



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLÁN

“Cuantificación de Clotrimazol encapsulado en
nanopartículas de acetato ftalato de celulosa para
administración vaginal”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICO FARMACEÚTICO BIÓLOGO

P R E S E N T A:

REYES OZUNA FABIOLA ROCIO

ASESORA:

Dra. Elizabeth Piñón Segundo

COASESORA:

Dra. María Guadalupe Nava Arzaluz



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

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

ASUNTO: VOTO APROBATORIO

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

**ATN: I.A. LAURA MARGARITA CORTAZAR FIGUEROA
Jefa 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: Trabajo de Tesis

Cuantificación de Clotrimazol encapsulado en nanopartículas de acetato ftalato de celulosa para administración vaginal.

Que presenta la pasante: **Fabiola Rocio Reyes Ozuna**

Con número de cuenta: 301325554 para obtener el Título de la carrera: Química Farmacéutico Biológica.

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 09 de Mayo de 2018.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	DESS. Rodolfo Cruz Rodríguez	
VOCAL	Dr. David Quintanar Guerrero	
SECRETARIO	Dra. Elizabeth Piñón Segundo	
1er. SUPLENTE	M.AE. Francisco Javier Flores Rivera	
2do. SUPLENTE	M. en C. Guadalupe Alvarez Avila	

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

LMCF/cga*

Este trabajo fue realizado en el Laboratorio de Sistemas Farmacéuticos de Liberación Modificada (L-13) de la Unidad de Investigación Multidisciplinaria de la FES-Cuautitlán, UNAM.

Investigación realizada gracias al programa UNAM-DGAPA-PAPIIT-IN221717 y al PIAPI 1803, FES-Cuautitlán, UNAM.

Agradecimientos

Quiero ofrecer estas líneas en agradecimiento a todas aquellas personas que de una u otra manera me han impulsado a ser lo que soy, a aquellos quienes con su ejemplo, entusiasmo, apoyo, dedicación, consejos, sueños, sonrisas, llantos, diferencias y proyectos, han hecho de mi un profesional.

Agradezco a dos de los pilares fundamentales en mi formación, a mis abuelos Consuelo Urbina y Rogelio Ozuna, quienes a través de su amor y educación se convirtieron en mis padres incondicionales, en mi inspiración y en el ejemplo a seguir, impulsándome siempre a ser una mejor persona.

A Socorro y Margarito, ¡Son los padres perfectos!, gracias por dejarme ser libre y apoyar cada decisión en mi vida, por aceptar y respetar mi forma de ser, por enseñarme a soñar sin límites, a trabajar para cumplir cada meta, a disfrutar del camino sea cual sea la forma en que éste se presente. Gracias por su apoyo y el amor que siempre me han brindado.

Laura, Gerardo (Toto), Gabriela y Daniel, mis amados hermanos, con los que descubrí este hermoso mundo y sus particularidades, a ustedes, mil gracias por tomarnos juntos de la mano e ir tejiendo nuestros destinos, gracias por rodearme de amor y felicidad, por creer en mí y enseñarme que la vida son momentos irrepetibles que deben disfrutarse con todos los sentidos, valoro enormemente su amor incondicional. Los amo, gracias por existir.

A Norma, Eddy, Hugo, Cecilia, Carlos, Rogelio, José Luis y Martín por forjar mi carácter, brindarme su amor y mostrar siempre su generosidad, por apoyarme en circunstancias inolvidables haciéndome sentir orgullosa de quien soy y de mis raíces, gracias por estar y por otorgarme la gran bendición de ser parte de su familia.

A Eduardo Jiménez y Sofy Cerero por ayudarme a comprender particularidades de la vida, por su amor e ingenuidad y por enseñarme a conocer un mundo diferente.

También quiero aprovechar la oportunidad para agradecer a todas aquellas personas que me han ayudado a construir mi formación profesional, a quienes han hecho de Fabiola Reyes, un digno representante de esta gloriosa casa de estudios.

Dra. Elizabeth Piñón Segundo, gracias por confiar siempre en mí y darme la oportunidad de formar parte de su equipo de trabajo. Por todas las enseñanzas profesionales y personales. Gracias por regresar mi confianza y demostrarme que aún existen personas dignas de admirar por su compromiso en la vida y en el trabajo. Gracias por su ética profesional, por ser incondicional y por su generosidad

para cualquier circunstancia. Gracias Doctora Eli por mostrarme lo valioso que es el respeto. Agradezco a Dios por poner en mi camino a la mejor asesora del mundo.

Dra. Guadalupe Nava Arzaluz, por su paciencia, guía y enseñanzas. Por darme la oportunidad de trabajar y aprender de usted. Gracias por su apoyo y por alentarme cuando ya no tenía fuerzas.

Dra. Adriana Ganem Rondero, agradezco enormemente su confianza, por permitir el acceso a sus instalaciones, equipo, material y por hacerme sentir parte de sus colaboradores. Gracias doctora por su afecto y generosidad.

Norma Ozuna, por ser la amiga fiel que guía mis pasos y corrige amorosamente mi ser, gracias por tu presencia y por enseñarme con ejemplo que la vida se transforma con decisión y trabajo. ¡Te quiero mucho!

Mónica Ruiz, por fungir en mi vida como otra hermana, gracias por tu amistad leal y sincera. Tu apoyo ha sido tan importante no solo para la tesis, también has estado de soporte en mi vida. Gracias por las sonrisas, los detalles, las sorpresas y todo el tiempo a lo largo de estos años que has invertido para fortalecer este lazo. ¡Te quiero mucho Oti!

Mayra Ramírez mi compañera de viaje por la facultad, gracias por ser mi amiga y confidente, por los momentos de estudio, fiesta, frustración, amor y desamor, gracias porque al final te convertiste en la única de mi generación.

Karen Chabeli, Emilio Pineda, Viridiana Osorio, Jobany Calvillo, Felipe Vásquez, Marcos Rodríguez, Alejandra González y Sandra Anzures, a cada uno le agradezco su tiempo, palabras, apoyo. Gracias por estar cuando más los necesito y por darme las palabras adecuadas cambiando el enfoque de los problemas para encontrar soluciones, por formar parte de mi vida con su inigualable amistad.

Gracias Andrea Mora por ser mi amiga y colaboradora, por estar siempre al pendiente e impulsar con cariño mi avance profesional y personal.

A mis compañeros y amigos del Laboratorio de Sistemas Farmacéuticos de Liberación Modificada. Mony Rivera, Miriam García, Ana Nieto, Ulises Martínez, Alejandra Gómez Loo, Joel Morales y Jorge González, por compartir sus conocimientos, brindarme su tiempo, su amistad y apoyo a lo largo de este proyecto. Especialmente a María del Rocío Lara Sánchez, por brindarme las herramientas desde el primer día para alcanzar mis objetivos, gracias por los consejos, por las ideas y por las imágenes inéditas que me obsequiaste para el método de preparación de las nanopartículas, gracias por tu amistad sincera y el apoyo en todos los aspectos, por ser pieza fundamental en el rompecabezas de esta investigación.

A mis compañeros y amigos del laboratorio L-322. A Gisela González, Sergio Bernal. Marcela Vargas y Teresa Pineda. Por hacerme sentir parte de su equipo y cobijarme con cariño y respeto cada día de trabajo en mi estancia en el laboratorio. Especialmente a Marco Antonio Espinosa, por darme su amistad y dedicar su valioso tiempo para escuchar y aconsejar. Gracias Marquito por tu compañía desde el servicio, por enseñarme a ver siempre el lado bueno de la gente, por encontrar virtudes en lugar de defectos, por comprender en lugar de juzgar y por solucionar en vez de pelear. Gracias por tu valiosa amistad.

Y finalmente, con todo mi corazón y sobre todo y ante todo, a ti Dios mío por ser el suspiro que le da sentido a mi vida.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.	1
2. MARCO TEÓRICO.	3
2.1. Nanociencia.	3
2.2. Nanopartículas poliméricas.	4
2.3. Métodos de preparación de nanopartículas poliméricas.	7
2.3.1. Emulsificación- evaporación.	7
2.3.2. Desplazamiento de disolvente.	8
2.3.3. Método de “ <i>salting-out</i> ”.	9
2.3.4. Emulsificación-difusión.	10
2.4. Infecciones Vaginales.	11
2.4.1. Bacteriosis vaginal.	13
2.4.2. Vaginitis aeróbica.	14
2.4.3. Candidiasis vulvovaginal.	14
2.5. Administración vaginal.	17
2.6. Clotrimazol (CLOT).	19
2.7. Acetato ftalato de celulosa (CAP).	21
3. OBJETIVOS E HIPÓTESIS.	23
Objetivo General	23
Objetivos Particulares	23
Hipótesis	23
4. PARTE EXPERIMENTAL	24
4.1. Reactivos, material y equipo.	24
4.1.1. Reactivos.	24
4.1.2. Material y equipos.	25
5. METODOLOGÍA.	26
5.1. Nanopartículas obtenidas por el método emulsificación-difusión.	26
5.2. Evaluación de nanopartículas.	27
5.2.1. Tamaño de partícula.	27
5.2.2. Potencial Z.	27

5.2.3. Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC).....	27
5.2.4. Cuantificación de alcohol polivinílico.....	28
5.3. Cuantificación del clotrimazol.....	28
5.3.1. Método directo (espectrofotometría UV-VIS).....	28
5.3.2. Método indirecto (espectrofotometría UV-VIS con reactivo DDQ).	29
5.3.3. Cuantificación de clotrimazol por Cromatografía de capa fina de alta resolución (HPTLC).	33
5.4. Liberación del clotrimazol a partir de nanopartículas poliméricas de acetato ftalato de celulosa.	36
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	37
6.1. Preparación de nanopartículas	39
6.2. Caracterización de nanopartículas.....	40
6.2.1. Tamaño de partícula.	40
6.2.2. Potencial Z.....	42
6.2.3. Calorimetría.	44
6.2.4. Cuantificación de alcohol polivinílico.....	45
6.3. Cuantificación de clotrimazol	47
6.3.1. Método directo (espectrofotometría UV-VIS).....	47
6.3.2. Método indirecto (espectrofotometría UV-VIS con reactivo DDQ).	51
6.3.3. Cuantificación de clotrimazol por HPTLC.	56
6.4. Liberación de clotrimazol en nanopartículas poliméricas de acetato ftalato de celulosa.....	61
7. CONCLUSIONES	70
8. PERSPECTIVAS.....	71
9. REFERENCIAS.....	72
ANEXO	76

ÍNDICE DE FIGURAS

Fig. 1. Representación esquemática de nanoesfera y nanocápsula.....	5
Fig. 2. Representación esquemática del método emulsificación- evaporación.....	7
Fig. 3. Representación esquemática del método desplazamiento de disolvente. ...	8
Fig. 4. Representación esquemática del método "salting-out".....	9
Fig. 5. Representación esquemática del método emulsificación – difusión (Lara, 2015).....	11
Fig. 6. Distribución de tamaño de partícula para NP´s de LC(a), L1(b), L2(c).	41
Fig. 7. Medición de Potencial Z para NP´s de LC(a), L1(b), L2(c).	43
Fig. 8. Termograma de CLOT, CAP, PVA y Lote de NP´s.....	45
Fig. 9. Curva de calibración de PVAL.	47
Fig. 10. Barrido espectrofotométrico de LSS a diferentes concentraciones de 200 a 400 nm.	48
Fig. 11. Curva de calibración de CLOT en FVS con LSS 1%.	49
Fig. 12. Barrido espectrofotométrico de CLOT y CAP en FVS con LSS al 1% de 200 a 400nm.	50
Fig. 13. Barrido espectrofotométrico de 350 a 600 nm de CLOT y CAP en reacción con DDQ.....	51
Fig. 14. Barridos espectrofotométricos de la solución de CLOT con reactivo DDQ a los tiempos 0, 10, 20,30, 60 y 120 min.....	52
Fig. 15. Barridos espectrofotométricos de la solución de CLOT con reactivo DDQ a los tiempos 0, 10, 20,30 min.....	52

Fig. 16. Barridos espectrofotométricos de la solución de CLOT con reactivo DDQ (variando el volumen del reactivo).....	53
Fig. 17. Interacción de FVS con reactivo DDQ	56
Fig. 18. Cromatograma de CLOT en diferentes sistemas.....	58
Fig. 19. Curva de calibración en HPTLC de CLOT en FVS con Tween® 20 al 3%.	59
Fig. 20. Liberación de CLOT en FVS con Tween® 20 al 3%.....	61
Fig. 21. Liberación de CLOT en NP's poliméricas de CAP utilizando como medio FVS con Tween® 20 al 3%.	62
Fig. 22. Estabilidad de Solución de CLOT en FVS.	63
Fig. 23. Perfil de liberación del CLOT a partir de NP's de CAP (Lote 1).	66
Fig. 24. Perfil de liberación del CLOT a partir de NP's de CAP (Lote 2)	66
Fig. 25. Promedio de la cantidad liberada de fármaco del lote 1, aplicando el modelo de Peppas.	67
Fig. 26. Promedio de la cantidad liberada de fármaco del lote 2, aplicando el modelo de Peppas.	67
Fig. 27. Ajuste de los datos de liberación del CLOT a partir de las NP's de CAP al modelo de Higuchi (lote 1).....	68
Fig. 28. Ajuste de los datos de liberación del CLOT a partir de las NP's de CAP al modelo de Higuchi (lote 2).....	69

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Fármacos utilizados en el tratamiento de la vaginitis (http://w20.ssaver.gob.mx ; García, 2011).	16
Tabla 2. Mezclas para evaluar la especificidad del método.	33
Tabla 3. Métodos para obtener NP's de CAP con CLOT.	38
Tabla 4. Curva de calibración de PVAL.	46
Tabla 5. Resultados de la cuantificación PVAL en los lotes (1,2 y C).	47
Tabla 6. Curva de calibración de CLOT en FVS con LSS 1%.	49
Tabla 7. Curva de calibración de CLOT utilizando reactivo DDQ.	54
Tabla 8. Resultados de la cuantificación de CLOT en los lotes (1,2 y C).	55
Tabla 9. Curva de calibración de CLOT utilizando HPTLC.	59
Tabla 10. Método analítico para cuantificar CLOT por HPTLC.	60
Tabla 11. Mecanismo de transporte y tipo de liberación con base al exponente de difusión "n" de acuerdo al modelo de Peppas.	65
Tabla 12. Resultados de los exponentes de difusión "n" de acuerdo al modelo de Peppas.	65
Tabla 13. Constantes de velocidad de liberación de CLOT de acuerdo al modelo de Higuchi.	68

Lista de abreviaturas

Acetato Ftalato de Celulosa	CAP
Alcohol Polivinílico	PVAL
Bacteriosis Vaginal	BV
Calorimetría Diferencial de Barrido	DSC
Candidosis Vulvovaginal	CVV
Clotrimazol	CLOT
Coeficiente de Variación	C.V.
Cromatografía de capa fina de alta resolución	HPTLC
Desviación estándar	D.E.
Dispersión dinámica de luz	DLS
Donador-Aceptor original	DA
Fluido Vaginal Simulado pH=4.2	FVS
<i>Gardnerella vaginalis</i>	G. vaginalis
Lauril Sulfato de Sodio	LSS
Lote 1	L1
Lote 2	L2
Lote CAP	LC
Metil Etil Cetona	MEC
Nanopartículas	NP's
Poli (ácido glicólico)	PGA
Poli (ácido láctico)	PLA
Polidispersidad	PDI
Poli-ϵ-caprolactona	PCL
Reactivo 2,3-dicloro-5,6-diciano-p-benzoquinona	DDQ
Vaginitis Aeróbica	VA
Virus de la Inmunodeficiencia Humana	VIH
Virus del Herpes	HSV

1. INTRODUCCIÓN.

El Clotrimazol (CLOT) es un antifúngico de amplio espectro perteneciente al grupo de los imidazoles. Su toxicidad es baja y es utilizado ampliamente para tratar infecciones del tracto vaginal. Una concentración de 3 µg/mL es efectiva para inhibir diferentes especies de hongos, en particular especies de *Candida*, que son responsables de la vulvovaginitis (Pasqualotto, et al, 2008).

El desarrollo de la nanotecnología en diversas áreas incluye la administración de fármacos en sistemas coloidales, su principal utilidad es mejorar la biodisponibilidad del fármaco y reducir al mínimo los efectos secundarios de éste mediante el transporte de las moléculas a los lugares deseados. Ha sido eficaz para la administración de fármacos que presentan escasa solubilidad acuosa.

Los sistemas coloidales acarreadores de fármacos son capaces de liberar principios activos en sitios específicos del cuerpo (Piñón, 2005). La nanoencapsulación de fármacos incrementa la eficiencia, especificidad, tolerabilidad e índice terapéutico del principio activo (Lara, 2015). Las nanopartículas (NP's) pueden ser definidas como partículas coloidales sólidas con talla submicrónica. En la actualidad existen diversos métodos para preparar NP's poliméricas. Son técnicas similares en donde una solución orgánica que contiene los componentes de la nanopartícula funciona como una fase interna durante la preparación y una solución acuosa que contiene estabilizadores constituye el medio de dispersión (Quintanar-Guerrero, et al., 1998). La obtención de NP's con características homogéneas depende, entre otros factores, de la adecuada selección de la técnica de preparación (Lara, 2015).

Las NP's se caracterizan en términos de tamaño, morfología, contenido de principio activo, y liberación de fármaco *in vitro* (Reyes y Rivera, 2015). En el grupo de investigación del Laboratorio de Sistemas Farmacéuticos de Liberación Modificada se desarrollaron tesis que proponen la inclusión de antimicóticos en NP's poliméricas de Acetato Ftalato de Celulosa (CAP) para potencializar las propiedades microbidas de este polímero en el tratamiento de infecciones

vaginales. Además, se observó que el CAP es estable en fluido vaginal (condiciones ácidas).

En revisiones biblio-hemerográficas no se encontró un método de cuantificación validado de CLOT en NP's de CAP. La importancia del método analítico es conocer la encapsulación del principio activo y el comportamiento de éste en la liberación *in vitro*. La validación analítica es un requisito clave para evaluar y demostrar la confiabilidad de un método idóneo (Renger, et al., 2011).

2. MARCO TEÓRICO.

2.1. Nanociencia.

Richard Feynman en su discurso “hay mucho espacio en la parte inferior” de 1959 mencionó la posible existencia de la nanociencia. Feynman especuló sobre lo que podría estar en la escala molecular y desafió a la comunidad técnica “a encontrar maneras de manipular y controlar cosas en pequeña escala”. Inspirado por la visión de Feynman, la nanociencia se define hoy como; el estudio de la manipulación y el control de los materiales a escala molecular, es decir, un orden de escala espacial menores de cien nanómetros. Menos de un milésimo de la anchura de un pelo humano. La extraordinaria característica de la nanociencia es que permite la adaptación y la combinación de propiedades de la materia a nivel físico, biológico y de ingeniería, un nivel muy bajo de bloques arquitectónicos de la naturaleza. La nanotecnología se ha desarrollado en diversas áreas; electrónica, materiales conductores, sensores, biotecnología, tecnología ambiental, medicina, entre otras, incluyendo a las NP’s para la administración de fármacos (Goddard III, et al., 2007).

El diseño y la síntesis de sistemas eficaces de administración de fármacos son de vital importancia para la medicina. La innovación y la nanotecnología han impulsado sinérgicamente el avance de la administración de fármacos. La química de los materiales permite la generación de sistemas biodegradables, biocompatibles, sensibles al medio ambiente y sistemas de entrega dirigidos. La nanotecnología permite controlar el tamaño, la forma y la multifuncionalidad de las partículas (Zhang, et al., 2013).

Su principal utilidad es mejorar la biodisponibilidad del fármaco y reducir al mínimo los efectos secundarios de éste mediante el transporte de las moléculas a los lugares deseados. Se puede aumentar el tiempo de circulación de los fármacos dentro del organismo, ya que las partículas más grandes tienden a ser eliminadas mucho más rápido que las más pequeñas, mejoran las velocidades de disolución debido al aumento de superficie y potencial químico y ha sido eficaz para la

administración de fármacos que presentan escasa solubilidad (Shekunov, et al., 2006).

2.2. Nanopartículas poliméricas.

Las NP's pueden definirse como partículas sólidas coloidales que varían en tamaño de 10 a 1000 nm (1 μ m), formadas por materiales macromoleculares en los que el principio activo (fármaco o material biológicamente activo) se disuelve, se entrapa, encapsula, adsorbe o adjunta en la matriz de la nanopartícula (Kreuter, 2007). La matriz puede ser elaborada con infinidad de materiales como son; polímeros no biodegradables, polímeros biodegradables, lípidos, proteínas, o polisacáridos, proporcionándoles nuevas ventajas como nanoacarreadores biocompatibles. (Breunig, et al., 2008). Si se comparan con otros acarreadores coloidales, como los liposomas, las NP's presentan una mayor estabilidad, cuando están en contacto con fluidos biológicos; debido a su naturaleza polimérica son más susceptibles de convertirse en sistemas de liberación prolongada y controlada (Quintanar-Guerrero, et al., 1998).

Las NP's se pueden dividir en dos grupos: nanoesferas y nanocápsulas, como se muestra en la figura 1; las nanoesferas son sistemas matriciales en las cuales el fármaco está física y uniformemente dispersado o adsorbido, mientras que las nanocápsulas son sistemas en los cuales el fármaco se encuentra en una cavidad oleosa rodeado por una membrana polimérica, o adsorbido en ésta (Kumari et al., 2010).

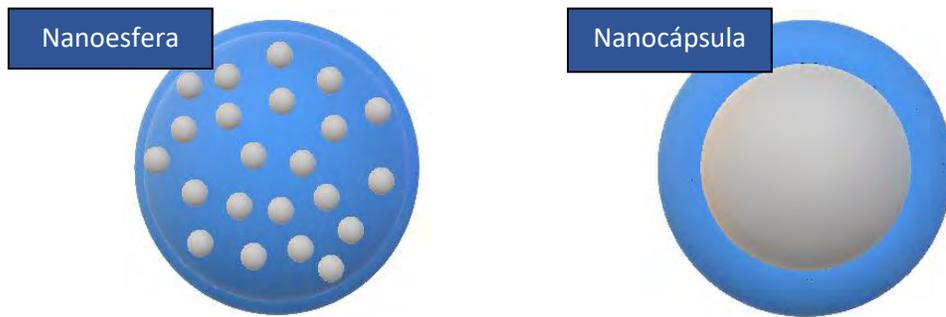


Fig. 1. Representación esquemática de nanoesfera y nanocápsula.

Las NP's pueden usarse para administrar fármacos hidrófilos, fármacos hidrófobos, proteínas, vacunas, macromoléculas. Pueden ser formuladas para la entrega dirigida al sistema linfático, cerebro, paredes arteriales, pulmones, hígado, bazo, o para la circulación sistémica a largo plazo. Por lo tanto, existen numerosos protocolos para sintetizar NP's basados en el tipo de fármaco utilizado. Una vez que se elige un método, los parámetros deben adaptarse para crear las mejores características posibles. Cinco de las características más importantes son: tamaño, encapsulación, eficiencia, potencial zeta (carga superficial) y características de liberación (Hans, et al., 2007).

