0.076	-2.02	335.5	0.021	-3.36
	C.V.	1.32	42.64	-11.45	1.77	28.89	-21.75	2.08	68.17	-9.56	2.39	159.46	-6.13
		387.1	0.047	-2.23	408.8	0.103	-3.38	410.7	0.133	-1.79	343.9	0.086	-2.59
200		416.6	0.112	-2.29	412.7	0.109	-3.11	402.8	0.088	-1.49	333.4	0.311	-2.83
200		454.8	0.171	-2.14	408.7	0.121	-3.58	425.4	0.145	-1.81	337.1	0.125	-2.34
	$\bar{x}$	419.5	0.110	-2.22	410.1	0.111	-3.36	413	0.122	-1.7	338.1	0.174	-2.59
	C.V.	8.09	56.39	-3.40	0.56	8.26	-7.02	2.78	24.63	-10.54	1.58	69.10	-9.46

**Tabla 9.** Evaluación del efecto de ultrasonido: Análisis de TP promedio, PDI y potencial Z (después de eliminar el exceso de estabilizante).

							Amplitud de	e Onda (	(%)				
			70			75			80			85	
Potencia (W)		TP (nm)	PDI	Potencial Z (mV)									
		387.2	0.115	-1.59	309.2	0.155	-1.37	400.6	0.162	-5.52	294	0.193	-4.11
400		413.8	0.171	-1.36	292.8	0.118	-1.9	397.5	0.168	-5.07	277	0.172	-4.34
100		394.2	0.123	-1.39	301.7	0.111	-1.95	404.8	0.171	-5.33	294	0.185	-4.09
	$\bar{x}$	398.4	0.136	-1.45	301.2	0.128	-1.74	401	0.167	-5.31	288	0.183	-4.18
	C.V.	3.46	22.27	-8.62	2.73	18.47	-18.47	0.91	2.74	-4.25	3.41	5.79	-3.32
		340.1	0.018	-5.08	321.2	0.147	-2.92	283	0.073	-4.54	357	0.216	-2.43
450		336.6	0.004	-5.22	320.5	0.16	-2.84	302.7	0.116	-3.95	362	0.24	-1.8
150		336.1	0.03	-5.13	305.6	0.104	-2.52	293.6	0.119	-4.3	369	0.21	-1.96
	$\bar{x}$	337.6	0.017	-5.14	315.77	0.137	-2.76	293.1	0.103	-4.26	363	0.222	-2.06
	C.V.	0.65	76.55	-1.38	2.79	21.39	-7.67	3.36	24.99	-6.96	1.66	7.15	-15.90
		434.4	0.175	-3.91	328.1	0.179	-2.27	280.3	0.14	-2.11	466	0.257	-2.59
200		415	0.147	-3.92	401.2	0.201	-2.56	291.8	0.143	-1.93	367	0.209	-2.83
200		398.8	0.16	-3.7	407.1	0.205	-2.3	311.5	0.193	-2.03	388	0.265	-2.34
	$\bar{x}$	416.1	0.161	-3.84	378.8	0.195	-2.38	294.5	0.159	-2.02	407	0.244	-2.59
	C.V.	4.28	8.70	-3.24	11.62	7.18	-6.70	5.36	18.72	-4.46	12.82	12.41	-9.46

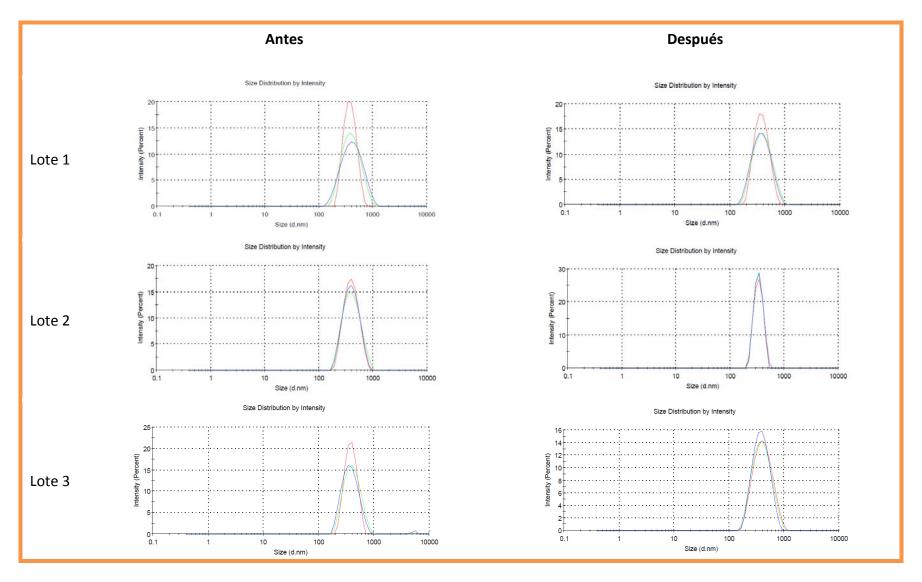


Figura 16. Distribución del TP de lotes obtenidos por ultrasonido, antes y después de eliminar el estabilizante residual (n=3).

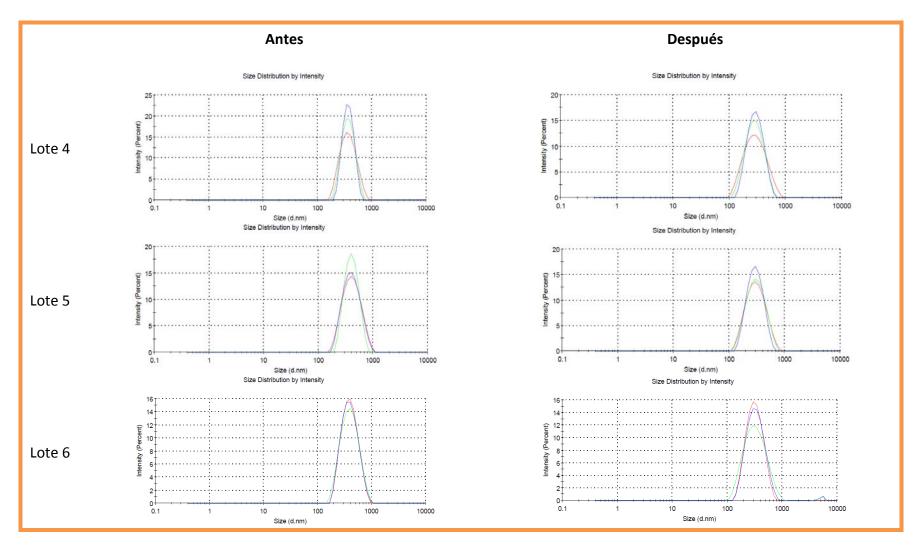
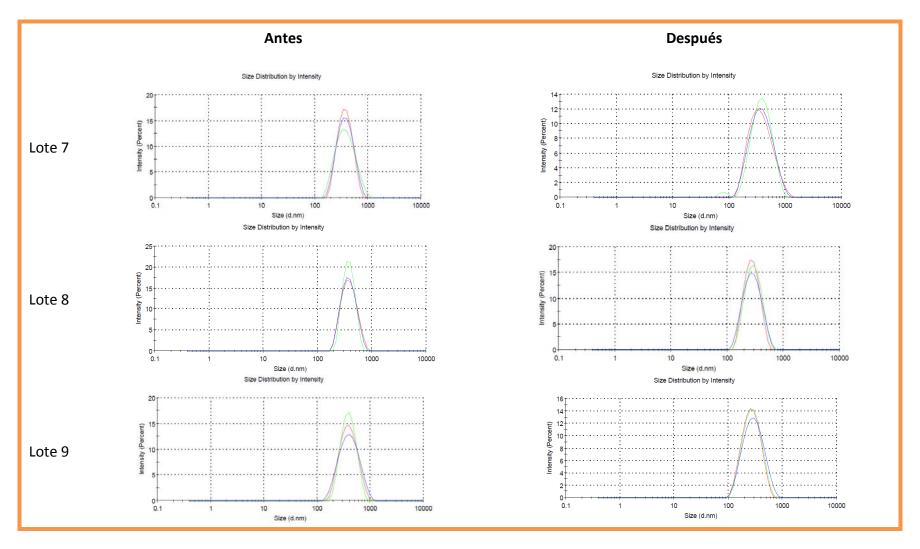
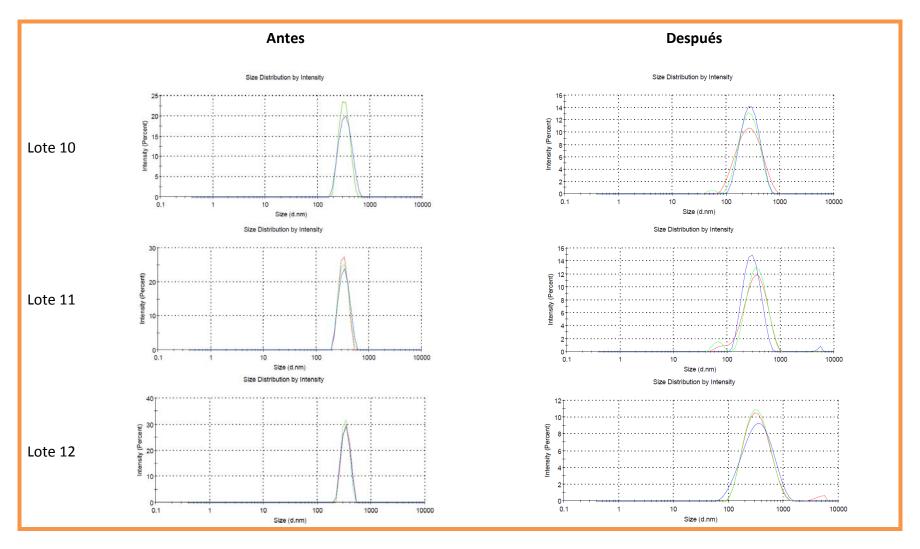


Figura 16. (Continuación) Distribución del TP de lotes obtenidos por ultrasonido antes y después de eliminar el estabilizante residual (n=3).