Los materiales utilizados para preparar NP's pueden clasificarse en dos grupos: polímeros sintéticos y compuestos, tales como proteínas y lípidos. Se han propuesto diversos métodos para preparar NP's de compuestos naturales, que implican el uso de calor o sonicación, altos volúmenes de disolventes o aceites orgánicos y productos químicos tóxicos. Por otra parte, la incertidumbre de la fuente y pureza de la macromolécula y el potencial de antigenicidad restringe el uso de este tipo de NP's. También se han reportado inconvenientes para NP's poliméricas preparadas por polimerización de monómeros dispersados. La mayoría de las NP's formadas a partir de estos monómeros no son biodegradables y algunos subproductos pueden no ser totalmente biocompatibles, pueden contener residuos tóxicos tales como monómeros, oligómeros o la persistencia de los catalizadores, además, pueden ocurrir reacciones cruzadas con el fármaco o degradación de los componentes

cuando la radiación se utiliza para inducir la polimerización (Quintanar-Guerrero, et al., 1998).

Los polímeros sintéticos han recibido significativamente más atención que los naturales debido a lo mencionado en el párrafo anterior, los más utilizados para las NP's han sido: poli- ϵ -caprolactona (PCL), poli (ácido láctico) (PLA), poli (ácido glicólico) (PGA) y sus copolímeros, entre otros. Estos polímeros son conocidos por su biocompatibilidad y por su excreción a través de vías naturales, además, la velocidad de degradación y, en consecuencia, la velocidad de liberación del fármaco puede manipularse variando la relación de PLA o PGA. Se han desarrollado varios sistemas de administración con estos polímeros para minimizar los efectos secundarios (Hans, et al., 2007).

La biocompatibilidad de los monómeros es el fundamento de la biocompatibilidad del polímero. Las propiedades de degradación son afectadas por la cristalinidad, el peso molecular, la temperatura de transición vítrea y la hidrofobicidad del monómero. La solubilidad de los polímeros en disolventes orgánicos es un factor importante que debe ser considerado en la fabricación de sistemas de liberación de fármacos (Piñón, 2008).

El desarrollo de productos biodegradables y la garantía de un proceso robusto de producción requieren un conocimiento exhaustivo de los materiales y el proceso a utilizar. Hoy en día existen varios métodos para preparar NP's, en consecuencia, se han llevado a cabo extensos estudios y los equipos de investigación han publicado revisiones sobre las técnicas, materiales y mecanismos de formación para la preparación de NP's (Mora-Huertas, et al., 2011). Quintanar Guerrero y colaboradores clasifican las técnicas de preparación a partir de polímeros preformados en cuatro categorías (Piñón, 2008):

- a) Emulsificación-evaporación.
- b) Desplazamiento de disolvente.
- c) Método "*salting-out*" o inmiscibilidad por soluciones salinas.
- d) Emulsificación-difusión.

2.3. Métodos de preparación de nanopartículas poliméricas.

2.3.1. Emulsificación- evaporación.

En este método el polímero y fármaco hidrófobo se disuelven en un disolvente orgánico tal como; diclorometano, cloroformo o acetato de etilo, ésta mezcla se emulsiona con una solución acuosa que contiene tensioactivo o emulsionante para formar una emulsión aceite en agua (o / w). Después de la formación de una emulsión, el disolvente orgánico se evapora reduciendo la presión o agitando continuamente, induciendo la precipitación del polímero. Con el fin de disminuir y homogeneizar el tamaño de partícula, pueden emplearse homogeneización de alta velocidad o ultrasonificación (Mohanraj y Chen, 2006), en la figura 2 se esquematiza este método.

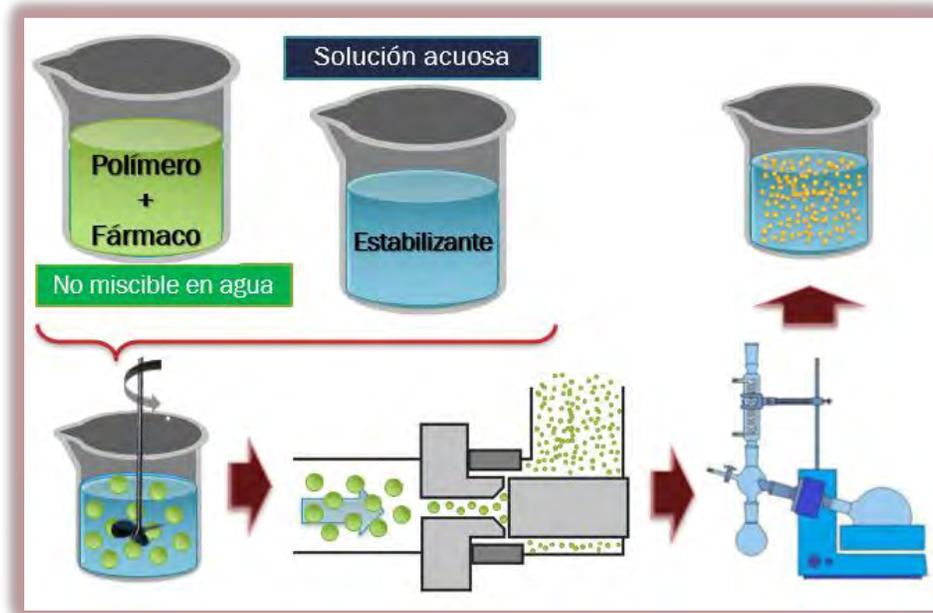


Fig. 2. Representación esquemática del método emulsificación- evaporación.

2.3.2. Desplazamiento de disolvente.

El desplazamiento de disolventes y la emulsificación-difusión son los métodos más utilizados para preparar NP's biodegradables. La diferencia principal entre ellos es el procedimiento, que resulta de la miscibilidad total o parcial del o los disolventes orgánicos utilizados en agua (Mora-Huertas, et al., 2011).

Este método también conocido como nanoprecipitación, fue descrito y patentado por Fessi y colaboradores, consiste en dos fases, una acuosa y otra orgánica; la primera es constituida por los estabilizantes disueltos en agua y la segunda se compone de la sustancia activa y el polímero biodegradable disueltos en un disolvente miscible en agua como la acetona. La fase orgánica es adicionada lenta y constantemente a la fase acuosa con agitación magnética constante, formándose instantáneamente las NP's por la rápida difusión del disolvente que favorece la precipitación del polímero. La acetona es evaporada a presión reducida, la figura 3 presenta esta técnica de preparación (Quintanar Guerrero et al, 1998; Reyes y Rivera, 2015).

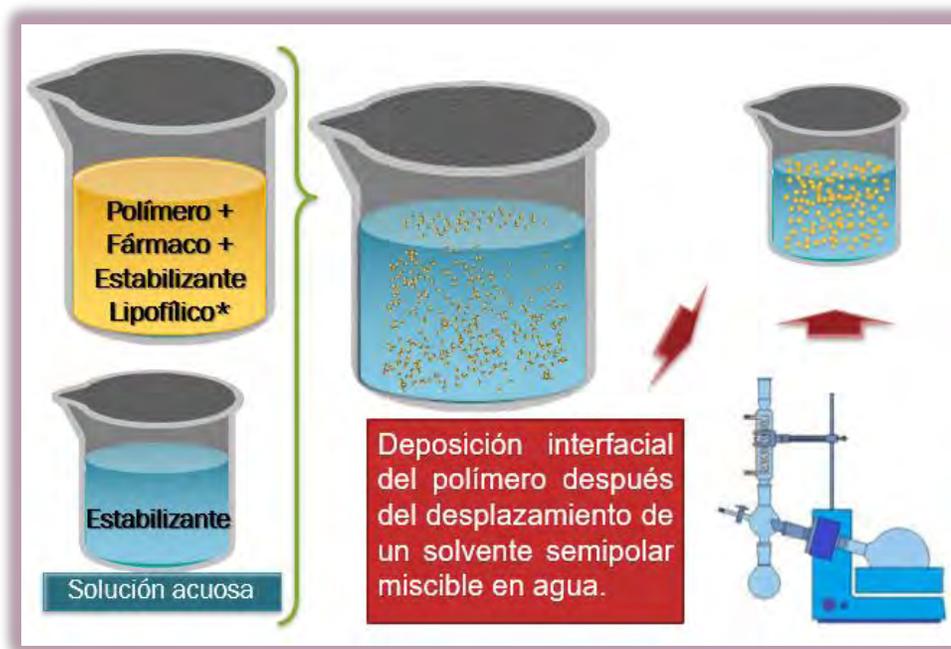


Fig. 3. Representación esquemática del método desplazamiento de disolvente.

2.3.3. Método de “salting-out”.

Este método es ampliamente utilizado en la industria, debido a su alto rendimiento, pureza, velocidad y sencilla operación. El método no exige tratamiento térmico en el procesamiento de la muestra y, por tanto, es especialmente útil para la incorporación de fármacos termolábiles. Se basa en el fenómeno de solubilidad, en donde, esta se reduce a través de la adición de un electrolito a un no electrolito en agua. Aunque se trata de una etapa de emulsificación, se evita el uso de tensioactivos y disolventes clorados. El estabilizante soluble en agua se añade a una solución saturada de electrolito (por ejemplo, cloruro de sodio, acetato de magnesio o cloruro de magnesio) alcanzando la consistencia de un gel viscoso. Posteriormente, el polímero y el fármaco son disueltos en un disolvente orgánico. La acetona se utiliza frecuentemente como disolvente debido a sus propiedades solubilizantes. La adición de la fase orgánica al gel viscoso bajo agitación continua provoca la salificación del disolvente orgánico, induciendo la formación de NP’s en un medio orgánico-acuoso. Finalmente, el disolvente y electrolito son eliminados por filtración de flujo cruzado (Toth, et al., 2005; Mishra, et al., 2010). En la figura 4 se esquematiza este método.

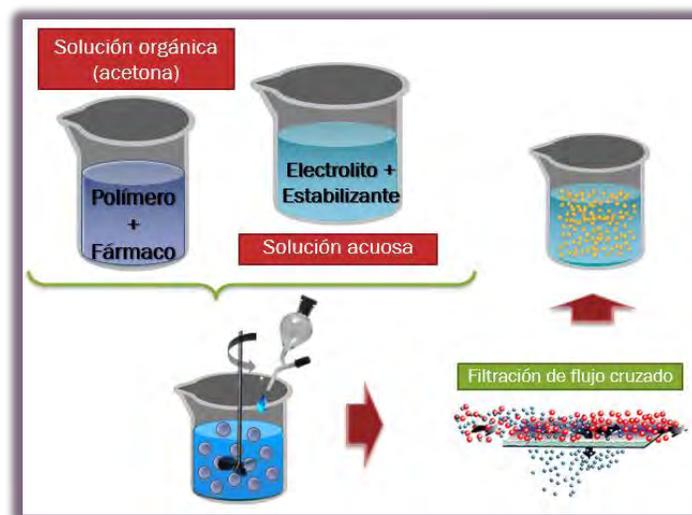


Fig. 4. Representación esquemática del método “salting-out”.

2.3.4. Emulsificación-difusión.

La técnica de emulsificación – difusión fue patentada en 1999 (Quintanar-Guerrero, et al., 1999), parte de un polímero preformado e involucra el uso de un disolvente parcialmente miscible en agua, el cual debe ser previamente saturado en agua para asegurar el equilibrio termodinámico inicial de ambos líquidos. El polímero se disuelve en el disolvente saturado con agua y esta fase orgánica se emulsifica bajo agitación vigorosa en una solución acuosa que contiene un estabilizante y que a su vez ha sido saturada con el disolvente orgánico. La subsecuente adición de agua libre (no saturada) al sistema causa que el disolvente difunda hacia la fase externa, resultando en la formación de las NP's (figura 5). Generalmente los disolventes que se utilizan son eliminados por destilación a presión reducida. Se ha demostrado que cada gota de la emulsión produce varias NP's y que éstas se forman por distintos fenómenos que ocurren en la interfase durante la difusión del disolvente. Sin embargo, la formación de las NP's no puede ser completamente explicada por las turbulencias producidas en la interfase, por lo que los autores han sugerido que las NP's se forman por la inestabilidad fisicoquímica que produce el transporte del disolvente, de manera similar al mecanismo utilizado para explicar los procesos de emulsificación espontánea. La difusión del disolvente desde las gotículas transporta consigo moléculas de polímero a la fase acuosa, formando regiones localizadas sobresaturadas, en las cuales se originan nuevos glóbulos o agregados de polímero (no totalmente desolvatados). La estabilización de estas NP's embrionarias por la presencia de un agente estabilizante es crucial para evitar coalescencia y formación de aglomerados durante y hasta la completa difusión del disolvente (Quintanar-Guerrero, et al., 1998; Piñón, 2008; Lara, 2015).

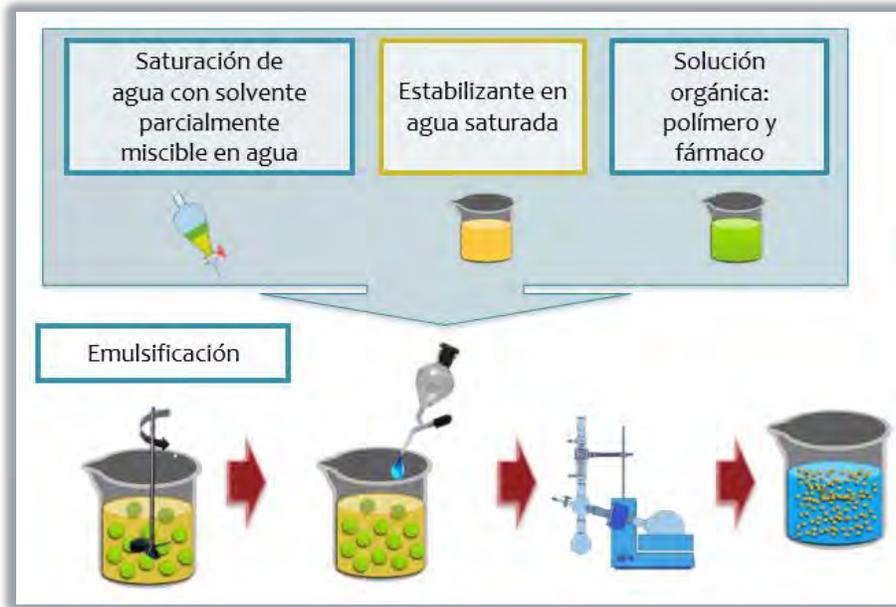


Fig. 5. Representación esquemática del método emulsificación – difusión (Lara, 2015).

2.4. Infecciones Vaginales.

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

Las secreciones vaginales normales se caracterizan por ser (Caballero, et al., 2000):

- a) Inodoras.
- b) Claras o blancas.
- c) Viscosas.
- d) Homogéneas o algo floculentas con elementos aglutinados.
- e) pH ácido < 4.5.
- f) No fluyen durante el examen del espéculo.
- g) Sin neutrófilos polimorfonucleares.

La microbiota vaginal sana es una barrera biológica importante para los microorganismos patógenos (Nardis, et al., 2013). La *Gardnerella vaginalis* (*G. vaginalis*) puede aislarse en el 5 a 60 % en las mujeres sanas sexualmente activas, el *Mycoplasma hominis* en el 15-30 % y existen concentraciones balanceadas de organismos facultativos y anaerobios. Las especies microbiológicas que se encuentran en la vagina de la mujer saludable en edad reproductiva tienen gran importancia, por ejemplo, los *Lactobacillus spp* producen peróxido de hidrógeno, a este compuesto se le han atribuido propiedades bacteriostáticas o bactericidas, dependiendo de la especie microbiana, dificultando la producción de bacterias catalasa negativas. Los bacilos producen ácido láctico a partir de la descomposición del glucógeno que se deposita en las células epiteliales de la vagina después de la pubertad. Este proceso hace que el pH normal de la vagina se ubique entre 3.8 y 4.4, excepto durante las menstruaciones, que fomenta el crecimiento de *lactobacilos* acidofílicos (bacilos anaerobios y facultativamente grampositivos) (Caballero, et al., 2000).

Se denomina vaginitis a la inflamación infecciosa o no infecciosa de la mucosa vaginal. Las causas pueden variar de acuerdo con la edad, en las niñas podría originarse por escasa o incorrecta higiene perineal. En mujeres de edad fértil por lo general se debe a infecciones que pueden ser causadas por bacterias, parásitos, virus u hongos. Existe también la vaginitis trófica que está relacionada con la menopausia o la vaginitis senil y la vaginitis traumática por cuerpos extraños que pueden generarse por tampones olvidados, por ejemplo, y también engloba la vaginitis causada por violaciones.

Existen varios factores que predisponen a la vaginitis, eventualmente se clasifican como endógenos y exógenos. Entre los endógenos se encuentran: enfermedades metabólicas como la diabetes, la anemia ferropénica, hipo e hipertiroidismo, enfermedades crónicas y VIH. Entre los factores exógenos se encuentran: el uso de prendas ajustadas, ropa interior sintética, obesidad, poca higiene, aerosoles y desodorantes vaginales, anticonceptivos orales, dispositivos intrauterinos, diafragma, duchas vaginales, también el uso de antibióticos, radiaciones,

inmunosupresores, gestágenos y corticoides, así como una dieta rica en carbohidratos y tratamientos hormonales (Padilla, 1997).

Cada una de las infecciones vaginales presenta características dinámicas y patológicas peculiares. Palmeira y colaboradores en 2015, hicieron una recopilación de las infecciones vaginales más comunes: Bacteriosis Vaginal (BV), Vaginitis Aeróbica (VA), Candidosis Vulvovaginal (CVV) y tricomoniasis. Descritas a continuación.

2.4.1. Bacteriosis vaginal.

Se identifica por un gran aumento en el número de bacterias endógenas, por lo general *G. vaginalis* y otros microorganismos patógenos como *Atopobium vaginae*, *Bacteroides spp.*, *Prevotella spp.*, *Peptostreptococcus spp.*, *Mobiluncus spp.* y *Mycoplasma hominis*. Esto es acompañado de una reducción significativa en el número de lactobacilos protectores, que explica un característico incremento en el pH vaginal (pH > 4.5) en comparación a un medio vaginal sano típico. La BV es, de acuerdo con varios autores, la infección vaginal más común en mujeres de edad reproductiva, aunque también puede afectar a las mujeres durante la menopausia, frecuentemente es asintomática. A pesar de su alta prevalencia, es la infección vaginal menos diagnosticada y se ha demostrado que, si no se trata, puede asociarse con complicaciones. Una de las principales limitaciones es que tiene una definición sindrómica, en otras palabras, cualquier combinación de tres de sus cuatro criterios de diagnóstico llamados Amsel (abundante dispersión vaginal cremosa y adherente, olor a pescado podrido, pH > 4.5, presencia de células clave en el frotis vaginal) conduce a un único diagnóstico. El olor, su síntoma más común, parece estar relacionado con los metabolitos, como aminas, producidas por patógenos y el bajo contenido de ácido debido a una disminución en la población de lactobacilos. Estas características dinámicas, junto con la observación microscópica de células vaginales exfoliadas cubiertas por *G. vaginalis*, son la base de los criterios diagnósticos de Amsel. Por otra parte, *G. vaginalis* parece ser la

única bacteria que expresa factores de virulencia relacionados con la infección por BV, lo que sugiere que las otras bacterias pueden ser oportunistas.

2.4.2. Vaginitis aeróbica.

Los datos microscópicos de infecciones vaginales causadas por bacterias sugirieron en algunos casos que las condiciones estaban completamente relacionadas con BV, ya que las bacterias aeróbicas predominan y hay signos de respuesta inflamatoria, pero existían bacterias que no se ajustaban completamente a los criterios de este diagnóstico, por lo que eran clasificadas como "flora intermedia", esto impulsó a la búsqueda de la nueva entidad. A diferencia de BV, esta condición está muy asociada con la inflamación, como lo confirma la observación microscópica de leucocitos y células parabasales en muestras vaginales y un significativo aumento en la cantidad de citocinas proinflamatorias en los lavados vaginales. Adicionalmente, los patógenos asociados con esta infección son distintos de los asociados con BV, siendo principalmente bacterias aeróbicas, como *Streptococos* del grupo B, *Escherichia coli* y *Enterococós*. Como los Lactobacilos son escasos en este medio vaginal, la concentración de lactato es muy baja, y el succinato, un metabolito producido por microorganismos anaerobios típicamente presentes en BV, está ausente. Los síntomas asociados con VA también son indicativos de una enfermedad inflamatoria, ya que los síntomas genitales son enrojecimiento del epitelio, baja descarga y dispareunia. Aunque el fluido vaginal presenta un pH > 5.0, no se presenta olor a pescado podrido en esta condición. La prevalencia de VA oscila entre el 5 % y el 10 % en mujeres no embarazadas.

2.4.3. Candidiasis vulvovaginal.

Los síntomas más comunes asociados con CVV son irritación y secreción vaginal, quemadura vulvar, prurito e inflamación. Aunque estos síntomas no son

exclusivamente relacionados con esta infección, cuando se asocian a una secreción vaginal tipo "queso cottage", homogéneamente gruesa a floculante, sin olor a leche o fermentación, da un panorama general que se ha considerado típico. Las mujeres a menudo tienen dispareunia, disuria y no pocas veces una leve hemorragia por fisuras y excoiaciones. El examen óptico revela eritema, hinchazón y fisuración de la vulva, con papular pustular discreto y perlas periféricas. El enrojecimiento difuso se extiende al epitelio vaginal. Dado que los síntomas de CVV no son patognomónicos, el diagnóstico exige la detección de células de levadura y formas miceliales (usualmente considerados fenotipos patógenos) en un examen de fluido vaginal al microscopio. El pH vaginal en tales casos es invariablemente normal (4.0-4.5). Uno de los retos más difíciles con respecto a *Candida spp.* es el comportamiento de su presencia en el medio vaginal. A pesar de la evidencia clara del papel de *Candida albicans* en CVV, solo puede aislarse de la vulva y/o la vagina hasta en un 20 % en las mujeres asintomáticas de edad reproductiva. Como los mecanismos de defensa vaginales parecen no actuar rápidamente, la presencia de levaduras en la vagina puede confundirse con un comensalismo, el cual no es verdadero sino un estado transitorio o una infección subclínica quiescente. Puede presentarse infecciones recurrentes causadas por cepas de levadura resistentes a pesar del tratamiento antifúngico prolongado. Las cepas aisladas antes y después del tratamiento son idénticas en más de dos tercios de las recurrencias. El proceso de colonización se ha relacionado con *Candida spp.* La existencia de un estado de colonización antes de la infección apoya la definición de *Candida spp.* como patógeno oportunista (Palmeira, et al., 2015).

Existen determinados medicamentos que son efectivos en el tratamiento de la vaginitis. El objetivo principal es eliminar las manifestaciones y signos de la infección vaginal. La tabla 1 muestra los medicamentos comúnmente recetados para el tratamiento de la vaginitis dependiendo del microorganismo a eliminar.

Tabla 1. Fármacos utilizados en el tratamiento de la vaginitis (<http://w20.ssaver.gob.mx>; García, 2011).

Microorganismo	Activo	Forma farmacéutica	Dosis
Bacterias	Metronidazol	Tabletas orales	500 mg
		Ampolletas	200 mg
		Suspensión	250 mg en 5 ml.
		Óvulos	500 mg
		Gel	0.75 %
	Clindamicina	Crema vaginal	2 %
		Tabletas orales	300 mg
Óvulos		100 mg	
Hongos o levaduras	Clotrimazol	Tabletas vaginales	100 mg
		Crema vaginal	1 %
		Tabletas vaginales	500 mg
		Supositorios vaginales	200 mg
		Supositorios vaginales	500 mg
	Miconazol	Crema	2 %
		Supositorios vaginales	---
	Nistatina	Tabletas vaginales	100000 UI
		Crema	2 %
	Fluconazol	Tabletas orales	100, 150 y 200 mg
	Butoconazol	Crema vaginal	2 %
	Ketaconazol	Óvulos	400 mg

Continuación Tabla 1. Fármacos utilizados en el tratamiento de la vaginitis (<http://w20.ssaver.gob.mx>; García, 2011).

Parásitos	Tinidazol	Tabletas orales	500 mg
	Metronidazol	Tabletas orales	500 mg
		Ampolletas	200 mg
		Suspensión	250 en 5 ml.
		Óvulos	500 mg
		Gel	0.75 %

2.5. Administración vaginal.

Mientras la vagina se consideraba un órgano pasivo, ahora es reconocida por ser parte del aparato reproductor femenino. Su relevancia como órgano funcional es en diferentes aspectos; desde la sexualidad hasta la homeostasis (Palmeira, et al., 2015). En 1918 la vagina era calificada como un órgano incapaz de absorber fármacos. Estudios posteriores revocaron este concepto erróneo mostrando efectividad terapéutica sistémica después de la administración vaginal de medicamentos. Aunque esta ruta ofrece un tratamiento de género específico, evita obstáculos asociados con la administración oral o parenteral, es decir; hepatotoxicidad del fármaco, metabolismo de primer paso, fluctuaciones de las concentraciones plasmáticas del fármaco, efectos secundarios, inconveniencia, irritación de la mucosa gastrointestinal, entre otras (Berginc, et al., 2012).

Los sistemas de administración utilizados para tratamientos vaginales incluyen soluciones (espumas, duchas), aerosoles, semisólidos (cremas, ungüentos, geles), tampones, tabletas, cápsulas, pesarios, supositorios, sistemas de partículas, anillos intravaginales, esponjas y polvos. En la actualidad se investigan y desarrollan sistemas de administración de fármacos para prevenir enfermedades de

transmisión sexual, como la infección por VIH. Estos sistemas están siendo desarrollados para entregar formulaciones intravaginales tópicas de agentes anti-VIH o microbicidas para prevenir la transmisión del virus en la mucosa (van Eyk and van der Bijl, 2005).

El desarrollo de formas farmacéuticas de administración vaginal está siendo un prominente campo de investigación. Sin embargo, la optimización de los sistemas de administración vaginal de fármacos todavía necesita un arduo trabajo para mostrar resultados prometedores en pruebas preclínicas (das Neves, et al., 2008). Con respecto a lo anterior, se han propuesto enfoques nanotecnológicos para mejorar la eficacia de fármacos comúnmente usados, y otras modalidades de tratamiento, como nuevos fármacos y/o medicamentos (Palmeira, et al., 2015).

La aparición de micro y nanotecnologías junto con la implementación de rutas de administración no invasivas e indoloras ha revolucionado el mercado farmacéutico y el tratamiento de la enfermedad. Con el objetivo de superar los principales inconvenientes de la vía oral la ingeniería de sistemas innovadores de administración de fármacos por rutas mucosales ha salido a la luz y ha ganado el interés de la comunidad científica debido a la posibilidad de cambiar drásticamente la farmacocinética del fármaco, mejorando así su eficacia terapéutica. Además, para lograr el objetivo de la administración de fármacos en la mucosa, el desarrollo de bioadhesivos se ha perfeccionado para adaptarse a aplicaciones específicas (Sosnik, et al., 2014).

La vagina no tiene glándulas secretoras; pero se encuentra una mezcla de fluidos originados de numerosas fuentes que componen la película superficial húmeda de este tejido. Este recubrimiento mucoso tiene varias funciones fisiológicas importantes y juega un papel significativo en la absorción de fármacos. La composición, volumen y propiedades reológicas de los fluidos vaginales se ven afectadas por la edad, la etapa del ciclo menstrual y la excitación sexual, lo que influye en el patrón de liberación de un fármaco a partir de un sistema de administración vaginal. Además, está bien establecido que cambios en el volumen, la viscosidad y el pH del fluido vaginal puede afectar la eficacia de los sistemas

administrados. Es importante destacar que, debido a la acción de autolimpieza del tracto vaginal, los tiempos de residencia de las formas de dosificación y los sistemas de administración serán reducidos, a menos que se modifiquen para esta ruta específica (das Neves et al., 2011)

Como ya se mencionó una característica que define a la mucosa vaginal es la presencia de una capa protectora de fluido llamado moco, que actúa como una barrera física contra los daños químicos y biológicos, así como un lubricante natural que se opone al daño por cizalla. Este fluido también desempeña importantes funciones homeostáticas, como la regulación del balance hídrico y el transporte iónico, la eliminación de restos celulares, la regulación inmune de la mucosa, el transporte de espermatozoides en el tracto cervicovaginal, entre otros (Litt M., 1984; Sosnik, et al., 2014).

La alta relación de área de superficie a volumen de nanosistemas es de suma importancia ya que la interfaz disponible para establecer enlaces aumenta drásticamente. Esto generalmente significa que, tras el establecimiento de interacciones adhesivas entre los nanosistemas y la mucina, se adhieren durante más tiempo.

La química de la superficie, la carga y el tamaño de los nanosistemas determinan su comportamiento mucoadhesivo. Estas propiedades se pueden ajustar para maximizar o minimizar las interacciones con los fluidos mucosos (Sosnik, et al., 2014), el contenido básico puede ser liberado por fricción, presión, cambio de la temperatura, difusión a través de la pared del polímero, disolución o biodegradación de la pared del polímero (Chun-Wah, et al., 2012).

2.6. Clotrimazol (CLOT).

Los hongos causan un amplio espectro de enfermedades. Los ejemplos más comunes son infecciones localizadas en la piel y membranas mucosas, tales como pie de atleta, infecciones vaginales e infecciones en las uñas. Los tratamientos

farmacológicos de estas enfermedades implican el uso de agentes antifúngicos tópicos, como terbinafina, clotrimazol, miconazol o ciclopirox (Chun-Wah, et al., 2012).

En los últimos años, ha aumentado el interés por las infecciones producidas por *Candida spp* y *Candida albicans* en particular, ya que la incidencia de estas infecciones ha aumentado considerablemente y se ha reconocido nuevas patologías basadas en este microorganismo. Las mucosas oral y vaginal se caracterizan por tener una biota normal, que consiste en un complejo de bacterias susceptible a provocar infecciones en condiciones fisiológicas extraordinarias; por ejemplo, *Candida albicans* la cual es un hongo ubicuo que normalmente se encuentra en la piel, estómago, colon, vagina, recto, boca y garganta. Cuando este organismo prolifera, puede producir infecciones que van desde condiciones relativamente insignificantes, hasta infecciones sistémicas cruciales en pacientes inmunodeprimidos y/o sometidos a quimioterapia (Esposito, et al., 2013).

El CLOT es un antifúngico sintético derivado del imidazol, utilizado ampliamente para el tratamiento de este tipo de infecciones. Infortunadamente, la administración oral de este fármaco no es conveniente debido a sus efectos secundarios (dolor en abdomen o estómago, diarrea, náuseas o vómito) y su corta vida media que requiere frecuente dosificación. Por estas razones, una administración tópica es adecuada y recomendada. Sin embargo, el CLOT presenta una solubilidad en agua muy baja, por lo que necesita ser incorporado en un vehículo apropiado para tener niveles adecuados de absorción. Cuando se aplica por vía tópica, el CLOT penetra en la epidermis, pero la absorción sistémica si se produce es muy baja. Tras la administración vaginal alcanza niveles de absorción del 3 al 10 % de la dosis (Esposito, et al., 2013), se metaboliza en el hígado a compuestos inactivos, que se excretan por heces u orina (www.drugbank.ca).

El CLOT es un fármaco común en medicina humana y veterinaria para el tratamiento de infecciones fúngicas, además, se ha informado que es activo contra bacterias gram-positivas como *estafilococos* y *estreptococos* (Kalhapure, et al., 2015). También se ha investigado su utilidad en el tratamiento de anemia falciforme, artritis

reumatoide, malaria (Tiffert et al., 2000), tuberculosis (Kelly et al., 2001; McLean et al., 2002) y se investigan derivados del CLOT como inmunosupresores (Wulff et al., 2000; Posbring, et al., 2009).

El CLOT pertenece a los diversos grupos de azoles que bloquean la síntesis de esterol, al inhibir la enzima 14α - desmetilasa dependiente del citocromo P450 (Stenersen, 2004). Los esteroides regulan la integridad estructural, la función de las membranas citoplásmicas y el crecimiento de hongos (Porsbring, et al., 2009), también inhibe la respiración endógena de los hongos al interactuar con los fosfolípidos de membrana y puede inhibir la transformación de levaduras a las formas miceliales (www.drugbank.ca).

Su fórmula es; 1- (2-cloro-fenil) difenilmetil-1H-imidazol, con identificación CAS-Reg.-No. 23593-75-1 (Esposito, et al., 2013). Es altamente lipófilo, con un pKa 6.12 considerándose una base débil, presenta baja solubilidad en rangos de pH 1 a 10 y tiene un punto de fusión de 141 a 145 °C (Buchanan, et al., 2007). Se propone encapsular el CLOT en nanopartículas poliméricas que permitan mejorar su eficacia terapéutica en el tratamiento de infecciones vaginales causadas por hongos, como la CVV.

2.7. Acetato ftalato de celulosa (CAP).

Actualmente, se están llevando a cabo investigaciones para desarrollar estructuras de polímeros biocompatibles en la ingeniería de tejidos óseos y nerviosos que puedan superar las limitaciones de los andamios estudiados previamente. Las numerosas características de los polímeros celulósicos como biocompatibilidad, biodegradabilidad y soporte mecánico a las células, optimizan su uso en la ingeniería de tejidos (García, et al.2017b).

Teniendo esto en cuenta, se ha explorado la posibilidad de utilizar uno de los derivados de celulosa más interesantes, el CAP, como biomaterial en ingeniería de

tejidos. En investigaciones recientes se ha encontrado que el CAP tiene propiedades antimicrobianas y antivirales (Shrestha, et al. 2016).

En aplicaciones vaginales se ha utilizado para prevenir la infección del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH-1), el virus del herpes (HSV I y II) y patógenos no víricos. (García, et al.2017b). Se ha observado que inactiva cepas como *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Haemophilus ducreyi* y *Trichomonas vaginalis*, sin afectar los lactobacilos de la flora vaginal natural, contribuyendo a la resistencia contra las enfermedades de transmisión sexual. Por lo tanto, las formulaciones de CAP cumplen los criterios de microbicidas y justifican una evaluación adicional *in vivo* en humanos (Neurath, et al., 1999).

El CAP es un polímero derivado de la celulosa utilizado con bastante frecuencia, las propiedades fisicoquímicas del CAP se han estudiado detalladamente desde 1998, se ha evaluado la distribución de masa molecular la degradación térmica y la temperatura de transición vítrea (Shrestha, et al. 2016). Se utiliza como excipiente en la preparación de formas farmacéuticas sólidas de liberación controlada y sostenida (García-Casas, et al., 2017a). En términos de seguridad se considera como no tóxico, apto para uso en biología humana (Neurath et al., 1999). Es un material conocido por su característica degradación en dependencia del pH, el bajo nivel de degradación en fluidos por debajo de pH 6.8 lo hacen muy resistente a los medios gástricos y se utiliza como un material de recubrimiento entérico (García, et al.2017b). Esta propiedad del CAP es benéfica en el caso de productos farmacéuticos dependientes del pH ya que ayuda a la administración dirigida del fármaco (Shrestha, et al. 2016).

3. OBJETIVOS E HIPÓTESIS.

Objetivo General:

Preparar y caracterizar nanopartículas de acetato ftalato de celulosa conteniendo clotrimazol por el método de emulsificación difusión y desarrollar métodos analíticos que permitan cuantificar el fármaco liberado de las nanopartículas en las pruebas *in vitro*.

Objetivos Particulares:

- a) Incorporar clotrimazol en nanopartículas poliméricas por el método de emulsificación-difusión usando como polímero acetato ftalato de celulosa y alcohol polivinílico como estabilizante.
- b) Caracterizar las nanopartículas poliméricas a través de su distribución de tamaño de partícula, potencial zeta e índice de polidispersión, cristalinidad, porcentaje de estabilizante residual, eficiencia de encapsulamiento y perfil de liberación *in vitro*.
- c) Desarrollar métodos analíticos para cuantificar el clotrimazol incluido en nanopartículas poliméricas de acetato ftalato de celulosa y el fármaco en los estudios de liberación *in vitro*.

Hipótesis:

Al desarrollar un método analítico para cuantificar clotrimazol permitirá conocer la cantidad de clotrimazol que puede incorporarse en nanopartículas poliméricas de acetato ftalato de celulosa y evaluar el perfil de liberación *in vitro* del clotrimazol a partir de las nanopartículas poliméricas utilizando bolsas de diálisis.

4. PARTE EXPERIMENTAL

4.1. Reactivos, material y equipo.

4.1.1. Reactivos.

- Clotrimazol (donación de Globe Chemicals S.A. de C.V., México)
- Acetato ftalato de celulosa P.M. 2534.12 A.C.S. (Sigma-Aldrich, USA)
- Metil etil cetona A.C.S. (Fermont, México)
- Acetona (Fermont, México)
- Metanol (Fermont, México)
- Hexano (Fermont, México)
- Alcohol polivinílico, Mowiol® 4-88 (Glomarza, México)
- Ácido bórico A.C.S. (Sigma-Aldrich, USA)
- Yoduro de potasio A.C.S. (Sigma-Aldrich, USA)
- Yodo A.C.S. (Sigma-Aldrich, USA)
- Ácido acético glacial R.A. (INDEQ, México)
- Tubos de Membrana de celulosa (anchura plana 10 mm (0.4in.) Sigma-Aldrich, USA)
- Lauril sulfato de sodio (Droguería cosmopolita, México)
- Tween® 20 (Droguería cosmopolita, México)
- Gelucire® 44/14 (GATTEFOSSE SAS) Francia
- Cloruro de sodio (Farmacia París, México)
- Hidróxido de potasio (Farmacia París, México)
- Hidróxido de Calcio (Farmacia París, México)
- Ácido láctico (Farmacia París, México)
- Glicerol (Farmacia París, México)
- Urea (Farmacia París, México)
- Glucosa (Farmacia París, México)

4.1.2. Material y equipos

- Balanza analítica (VE-204, VELAB), México
- Agitador multi plaza (RT 5, IKA), USA
- Agitador multi plaza (RT 10, IKA), USA
- Rotaevaporador (R 210, BUCHI), Suiza
- Baño Dubnoff (QUIMIS), Brasil
- Ultra-Turrax (T25, IKA), USA
- Potenciómetro (HI2211, Hanna instruments), USA
- Espectrofotómetro (Espectrofotómetro de UV Vis GENESYS™ 10S), USA
- Liofilizadora de mesa (Labconco®), USA
- Calorímetro Diferencial de Barrido (DSC Q10 TA), USA
- Zetasizer Nano ZS90 (Malvern), UK
- Aplicador automático para cromatografía de capa fina de alta resolución, Automatic TLC Sampler III versión 2.12 (CAMAG), Suiza
- Escaner 3 y software CATS versión 4.06 para cromatografía de capa fina de alta resolución (CAMAG), Suiza
- Programa estadístico Statgraphics® Centurion XVI
- Placas de sílica gel F254 (Macherey-Nagel), Alemania

5. METODOLOGÍA.

Los siguientes estudios fueron realizados en continuidad al trabajo que se lleva a cabo en el Laboratorio de Sistemas Farmacéuticos de Liberación Modificada, se tomaron como base los resultados obtenidos en los estudios de maestría de la alumna Rocío Lara Sánchez para preparar y estandarizar los lotes sin fármaco y obtener NP's de CAP cargados con CLOT por el método de emulsificación-difusión (Lara, 2015).

5.1. Nanopartículas obtenidas por el método emulsificación-difusión.

Preparación de nanopartículas.

En un embudo de separación, se agitaron y se mantuvieron en contacto durante 20 minutos un disolvente orgánico, en este caso la Metil Etil Cetona (MEC) y agua bidestilada para promover la saturación entre los dos líquidos. En el disolvente orgánico previamente saturado: se disolvió el polímero (400 mg de CAP) y el principio activo (100 mg de CLOT), para los lotes L1 y L2. En cambio, para el lote control (LC) únicamente se disolvió el polímero (400 mg de CAP). Posteriormente en el agua saturada se disolvió el estabilizante, Alcohol Polivinílico (PVAL) al 0.5 %. Se realizó la emulsificación de las soluciones con agitación mecánica utilizando un dispersor ultra-TURRAX (IKA T-25) a 17 000 rpm durante 10 min. Se agregó al sistema 120 ml de agua bidestilada y se mantuvo la agitación a 12 000 rpm durante 10 min. Se eliminó el disolvente orgánico reduciendo la presión con un rotaevaporador (Buchi® R-210).

Para eliminar el exceso de PVAL de la suspensión de NP's, se sometieron a ultracentrifugación (Ultracentrífuga Optima LE 80-K, Beckman, USA) a 20 000 rpm durante 25 min. Se decantó el agua y la pastilla se resuspendió en agua bidestilada y se centrifugó a las condiciones anteriores. El procedimiento se llevó a cabo por

triplicado. Se liofilizaron los lotes; Lote 1 (L1), Lote 2 (L2), y Lote LC en una liofilizadora de mesa (Labconco®, USA).

5.2. Evaluación de nanopartículas.

5.2.1. Tamaño de partícula.

Se determinó la talla de partícula promedio utilizando un Zetasizer Nano ZS90 (Malvern, UK). Las determinaciones se hicieron por triplicado para cada lote (L1, L2, LC), preparando suspensiones diluidas con agua bidestilada hasta alcanzar la concentración de partículas adecuadas. Previamente a la lectura las suspensiones se sonicaron durante 10 minutos para evitar la aglutinación. El análisis se llevó a cabo en un ángulo de incidencia de luz de 90° y temperatura de 25°C.

5.2.2. Potencial Z

Se agregó la suspensión de NP's a una celda capilar desechable, evitando agregar burbujas al capilar. Se determinó el potencial Z promedio utilizando un Zetasizer Nano ZS90 (Malvern, UK). Las determinaciones se hicieron por triplicado para cada lote (L1, L2, LC).

5.2.3. Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC).

En charolas de aluminio no herméticas se pesaron de 3 a 5 mg de muestra; Polvo de CLOT, polvo de CAP, NP's de CAP cargadas con CLOT y polvo de PVAL, posteriormente se escaneó cada muestra entre 0 y 400 °C a una velocidad de calentamiento de 10 °C/min utilizando un DSC Q10 (TA Instruments, USA).

5.2.4. Cuantificación de alcohol polivinílico.

Se agregaron 15 mg de NP's liofilizadas en 10 ml de MEC hasta sequedad. Se adicionaron 9 ml de agua bidestilada y se continuo la agitación magnética por 48 horas. La suspensión se filtró con una membrana de 0.1 μm y se recolectó en un matraz volumétrico de 10 ml llevando a volumen de aforo con agua bidestilada (a este proceso se le conoce como digestión de NP's para liberar los componentes de las nanoesferas). De este se tomó 1ml y se ajustó a 5 ml con agua bidestilada mezclándose con 2 ml de H_3BO_3 0.65 M y 1 ml de I_2 0.05 M en KI 0.15 M para formar un complejo colorido. El sistema se leyó en un espectrofotómetro UV-VIS (Thermoscientific, Genesys 10s) a una longitud de onda de 640 nm. La absorbancia obtenida se interpolo en una curva de calibración para obtener la concentración de PVAL en el sistema. La cuantificación de PVAL se realizó por triplicado.

5.3. Cuantificación del clotrimazol.

5.3.1. Método directo (espectrofotometría UV-VIS)

5.3.1.1. Preparación de fluido vaginal simulado.

Para este método el medio que se utilizó fue FVS. Se pesaron 3.51 g de NaCl, 1.40 g de KOH, 0.22 g de $\text{Ca}(\text{OH})_2$, 2 g de ácido láctico, 1 g de ácido acético, 0.16 g de glicerol, 1.4 g de urea, 5 g de glucosa, se disolvieron en agua destilada. Se midió el pH con un potenciómetro (Hanna Instruments HI 211), ajustándolo a 4.2 con HCl (1 N) o NaOH (1 N). La solución se llevó a un volumen de aforo de 1 litro con agua destilada (Huang, et al., 2012).

El fármaco es poco soluble en agua por lo que se realizaron pruebas de solubilidad para determinar al tensoactivo adecuado. Se evaluaron, Lauril Sulfato de Sodio (LSS) y Tween® 80, buscando solubilizar al CLOT en FVS. Se prepararon varios

sistemas; en 25 ml de FVS se agregaron 5 mg de CLOT y tensoactivo al 0.5 %, 1 %, 1.5 % y 2 %.

5.3.1.2. Curva de calibración del método directo (espectrofotometría UV-VIS)

Con base en la concentración teórica de CLOT incluido en las NP's de CAP, se construyó una curva de calibración de 0.062 a 0.372 mg/ml de CLOT, utilizando como medio FVS y de tensoactivo LSS al 1 %.

Se pesaron 32 mg de CLOT, se disolvieron y se llevaron a un volumen de aforo de 100 ml con FVS y LSS al 1 %. Se tomaron alícuotas de 1, 2, 3, 4, 5 y 6 ml en matraces aforados de 10 ml llevándose a volumen de aforo con FVS y LSS al 1 %. Los sistemas se leyeron en un espectrofotómetro UV-VIS (Thermoscientific, Genesys 10s) a una longitud de onda de 263nm

5.3.2. Método indirecto (espectrofotometría UV-VIS con reactivo DDQ).

Se evaluó la solubilidad de CLOT en metanol; disolviendo 25 mg de CLOT en 20 ml de metanol, se observó el sistema cada 20 min, sí se encontraban partículas suspendidas se adicionaban 5 ml de metanol hasta disolución completa.

5.3.2.1. Evaluación del reactivo.

Se pesaron 0.04 g del reactivo 2,3-dicloro-5,6-diciano-p-benzoquinona (DDQ) y se disolvieron en 10 ml de metanol. Se pesaron 0.02 g de CLOT, se disolvieron en 20 ml de metanol llevándose a un volumen de aforo de 25 ml, se tomó una alícuota de 5 ml y se llevó a un volumen de aforo de 10 ml con metanol. Posteriormente se tomó 1 ml de esta solución de CLOT y se agregó a un matraz volumétrico de 10 ml añadiendo 1 ml de la solución del reactivo DDQ. Se agitó manualmente el matraz durante 3 min y se llevó al volumen de aforo con metanol. Inmediatamente se realizó

un barrido espectrofotométrico en un intervalo de longitud de onda de 200 a 800 nm (Khashaba, et al. 2000).