**Figura 16.** (Continuación) Distribución del TP de lotes obtenidos por ultrasonido, antes y después de eliminar el estabilizante residual (n=3).



**Figura 16.** (Continuación) Distribución del TP de lotes obtenidos por ultrasonido, antes y después de eliminar el estabilizante residual (n=3).

Como se observa en la Tabla 8 y 9, con la modificación del método desplazamiento de solvente, se lograron obtener TP promedio (n=3) menores a 423 nm y un PDI menor a 0.244, esto antes y después de eliminar el exceso de estabilizante. También se puede observar que los valores de PDI aumentaron después de eliminar el estabilizante residual, lo cual, indica una mayor variación en la distribución del TP, ya que como se mencionó anteriormente valores más cercano a 1 representa una muestra polidispersa (Boon, 2015). Este comportamiento podría esperarse ya que el PVAL es el encargado de prevenir la agregación de las partículas.

A partir de los resultados obtenidos de TP y PDI (posterior a la preparación, es decir, antes de eliminar el estabilizante residual) se realizó el análisis de varianza de dos factores, para determinar los efectos de ultrasonido, amplitud de onda y potencia, (factores), sobre el TP y PDI (variables de respuesta). El análisis se hizo por separado para cada una de las variables de respuesta como se observa en la Figura 17.

Usaremos el análisis de la varianza de dos factores para contrastar las hipótesis nulas asociadas a cada factor. Las hipótesis planteadas para TP y PDI se muestran a continuación:

- H<sub>01</sub>: El factor amplitud de onda no influye sobre las variables de respuesta.
- H<sub>02</sub>: El factor potencia no influye sobre las variables de respuesta.
- H<sub>03</sub>: No hay interacción entre ambos factores.

El criterio de aceptación fue el siguiente:

Si F calculada > F crítica se rechazan las hipótesis nulas.

Si F calculada < F crítica se aceptan las hipótesis nulas.

El análisis de varianza se realizó utilizando el programa estadístico Statgraphics®

	Promedio de								
	Origen de las variaciones		Grados de libertad	los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F		
	Amplitud de			Leikord do Jacob Cart (natical)					
	onda	34458.7031	3	11486.2344	53.3847556	9.0733E-11			
Tamaño de partícula	Potencia	1360.87056	2	680.435278	3.16246995	0.0603859	3,40282611		
·	Interacción	3154.60278	6	525.76713	2.44361632	0.05491051	2.50818882		
	Dentro del								
	grupo	5163.82667	24	215.159444					
	Total	44138.0031	35						
	ANÁLISIS DE \	/ARIANZA							
	-	/ARIANZA		Promedio de					
	-		Grados de	Promedio de Ios			Valor crítico		
	ANÁLISIS DE \	Suma de			F	Probabilidad	Valor crítico para F		
	ANÁLISIS DE \ Origen de las	Suma de	Grados de	los	F	Probabilidad			
	ANÁLISIS DE \ Origen de las variaciones	Suma de	Grados de	los cuadrados	1000		para F		
idice de polidispersión	ANÁLISIS DE \ Origen de las variaciones Amplitud de	Suma de cuadrados	Grados de libertad	los cuadrados 0.00148247	1000	0.65735235	para F 3.00878657		
idice de polidispersión	ANÁLISIS DE V Origen de las variaciones Amplitud de onda	Suma de cuadrados 0.00444742	Grados de libertad	los cuadrados 0.00148247	0.54327887 3.31050033	0.65735235	para F 3.00878657 3.40282611		
dice de polidispersión	ANÁLISIS DE \ Origen de las variaciones Amplitud de onda Potencia	Suma de cuadrados 0.00444742 0.01806706	Grados de libertad 3 2 6	los cuadrados 0.00148247 0.00903353 0.00440819	0.54327887 3.31050033	0.65735235 0.05374058	para F 3.00878657 3.40282611		
dice de polidispersión	ANÁLISIS DE V Origen de las variaciones Amplitud de onda Potencia Interacción	Suma de cuadrados 0.00444742 0.01806706	Grados de libertad 3 2 6	los cuadrados 0.00148247 0.00903353	0.54327887 3.31050033	0.65735235 0.05374058	para F 3.00878657 3.40282611		

**Figura 17.** Análisis de varianza con dos factores (amplitud de onda y potencia) con tres muestras por grupo para los resultados de TP e PDI obtenidos de NPP preparadas por ultrasonido.

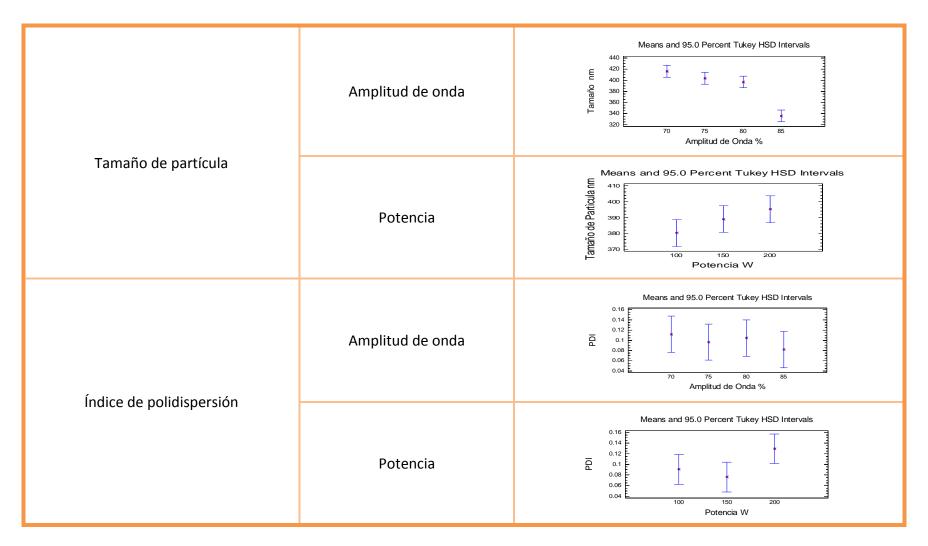


Figura 18. Gráficas de Tukey, nivel de confianza de 95 %.

En la Figura 17, podemos observar que el valor crítico para F (F crítica) está asociado a cada factor (Amplitud de onda y potencia). En el caso del análisis de varianza para los resultados obtenidos de TP, se observa que únicamente él % de amplitud de onda es determinante sobre el TP esperado, ya que el valor de F calculada es mayor al valor de F critica, 53.3847556 > 3.00878657. Esto también se puede comprobar observando las gráficas de Tukey en la Figura 18, donde se observa que en la gráfica de amplitud de onda para esta variable de respuesta, que no existe intersección entre todos los valores de % de amplitud de onda, por lo que existe diferencia estadísticamente significativa entre los % de amplitud de onda sobre el TP, con amplitudes al 85%.

En relación al PDI, los valores de F critica son mayores a los valores de F calculada, por lo que se aceptan las hipótesis nulas, lo que indica que no existe diferencia estadísticamente significativa entre las condiciones de ultrasonido, es decir, los datos demuestran que tanto la amplitud de onda como la potencia son factores que no influyen decisivamente sobre el PDI durante la preparación de las NPP, lo cual, se puede comprobar en la Figura 18.