Se evaluó la degradación del reactivo con respecto al tiempo. Se prepararon soluciones del CLOT y DDQ a las concentraciones descritas en el párrafo anterior, realizando barridos espectrofotométricos de 200 a 800 nm a diferentes tiempos (0, 10, 20, 30, 60 y 120 min).

A continuación, se valoró la concentración del reactivo, preparando soluciones del CLOT y DDQ a las concentraciones ya mencionadas. Al poner en contacto la solución del CLOT con DDQ se varió el volumen de reactivo (1, 2, 3, 4, 5, 7 y 9 ml). Cada sistema se agitó durante 3 min y se llevó a un volumen de aforo de 10 ml con metanol. Se realizaron barridos espectrofotométricos de 200 a 800 nm.

5.3.2.2. Curva de calibración del método indirecto (espectrofotometría UV-VIS con reactivo DDQ).

Se pesaron 15 mg de CLOT. Con metanol se solubilizaron y se llevaron a un volumen de aforo de 25 ml. Se tomaron alícuotas (0.5, 1, 2, 3, 4, 5 y 6 ml), agregando cada alícuota a matraces aforados de 10 ml. Se preparó el reactivo, pesando 40 mg del DDQ y se llevó a un volumen de aforo de 10 mL con metanol. Se agregó 1 ml de reactivo DDQ a los matraces aforados de 10 ml que contenían las soluciones de CLOT (El reactivo DDQ se añadió a cada matraz en serie y en un tiempo constante para obtener la linealidad de la curva). A partir del contacto del reactivo DDQ con la solución de CLOT cada sistema se agitó durante 2 min y se llevó al volumen de aforo con metanol. Se leyó en el espectrofotómetro UV-VIS (Thermoscientific, Genesys 10s) a 450 nm. Es importante mencionar que para cada punto se preparó un blanco bajo las mismas condiciones.

5.3.2.3. Cuantificación de clotrimazol en nanopartículas de acetato ftalado de celulosa utilizando reactivo DDQ.

Se pesaron 15 mg de cada lote de NP's (L1, L2, LC) en vasos de precipitados de 10 ml. A cada vaso se le agregó 10 ml de MEC y los tres se dejaron en agitación mecánica hasta sequedad. Se añadieron 9 ml de metanol a cada vaso de precipitado para resuspender los residuos que contenían y posteriormente cada uno se llevó a un volumen de aforo de 10 ml con metanol. Se agregó 1 ml de cada solución en matraces aforados de 10 ml. Se pesaron 0.04 g de reactivo DDQ y se disolvieron en 10 ml de metanol. A continuación se agregó 1 ml de reactivo DDQ a cada matraz. A partir del contacto de la solución de CLOT y el reactivo DDQ se agitó durante 2 min y se llevó al volumen de aforo con metanol. Se leyó a 450 nm en un espectrofotómetro UV-VIS (Thermoscientific, Genesys 10s).

La Carga de CLOT y la eficiencia de entrapamiento se calcularon de acuerdo con las siguientes ecuaciones:

$$\text{Carga de CLOT (\%)} = \frac{\text{Cantidad de CLOT en Np's}}{\text{Cantidad de NP's}} \times 100$$

$$\text{Eficiencia de entrapamiento (\%)} = \frac{\text{Carga de CLOT (\%)}}{\% \text{ del contenido inicial de CLOT (1-fracción de PVAL residual)}} \times 100$$

Cierta cantidad de PVAL se adsorbe en las NP's, para evitar una desestimación se introduce el factor de corrección $1 / (1 - \text{fracción de PVAL residual})$ en la ecuación de eficiencia de entrapamiento. El contenido inicial de CLOT corresponde a la cantidad agregada a cada lote. Las determinaciones de eficiencia de entrapamiento se calcularon con los datos de carga de CLOT y PVAL residual correspondientes a cada lote.

La eficiencia del proceso se calculó con la siguiente ecuación, después del secado por liofilización de las NP's.

$$\text{Eficiencia de proceso (\%)} = \frac{\text{Peso de NP's recuperadas}}{\text{Peso de CLOT} + \text{Peso de CAP} - \text{Peso de PVAL residual}} \times 100$$

El peso del CLOT incluido corresponde al CLOT cargado en las NP's y el peso de CAP es la cantidad de polímero utilizado en la preparación de las NP's. El peso de PVAL residual es el promedio de los ensayos de PVAL residual para cada lote (Piñón, 2005; Lara, 2015).

5.3.2.4. Liberación *in vitro* del clotrimazol encapsulado en nanopartículas poliméricas de acetato ftalato de celulosa utilizando como medio fluido vaginal simulado.

Se preparó FVS como está escrito en el punto 5.1.3.1.1. Para promover la solubilidad de CLOT se utilizó Gelucire® 44/14. La cantidad máxima disuelta de fármaco en el medio fue a una concentración de 5 % p/v. Sin embargo, al aumentar la concentración del tensoactivo, aumenta la turbidez del sistema y se dificulta la cuantificación en el espectrofotómetro, debido a lo anterior se trabajó a una concentración del 3 % p/v, con respecto al 5 % p/v es mínima la diferencia en la cantidad de fármaco disuelto (Sánchez, 2016).

Se hidrataron las membranas de diálisis (Sigma-Aldrich 10 mm (0.4 in)) durante 14 horas con agua destilada. Se pesaron 30 mg de cada lote de NP's poliméricas (L1, L2, LC) y se suspendieron en 3 ml de FVS con Gelucire® al 3 %. Las suspensiones se agregaron a las bolsas de diálisis que se formaron con la membrana y se sumergieron en viales que contenía 30 ml de FVS con Gelucire® al 3 %. Los sistemas se mantuvieron en un baño de agitación Dubnoff (QUIMIS) a una temperatura de 37 °C ± 1 °C. Se tomaron muestras de los viales las dos primeras horas cada 30 min, después de la segunda hora la muestra se tomó cada hora por

8 horas y se volvió a tomar a las 24 y 48 horas. Para cada toma de muestra se repuso el volumen en los viales utilizando FVS con Gelucire® al 3 %. Se realizaron las determinaciones de cada lote por triplicado.

5.3.3. Cuantificación de clotrimazol por Cromatografía de capa fina de alta resolución (HPTLC).

5.3.3.1. Preparación de soluciones.

Se prepararon soluciones de los componentes en las NP's de CAP cargadas con CLOT y de las sustancias presentes durante la liberación, como se muestra en la tabla 2.

Tabla 2. Mezclas para evaluar la especificidad del método.

No. de Vial	Contenido
1	10 mg de CLOT y 10 mg de CAP en 20 ml de MEC
2	Solución de CLOT en FVS con Tween® 20 al 3 %. Concentración de 600 ng/ml
3	10 mg de CLOT en 10 ml de MEC
4	10 mg de CLOT en 10 ml de metanol
5	12 mg de CAP en 10 ml de MEC
6	FVS con Tween® 20 al 3 %
7	FVS

5.3.3.2. Lavado de placas y determinación de fase móvil.

Para el lavado de la placa se saturó la cámara cromatográfica durante 10 min con metanol. Se insertó la placa de sílica gel F254 hasta que el metanol eluyó completamente. Se extrajo la placa y se secó por 10 min. Se aplicaron las muestras (de los viales descritos en la tabla 2) de manera automática con un equipo ATS 4 a una velocidad de 40 nl/s en bandas de 6 mm. Se evaluó la separación de los compuestos probando las siguientes fases móviles:

- Tolueno: cloroformo: metanol (26: 65: 9 v/v).
- Acetonitrilo: Agua (70: 30 v/v).
- Tolueno: Acetona (75:25 v/v).
- Hexano: Acetona (50:50 v/v).
- Hexano: Acetona (60:40 v/v).

La longitud de desarrollo fue de 5 cm y las placas se leyeron en un Scanner Camag III por densitometría a 265 nm.

5.3.3.3. Evaluación de especificidad.

Se aplicaron las muestras automáticamente (de los viales descritos en la tabla 2) a través de un equipo ATS 4 a una velocidad de 40 nl/s en bandas de 6 mm en placas previamente lavadas y secadas. Se preparó la fase móvil de hexano: acetona (60:40 v/v) y se saturó la cámara durante 10 min. Se insertó la placa para eluir la fase móvil. Se extrajo la placa y se dejó secar para leer en un Scanner Camag III a 265 nm. Se observó la interferencia entre sustancias para evaluar la especificidad del método.

5.3.3.4. Curva de calibración por el método de HPTLC.

Se disolvieron 90 mg de CLOT en 10 ml de metanol. Se tomó una alícuota de 3 ml y se llevó a un volumen de aforo de 25 ml utilizando FVS con Tween® 20 al 3 %. Se aplicaron las soluciones de 0.5 a 6 µl de manera automática con un equipo (ATS 4) en bandas de 6mm, en placas de sílica gel F254 previamente lavadas con metanol. Se preparó la fase móvil de hexano: acetona (60:40 v/v) y se saturó la cámara durante 10 min. Se insertó la placa para eluir la fase móvil. Se extrajo la placa y se dejó secar para leer en un Scanner Camag III a 265 nm. Los parámetros analíticos que se evaluaron fueron linealidad (en un intervalo de 0.5 a 6.5 µg de CLOT), selectividad, precisión y exactitud.

5.3.3.5. Difusión de solución de clotrimazol.

A 5 ml de FVS con Tween® 20 al 3 % se le agregó CLOT hasta saturarlo. Se dejó en agitación constante por 20 horas. Se centrifugó a 18 000 rpm durante 15 min. Se tomó 1ml del sobrenadante y se agregó a una bolsa de membrana de diálisis (Sigma-Aldrich 10 mm (0.4 in)) previamente hidratada con agua destilada por 14 horas. Se sumergió en un vial que contenía 20 ml de FVS Tween® 20 al 3 %. El vial se mantuvo en un sistema de agitación continua, en un baño de agua a 37 °C, utilizando un recirculador con termostato. Se tomaron muestras del vial a diferentes tiempos (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 24, 35, 48 y 54 horas), se repuso el volumen del vial con FVS Tween® 20 al 3 %. La liberación de la solución de CLOT se hizo por triplicado. Se aplicaron las muestras de manera automática con un equipo (ATS 4) en bandas de 6mm en placas sílica gel F254 previamente lavadas con metanol. Se preparó la fase móvil de hexano: acetona (60:40 v/v) y se saturó la cámara durante 10 min. Se insertó la placa para eluir la fase móvil. Se extrajo la placa y se dejó secar. Se leyó en un Scanner Camag III a 265 nm.

5.4. Liberación del clotrimazol a partir de nanopartículas poliméricas de acetato ftalato de celulosa.

Se pesaron 15 mg de NP's, se suspendieron en 1 ml de FVS con Tween® 20 al 3 %. Se agregó a una membrana de diálisis (Sigma-Aldrich 10 mm (0.4 in)) en forma de bolsa previamente hidratada con agua destilada durante 14 horas. Se sumergió en un vial que contenía 20 ml de FVS Tween® 20 al 3 %. El vial se mantuvo en un sistema de agitación continua en un baño de agua a 37 °C, utilizando un recirculador con termostato. Se tomaron muestras del vial a diferentes tiempos (1, 1:30, 2, 2:30, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 24, 48 y 72 horas), se repuso el volumen del vial con FVS Tween® 20 al 3 %. Se aplicaron las muestras de manera automática con un equipo (ATS 4) en bandas de 6 mm en placas sílica gel F254 previamente lavadas con metanol. Se preparó la fase móvil de hexano: acetona (60:40 v/v) y se saturó la cámara durante 10 min. Se insertó la placa hasta eluir la fase móvil. Se extrajo la placa y se dejó secar. Se leyó en un Scanner Camag III a 265 nm. Este procedimiento se realizó para los tres lotes de NP's (L1, L2, LC) por triplicado.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el Laboratorio de Sistemas Farmacéuticos de Liberación Modificada, se han realizado diversas investigaciones para encapsular CLOT en CAP, obteniendo lotes de NP's con características satisfactorias (tamaño, morfología, homogeneidad entre lotes). El informe de Maestría en Ciencias Químicas (Posgrado en Ciencias Químicas de la UNAM) de la alumna María del Rocío Lara Sánchez contiene las variables que impactan la formación y el tamaño de éstas (concentración de polímero, concentración de principio activo, porcentaje de estabilizante, equipos, tiempo, velocidad) y estandariza las condiciones por el método de emulsificación-difusión; el trabajo fue dirigido por una de las asesoras de esta tesis.

En este estudio se planteó la posibilidad de obtener NP's de acetato ftalato de celulosa con clotrimazol a partir de dos métodos. Método de emulsificación-difusión modificado y método de emulsificación-difusión tradicional. En la tabla 3 se describe el procedimiento para ambos métodos y se observa que en el método de emulsificación-difusión modificado; no se adiciona agua destilada a la emulsión. Esto se debe a que los volúmenes de agua que se deben eliminar de la suspensión son grandes y el método tradicional no es muy eficiente para encapsular fármacos hidrofílicos.

Tabla 3. Métodos para obtener NP's de CAP con CLOT.

Método emulsificación-difusión tradicional	Método emulsificación-difusión modificado
Se pesaron 400 mg de CAP y la cantidad correspondiente de CLOT (50mg, 100 mg y 150 mg)	Se pesaron 400 mg de CAP y la cantidad correspondiente de CLOT (50mg, 100mg, LC-150mg ó LD-200 mg)
Se disolvieron en 20 mL de MEC previamente saturada con agua destilada: soluciones A	se disolvieron en 20 mL de metil etil cetona (MEC) previamente saturada con agua destilada: soluciones A.
Se preparó una solución de polivinil alcohol (PVAL) al 5 % con agua destilada previamente saturada con MEC: solución B	Se preparó una solución de PVAL al 5 % con agua destilada previamente saturada con MEC: Solución B.
Se emulsificaron los 20 mL de la solución A con 40 mL de la solución B durante 10 minutos con un agitador mecánico con propela de turbina a 2200 rpm	Se emulsificaron los 20 mL de la solución A con 40 mL de la solución B durante 10 minutos con un agitador mecánico con propela de turbina a 2200 rpm.
se adicionaron 120 mL de agua destilada y se continuó la agitación durante 10 minutos más.	
La emulsión se pasó a un evaporador de presión reducida para eliminar el disolvente	Inmediatamente después la emulsión se pasó a un evaporador de presión reducida para eliminar el disolvente
La suspensión de las partículas se sometió a tres "lavados" por ultracentrifugación para eliminar el exceso de PVAL	La suspensión de las partículas se sometió a tres ciclos de "lavado" por ultracentrifugación para eliminar el exceso de PVAL
Cada lote se liofilizó en una liofilizadora de mesa	Cada lote fue liofilizado en una liofilizadora de mesa

Después de realizar las pruebas preliminares para elegir el disolvente y la concentración de PVAL preparó lotes por los dos métodos y concluyó que la técnica de emulsificación – difusión modificada forma agregados de NP's de CAP con CLOT debido a la deficiente difusión del disolvente a través del agua. Después aplicó la técnica de emulsificación – difusión tradicional y obtuvo lotes de NP's de CAP con CLOT.

Los lotes de NP's de CAP con CLOT obtenidos por la técnica tradicional presentaron las siguientes características: tamaño promedio de 235-290 nm, PVAL residual menor a 4.6 % y Potencial Z de -24.0 a -34.5 mV. Las eficiencias de atrapamiento disminuyeron conforme se aumentó la carga de CLOT. El CLOT se incorporó en las NP's en forma molecular (de acuerdo con estudios de calorimetría diferencial de barrido) y el perfil de liberación del CLOT desde las NP's se ajustó al modelo de Weibull; la liberación se mantuvo durante cuatro días.

Para evaluar la carga de principio activo, la eficiencia de entrapamiento y el perfil de liberación *in vitro* se desarrolló un método espectrofotométrico UV-Vis y se utilizó como medio una mezcla de 60 % de solución amortiguadora de fosfatos pH 4.5 con 0.2 % de Tween® 20 y 40 % de etanol.

Dentro de las perspectivas de la investigación de María Lara se encuentra: Realizar mayores estudios de la permeación del antimicótico *in vitro* con tejido vaginal animal, así como evaluar la liberación *in vitro* en un medio que simule las condiciones fisiológicas. Por lo que fue necesario desarrollar un método analítico para cuantificar CLOT liberado en NP's de CAP. En condiciones fisiológicas, utilizando como medio FVS.

Continuando con la investigación de María Lara, se reprodujeron las condiciones del método de emulsificación-difusión tradicional y se obtuvieron NP's de CLOT con CAP. Se caracterizaron los lotes y se desarrollaron tres métodos analíticos buscando cuantificar el CLOT en NP's de CAP y en los estudios de liberación. Los resultados obtenidos se describen a continuación.

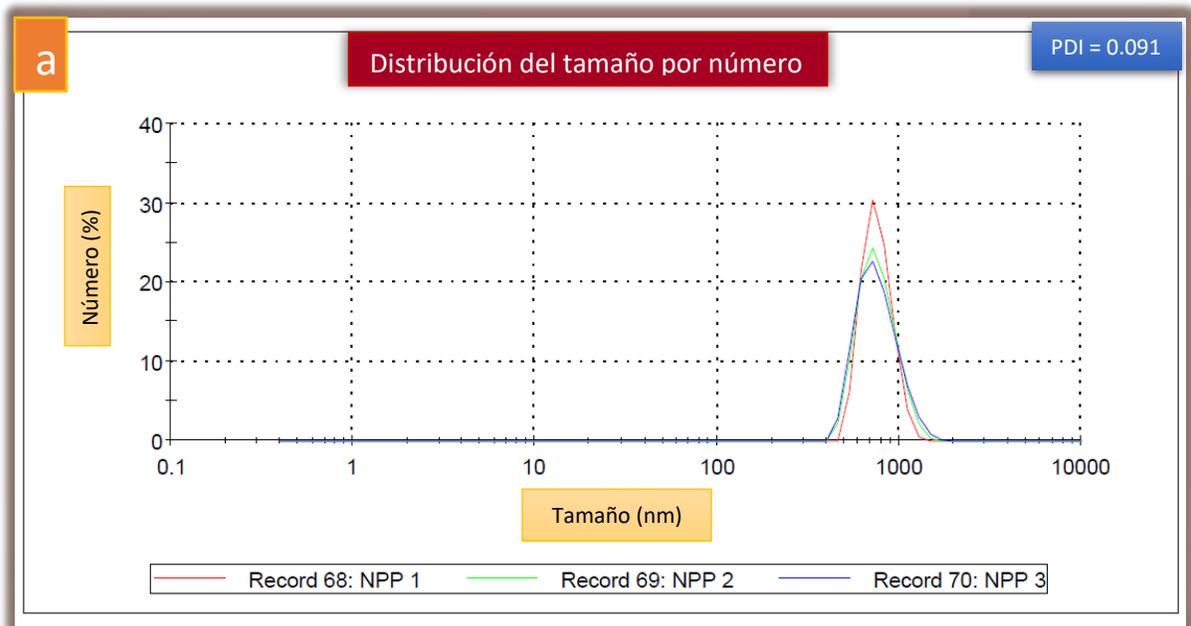
6.1. Preparación de nanopartículas

Se prepararon tres lotes de NP's; dos lotes de CAP cargados de CLOT (L1, L2) y un lote control (solo del polímero CAP, LC). Se pesaron 400 mg de CAP y 100 mg de CLOT, para los lotes cargados (L1 y L2) y 400 mg de CAP para el lote blanco (LC). Se obtuvieron NP's por el método de emulsificación-difusión (Lara, 2015), que posteriormente se caracterizaron obteniendo los siguientes resultados.

6.2. Caracterización de nanopartículas

6.2.1. Tamaño de partícula.

La técnica de emulsificación-difusión permitió preparar NP's de talla submicrónica. Para obtener el tamaño se utilizó el Zetasizer Malvern que se basa en la función de los algoritmos de distribución para la técnica de dispersión dinámica de luz (DLS). El movimiento Browniano de las partículas en suspensión hace que la luz láser se disperse en diferentes intensidades, con el análisis de las fluctuaciones en la intensidad se obtiene la velocidad del movimiento Browniano y mediante la relación de Stokes-Einstein el tamaño de partícula (Malvern). Los lotes (L1, L2, LC) presentaron tamaños de 800 nm como se ve en la figura 6 con una estrecha distribución que se confirma con el Índice de polidispersidad (PDI). Los tres lotes obtuvieron valores de PDI menores a 0.17