Por otra parte, el método desplazamiento de solvente modificado (NPP por ultrasonido) permitió formar partículas de tamaños menores y más homogéneos en comparación con las NPP preparadas por el método convencional, ya que en este último, se obtuvieron tamaños mayores a 500 nm (ver resultados, sección 6.2.1.). En el caso del PDI y de acuerdo a la comparación de los gráficos de distribución de TP que se llevó a cabo entre la Figuras 15 (Método convencional) y Figura 16 (Método modificado), se observa que los lotes preparados por ultrasonido presentaron una distribución más estrecha, es decir, tenían menor variación en la distribución del TP y debido a esto, entre más estrecha sea la distribución de TP, mayor será la reproducibilidad del método (Boon, 2015).

## 6.2.2.2. Preparación bajo condiciones óptimas seleccionadas

Las condiciones óptimas de ultrasonido seleccionadas para preparar NPP bajo acción de ultrasonido fueron 70 % de amplitud de onda y 150 W de potencia. La selección se basó en la estrecha distribución de TP y la obtención de tamaños de menores a 413 nm. Una vez seleccionadas las condiciones óptimas de ultrasonido (amplitud de onda y potencia), se prepararon dos lotes de NPP en mayor cantidad. La preparación y la representación esquemática del proceso se describen y encuentran en la metodología, sección 5.2.2.2. Una vez obtenida la suspensión de NPP esta se centrifugó para eliminar el exceso de estabilizante y después se adicionó un agente crioprotector (manitol al 15% p/v) únicamente a uno de los dos lotes. Posteriormente, ambos lotes se liofilizaron para hacer más fácil su manejo.

El proceso de liofilización puede afectar de manera decisiva el TP, debido a la posible agregación y retención adicional de otros componentes, como el exceso de PVAL por lo cual fue importante el uso de un agente crioproctector. En esta experimentación, se utilizó como agente crioprotector manitol al 15 % p/v, el cual es un sacárido. El uso de estos agentes mejora la velocidad de liofilización y previene el crecimiento ocasionado por la presión que ejerce el agua congelada en el interior de las partículas (Garzón, 2008).

Las NPP fueron caracterizadas para obtener información sobre su comportamiento, ya que el cambio en su tamaño puede ocasionar cambios drásticos sobre sus características. Para ello, se determinó la morfología, cristalinidad, TP, PDI y potencial Z, estos últimos se evaluaron antes de eliminar el exceso de estabilizante y después del proceso de liofilización. También se cuantificó del estabilizante residual (PVAL residual), se obtuvieron los valores del porcentaje de fármaco encapsulado en la matriz polimérica (% EE), porcentaje de fármaco cargado (% DL, por sus siglas en inglés), porcentaje de eficiencia del proceso (% EP) y se realizaron los perfiles de liberación *in vitro*.

#### 6.3. Caracterización de las NPP

## 6.3.1. Análisis del TP, PDI y potencial Z

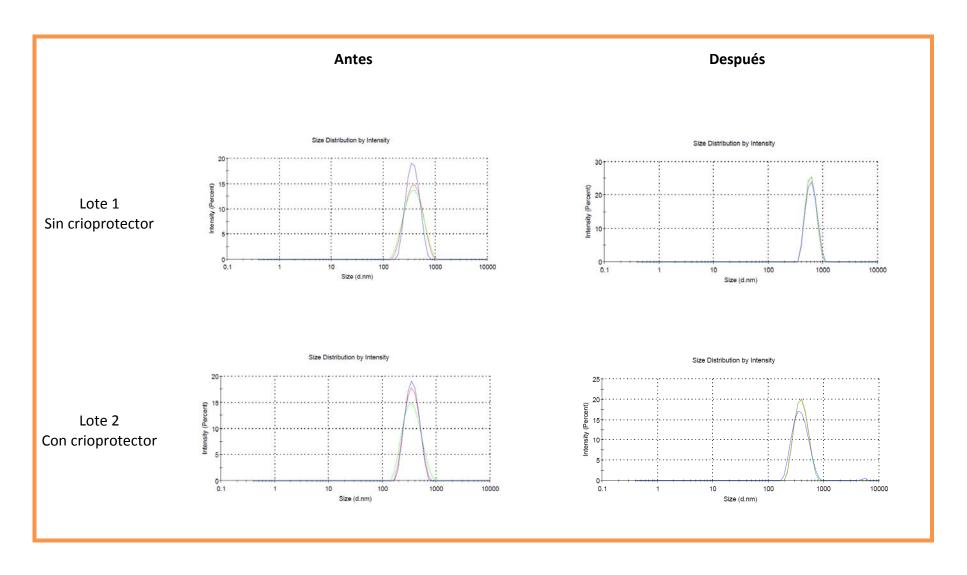
El análisis del TP, PDI y potencial Z que se describe en esta sección se llevó a cabo para los dos lotes de NPP preparados bajo condiciones óptimas seleccionadas de ultrasonido (70 % de amplitud de onda y 150 W de potencia) y liofilizados, también es importante recordar que se adiciono un agente crioprotector a uno de los dos lotes.

El análisis se llevó a cabo en un equipo Zetasizer por la técnica de dispersión de la luz dinámica. Esta técnica mide la difusión de las partículas que se mueven bajo el movimiento browniano, y la convierte a la medida y una distribución de tamaño utilizando la relación de Stokes-Einstein, la cual determina la constante de difusión de una partícula (www.malvern.com).

Las mediciones de TP y PDI de las NPP se determinaron a las condiciones que se describe en la metodología, sección 5.3.1, y los parámetros fueron evaluados antes de eliminar el exceso de estabilizante y después del proceso de liofilización. Los resultados se muestran en la Tabla 10 y la distribución del TP se ilustra en la Figura 19, antes del proceso de liofilización y después del proceso de liofilización.

**Tabla 10.** Preparación de NPP bajo condiciones óptimas seleccionadas: Análisis de TP, PDI y potencial Z.

Lotes	A	ntes de lic	ofilizar	De	spués de lic	ofilizar
	Talla	PDI	Potencial Z	Talla	PDI	Potencial Z
	(nm)		(mV)	(nm)		(mV)
1	400.3	0.121	-0.919	606.4	0.274	-1.12
(Sin crioprotector)	400	0.120	-0.770	602.4	0.264	-2.39
	377	0.064	-0.664	616.9	0.220	-1.46
PROMEDIO	392.4	0.102	-0.784	608.6	0.253	-1.66
2	364.5	0.076	-2.50	402.9	0.114	-1.89
(Con crioprotector)	369.3	0.154	-2.38	397.1	0.117	-1.81
	363.5	0.073	-2.60	447.1	0.147	-1.29
PROMEDIO	365.8	0.101	-2.493	415.7	0.126	-1.66



**Figura 19.** Distribución del TP de NPP preparadas por ultrasonido con y sin crioprotector, antes de eliminar el estabilizante residual y después del proceso de liofilización (n=3).

En el lote sin crioprotector, el TP promedio fue de 392.4 nm al momento de la preparación, y de 608.6 nm después del proceso de liofilización, se observó un aumento de tamaño obteniendo valores mayores a 500 nm después de la liofilización, lo mismo ocurrió con el PDI obteniendo un valor de 0.253 después del proceso de liofilización.

En relación al lote que se le adicionó manitol al 15% p/v, se obtuvieron TP menores a 450 nm y un PDI menor a 0.144, antes y después del proceso de liofilización. Como se mencionó anteriormente, el uso de este agente crioprotector evito la agregación de partículas durante el proceso de liofilización permitiendo mantener el tamaño de las partículas más homogéneo y de menor tamaño. También se observó una mejor redispersión del liofilizado, ya que solamente se necesitaban unos minutos de agitación en comparación con las muestras sin manitol.

El potencial Z de las NPP de PCL cargadas con CLOT, fue determinado por la técnica de Laser Doppler Micro-electrophoresis (ver marco teórico, sección X). Las mediciones se determinaron a las condiciones que se describe en la metodología, sección 5.3.1 y los resultados se muestran en la Tabla 10.

El potencial Z fue determinado al momento de la preparación y después del proceso de liofilización mostrando valores negativos cercanos a 0, obteniendo valores de -0.664 a - 2.60 mV para ambos lotes (con y sin crioprotector). Este valor es característico de las partículas y su atmosfera en solución, es decir, todos los lotes deben tener valores similares, ya que están preparados bajo las mismas condiciones. Por otro lado, es importante mencionar que la presencia del estabilizante actúa por impedimento estérico y la adsorción del mismo en la superficie de las NPP disminuye el potencial Z (Batalla, 2014 y Wolgang, 2001).

#### 6.3.2. Cuantificación del estabilizante residual

Para determinar correctamente el porcentaje de fármaco encapsulado en la matriz polimérica, primero se cuantificó la cantidad presente de PVAL residual, debido a que, como se mencionó anteriormente durante la preparación de NPP se utilizó como estabilizante, y tiene la función de evitar la agregación de las partículas, absorbiéndose en la superficie.