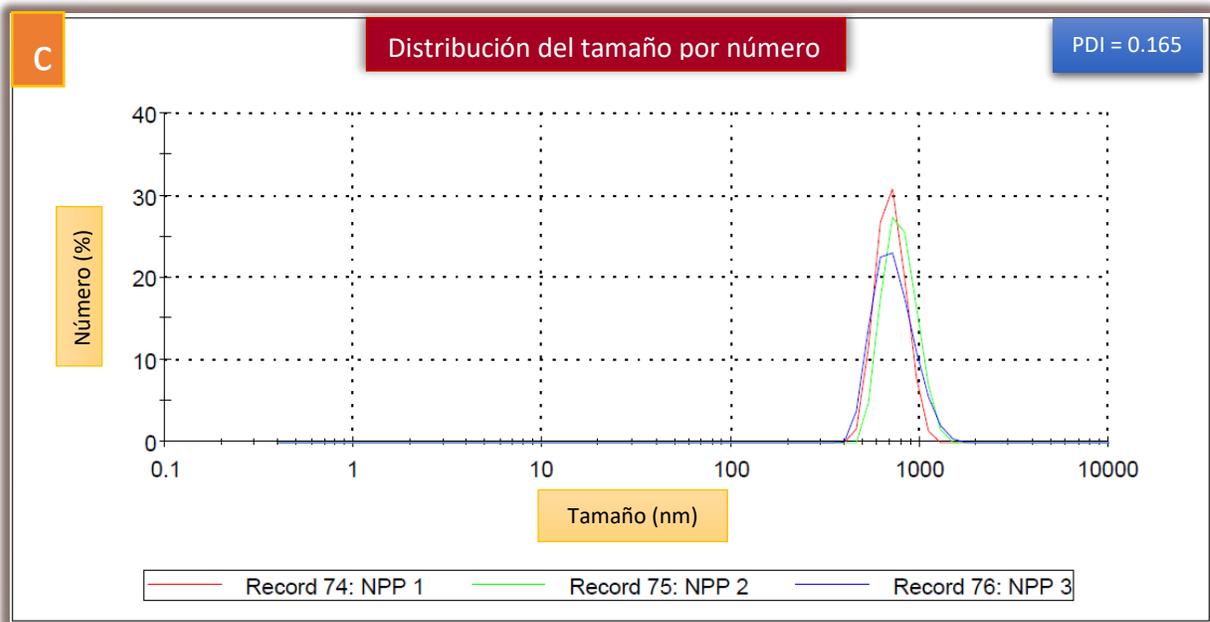
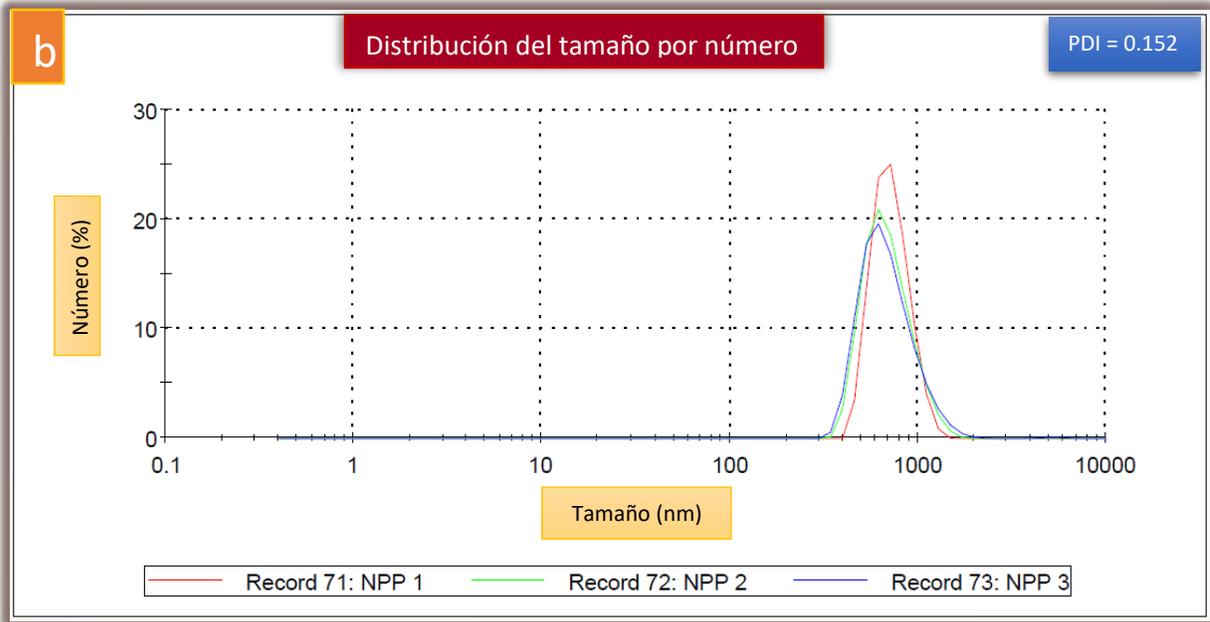
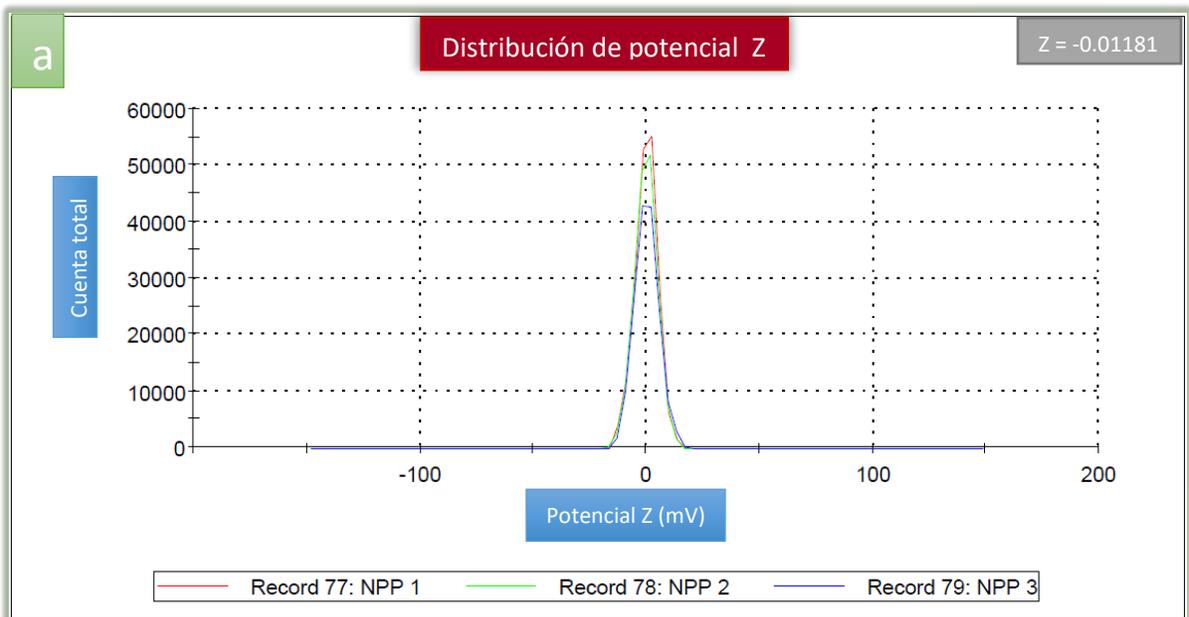


Fig. 6. Distribución de tamaño de partícula para NP's de LC(a), L1(b), L2(c).

6.2.2. Potencial Z.

El potencial zeta se determinó con el Zetasizer Nano ZS90, el lote LC presentó un potencial z cercano a cero, mientras los lotes 1 y 2 reportaron potencial zeta de -24.4 y -22.7 mV respectivamente (figura 7). La variación de los lotes L1 y L2 con respecto al lote LC se puede atribuir a la carga positiva del CLOT (Lara, 2015). Esto es importante debido a que el potencial zeta es una medida de la carga de la partícula, se relaciona proporcionalmente con la carga de la superficie, representa un índice para la estabilidad de las partículas. En el caso de partículas cargadas, a medida que aumenta el potencial zeta las interacciones repulsivas serán más grandes conduciendo a la formación de partículas más estables con una distribución de tamaño uniforme. Una nanosuspensión físicamente estable, estabilizada únicamente por repulsión electrostática tendrá un potencial zeta mínimo de $\pm 30\text{mV}$, esta estabilidad es importante para evitar la agregación (Hans, et al., 2007).



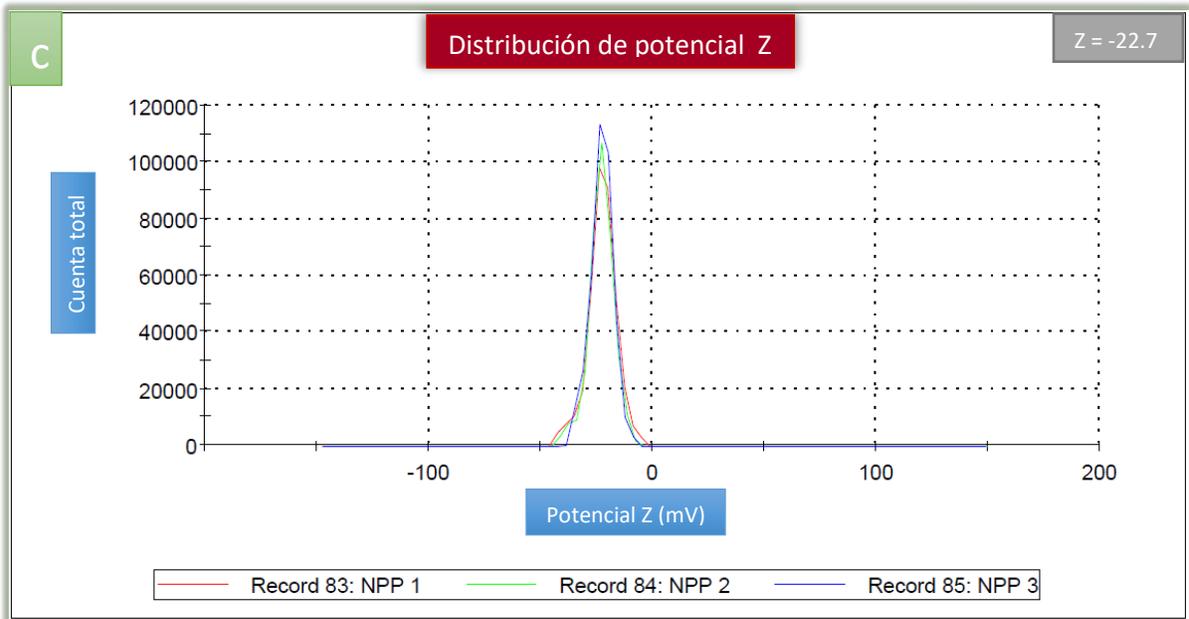
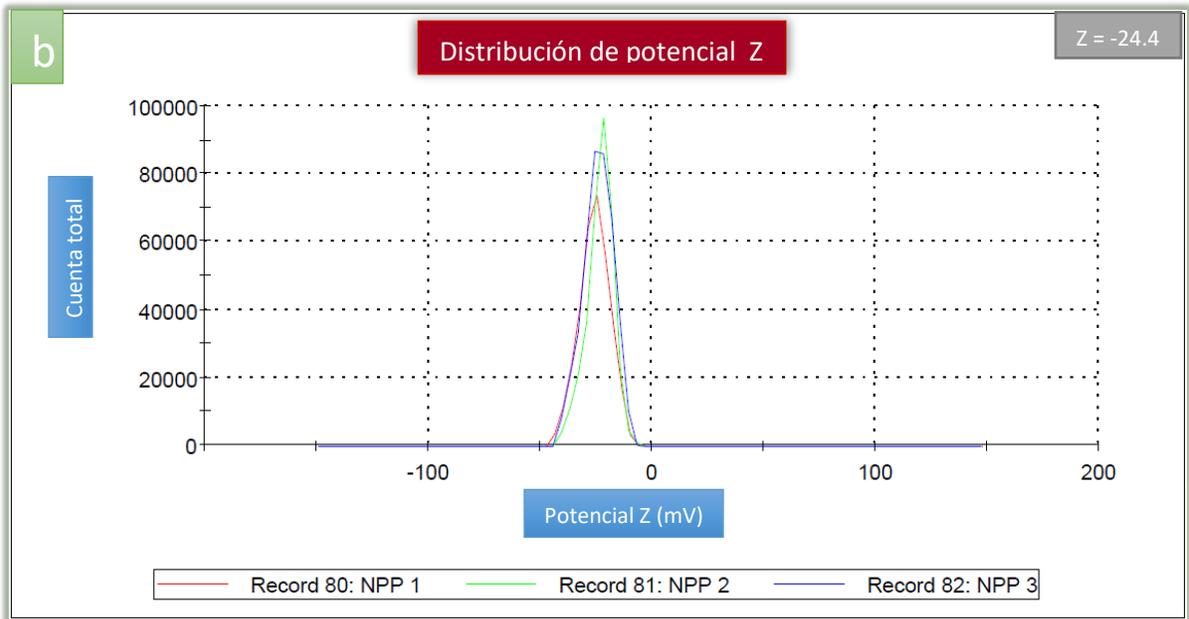


Fig. 7. Medición de Potencial Z para NP's de LC(a), L1(b), L2(c).

6.2.3. Calorimetría.

La DSC es una técnica bien establecida de análisis térmico dentro de las ciencias farmacéuticas. Se puede usar para caracterizar los eventos físicos y químicos a través de cambios en la entalpía o en la capacidad calorífica de una muestra. Las aplicaciones incluyen: la detección de polimorfismo; la medición de la reacción y la cinética de descomposición; la evaluación de la compatibilidad de los constituyentes en la formulación; la determinación de la pureza y determinación de la temperatura de transición vítrea. Los eventos térmicos que son detectables pueden ser endotérmicos, exotérmicos o pueden implicar un cambio en la capacidad calorífica de una muestra (Clas, et al., 1999).

La figura 8 presenta los termogramas obtenidos de las muestras de CLOT, CAP, PVAL y NP's de CAP con CLOT. El punto de fusión teórico del CLOT es de 147 a 149 °C (Moffat, et al., 2004). El cual coincide con el obtenido en el termograma del CLOT, en el que se puede apreciar un pico endotérmico en aproximadamente 147 °C evidenciando la fusión del compuesto. El termograma de las NP's cargadas con CLOT no presenta el punto de fusión del fármaco evidenciando que este se encuentra disperso a nivel molecular en las NP's, el CLOT podría estar en un estado amorfo o desordenado en una dispersión molecular o en estado sólido en la matriz polimérica (Mu y Feng, 2002; Piñón 2005).

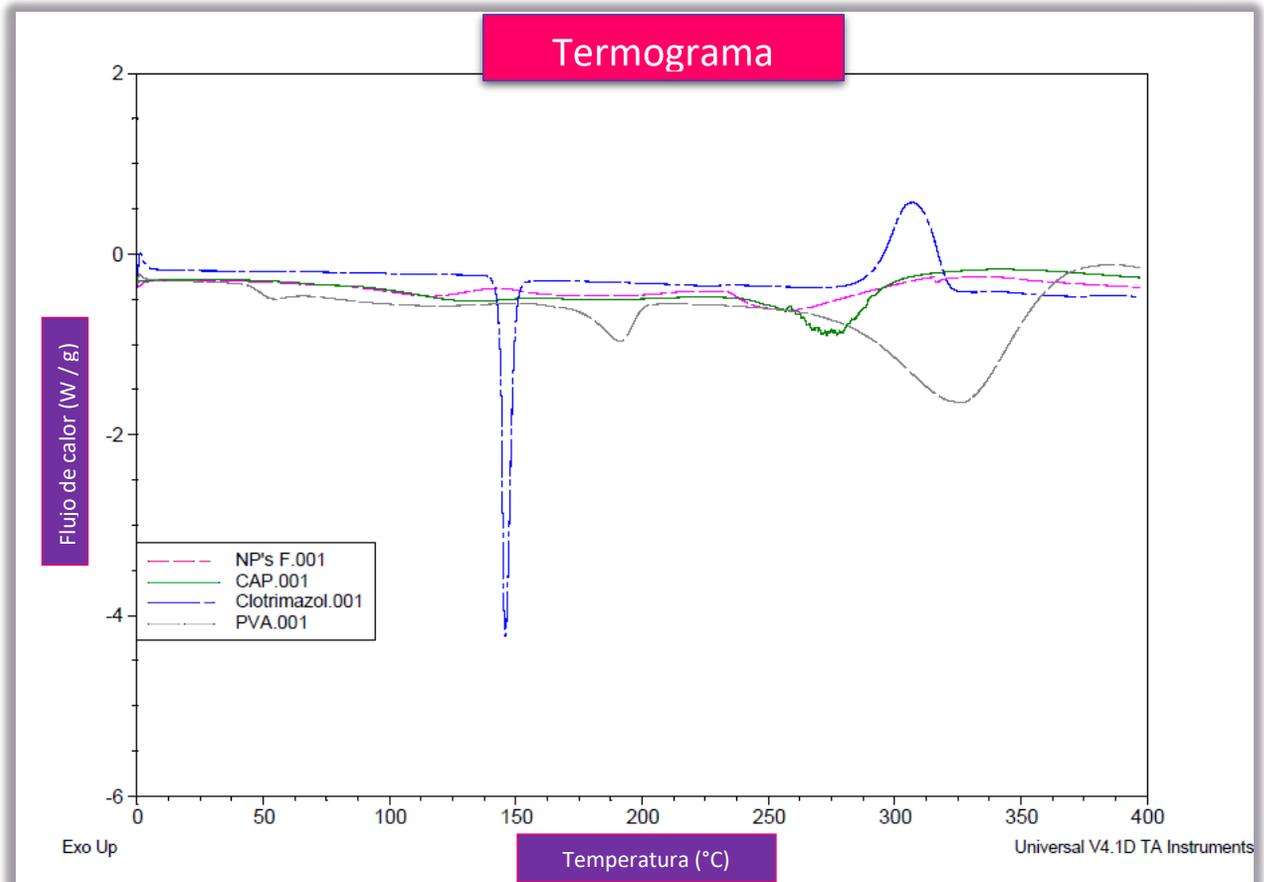


Fig. 8. Termograma de CLOT, CAP, PVA y Lote de NP's.

6.2.4. Cuantificación de alcohol polivinílico.

El PVAL funciona como un coloide protector para los glóbulos de la emulsión formada durante la preparación de las nanoesferas (Piñón, 2008), es necesario para evitar el crecimiento de partículas, evitar la aglomeración de las mismas y mejorar su estabilidad (Chan, et al., 2011). Para determinar la cantidad de PVAL residual en los lotes de NP's (L1, L2, LC), se utilizó un método espectrofotométrico colorido que considera la formación de un complejo entre el PVAL en solución y yodo, en presencia de ácido bórico (Pritchard y Akintola, 1972; Lara, 2015).

Se preparó una curva de calibración para cuantificar el PVAL, pero los resultados de las absorbancias que se obtuvieron del PVAL presente en las nanoesferas fueron

menores al intervalo de absorbancias que posee la curva. Por lo que se tomó una curva de calibración realizada por el equipo de investigación del Laboratorio de Sistemas Farmacéuticos de Liberación Modificada (Tabla 4 y figura 9). Se realizaron las mediciones para cuantificar el PVAL presente en los lotes de NP's (la descripción se encuentra en la sección de metodología en el punto 5.2.4). Los resultados se presentan en la tabla 5. Todos los lotes obtuvieron residuos de PVAL muy bajos, lo que indica que los lavados durante el proceso de preparación de las NP's se realizaron adecuadamente.

Tabla 4. Curva de calibración de PVAL.

Concentración (µg/mL)	Absorbancia	Abs/Conc
10.960	0.231	0.021
10.960	0.220	0.020
10.960	0.227	0.021
21.632	0.471	0.022
21.632	0.447	0.021
21.632	0.465	0.022
32.448	0.687	0.021
32.448	0.688	0.021
32.448	0.688	0.021
43.264	0.935	0.022
43.264	0.935	0.022
43.264	0.968	0.022
54.080	1.170	0.022
54.080	1.170	0.022
54.080	1.204	0.022
	Promedio	0.021
	DesvEst	0.001
	C.V.	2.807

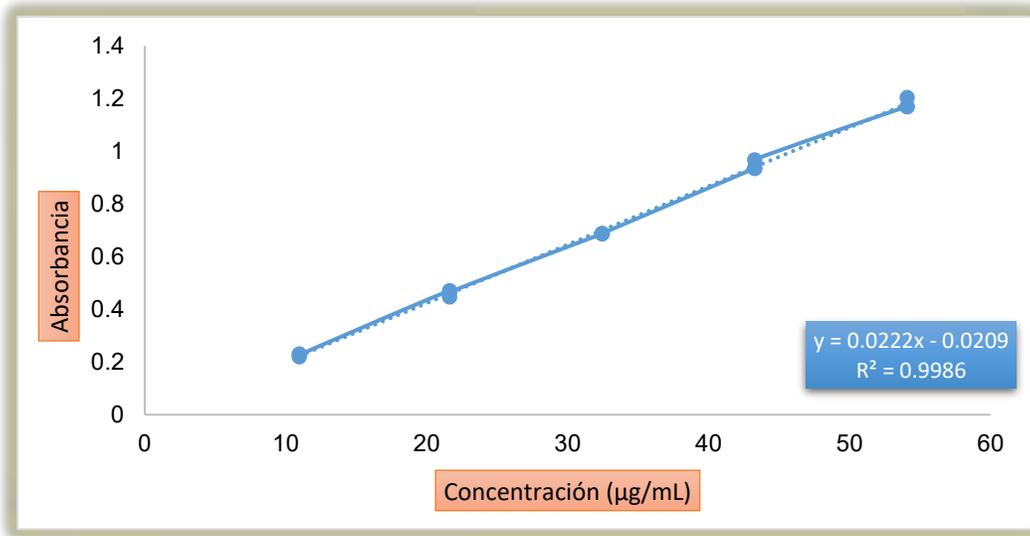


Fig. 9. Curva de calibración de PVAL.

Tabla 5. Resultados de la cuantificación PVAL en los lotes (1,2 y C).

Lote	PVAL residual (%)
1	0.77
2	0.86
C	0.98

6.3. Cuantificación de clotrimazol

6.3.1. Método directo (espectrofotometría UV-VIS)

Debido a la escasa solubilidad del CLOT en agua, se realizaron pruebas cualitativas de solubilidad, esta se evaluó visualmente y espectrofotométricamente adicionando CLOT a diferentes medios: FVS (la preparación del FVS se encuentra en la sección de metodología, en el punto 5.3.1.1) con diferentes concentraciones de LSS (0.5 %, 1 %, 1.5 % y 2 %); se realizaron barridos espectrofotométricos de 200 a 400 nm y cómo se observa en la figura 10, la longitud de onda para cuantificar al CLOT es a

263nm. La línea morada que corresponde al 2 % (la concentración más alta) queda debajo de las demás concentraciones, la línea roja que representa al 1 % y la verde al 1.5 % tienen picos similares, por lo que tendrían el mismo efecto, pero se diferencia la cantidad de LSS. Por lo que se consideró la concentración de LSS al 1 % como la concentración óptima.

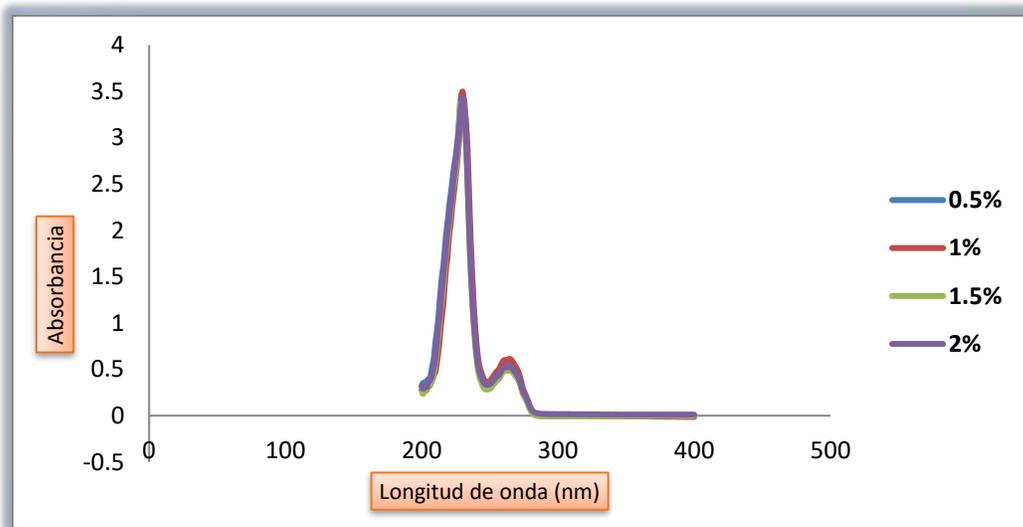


Fig. 10. Barrido espectrofotométrico de CLOT en FVS con diferentes concentraciones de LSS.

6.3.1.1. Curva de calibración del método directo (espectrofotometría UV-VIS)

Para el método analítico directo (por espectrofotometría UV-VIS) la curva de calibración de CLOT en FVS utilizando como tensoactivo LSS al 1 %, presentó una R^2 de 0.9998, una ordenada al origen de 0.0006 y una pendiente de 2.3982 y un coeficiente de variación (C.V.) de 0.6215 %, la curva obtenida se muestra en la figura 11.

Tabla 6. Curva de calibración de CLOT en FVS con LSS 1 %.

Concentración (mg/ml)	Absorbancia	Absorbancia / Concentración	Promedio	D. E.	C.V.
0.062	0.151	2.435	2.414	0.025	1.021
	0.15	2.419			
	0.148	2.387			
0.124	0.299	2.411	2.398	0.012	0.514
	0.296	2.387			
	0.297	2.395			
0.186	0.447	2.403	2.407	0.006	0.258
	0.449	2.414			
	0.447	2.403			
0.248	0.589	2.375	2.391	0.014	0.584
	0.595	2.399			
	0.595	2.399			
0.31	0.743	2.397	2.399	0.010	0.411
	0.747	2.410			
	0.741	2.390			
0.372	0.897	2.411	2.415	0.011	0.463
	0.895	2.406			
	0.903	2.427			
PROMEDIO					0.542

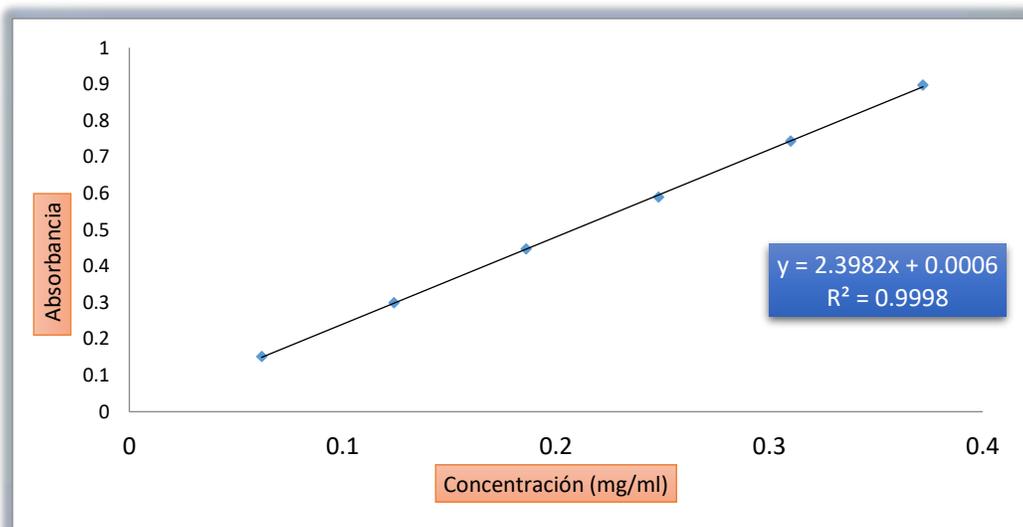


Fig. 11. Curva de calibración de CLOT en FVS con LSS 1 %.

Se esperaba que el método fuera específico (la respuesta únicamente se debiera al analito), debido a que el CAP presenta una solubilidad dependiente del pH (Shrestha, et al., 2016), no es soluble en agua a $\text{pH} \leq 5.8$ (Neurath, et al., 2002), pero al realizar un barrido espectrofotométrico con una mezcla de CLOT y CAP en FVS con LSS al 1 %, se observa la interferencia del CAP que absorbe a la misma longitud de onda que el CLOT (figura 12) lo que es negativo para la cuantificación, pero positivo para la investigación, como el pKa del CAP es 5.28, significaría que aún en el bajo pH del lumen vaginal (alrededor de 4.5) el CAP es muy poco soluble. La importancia de lo anterior recae en que aún en el ambiente vaginal, el CAP podría liberarse o ejercer su acción como microbicida desde una nanomatriz polimérica (Lara, 2015).

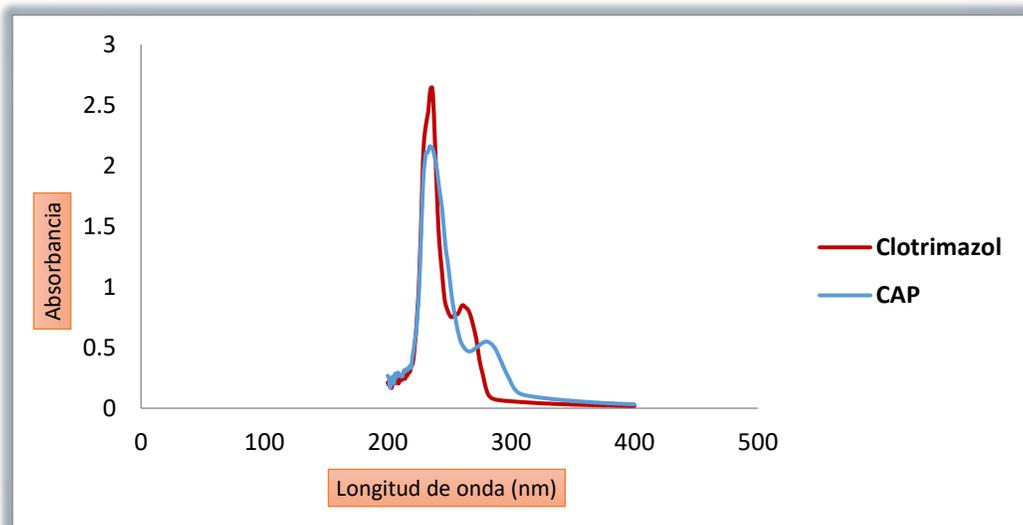


Fig. 12. Barrido espectrofotométrico de CLOT y CAP en FVS con LSS al 1 % de 200 a 400nm.

6.3.2. Método indirecto (espectrofotometría UV-VIS con reactivo DDQ).

6.3.2.1. Evaluación del reactivo DDQ

Como se observa en la figura 12 el CLOT y el CAP presentan absorbancia a la misma longitud de onda, por lo que se propuso un método indirecto utilizando el reactivo DDQ. El mecanismo de reacción producido en el método propuesto (método DDQ) depende de la formación de un complejo donador-aceptor original (DA) a través de la interacción entre la amina terciaria del CLOT como n-electrón donante y del DDQ como p-aceptor, se promovió la disociación del complejo DA por el alto poder de ionización del disolvente (metanol) donde tiene lugar la transferencia completa del donante al aceptor. Esta alcanza la formación del radical DDQ anión como cromógeno predominante siguiendo la ley de Beer a una longitud de onda de 460 nm (Khashaba, et al., 2000).

Para evaluar el comportamiento del reactivo DDQ con el CLOT y CAP, primero se realizaron pruebas de solubilidad y se observó que el CLOT es muy soluble en metanol. En 25 ml de metanol se disolvieron 25 mg de CLOT, posteriormente se realizó un barrido espectrofotométrico para evaluar la interacción de CAP y CLOT utilizando el reactivo DDQ, como se observa en la figura 13 el reactivo solo reacciona con el CLOT y no con el CAP, por lo que podemos decir que es específico, teniendo un máximo de absorbancia después de 450 nm

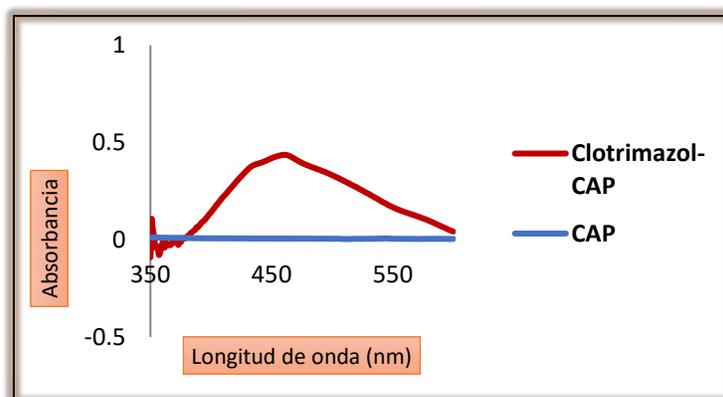


Fig. 13. Barrido espectrofotométrico de 350 a 600 nm de CLOT y CAP en reacción con DDQ.

Al preparar el reactivo DDQ se observó que con el tiempo variaba la coloración, de este, en solución con metanol, por lo que se preparó una solución de CLOT con reactivo DDQ (descrita en la parte de metodología en el punto 5.3.2.1) y se corrieron barridos espectrofotométricos de 400 a 800 nm de la misma solución a diferentes tiempos para determinar el tiempo de estabilidad de este (figura 14).

Después de 30 minutos se observa que disminuye la absorbancia de la solución de CLOT con el reactivo DDQ. Se concluyó que el reactivo es estable durante 30 minutos después de su preparación (figura 15).

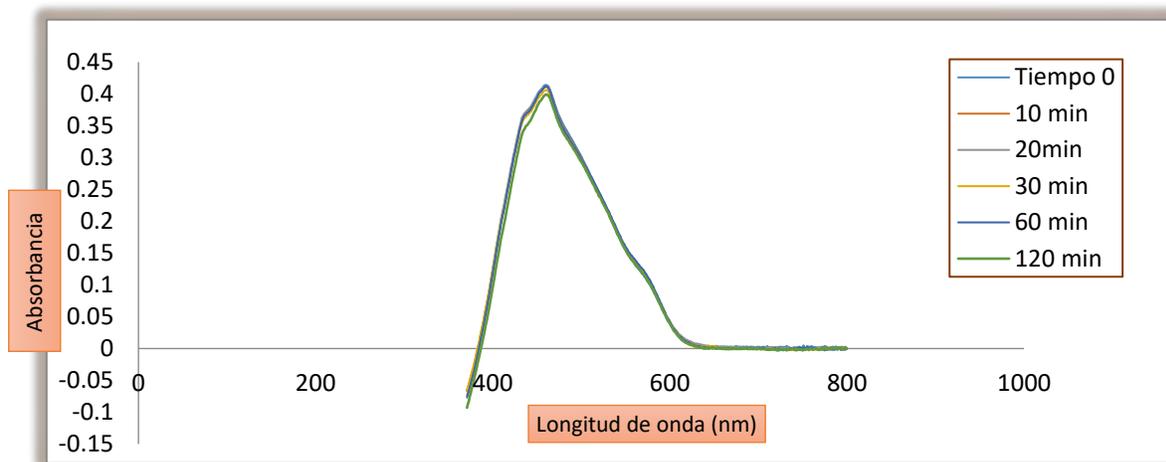


Fig. 14. Barridos espectrofotométricos de la solución de CLOT con reactivo DDQ a los tiempos 0, 10, 20, 30, 60 y 120 min.

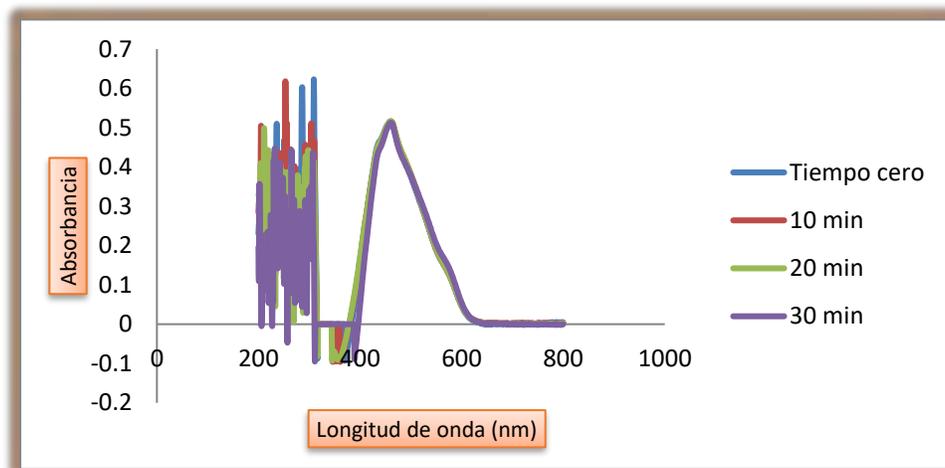


Fig. 15. Barridos espectrofotométricos de la solución de CLOT con reactivo DDQ a los tiempos 0, 10, 20, 30 min.

Khashaba y colaboradores proponen una concentración para formar el complejo entre el CLOT (49.7 - 800 ng/ml) y el reactivo DDQ (22.5 – 200 µg/ml) ya que los cromógenos producidos cumplen la ley de Beer en ese intervalo de concentraciones (Khashaba, et al., 2000). Tomando en cuenta esa concentración se preparó una solución de CLOT y de reactivo DDQ (descrita en la parte de metodología en el punto 5.3.2.1) y se leyó cada sistema aumentando el volumen del reactivo para variar la concentración del mismo. En la figura 16 se muestra como disminuye la absorbancia del sistema al aumentar la concentración del reactivo en la solución de CLOT. Por lo que se preparó la curva de calibración adecuando las concentraciones a las condiciones descritas en el artículo ya mencionado.

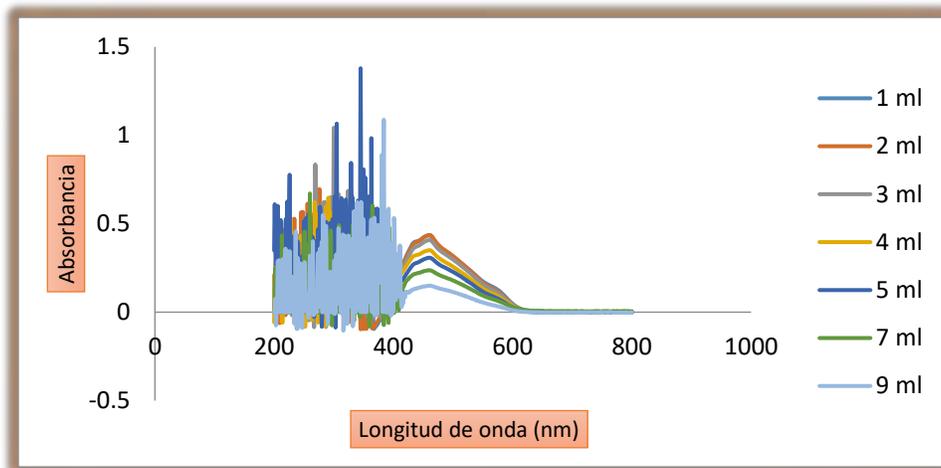


Fig. 16. Barridos espectrofotométricos de la solución de CLOT con reactivo DDQ (variando el volumen del reactivo).

6.3.2.2. Curva de calibración del método indirecto (espectrofotometría UV-VIS con el reactivo DDQ).

Para el método analítico indirecto (por espectrofotometría UV-VIS con reactivo DDQ) se construyó la curva de calibración y se obtuvieron los siguientes parámetros de validación: Linealidad (R^2 de 0.9842), una ordenada al origen de 0.052 y una pendiente de 2.7158, con un C.V. de 1.304 %. El método cumple con linealidad, especificidad y precisión del sistema de acuerdo a la guía de validación (2002) para

métodos espectrofotométricos emitida por el Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos de México, A.C.

Tabla 7. Curva de calibración de CLOT utilizando reactivo DDQ.

Concentración (mg/ml)	Absorbancia	Absorbancia / Concentración	Promedio	D. E.	C.V.
0.029	0.098	3.333	3.311	0.071	2.139
	0.099	3.367			
	0.095	3.231			
0.059	0.201	3.419	3.447	0.049	1.424
	0.201	3.418			
	0.206	3.503			
0.118	0.401	3.410	3.438	0.042	1.220
	0.402	3.418			
	0.410	3.486			
0.176	0.569	3.226	3.232	0.010	0.304
	0.569	3.226			
	0.572	3.243			
0.235	0.703	2.989	2.997	0.039	1.300
	0.697	2.963			
	0.715	3.039			
0.294	0.797	2.711	2.747	0.039	1.435
	0.806	2.742			
	0.820	2.789			
				Promedio	1.304

6.3.2.3. Cuantificación de clotrimazol en nanopartículas de acetato ftalato de celulosa utilizando el reactivo DDQ.

Debido a que el método propuesto es lineal y específico, se optimizaron las condiciones para determinar el porcentaje de encapsulación de CLOT en cada lote de NP's (1, 2, C). Se liberó el contenido de CLOT presente en las NP's por medio de una digestión de NP's. En seguida se cuantificó por el método indirecto de espectrofotometría UV-VIS con reactivo DDQ (el proceso esta descrito en la parte

de metodología en el punto 5.3.2.3). Obteniendo los resultados de la tabla 8. En donde se observa el lote 2 tiene una eficiencia de entrapamiento mayor que el lote 1. Mientras que la eficiencia del proceso fue mayor en el lote uno y muy bajo en el lote control. Estas variaciones pueden deberse a la velocidad con la que se agregó el agua libre a la emulsión. Se utilizó una propela diferente a la utilizada en el procedimiento para obtener NP's de CLOT con CAP del informe de maestría de la alumna María Lara, esto influye en la velocidad de agitación. En el proceso para eliminar el disolvente y agua de la suspensión de NP's, reduciendo la presión, se formó una nata en el matraz produciendo pérdida del producto. Además, en los lavados para eliminar el exceso de PVAL de las NP's y el cambio del vaso para liofilizar los lotes al recipiente de contención hubo pérdida de producto.

Tabla 8. Resultados de la cuantificación de CLOT en los lotes (1,2 y C).

Lote	Carga de CLOT (%)	Eficiencia de entrapamiento (%)	Eficiencia de proceso (%)
1	10.80	54.42	72.48
2	17.90	90.28	58.89
C	—	—	34.32

6.3.2.4. Liberación *in vitro* del clotrimazol encapsulado en nanopartículas poliméricas de acetato ftalato de celulosa utilizando como medio fluido vaginal simulado.

En la prueba de especificidad que muestra la figura 12 no hay señal de CAP que absorba a las longitudes de onda que absorbe el CLOT. Sin embargo, para que se lleve a cabo el mecanismo de reacción se necesita el poder de ionización del metanol que se utiliza como disolvente. Para las pruebas de liberación, el medio que se requiere es FVS con un porcentaje de tensoactivo. Cuando se realizaron las pruebas se comprobó que el complejo DA no se producía y se evidenciaba con la coloración del sistema; el DA en metanol daba una coloración naranja y el DA en

FVS emitía una coloración cereza intensa y se comprobó con un barrido espectrofotométrico de 400 a 600 nm de 0.5 y 1 ml de FVS con reactivo DDQ. En donde se evidencia que el FVS presenta una absorbancia (figura 17). Las absorbancias obtenidas durante la liberación de CLOT fueron negativas y valores discontinuos, por lo que se comenzó a estudiar la cuantificación de CLOT a través de la cromatografía en capa fina de alta resolución.

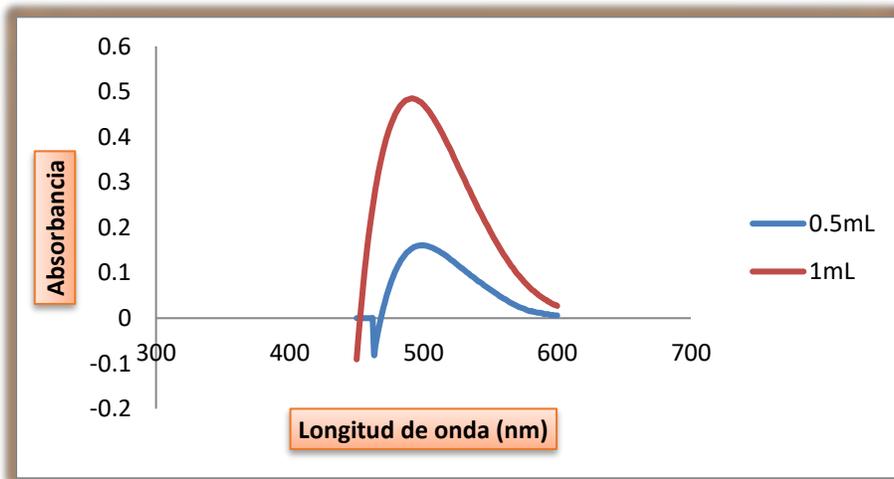


Fig. 17. Interacción de FVS con reactivo DDQ

6.3.3. Cuantificación de clotrimazol por HPTLC.

Los procedimientos cromatográficos en capa fina se utilizan en diferentes aplicaciones que van desde pruebas simples de detección a sofisticados ensayos cuantitativos instrumentales de analitos en matrices complejas (Renger, et al., 2011). Para evaluar el perfil de liberación del CLOT a partir de NP's de CAP, fue necesario desarrollar un método analítico utilizando esta técnica.

6.3.3.1. Preparación de soluciones y determinación de fase móvil.

Se formaron mezclas que contenían los componentes presentes; en la preparación de las NP's (MEC, CAP, CLOT) y en los estudios de liberación (metanol, FVS con

Tween® 20 al 3 %). Se aplicaron estas mezclas en placas de fase normal y se evaluaron diferentes fases móviles utilizando disolventes que solubilizaran al CLOT (tolueno, cloroformo, metanol, acetonitrilo, acetona y hexano) haciendo mezclas para variar la polaridad de las fases (procedimiento descrito en el apartado de metodología en el punto 5.3.3.2). La fase móvil constituida por hexano acetona (50:50 v/v) permitió eluir y separar el CLOT. Con esta fase móvil el CLOT presentó un R_f después de 0.5, se cambió ligeramente la polaridad de la fase hexano acetona (60:40 v/v), con esta fase móvil se obtuvo un R_f de 0.4, como se muestra en la figura 18.

Cabe mencionar que para eliminar posibles contaminaciones o residuos que pudieran estar presentes en la placa de sílica gel F254. Antes de cualquier evaluación, se realizó el lavado de la placa con metanol (procedimiento descrito en la parte de metodología en el punto 5.3.3.2).

6.3.3.2. Evaluación de especificidad.

Se lavaron las placas de sílica gel, y se aplicaron los sistemas (el contenido de cada sistema se encuentra en la sección de metodología en el punto 5.3.3.1 en la tabla 2) con un equipo automatizado. Se corrió la placa con la fase móvil y se leyó en un Scanner Camag III a 265 nm por espectrofotometría UV-VIS (procedimiento descrito en el apartado de metodología en el punto 5.3.3.3). En el cromatograma se observa que los componentes de las mezclas se quedan en el punto de aplicación, mientras que el CLOT se separa. En los sistemas 1, 2, 3 y 4 se ve el pico de CLOT con un R_f de 0.4 y en los sistemas 5, 6 y 7 no hay presencia de CLOT y la línea es continua (figura 18). Con esto se comprueba la especificidad del método para la cuantificación del CLOT.