La cantidad de estabilizante residual se determinó a los lotes preparados bajo condiciones óptimas seleccionadas por el espectrofotometría Vis/visible formando un complejo colorido. El complejo colorido se formó de acuerdo al procedimiento descrito en la metodología, sección 5.1.3. Los resultados se incluyen en la Tabla 11 y se puede observar que el porcentaje calculado es menor a 3% para ambos lotes, esto coincide con lo reportado por Piñón-Segundo et al., 2005.

**Tabla 11.** Preparación de NPP bajo condiciones óptimas seleccionadas: Resultados del % de PVAL residual, % EE, % DL y % EP (n=3).

Lote	CLOT (mg)	PCL (mg)	PVAL residual (%)	% DL	% EE	% EP *
1 Sin crioprotector	51.7	163.7	2.6	19.36 ± 0.96	80.6 ± 3.96	76.73 ± 0.76
2 Con crioprotector	53.0	143.0	2.4	22.23 ± 0.76	82.16 ± 2.90	90.26 ± 0.76

<sup>\*</sup>Para realizar el calculó de eficiencia de proceso se tomó en cuenta la cantidad adicionada de manitol (agente crioprotector).

# 6.3.3. Porcentaje de fármaco encapsulado en la matriz polimérica (% EE), porcentaje de fármaco cargado (% DL), porcentaje de eficiencia del proceso (% EP) y cuantificación del estabilizante residual

Después de determinar espectrofotométricamente la cantidad de CLOT presente en las NPP (% DL, por sus siglas en inglés) preparadas bajo las condiciones óptimas seleccionadas, se procedió a determinar la cantidad de fármaco encapsulado en la matriz polimérica (% EE) y también la eficiencia del proceso (% EP), empleando las ecuaciones descritas por Piñón-Segundo *et al.*, 2005, para ambos lotes. Los resultados se encuentran en la Tabla 11. (ver ecuaciones en metodología, sección 5.3.3)

El porcentaje de CLOT encapsulado en las NPP de PCL y la eficacia de encapsulamiento fueron de  $19.36 \pm 0.96$  y  $80.6 \pm 3.96\%$  respectivamente, para el lote sin crioprotector y para el lote con crioprotector fueron de  $22.23 \pm 0.76$  y  $82.16 \pm 2.90\%$ . En ambos lotes, se observó que el porcentaje de contenido de fármaco es aproximado al porcentaje inicial de fármaco en relación con el peso del polímero, lo cual, se asocia con la naturaleza lipófila del fármaco que impide su partición en la fase acuosa (Santos, 2012).

La eficiencia de encapsulamiento fue mayor a 80% tanto en las muestras con y sin manitol. Se considera que el porcentaje obtenido es óptimo para encapsular CLOT, pues conforme a lo reportado por Tonglairoum *et al.* 2015, los %EE que obtuvieron en NPP preparadas con CLOT en mezcla de quitosan y PVAL por electrospinning fueron de 72 a 90%.

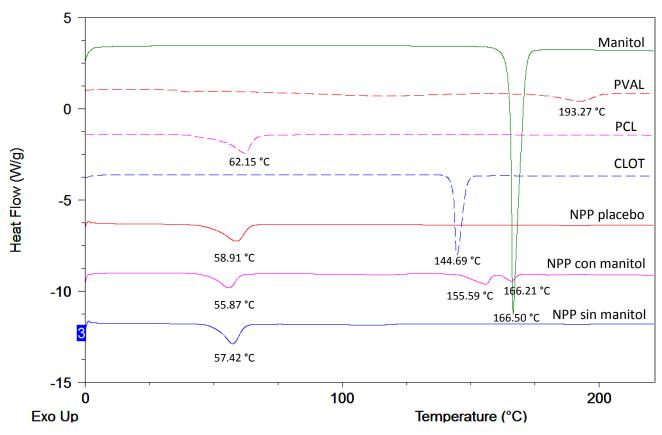
También se determinó la eficiencia del proceso, este parámetro expresa el porcentaje de polímero transformado en relación con el total de la cantidad de polímero en la solución orgánica (Piñón-Segundo, 2006).

#### 6.3.4. Estado cristalino de las NPP

Los estudios por calorimetría diferencial de barrido (DSC) son útiles para evaluar y determinan la forma en que se encuentra el fármaco dentro de las NPP, por ello, y para saber si el fármaco se encontraba disperso molecularmente, se obtuvieron los termogramas de CLOT, PCL, PVAL, manitol y NPP biodegradables (Método modificado) con y sin manitol.

En el Gráfico 2, se muestran los termogramas obtenidos por calorimetría diferencial de barrido. El termograma de CLOT puro presentó un pico endotérmico a 144.69 °C, esto coincide, con el valor de 145.4 °C reportado por Das, *et al.*, 2012, para el pico característico de CLOT. Como el pico de fusión del fármaco está ausente o no se detecta en los termogramas de las NPP, se puede decir que el fármaco está dispersó molecularmente en la matriz polimérica.

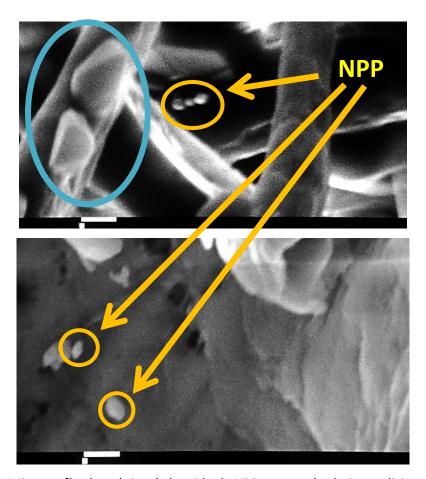
Por otro lado, en el termograma de las NPP que contienen manitol como agente crioprotector, se observa un pequeño pico endotérmico de 155 a 166 °C, esto puede deberse a la presencia de cristales de manitol ya que el pico característico de manitol se presenta a 166.50 °C.



**Gráfico 2.** Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC). Termogramas de CLOT, PCL, PVAL, manitol y de NPP biodegradables preparadas bajo condiciones óptimas de ultrasonidos.

#### 6.3.5. Morfología

El análisis se realizó únicamente al lote de NPP preparadas bajo condiciones óptimas de ultrasonido con un agente crioprotector. Las NPP fueron analizadas por medio de microscopia electrónica de barrido, para observar su morfología. Las fotografías de las NPP se muestran en la Figura 20, donde la barra blanca representa 1 µm, estas fotografías se obtuvieron con una magnificación de 10000 x. En la Figura 20, se nota claramente la presencia de NPP (círculos amarillos), como se puede observar estas presentan una forma esférica y sólida principalmente. En las fotografías, también se observa la presencia de cristales aislados (círculo azul), que corresponden al agente crioprotector (Manitol).

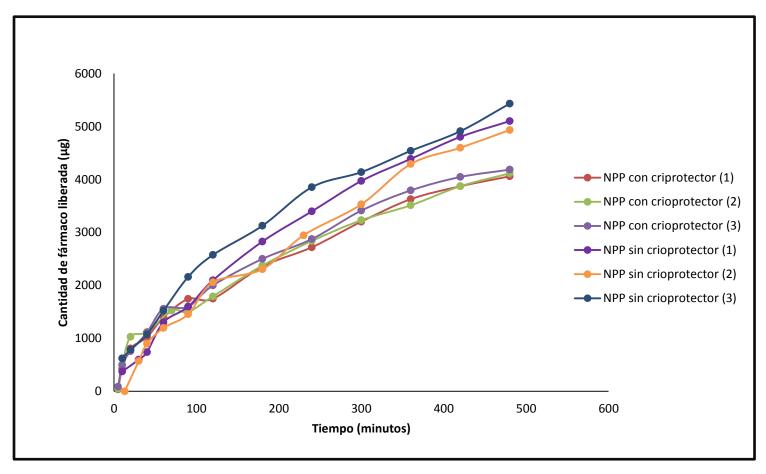


**Figura 20.** Micrografía electrónica de barrido de NPP preparadas bajo condiciones óptimas seleccionadas con crioprotector.

#### 6.3.6. Estudio de los perfiles de liberación

El estudio *in vitro* de liberación de CLOT se llevó a cabo a partir de NPP preparadas a base de PCL (polímero biodegradable) bajo acción ultrasonido a 70% de amplitud de onda y 150 W de potencia (condiciones óptimas seleccionadas) con y sin crioprotector, empleando el método de difusión con bolsas de diálisis. Cada muestra se analizó por triplicado. Con este estudio se pretende conocer y analizar el proceso de liberación de CLOT cargado dentro de la matriz polimería de las NPP, el mecanismo de transporte y tipo de liberación.

El estudio de liberación se efectuó en condiciones de perfecta solubilidad del fármaco (sink conditions), es decir, que la concentración del fármaco en el medio de disolución fue menor a la concentración de saturación (solubilidad), ya que a medida que transcurre el tiempo, el fármaco se disuelve en el medio y la concentración aumenta. Esto significa que la cantidad de fármaco disuelto en el medio puede alterar el proceso de disolución y modificar la velocidad de disolución. Para este estudio se utilizó como medio de disolución fluido vaginal simulado a pH de 4.5 con un agente solubilizante (Gelucire 44/14 al 3% p/v), ya que el fármaco es insoluble en agua. Los perfiles de liberación se muestran en el Gráfico 3.



**Gráfico 3.** Perfiles de liberación de CLOT a partir de NPP de PCL por el método de difusión con bolsas de diálisis. (•) Sistemas con crioprotector (n=3) y (◆) Sistemas sin crioprotector (n=3).

En los perfiles de liberación obtenidos (n=3), se puede observar como al adicionar un agente crioprotector en la formulación, disminuye la cantidad de CLOT liberada al medio de disolución (Gráfico 3). Este comportamiento puede relacionarse con el efecto provocado por el agente crioprotector sobre la superficie de las partículas, ya que es el encargado de proteger las NPP durante el proceso de liofilización y a la vez forma una barrera actuando como una envoltura, por lo cual, podría influir en el contacto de las partículas con el medio de dispersión.

En el caso de ambas formulaciones (con y sin crioprotector), se puede observar como el perfil de liberación es muy similar durante la primera hora, momento a partir del cual se comienza a ver la influencia de agente crioprotector. Por otro lado puede apreciarse que ambos sistemas, presentan una rápida liberación del fármaco, liberando el 95 % en menos de 7 horas. Este efecto, se atribuye a que al disminuir el tamaño de las NPP incrementar el área superficial de las mismas y el fármaco absorbido en la superficie tiene alto contacto con el medio de disolución, por lo que difunde rápidamente hacia el exterior (Yokoyama, 2012).

Otro factor importante que define la velocidad de liberación de CLOT es la concentración total del fármaco, es decir, el CLOT se libera más rápidamente al usar concentraciones más baja. Esto concuerda con lo reportado por Souto, et al., (2004), el cual, realizo un estudio sobre la liberación de CLOT a partir formulaciones de liberación controlada basadas en NPP lipídicas solidad y vehículos lipídicos nanoestructurados.

Análisis de los modelos matemáticos analizados.

Con el objetivo de estudiar el mecanismo mediante el cual se lleva a cabo la liberación de CLOT desde la matriz polimérica, se ajustó la media de los perfiles de liberación obtenidos de ambos lotes para analizar y describir el mecanismo mediante el cual ocurre el proceso de liberación. Los resultados se muestran en la Tabla 13 y Gráficos 4 y 5.

La cinética de liberación se analizó de acuerdo al modelo de Krosmeyer-Peppas y Higuchi. El modelo Krosmeyer-Peppas se basa en diferentes funciones matemáticas que describen el perfil de disolución, para determinar la cinética de liberación del fármaco a partir de un polímero, en este modelo se ajustan los datos hasta un 60% de la cantidad total liberada (Suvakanta, 2010).

$$M_t / M_{\infty} = Kt^n$$

Donde  $M_t$  /  $M_\infty$  es la fracción de fármaco liberado a un tiempo, K es una constante y el exponente de difusión "n" es la pendiente. El exponente de difusión "n" es utilizado para caracterizar el mecanismo de transporte y el tipo de liberación como se describe en la Tabla 12.

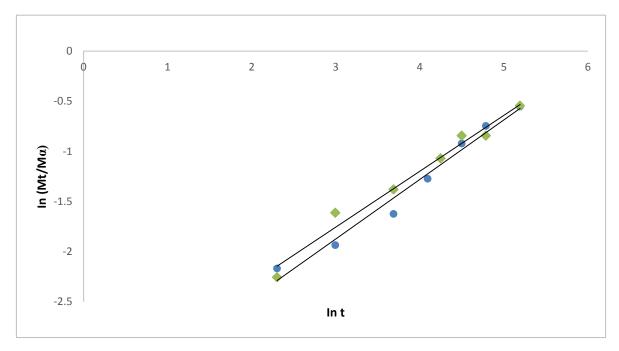
**Tabla 12.** Mecanismos de transporte y tipo de liberación en base al exponente de difusión "n" de acuerdo al modelo de Krosmeyer-Peppas.

Exponente (n)	Mecanismo de transporte	Tipo de liberación
0.5	Difusión fickiana	Dependiente del tiempo (t <sup>-0.5</sup> )
0.45 < n = 0.89	No fickiana	Dependiente del tiempo (t <sup>n-1</sup> )
0.89	Transporte caso II	Independiente del tiempo (orden cero)
n > 0.89	Transporte súper caso II	Dependiente del tiempo (t <sup>n-1</sup> )

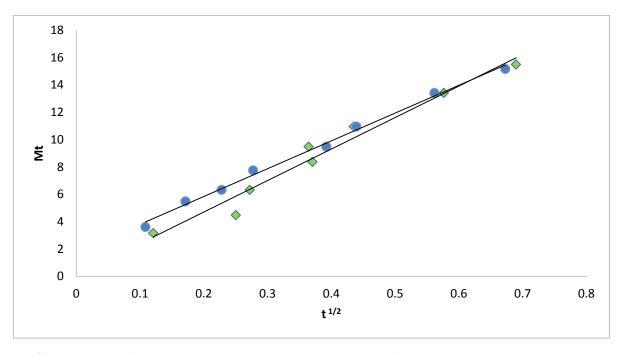
De acuerdo a los resultados obtenidos de n en este estudio, el valor del exponente de difusión osilló ente de 0.47 a 0.68 para ambos lotes, lo cual conforme a lo estipulado anteriormente y a los parámetros descritos en la Tabla 12, se determina que el mecanismo de liberación del fármaco a partir de NPP a base de PCL es fickiano, es decir, fármaco difunde al medio de disolución. El mecanismo de liberación fickiano no se ve afectado por el fenómeno de relajación del polímero en el proceso de hinchamiento, por lo tanto presenta una liberación inicial rápida pero no inmediata (Saéz, 2004).

**Tabla 13.** Resultados de las cinéticas de liberación de acuerdo a los modelos de Krosmeyer-Peppas y Higuchi.

MODELOS						
Lote	Muestra	Korsme	Higuchi			
	Valor de n Coeficiente d correlación		Coeficiente de correlación	Coeficiente de correlación		
1	1	0.6830	0.967	0.981		
	2	0.6398	0.993	0.994		
	3	0.5948	0.976	0.992		
2	1	0.5578	0.977	0.983		
	2	0.4722	0.935	0.968		
	3	0.5511	0.988	0.981		



**Gráfico 4.** Liberación de CLOT a partir de NPP bajo condiciones óptimas seleccionadas (Modelo de Peppas): ◆ Lote sin manitol y ◆ Lote con manitol (n=3).



**Gráfico 5.** Liberación de CLOT a partir de NPP bajo condiciones óptimas seleccionadas (Modelo de Higuchi): ◆ Lote sin manitol y ◆ Lote con manitol (n=3).

Como se mencionó anteriormente, la cinética de liberación de los perfiles de liberación, también se analizó de acuerdo al modelo de Higuchi. En 1961 Higuchi fue el primer en proponer un modelo matemático para describir la liberación de un fármaco a partir de un sistema matricial. La expresión del modelo está dada por la siguiente ecuación (Saéz, 2004).

$$\frac{M_t}{M_{\odot}} = Kt^2$$

Donde  $M_t$  es la cantidad de fármaco liberado a un tiempo,  $M_\infty$  es la cantidad máxima liberada, K en una constante y t es el tiempo. Los valores de los coeficientes de correlación obtenidos en este estudio son muy cercanos a 1, lo que indica que los datos se ajustan al modelo propuesto por Higuchi, es decir, estos sistemas se consideran matriciales. Los resultados coinciden con la descripción del sistema preparado.

Los datos obtenidos de los perfiles de liberación in vitro muestran que el proceso por el cual se obtuvieron las nanopartículas es adecuado ya que permite la obtención de nanopartículas con perfiles de liberación semejantes.

El uso de estos sistemas en formas farmacéuticas puede mejorar los tratamientos farmacológicos actuales, aumentando la cantidad de fármaco disponible y disminuye el tiempo del tratamiento, siendo un tratamiento farmacológico cómodo y de fácil administración. Aunque este trabajo sólo comprende una etapa de una línea de investigación extensa, contribuye de manera importante al desarrollo de la investigación global.