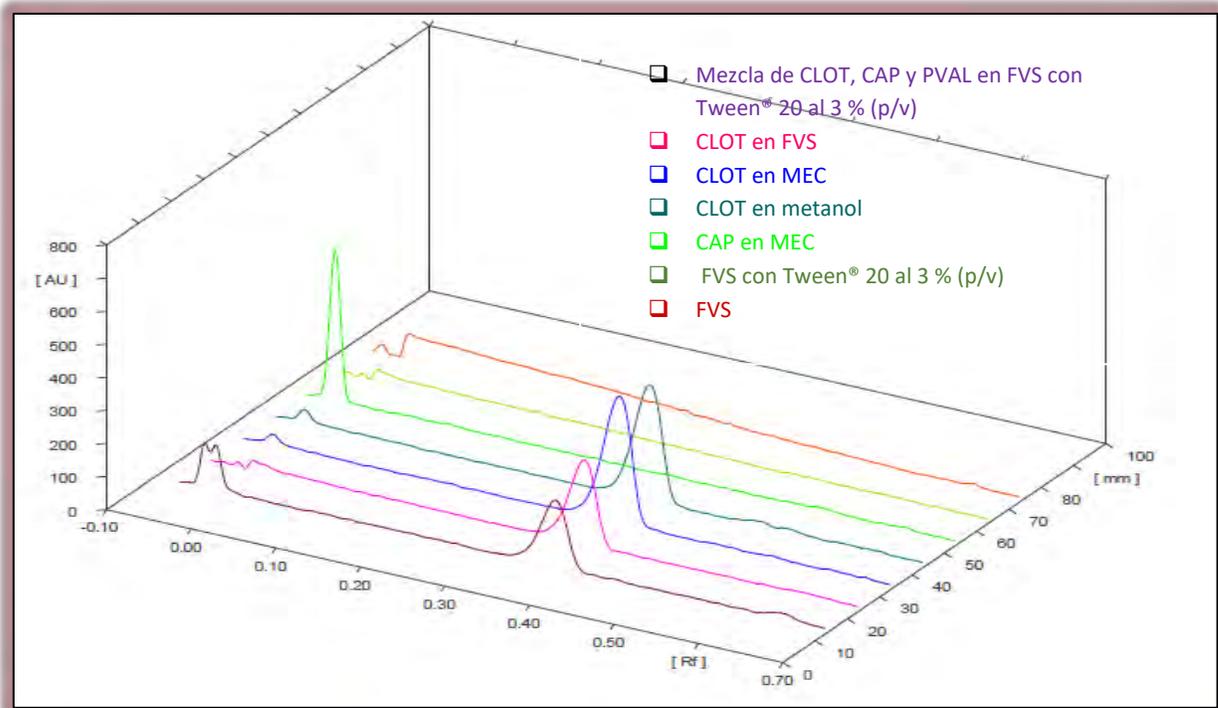


Fig. 18. Cromatograma de CLOT en diferentes sistemas.

6.3.3.3. Curva de calibración

Se realizó la curva de calibración entre 0.5 y 6.5 $\mu\text{g}/\text{mancha}$ de CLOT utilizando como medio FVS con Tween[®] 20 al 3 % (las condiciones específicas de elaboración se encuentran en el apartado de metodología en el punto 5.3.3.4). En donde se obtuvo una linealidad de 0.9968, una ordenada al origen de 113.04 y una pendiente de 417.27, como se muestra en la figura 19 y tabla 9. Al encontrar que el método es lineal y específico, se evaluaron otros puntos de validación para probar la confiabilidad e idoneidad del método.

Tabla 9. Curva de calibración de CLOT utilizando HPTLC.

Volumen (μL)	Cantidad	Curva 1	Curva 2	Curva 3	Promedio
0.5	0.542	306.3	272.5	299.0	292.6
1	1.084	594.1	519.9	499.2	537.7
2	2.167	1081.8	996.1	1025.7	1034.5
3	3.251	1642.0	1490.8	1500.5	1544.4
4	4.334	2028.1	1885.3	1972.8	1962.1
5	5.418	2491.2	2185.7	2500.3	2392.4
6	6.502	2887.3	2577.0	2781.9	2748.7

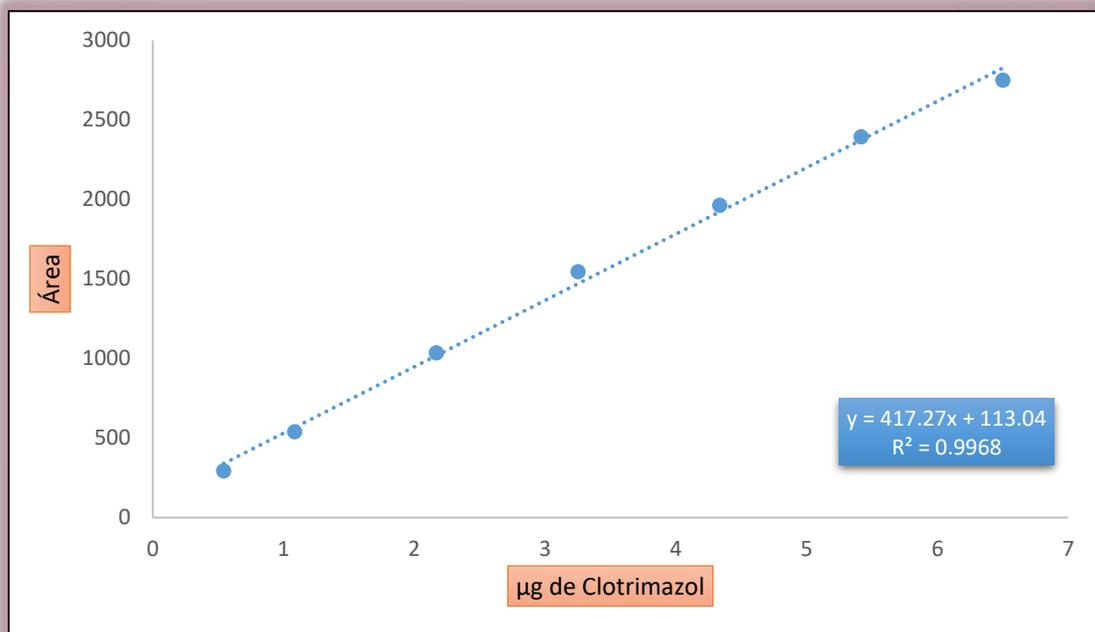


Fig. 19. Curva de calibración en HPTLC de CLOT en FVS con Tween® 20 al 3 %.

Se calcularon los siguientes puntos; la reproducibilidad del método en el mismo día y en diferentes días para obtener precisión (C.V.) menor al 3 % y exactitud (error relativo) menor al 2 %. Se determinó el límite de cuantificación (35.56 ng) y el límite de detección (12.53 ng). Los resultados se presentan en la tabla 10.

Tabla 10. Método analítico para cuantificar CLOT por HPTLC.

Linealidad	Pendiente	417.3	
	Ordenada a el origen	113.1	
	Coeficiente de determinación (R ²)	0.9968	
Exactitud	Porcentaje de recobro (%)	100.99 ± 1.7	
	C.V., %	1.6	
Precisión	Repetibilidad	Día uno (C.V., %)	2.2
		Día dos (C.V., %)	2.7
	Reproducibilidad	Analista uno, día uno (C.V., %)	2.2
		Analista dos, día uno (C.V., %)	2.1
		Analista uno, día dos (C.V., %)	2.7
		Analista dos, día dos (C.V., %)	2.7
Límite de cuantificación	ng	35.6	
Límite de detección	ng	12.5	

6.3.3.4. Difusión de la solución de clotrimazol

Al tener un método confiable, se realizó un perfil de difusión *in vitro* para monitorear la difusión de CLOT a través de una membrana de diálisis (Sigma-Aldrich 10 mm (0.4 in)) utilizando como medio FVS con Tween® 20 al 3 % (descripción detallada en la parte de metodología en el punto 5.3.3.5.) y determinar que el paso del fármaco a través de la membrana de diálisis no es una limitante y que entonces la podemos utilizar para evaluar la liberación del fármaco a partir de las nanopartículas. Como se muestra en la figura 20; la difusión se cuantifica a partir de la primera hora hasta las 48 horas alcanzando a difundir el 92 % de CLOT presente en la solución. Por lo tanto, la difusión de CLOT no se ve limitada por la membrana de diálisis, sino que es dependiente de su solubilidad.

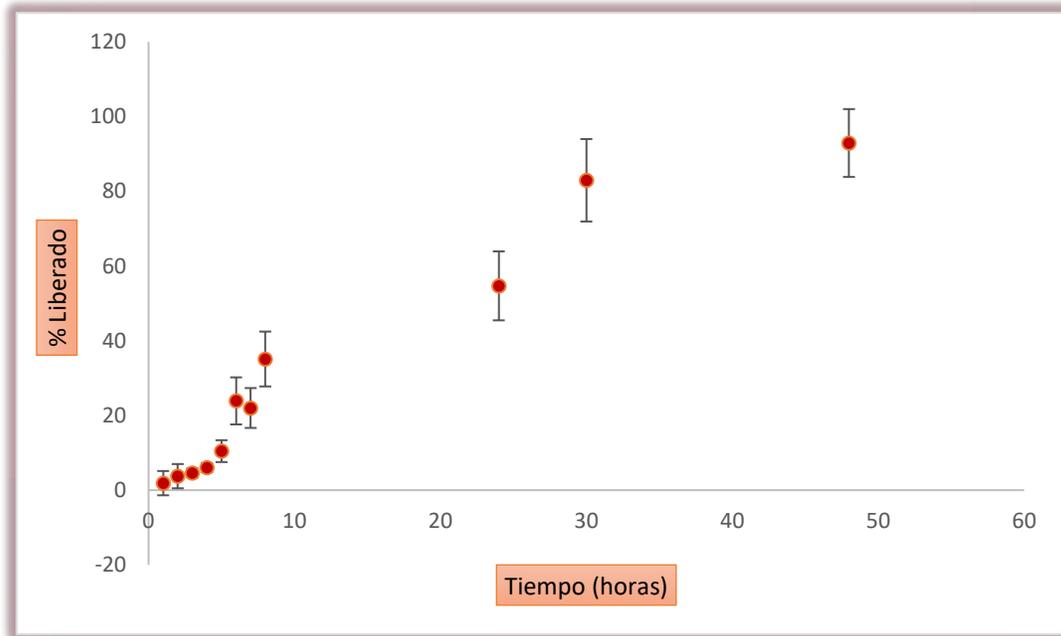


Fig. 20. Liberación de CLOT en FVS con Tween® 20 al 3 %.

6.4. Liberación de clotrimazol en nanopartículas poliméricas de acetato ftalato de celulosa.

En la parte experimental de liberación *in vitro* de CLOT a partir de las NP's preparadas se realizaron estudios empleando membranas de diálisis, en dónde las NP's son suspendidas en pequeños volúmenes de fase continua (FVS con Tween® 20 al 3 %) y son separados a través de una membrana de diálisis, manteniendo condiciones sink durante toda la prueba (descripción del procedimiento en la parte de metodología en el punto 5.4).

Como era de esperarse, el perfil de liberación del CLOT a partir de las NP's es completamente diferente al perfil de difusión del fármaco libre descrito en el punto anterior. Como se muestra en la figura 21; se observa un comportamiento de liberación prolongada (promedio de los lotes 1 y 2 de CLOT en NP's de CAP), empezando a liberar a partir de la sexta y de manera prolongada hasta las 72 horas de monitoreo, alcanzando más del 45 % de liberación en este tiempo. Es interesante

notar en la figura 21 que no hay el típico efecto “burts” en la liberación que se observa en otros sistemas nanoparticulados, lo cual puede deberse a que los lavados realizados a las NP’s para eliminar el PVAL fueron también eficientes eliminando el fármaco adsorbido en la superficie de las NP’s. También se evaluó el LC, en el que evidentemente no hay resultados, confirmando que el método elegido para cuantificar el CLOT es el adecuado al no haber interferencia de los componentes de las NP’s en la cuantificación del fármaco.

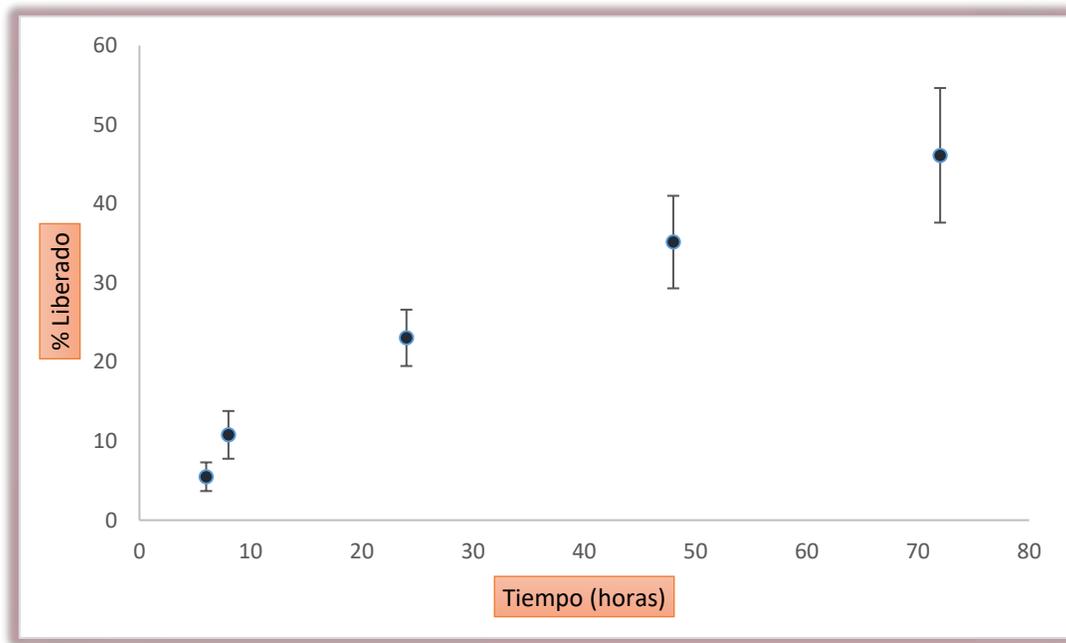


Fig. 21. Liberación de CLOT en NP’s poliméricas de CAP utilizando como medio FVS con Tween® 20 al 3 %.

La liberación de CLOT en NP’s de CAP alcanzó el 45 % aproximadamente a las 72 horas, no fue posible monitorear más días la liberación, debido a que se realizaron pruebas de estabilidad a la solución de CLOT en FVS y este resultado inestable después de tres días. Después de analizar los datos del cambio en la concentración del fármaco en un programa estadístico Statgraphics® Centurion XVI y como se muestra en la figura 22; el día 1, 2 y 3 no hay diferencia estadística significativa en la concentración del fármaco, mientras que en el día 4 se observa diferencia estadística significativa con respecto al día 3. Y se observa diferencia significativa en la concentración del fármaco en el día 5 respecto a los demás días (1,2,3 y 4),

por lo que se decidió tomar solo los primeros tres días para hacer el perfil de liberación.

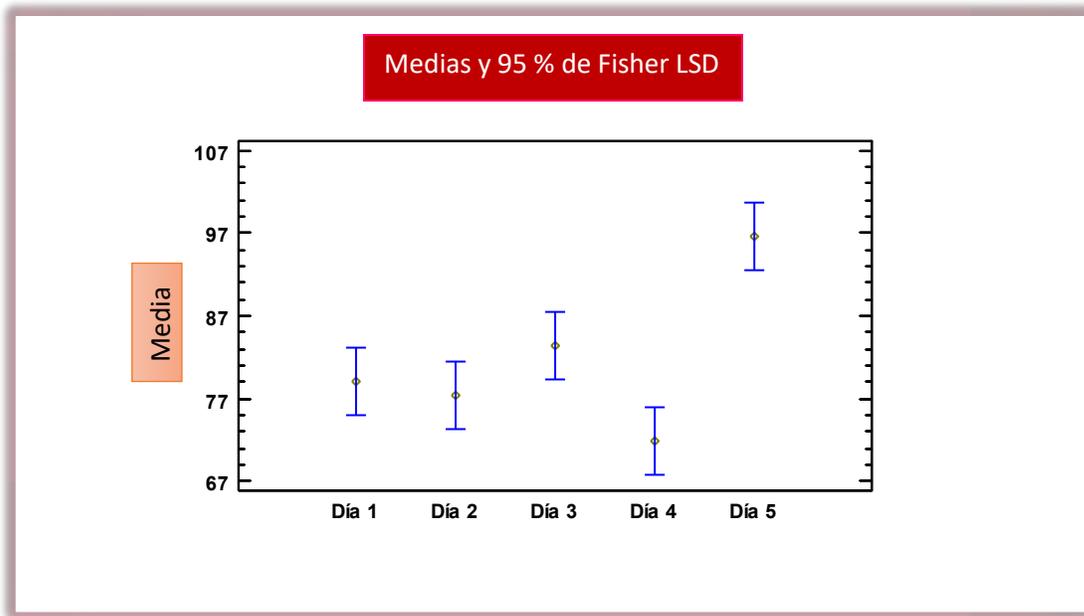


Fig. 22. Estabilidad de Solución de CLOT en FVS.

Para el análisis de los perfiles de liberación se utilizan modelos matemáticos simples o sofisticados para determinar el mecanismo de liberación (Peppas, et al., 2000; Siepmann, et al., 2011). La velocidad de disolución de un fármaco en un sistema matricial de liberación controlada depende de dos aspectos fundamentales: la difusividad del fármaco en el medio y la dependencia de esta con la concentración del polímero. La interpretación de dichos fenómenos fisicoquímicos implica el utilizar modelos matemáticos que tengan en cuenta ambos efectos. Los modelos más simples no tienen en cuenta la totalidad de los procesos y no pueden predecir con exactitud los fenómenos de liberación, pero son muy útiles, por ejemplo, cuando son empleados en nuevas formas de dosificación controlada de fármacos, o bien cuando son parte de estudios biofarmacéuticos más amplios, en estos casos modelos empíricos o semi-empíricos son suficientes (Andretta, 2003).

Los perfiles de liberación se analizaron de acuerdo con el modelo semi-empírico propuesto por Rigter y Peppas que se ejemplifica en la ecuación 1 (Peppas, et al., 2000).

$$\ln \frac{M_t}{M_\infty} = \ln K + n \ln t$$

Ecuación 1

En donde M_t/M_∞ es fracción de fármaco liberado a un tiempo t , K es una constante y “ n ” es la pendiente y representa el exponente de difusión, éste indica el probable mecanismo de transporte y el tipo de liberación (tabla 11); es importante mencionar que en este modelo se toman en cuenta los datos hasta el 60 % de la cantidad total liberada.

En los sistemas de liberación de fármacos a base de polímeros, la liberación del fármaco está íntimamente relacionada con la solubilidad del mismo, pero también con el tipo de polímero, los sistemas poliméricos se pueden hinchar (al absorber agua y el fármaco disuelto difundir a través de esta capa) o bien el polímero se puede erosionar, también es posible la combinación de ambos fenómenos. El valor de n nos indica el mecanismo de liberación como se indica en la tabla 11. La cinética liberación (en la que se observa hinchamiento y/o erosión) se puede clasificar como: controlado por la difusión de tipo fickiano; difusión no fickiano o anómala; o controlado por la relajación de las cadenas poliméricas. La tabla 12 (y la figura 23 y 24) muestra que para los lotes 1 y 2, n es mayor a 0.5 y menor a 1 lo que indica un mecanismo de transporte no fickiano (anómalo) dependiente del tiempo, en las figuras 25 y 26 se reportan los datos obtenidos utilizando el modelo de Peppas (los gráficos se obtuvieron a partir de los datos incluidos en el anexo).

Tabla 11. Mecanismo de transporte y tipo de liberación con base al exponente de difusión “n” de acuerdo al modelo de Peppas.

Exponente de difusión “n”	Mecanismo de transporte	Tipo de liberación
0.5	Difusión Fickiana	Dependiente del tiempo $f(t^{0.5})$
$0.5 < n < 1$	No Fickiano (Anómalo)	Dependiente del tiempo $f(t^{n-1})$
1	Transporte caso II	Independiente del tiempo (orden cero)
$n > 1$	Super caso II	Dependiente del tiempo $f(t^{n-1})$

En el caso de fármacos poco solubles en agua, el fármaco disuelto y no disuelto coexisten dentro de la matriz, el fármaco no disuelto no se libera solo por difusión, sino también son importantes los fenómenos de erosión. Que la matriz se disuelva en forma rápida o lenta tiene importancia para aquellos fármacos que son parcial o poco solubles en agua, los procesos difusionales requieren de términos fuertemente dependientes del tiempo. Por otro lado, la liberación del fármaco, dependerá fuertemente de la composición de la matriz polimérica (Andretta, 2003).

Tabla 12. Resultados de los exponentes de difusión “n” de acuerdo al modelo de Peppas.

Lote	Exponente de difusión “n”	Coefficiente de correlación	Tiempo de liberación (h)
1	0.802	0.9876	6-48
2	0.862	0.9827	6-48

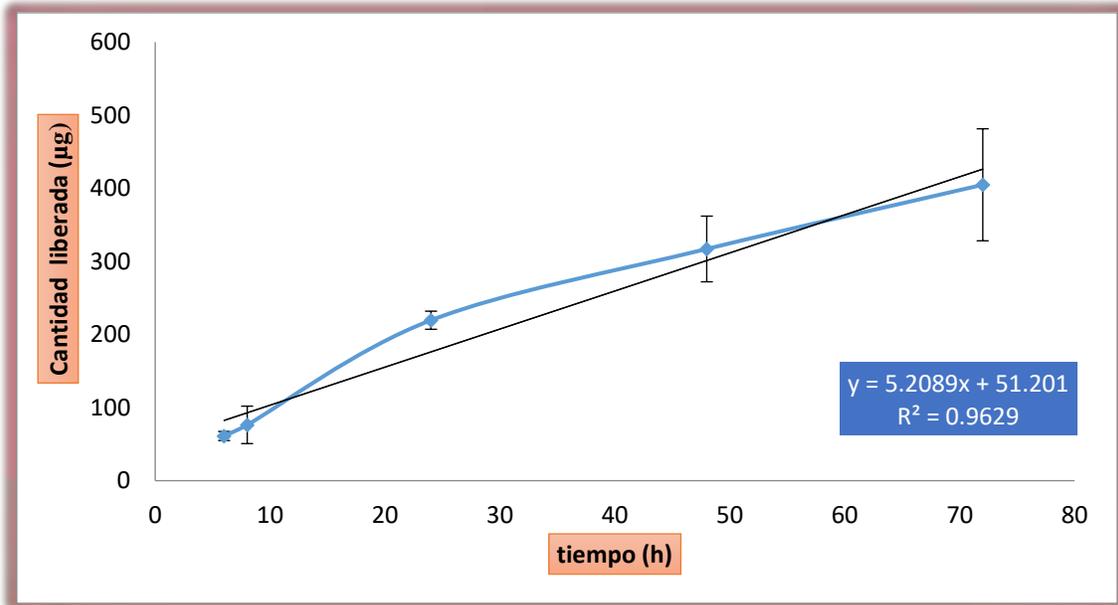


Fig. 23. Perfil de liberación del CLOT a partir de NP's de CAP (Lote 1).

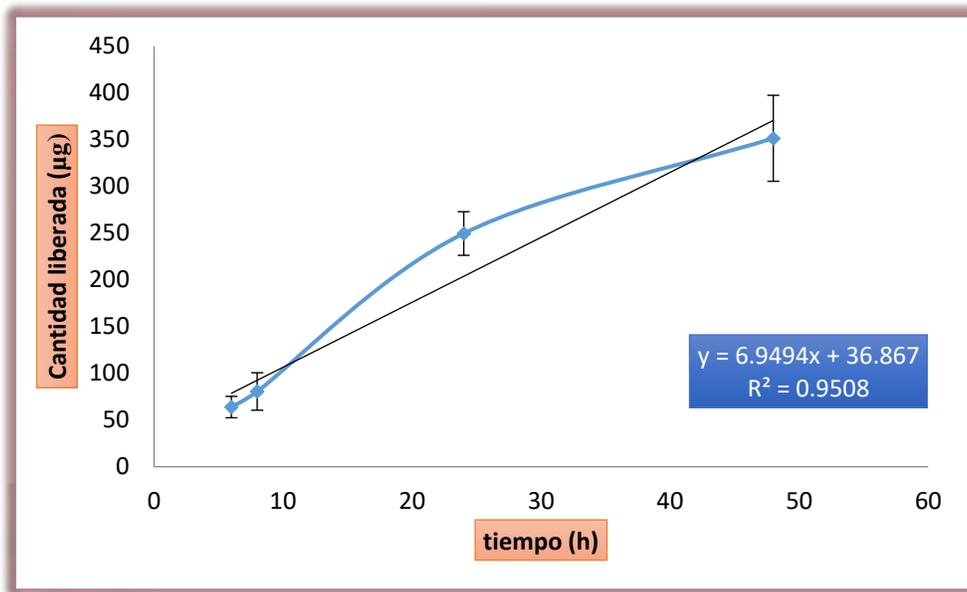


Fig. 24. Perfil de liberación del CLOT a partir de NP's de CAP (Lote 2).