#### 7. CONCLUSIONES

- Se elaboraron NPP biodegradables cargadas con CLOT como principio activo a partir del método desplazamiento de solvente bajo acción de ultrasonido, como posible tratamiento de infecciones ginecológicas principalmente candidiasis vulvovaginal.
- Se determinó que el cambio de la energía mecánica a ultrasonido durante la preparación de nanopartículas por el método desplazamiento de solvente, permite obtener partículas más homogéneas.
- Las condiciones óptimas fueron de 75 % de amplitud de onda y 150 W de potencia para obtener tamaños de partícula menor a 400 nm, eficiencias de encapsulamiento mayores a 80%, y un porcentaje de estabilizante residual menor al 3%, ideal para ocuparse como vectores farmacéuticos.
- Se determinó por calorimetría diferencial de barrido que el fármaco se encontraba disperso en la matriz polimérica y no en la superficie. También mediante microscopia electrónica de barrido se pudo observar la morfología de las NPP, las cuales presentaron forma esférica.
- La liberación del CLOT fue rápida, liberando el 95 % en menos de 7 horas debido al incremento del área superficial de las partículas.
- El logró de estos resultados es derivado de la modificación al método desplazamiento de solvente donde se utilizó ultrasonido a diferentes amplitudes de onda y potencias durante la elaboración, seleccionando las condiciones óptimas; ante la problemática del método convencional, el cual, requiere tiempos prolongados y altas velocidades de agitación.

#### 8. REFERENCIAS

- Aka-Any-Grah, A., Bouchemal, K., Koffi, A., Agnely, F., Zhang, M., Djabourov, M. y Ponchel, G. (2010). Formulation of mucoadhesive vaginal hydrogels insensitive to dilution with vaginal fluids. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics. 76, 296-303.
- Abruzzo, A., Bigucci, F., Saladini, B., Gallucci, M. C., Cruciani, F., Vitali, B. y Luppi, B. (2013). Chitosan/alginate complexes for vaginal delivery of chlorhexidine digluconate. Carbohydrate Polymers. *91*, 651-658.
- American Academy of Orthopaedic Surgeons (2011). Los cuidados de urgencias y el transporte de los enfermos y los heridos, Jones and Bartlett Publisher. Malaysia.
- Aragón Fernández, J., Gonzáles Santos, R. y Fuentes Esteves G. (2010). Estudio in vitro de liberación de fármacos desde un biomaterial compuesto. Ciencias Químicas, 41, 1 8.
- Batalla, J., Cuadros A. y Martín-Martínez E. (2014). Potencial zeta en la determinación de carga superficial de liposomas. Latin-American Journal of Physics Education. 8(4), 1-6.
- Bensebaa, F. (2013). Chapter 1 Nanoparticle Fundamentals. Interface Science and Technology, 19, 1-84.
- Bidart T. (2004). Rol de voriconazol y caspofungina en terapia antifúngica. Revista chilena de infectología, 21, 13-19.
- Boon, T., Yussof, T., Abas, F., Mirhosseini, H., Nehdi, A. y Tan, C. (2015). Forming a lutein nanodispersion via solvent displacement method: The effects of processing parameters and emulsifiers with different stabilizing mechanisms. Food Chemistry, 194, 416-423.
- Borhade, V., Pathak, S., Sharma, S. y Patravele, V. (2012). Clotrimazole nanoemulsion for malaria chemotherapy. Part I: Preformulation studies, formulation design and physicochemical evaluation. International Journal of Pharmaceutics. 431, 138-148.

- CANESTEN® V ÓVULOS, BAYER CONSUMER Recuperado el 15 de Noviembre de 2015, de http://mx.prvademecum.com/producto.php?producto=11245.
- Cararach, M., Comino, R., Armengol E. D., García, E. M., Martínez J. C., Palacios, S. y
   Torres, J. (2013). La vulvovaginitis Candidiásica recurrente. Progresos de
   Obstetricia y Ginecología. 56, 108-116.
- Carrillo-Muñoz, A.J., Tur-Tur, C., Cárdenes, D., Rojas, F. y Giusiano, G. (2013).
   Influence of the ecological group on the in vitro antifungal susceptibility of dermatophytic fungi. Revista Iberoamericana de Micología. 30, 130-133.
- Centro Andaluz de Información de Medicamentos (2013). Vulvovaginitis por Cándida: tratamiento. Escuela Andaluza de Salud Pública, 19(5), 17-20.
- Clotrimazol. Recuperado el 15 de Febrero de 2014, de http://www.iqb.es/cbasicas/farma/farma04/c098.htm.
- Cu, Y., Booth, C.J. y Saltzman, W.M. (2011). In vivo distribution of surface-modified PLGA nanoparticles following intravaginal delivery. Journal of Controlled Release. 156, 258-264.
- das Neves, J. y Bahia, M.F. (2006). Gels as vaginal drug delivery systems. International Journal of Pharmaceutics. *318*, 1-14.
- Das, S., Kong, W. y Tan, R. (2012). Are nanostructured lipid carriers (NLCs) better than solid lipid nanoparticles (SLNs): Development, characterizations and comparative evaluations of clotrimazole-loaded SLNs and NLCs?. European Journal of Pharmaceutical Sciences, 47, 139-151.
- Ficha de datos de seguridad. Recuperado el 15 de Noviembre de 2014, de https://fagron.com/sites/default/files/document/msds\_coa/23593-75-1\_(ES).pdf.
- Ficha de Información Técnica. Recuperado el 15 de Noviembre de 2014, de http://www.acofarma.com/admin/uploads/descarga/4460-e31555e3b2c 0f88379e 84db6de19 00370256b683/main/files/Clotrimazol.pdf
- García L., Ocaña A. y Cuéllar A. (2011). Sistema urogenital. Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Estudio Superiores Iztacala. México.

- Garzón, M., Hernández, A., Vázquez M., Villafuerte, L. y Garcpia B. (2008).
   Preparación de nanopartículas sólidas lipídicas (SLN), y de Acarreadores lipídicos nanoestructurados (NLC).
- González-Pedraza A. A., Ortiz Z. C., Mendoza R. D. y Valencia C. M. (2007).
   Infecciones cervicovaginales más frecuentes; prevalencia y factores de riesgo.
   Revista Cubana de Obstetricia y Ginecología, 33(2), 1-12.
- Guía de Práctica Clínica, Diagnóstico y Tratamiento de la Vaginitis Infecciosa en Mujeres en Edad Reproductiva, en el Primer Nivel de Atención. México: Secretaria de Salud; 2009. Recuperado el 12 de Septiembre de 2014, de http://www.saludbc.gob.mx/wp-content/uploads/2011/02/IMSS\_081\_08\_EyR.pdf
- Hussain, A. y Fakhrul, A. (2005). The vagina as a route for systemic drug delivery. Journal of Controlled Release. *103*, 01-313.
- Irache, J.M. (2008). Nanomedicina: nanopartículas con aplicaciones médicas.
   Anales Sis San Navarra, 31, 7-10.
- Kreuter, J. (2007). Nanoparticles a historical perspective. International Journal of Pharmaceutics, 331, 1-10.
- Lai, S. K., Wangc Ying-Ying y Hanes J. (2009). Mucus-penetrating nanoparticles for drug and gene delivery to mucosal tissues. Advanced Drug Delivery Reviews, 61(2), 158-171.
- Lee Mi-Yeon, Sang-Min Gi, Sung-Kyu Usted, Mi-Jung Choi, Geun-Pyo Hong, Ji-Yeon Chun (2013). Effect of β-cyclodextrin on physical properties of nanocapsules manufactured by emulsion–diffusion method. Journal of Food Engineering, 119, 588-594.
- Lewinski, N., Colvin, V. y Drezek, R. (2007). La citotoxicidad de nanopartículas.
   Small. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 4(1), 26-49.
- Luján J. (2013). Guía de estudio. Catedra de Química medicinal Fac Cs. Exts. Qcas. Y
   Nat-UnaM. Argentina. Recuperado el 27 de abril de 2015, de http://www.aulavirtual-exactas.dyndns.org

- Malvern® Zetasizer Nano ZS90. Recuperado el 15 de Noviembre de 2014, de http://www.malvern.com/en/products/product-range/zetasizer-range/zetasizer-nano-range/zetasizer-nano-zs90/.
- Martín-Aragón, S. y Benedí J. (2009). Tratamiento de las infecciones ginecológicas.
   Farmacia profesional, 23 (1), 52-57.
- Mora-Huerta, C., Fessi, H. y Elaissari A. (2011). Influence of process and formulation parameters on the formation of submicron particles by solvent displacement and emulsification—diffusion methods: Critical comparison. Advances in Colloid and Interface Science, 163(2), 90-122.
- Noriega-Peláez, E. K., Mendoza-Muñoz N., Ganem-Quintanar A. y Quintanar-Guerrero D. (2011). Optimization of the emulsification and solvent displacement method for the preparation of solid lipid nanoparticles. Drug Development and Industrial Pharmacy, 37(2), 160-166.
- Perea, A. J. (2010). Infecciones del aparato genital femenino: vaginitis, vaginosis y cervicitis. Medicine. 10(57), 3910-3914.
- Piñón-Segundo, E., Ganem-Quintanar, A., Alonso-Pérez, D. y Quintanar-Guerrero
   D. (2005). Preparation and characterization of triclosan nanoparticles for periodontal treatment. International Journal of Pharmaceutics. 294, 217-232.
- Piñon-Segundo, E., Ganem-Quintanar, A., Garibay-Bermúdez J., Escobar-Chávez, J., López-Cervantes M. y Quintanar-Guerrero D. (2006). Preparation of Nanoparticles by Solvent Displacement Using a Novel Recirculation System. Pharmaceutical Development & Technology. 11, 493-501.
- Polycaprolactone. Recuperado el 24 de abril de 2014, de http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/440744?lang=es&region= MX.
- Quintanar-Guerrero, D., Tamayo-Esquivel, D., Ganem-Quintanar, A., Allemann, E. y
   Doelker E. (2005). Adaptation and optimization of emulsification-diffusion
   technique for preparing lipid nanospheres. 26, 211-218.

- Quintanar-Guerrero, D., Fessi, H., Allémann E. y Doelker E. (1996). Influence of stabilizing agents and preparative variables on the formation of poly(D,L-lactic acid) nanoparticles by an emulsification-diffusion tecfnique. 143, 133-141.
- Rao, J.P. y Geckeler, K.E. (2011). Polymer nanoparticles: Preparation techniques and size-control parameters. Progress in Polymer Science, 36, 887-913.
- Rodríguez-Antolín, J., Cuevas, E., Nicolás, L., Fajardo, V., Castelán, F. y Martínez-Gómez M. (2012). Histología uretral y vaginal en algunas hembras de mamíferos.
   Universidad y ciencia. 28(1), 85-95.
- Rodríguez, I. C., Cerezo, A. Y Salem, I. I. (2000). Bioadhesive delivery systems. Ars Pharmaceutica, 41, 115-128.
- Romero, G., Moya, S.E. (2012). Chapter 4 Synthesis of Organic Nanoparticles.
   Frontiers of Nanoscience, 4, 115-141.
- Ross, Michael H. y Wojciech Pawlina (2008) Histología: Texto y atlas color con biología celular y molecular. Médica panamericana. Argentina.
- Sáez V., Hernández E., Sanz L. y Katime I. (2004). Liberación controlada de fármacos, Micropartículas. Revista Iberoamericana de Polímeros, *5(2)*, 87-101.
- Santos, S., Lorenzoni, A., Pegoraro, N., Denardi, L., Alves, S., Schaffazick, S. y Cruz
   L. (2014), Formulation and in vitro evaluation of coconut oil-core cationic
   nanocapsules intended for vaginal delivery of clotrimazole. Colloids and Surfaces B:
   Biointerfaces, 116, 270-276.
- Sink conditions. Recuperado el 04 de febrero de 2015, de http://www.argostsp.com/es/investigacion-terminologica/argos-pharma/investigacion-termin ologic a/sink-conditions-como-evitar-el-anglicismo-condiciones-sink.html.
- Souto, E., Wissing, S., Barbosa, C. y Müller R. (2004). Development of a controlled release formulation based on SLN and NLC for topical clotrimazole delivery. International Journal of Pharmaceutics. 278, 71-77.
- Suriñach, S., Baro, M., Bordas, S., Clavaguera, N. y Clavaguera-Mora, M. (1992), La calorimetría diferencial de barrido y su aplicación a la Ciencia de Materiales.
   Sociedad Española de Cerámica y Vidrio. 31(1). 11-17.

- Suvakanta, D., Narasimha, P., Nath, L. y Chowdhury, P. (2010). Kinect modeling drug reléase from controlled drug delivery systems. Drug Research, *67(3)*, 217-223.
- Vauthier, C. y Bouchemal, K. (2008). Methods for the Preparation and Manufacture of Polymeric Nanoparticle. Pharmaceutical Research, Recuperado el 15 de abril del 2014, de http://link.springer.com.pbidi.unam.mx:8080/article/10.1007%2Fs11095-008-9800-3/fulltext.html.
- Wachsmann, P. y Lamprecht, A. (2012). Chapter nineteen Polymeric Nanoparticles for the Selective Therapy of Inflammatory Bowel Disease. Methods in Enzymology, 508, 377-397.
- Wolfgang M. y Karsten M. (2001). Solid lipid nanoparticles: Production, characterization and applications. Advanced Drug Delivery Reviews, *64*, 83-101.
- Xiao-Yun Lu, Dao Cheng-Wu, Zheng-Jun Li, Guo-Qiang Chen. (2011). Chpater 7 –
   Polymer Nanoparticles. Progress in Molecular Biology and Translational Science,
   104, 299-323.
- Yokoyama,T. (2012). Chapter 1 Basic properties and measuring methods of nanoparticles. Nanoparticle Technology Handbook.
- Yoo, J.W., Giri, N. y Lee, C.H. (2011). pH-sensitive Eudragit nanoparticles for mucosal drug delivery. International Journal of Pharmaceutics. 403, 262-267.

#### 9. ANEXOS

## 9.1. Estructura química y propiedades fisicoquímicas de los materiales

#### a) Clotrimazol

Formula molecular: C<sub>22</sub>H<sub>17</sub>N<sub>2</sub>Cl

Peso Molecular: 344.8 g/mol

Descripción: es un polvo cristalino, blanco o amarillento pálido

■ Punto de Fusión: 141 – 145 °C

Solubilidad: insoluble en agua, soluble en etanol al 96 % y cloruro de metileno.

■ Rango terapéutico: 4-12 mg/L

(http://www.acofarma.com y https://www.fagron.com)

#### b) Poli (ε-caprolactona)

Catalizador + calor 
$$CH_2$$
  $CH_2$   $CH_2$   $CH_3$   $CH_2$   $CH_3$   $CH_4$   $CH_2$   $CH_4$   $CH_5$   $CH_5$ 

- Formula molecular:  $(C_6 H_{10} O_2)_n$
- Descripción: Polímero hidrófobo biodegradable no tóxico en forma de gránulos de 3
   mm
- Solubilidad: cloroformo, dicloro, metano, carbón, tolueno, acetona, etilacetato y acetato de etilo
- Aplicaciones principales: Aplicaciones como un agente de administración de fármacos debido a su eficiencia y biocompatibilidad

(http://www.sigmaaldrich.com/)

# 9.2. Espectros de absorción

Gráfico 18. Espectro de absorción de solución de Fluido Vaginal Simulado a pH de 4.5 (FVS).

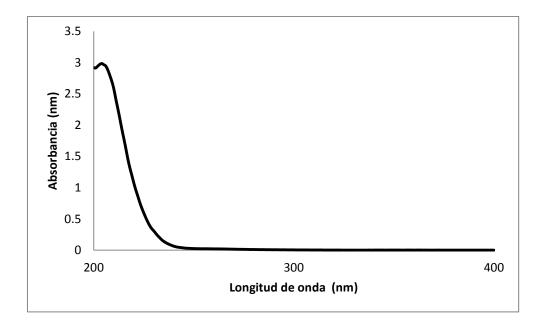


Gráfico 19. Espectro de absorción de solución de FVS con Gelucire® 44/14 al 3% p/v.

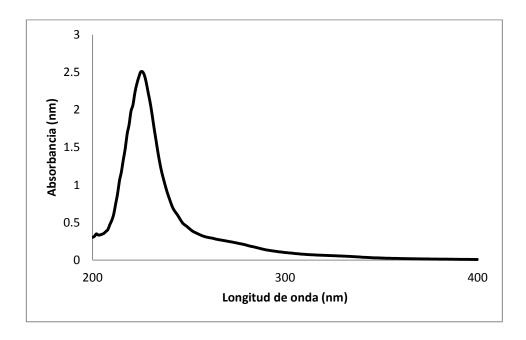


Gráfico 20. Espectro de absorción de CLOT en solución de FVS con Gelucire $^{\circ}$  44/14 al 3 % p/v.

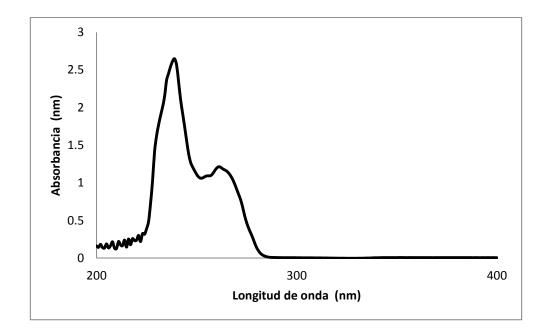
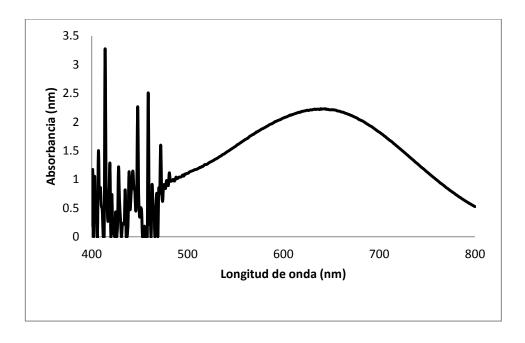


Gráfico 21. Espectro de absorción del complejo PVAL con H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, KI y I<sub>2</sub>.

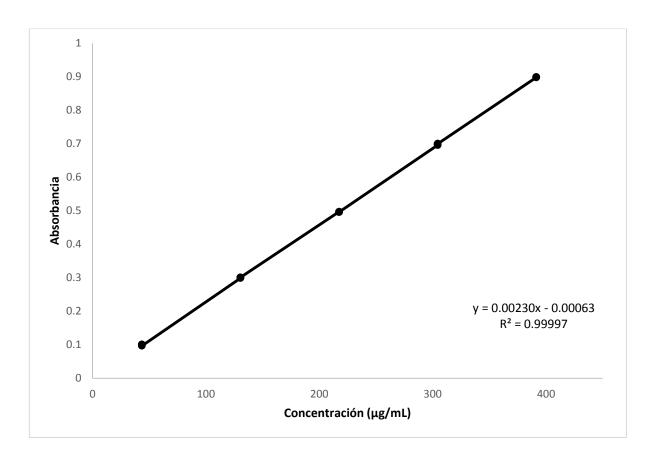


# 9.3. Curva de calibración

# a) Clotrimazol en una solución de Gelucire® 44/14 al 3% p/v en FVS.

Concentración			
μg/mL	Absorbancia	Abs/Conc	
43.5	0.101	0.00232	
43.5	0.100	0.00230	
43.5	0.097	0.00223	
130.5	0.299	0.00229	
130.5	0.300	0.00230	
130.5	0.301	0.00231	
217.5	0.497	0.00229	
217.5	0.497	0.00229	
217.5	0.496	0.00228	
304.5	0.696	0.00229	
304.5	0.698	0.00229	
304.5	0.700	0.00230	
391.5	0.898	0.00229	
391.5	0.899	0.00230	
391.5	0.899	0.00230	
	Х	0.00229073	
	D.S.	1.9613E-05	
	C.V.	0.86%	

 $\lambda$ = 260 nm.



# ANÁLISIS ESTADÍSTICO

- 1) Regresión Lineal
- r= 0.99998
- $r^2 = 0.99997$
- m= 0.00230
- b= 0.00063

#### 2) Análisis de Varianza

#### Prueba de hipótesis

- *H*<sub>o</sub>: No existe relación entre la concentración de CLOT y su respectiva absorbancia.
- $H_A$ : Existe relación entre la concentración de CLOT y su respectiva absorbancia.

#### El criterio de aceptación fue el siguiente:

- Si F calculada > F crítica se rechaza la hipótesis nula.
- Si F calculada < F crítica se acepta la hipótesis nula.

Como F calculada > F crítica se rechaza la hipótesis nula, es decir, si existe relación entre la concentración y su absorbancia.

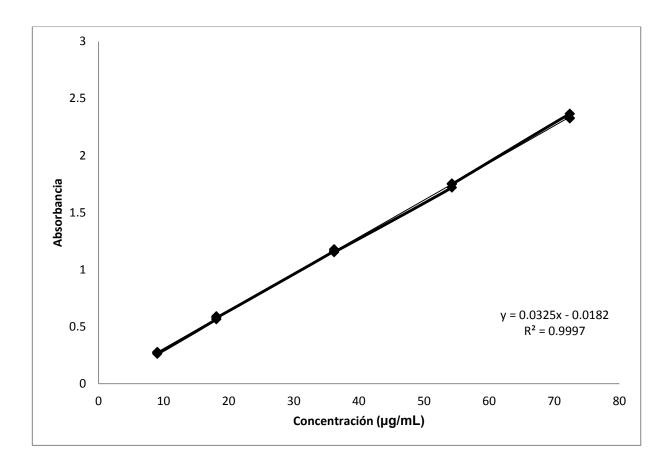
#### ANÁLISIS DE VARIANZA

	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F calculada	F crítica
				427144.04	
Regresión	1	1.19600333	1.19600333	8	9.5157E-31
Residuos	13	3.64E-05	2.8E-06		
Total	14	1.19603973			

# b) Complejo PVAL con $H_3BO_3$ , KI y $I_2$ en agua destilada.

Concentración	Absorbancia	Abs/Cons	
μg/mL	Absorbancia	Abs/Conc	
9.05	0.27	0.029834	
9.05	0.278	0.030718	
9.05	0.262	0.02895	
18.1	0.565	0.031215	
18.1	0.59	0.032597	
18.1	0.577	0.031878	
36.2	1.162	0.032099	
36.2	1.177	0.032514	
36.2	1.153	0.031851	
54.3	1.719	0.031657	
54.3	1.754	0.032302	
54.3	1.748	0.032192	
72.4	2.365	0.032666	
72.4	2.329	0.032169	
72.4	2.325	0.032113	
	х	0.03165	
	D.S.	0.001063	
	C.V.	3.36%	

 $\lambda$ = 644 nm.



# Análisis estadístico

# 1) Regresión Lineal

- r= 0.99993
- $r^2 = 0.9997$
- *m= 0.0325*
- b= 0.0182

#### 2) Análisis de Varianza

### Prueba de hipótesis

- H<sub>o</sub>: No existe relación entre la concentración del complejo colorido PVA-H<sub>3</sub>BO<sub>3-</sub>KI-I<sub>2</sub>
   y su respectiva absorbancia.
- $H_A$ : Existe relación entre la concentración del complejo colorido PVA- $H_3BO_3$ - $KI-I_2$  y su respectiva absorbancia.

#### El criterio de aceptación fue el siguiente:

- Si F calculada > F crítica se rechaza la hipótesis nula.
- Si F calculada < F crítica se acepta la hipótesis nula.

Como F calculada > F crítica se rechaza la hipótesis nula, es decir, si existe relación entre la concentración y su absorbancia.

#### ANÁLISIS DE VARIANZA

71117 (21313 2	Crados do	Cuma do	Promedio de los		
	Grados de libertad	Suma de cuadrados	cuadrados	F calculada	F crítica
				100758.06	
Regresión	1	30.7898579	30.7898579	9	1.1366E-26
Residuos	14	0.00427815	0.00030558		
Total	15	30.794136			

# 9.4. Cinéticas de liberación de los lotes preparados bajo condiciones óptimas seleccionadas

a) Resultados de la liberación de clotrimazol en NPP de PCL (Lote 1) sin crioprotector.

Tiempo	$t^{1/2}$	In t	Mt	Mt/M∞	In (Mt/M∞)
10	3.16227766	2.30258509	0.62126087	0.11440636	-2.16799859
20	4.47213595	2.99573227	0.78382174	0.14434225	-1.93556804
40	6.32455532	3.68887945	1.07029565	0.19709697	-1.62405946
60	7.74596669	4.09434456	1.51981304	0.27987644	-1.27340705
90	9.48683298	4.49980967	2.15976522	0.39772484	-0.92199486
120	10.9544512	4.78749174	2.57406522	0.47401897	-0.74650794
180	13.4164079	5.19295685	3.12532174	0.5755339	-0.55245715
240	15.4919334	5.48063892	3.85266522	0.70947558	-0.34322921
300	17.3205081	5.70378247	4.13783478	0.76199009	-0.27182173
360	18.973666	5.88610403	4.5390913	0.83588224	-0.17926754
420	20.4939015	6.04025471	4.90904348	0.90400963	-0.10091527

a) Resultados de la liberación de clotrimazol en NPP de PCL (Lote 2) con crioprotector.

Tiempo	$t^{1/2}$	In t	Mt	Mt/M∞	In (Mt/M∞)
5	2.23606798	1.60943791	0.04734783	0.01150971	-4.46456464
10	3.16227766	2.30258509	0.49686522	0.12078215	-2.11376675
20	4.47213595	2.99573227	1.02986087	0.25034719	-1.38490655
40	6.32455532	3.68887945	1.11937826	0.27210783	-1.30155686
70	8.36660027	4.24849524	1.52454783	0.37059984	-0.99263241
90	9.48683298	4.49980967	1.49928261	0.36445816	-1.00934353
120	10.9544512	4.78749174	1.79097391	0.43536492	-0.83157071
180	13.4164079	5.19295685	2.37223043	0.57666161	-0.55049964
240	15.4919334	5.48063892	2.8374	0.68973892	-0.37144213
300	17.3205081	5.70378247	3.22952609	0.78506021	-0.24199486
360	18.973666	5.88610403	3.51078261	0.8534304	-0.15849129
420	20.4939015	6.04025471	3.8703	0.94082489	-0.06099824