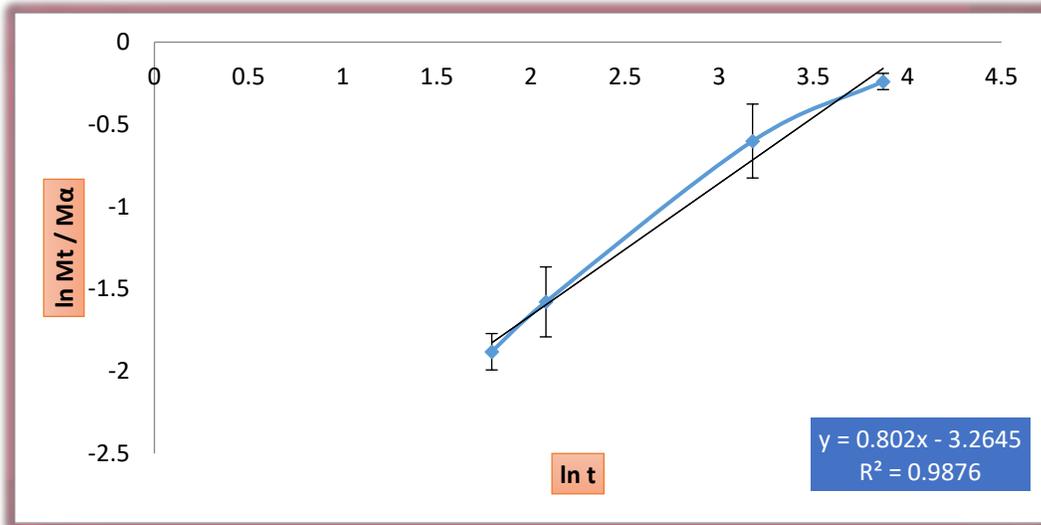


Fig. 25. Promedio de la cantidad liberada de fármaco del lote 1, aplicando el modelo de Peppas.

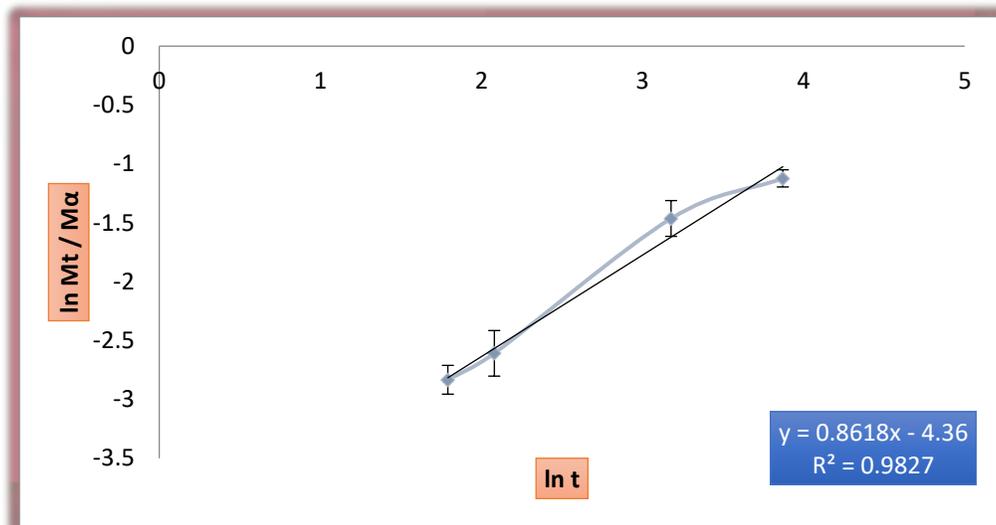


Fig. 26. Promedio de la cantidad liberada de fármaco del lote 2, aplicando el modelo de Peppas.

Los datos también se analizaron de acuerdo al modelo de Higuchi. Este modelo se puede aplicar con mayor exactitud a aquellas matrices unidimensionales tales como películas de polímeros poco solubles que no sufran hinchamiento, como por ejemplo el acetato de celulosa (Andretta, 2003). La ecuación (2) del modelo propuesto es la siguiente:

$$\frac{M_t}{M_\alpha} = K t^2$$

Ecuación 2

En dónde M_t es la cantidad de fármaco liberada a un tiempo t , M_α es la cantidad máxima liberada, K es una constante y t el tiempo. Este modelo se basa en estudiar la velocidad de liberación del fármaco a partir de sistemas matriciales.

El coeficiente de correlación que se obtuvo en los lotes 1 y 2 son cercanos a uno (tabla 13 y figuras 27 y 28), por lo tanto, los datos se ajustan al modelo propuesto por Higuchi (los gráficos se obtuvieron a partir de los datos incluidos en el anexo), y podemos decir que el fármaco se encuentra disperso homogéneamente en todo el sistema matricial (Rodríguez, 2010).

Tabla 13. Constantes obtenidas ajustando la liberación de CLOT al modelo de Higuchi.

Lote	$K_H(t)^{1/2}$	Coefficiente de correlación	Tiempo de liberación (h)
1	56.166	0.9971	6-72
2	66.447	0.9879	6-48

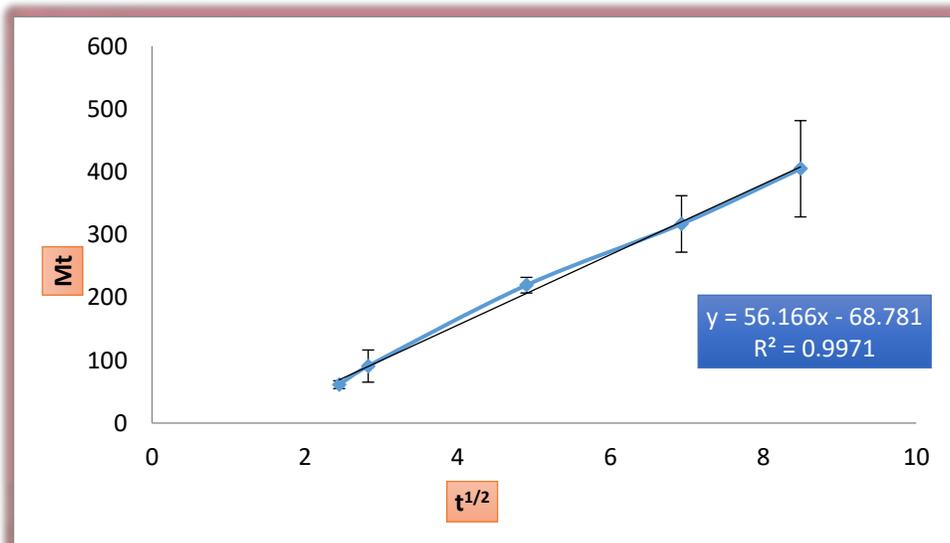


Fig. 27. Ajuste de los datos de liberación del CLOT a partir de las NP's de CAP al modelo de Higuchi (lote 1).

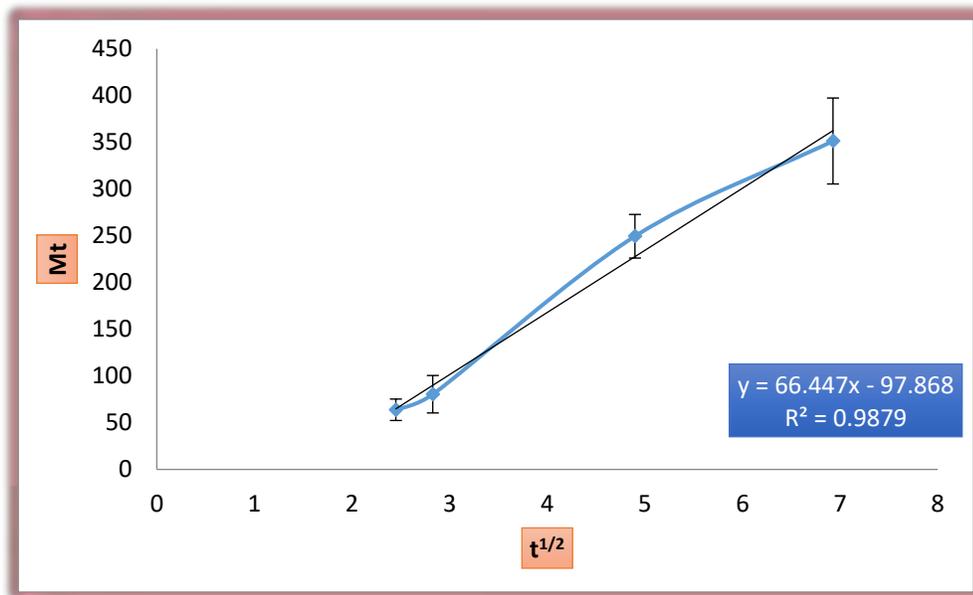


Fig. 28. Ajuste de los datos de liberación del CLOT a partir de las NP's de CAP al modelo de Higuchi (lote 2).

7. CONCLUSIONES

Se prepararon NP's poliméricas con CAP y CLOT por el método de emulsificación-difusión; las NP's tuvieron tamaños cercanos a 800 nm, con índices de polidispersión de 0.091 a 0.165, y potencial zeta de -22.7 a -24.4 mV.

La calorimetría diferencial de barrido evidenció que el CLOT se encuentra disperso a nivel molecular en el CAP. Se obtuvo una eficiencia de encapsulamiento mayor al 50 % y bajos porcentajes de estabilizante residual (<1 %). Los perfiles de liberación *in vitro* mostraron que las NP's tienen un comportamiento de sistema matricial cuya liberación se ajusta al modelo de Higuchi.

No fue posible determinar la cantidad de CLOT en las NP's de CAP por medio de un método directo (espectrofotometría UV-VIS) debido a que el CAP y el CLOT absorben en longitudes de ondas similares.

Se desarrolló un método indirecto para determinar la cantidad de CLOT en las NP's poliméricas. El método indirecto, contempló la formación de un complejo con el reactivo DDQ y el anillo imidazólico que contiene el CLOT. La inestabilidad del complejo en agua impidió la cuantificación de CLOT en los perfiles de liberación *in vitro*.

Se desarrolló un método analítico por HPTLC para evaluar la cantidad de CLOT en los estudios de liberación *in vitro*. Este último método demostró ser; lineal (0.9968), específico, exacto (100.99 ± 1.7), preciso, con un límite de cuantificación de 35.6 ng y un límite de detección de 12.5 ng.

Los objetivos planteados en este trabajo de tesis fueron alcanzados y los resultados del estudio de la liberación *in vitro* indican que las NP's propuestas tienen una aplicación potencial en el tratamiento de infecciones vaginales por hongos.

8. PERSPECTIVAS

- 1) Evaluar la liberación del clotrimazol contenido en las nanopartículas en un medio que favorezca la libre salida del fármaco, ya que en el medio utilizado sólo fue posible cuantificar el fármaco a partir de las 6 horas.
- 2) Evaluar el comportamiento de las nanopartículas usando modelos biológicos como el tejido vaginal de cerda.
- 3) Adaptar el método de cuantificación desarrollado en esta tesis para otros medios de liberación *in vitro* o *ex vivo*.
- 4) Evaluar si el método de cuantificación planteado puede ser utilizado para evaluar la estabilidad de las nanopartículas en función del tiempo, determinando la eficiencia de encapsulamiento.

9. REFERENCIAS.

- Andreetta, H.A. (2003). Fármacos de Acción Prolongada: Mecanismos de Liberación. Usos de Distintos Modelos. *Latin American Journal of Pharmacy*, 22 (4): 355-364.
- Ballou, B., Andreko, S.K., Osuna-Highley, Mc Raven, M., Catalone, T., Bruchez, M.P., Hope, T.J., y Labib, M.E. (2012). Nanoparticle Transport from Mouse Vaginal to Adjacent Lymph Nodes. *PLoS ONE* 7 (12): Recuperado de <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0051995>
- Berginc, K., Skalko, B.N., Basnet, P., y Kristl, A. (2012). Development and Evaluation of an *In Vitro* Vaginal Model for Assessment of Drug's Biopharmaceutical Properties: Curcumin. *AAPS PharmSciTech*, 13 (4): 1045–1053.
- Breuning, M., Brauer, S., y Goeferinch, A. (2008). Polimers and nanoparticles: Intelligent tools for intracellular targeting?. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 68 (1): 112-128.
- Buchanan, C.M., Buchanan, N.L., Edgar, K.J., y Ramsey, M.G. (2007). Solubility and dissolution studies of antifungal drug: hydroxybutenyl- β -cyclo-dextrin complexes. *Cellulose* 14 (1): 35-47.
- Caballero, P.R., Batista, M.R., Cué, B.M., Ortega, G.L., y Rodríguez, B.M. (2000). Artículo de revisión: Vaginitis bacteriana. *RESUMED* 13 (2): 63-75.
- Chan, H.K., y Chi Lip, K.P. (2011). Production methods for nanodrug particles using the bottom-up approach. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 63 (1): 406-416.
- Chun-Wah, M.Y., Yip, J., Liu, L., Cheuk, K., Kan, C.W., Cheung, H.C., y Cheng, S.H. (2012). Chitosan microcapsules loaded with either miconazole nitrate or clotrimazole, prepared via emulsion technique. *Carbohydrate Polymers*, 89 (1): 795-801.
- Clas, S.D., Dalton, C.R., and Hancock, B.C. (1999). Differential scanning calorimetry applications in drug development. *Pharmaceutical Science and Technology Today*. 2 (8), 311-320
- D. van Eyk, A., y Van der Bijl P. (2005). Porcine vaginal mucosa as an *in vitro* permeability model for human vaginal mucosa. *International Journal of Pharmaceutics*, 305 (1): 105-111.
- das Neves, J., Amaral, M.H., y Bahia, M.F., (2008). Performance of an *in vitro* mucoadhesion testing method for vaginal semisolid: Influence of different testing conditions and instrumental parameters. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 69 (1): 622-632.
- das Neves, J., Amiji, M., y Sarmiento, B. (2011). Mucoadhesive nanosystems for vaginal microbicide development: friend or foe?. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology*, 3 (4): 389–399.
- Esposito, E., Ravani, L., Contado, C., Costenaro, A., Drechsler, M., Rossi, D., Menegatti, E., Grandini, A., y Cortesi, R. (2013). Clotrimazole nanoparticle gel for mucosal administration. *Materials Science and Engineering C*, 33 (1): 411-418.
- García, G.N. (2011). Desarrollo de un sistema nanoparticulado de aplicación vaginal (Tesis de licenciatura). FESC, UNAM, México.
- García-Casas, I., Montes, A., Pereyra, C., y Martínez de la Ossa, E.J. (2017a). Co-precipitation of mangiferin with cellulose acetate phthalate by Supercritical antisolvent process. *Journal of CO₂ Utilization*, 22 (1): 197-207.

- García-Casas, I., Montes, A., Pereyra, C., y Martínez de la Ossa, E.J. (2017b). Generation of quercetin / cellulose acetate phthalate systems for delivery by supercritical antisolvent process. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 100 (1): 79-86.
- Goddard III, W.A. W.A., Brenner, D., Lyshevski, S., lafrate, G. (Eds). (2007). Handbook of nanoscience, engineering, and technology. New York, USA: CRC Press Tylor and Francis Group.
- Gómez-Moyano, E., Cid, L.A., Fernández, B.M., Lova N.M., Vera C.A., y Crespo E.V. (2013). Eficacia terapéutica de viriconazol en candidiasis vulvovaginal crónica por *Candida glabrata*. *Revista Iberoamericana de Micología*, 30 (1): 61-63.
- Hans, M., Lowman, A. (2007). Nanoparticles for Drug Delivery. Goddard III, W.A., Brenner, D., Lyshevski, S., lafrate, G. (Eds). Handbook of nanoscience, engineering, and technology (30:1-14). New York, USA: CRC Press Tylor and Francis Group.
- Huang, C., Soenen, S.J., van Gulck, E., Vanham, G., Rejman, J., Van Calenbergh, S., Vervaet, C., Coenye, T., Verstraelen, H., Temmerman, M., Demeester, J., y De Smedt, S.C. (2012). Electrospun celluloseacetate phthalate fibers for semen induced anti- HIV vaginal drug delivery. *Biomaterials*, 33 (1): 962-969.
- Kalhapure, R.S., Sonawane, S.J., Sikwal, D.R., Jadhav, M., Rambharose, S., Mocktar, C., y Govender, T. (2015). Solid lipid nanoparticles of clotrimazole silver complex: An efficient nano antibacterial against *Staphylococcus aureus* and MRSA. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 136 (1): 651-658.
- Kelly, S.L., Lamb D.C., Cannieux, M., Greetham, D., Jackson, C.J., Marczylo, T., ugochukwu, C., y Kelly, D.E. (2001). An old activity in the cytochrome P450 superfamily (CYP51) and a new story of drugs and resistance. *Biochemical Society Transactions*, 29(2): 122–128.
- Khashaba, P.Y., El-Shabouri, S.R., Emara, K.M., y Mohamed, A.M. (2000). Analysis of some antifungal drugs by spectrophotometric and spectrofluorimetric methods in different pharmaceutical dosage forms. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 22 (1): 363-376.
- Kreuter, J. (2007). Nanoparticles-a historical perspective. *Internaciona Journal of Pharmaceutics*, 331 (1): 1-10.
- Kumari, A., Kumar, Y.S., y C. Yadav, S. (2010). Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 75 (1): 1-18.
- Lai, P., Daeer, W., Lobenberg, R., y Prenner, E.J. (2014). Overview of the preparation of organic polymeric nanoparticles for drug delivery base don gelatine, chitosan, poly (D,L-lactide-co-glycolic acid) and polyalkylcyanoacrylate. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 118 (1): 154-163.
- Lara, S., M. del R. (2015). Obtención y Caracterización de Nanopartículas de Clotrimazol y Acetato Ftalato de Celulosa con potencial aplicación vaginal (Informe de investigación de maestría). FESC, UNAM, México.
- Litt, M. (1984). Comparative studies of mucus and mucin physicochemistry. *Ciba Found Symp* 109: 196–211.
- McLean, K.J., Marshall, K.R., Richmond, A., Hunter, I.S., Fowler, K., Kieser, T., Gurcha, S.S., Besra, G.S., y Munro, A.W., (2002). Azole antifungals are potent inhibitors of cytochrome P450 mono-oxygenases and bacterial growth in mycobacteria and streptomycetes. *Microbiology* 148 (10): 2937–2949.
- Mishra, B.PhD., Bhavesh B., P., Bpharm, Tiwari S., y MPharm. (2010). Colloidal nanocarriers: a review on formulation technology, types and applications toward targeted drug delivery. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 6 (1): 9-24.
- Moffat A.C., Osseltan, D., Widdop, B. (2004). Clark's Analysis of Drugs and Poisons. In Pharmaceuticals, body fluids and postmortem material. .3ed.

Mohanraj, V.J., y Chen Y. (2006). Nanoparticles – A review. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 5(1): 561-573.

Mora-Huertas, C.E., 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 (1): 90-122.

Mu, L., and Feng, S.S. (2002). Vitamin E TPGS used as emulsifier in the solvent evaporation / extraction technique for fabrication of polymeric nanospheres for controlled release of paclitaxel (Taxol). *Journal of Controlled Release*, 80 (1-3): 129-144.

Mukherjee, R., y Sirshendu De. (2014). Adsorptive removal of phenolic compounds using cellulose acetate phthalate-alumina nanoparticle mixed matrix membrane. *Journal of Hazardous Materials*, 265 (1): 8-19.

Nardis, C., Mosca, L., y Mastromarino, P. (2013). Vaginal microbiota and sexually transmitted diseases. *Ann Ig.*, 25 (5): 443-456.

Neurath A.R., *, Nathan S., Yun-Yao Li, Lin K., y Jiang, S., (1999). Design of a *microbicide* for Prevention of Sexually Transmitted Diseases Using *Inactive* Pharmaceutical Excipients. *Biologicals* 27 (1):11-21.

Neurath, A. R., Strick, N., y Li, Y.Y. (2002). Anti-HIV-1 activity of cellulose acetate phthalate: Synergy with soluble CD4 and induction of "dead-end" gp41 six helix bundles. *BMC Infectious Diseases*, 30: 2-6.

Padilla, M. (1997). Diagnostico Bacteriologico de la Vaginitis. *Revista del Instituto Medico Sucre*, 62, 43-47.

Palmeira de O. R., Martinez de O.J., y Caramella C. (2015). Special issue on vaginal drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 92 (1): 1-154.

Pasqualotto, A.C., y Denning, D.S. (2008). New and emerging treatments for fungal infections. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 61 (1): i19-i30.

Peppas, N.A., Bures, P., Leobandung, W., y Ichikawa, H. (2000). Hydrogels in pharmaceutical formulations. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 50 (1): 27-46.

Piñón, E., (2008). Diseño, elaboración y caracterización de vectores farmacéuticos a partir de nanopartículas poliméricas y sonogeles de SiO₂ (Tesis doctoral). UNAM, México.

Piñón, S.E., Ganem, Q.A., Alfonso, P. V., y Quintanar, G.D. (2005). Preparation and characterization of triclosan nanoparticles for periodontal treatment. *International Journal of Pharmaceutical*, 249 (1): 217-232.

Porsbring, T., Blanck, H., Tjellström, H., y Backhaus, T. (2009). Toxicity of the pharmaceutical clotrimazole to marine microalgal communities. *Aquatic Toxicology*, 91 (1): 203-211.

Pritchard, J.G. y Akintola, D. A. (1972). Complexation of polyvinyl alcohol with iodine Analytical precision and mechanism. *Talanta*, 19(7): 877-888.

Quintanar, G.D., Allémann, E., Fessi, H. y Doelker, E. (1998). Preparation Techniques and Mechanisms of Formation of Biodegradable Nanoparticles from Preformed Polymers. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 24 (12): 1113-1128.

Quintanar-Guerrero, D. y otros, 1999. Method for producing aqueous colloidal dispersions of nanoparticles. WO, Patente n° 01,002,087.

Renger, B., Végh, Z., y ferenczi-Fodor, K. (2011). Validation of thin layer and high performance thin layer chromatographic methods. *Journal of Chromatography A*, 1218 (19): 2712-2721.

Reyes, O., y Rivera, M. (2015). Preparación y caracterización de nanopartículas poliméricas de Clotrimazol por el método de desplazamiento del solvente para aplicación vaginal (Tesis de licenciatura). FESC, UNAM, México.

Rodríguez, C.I. (2010). Desarrollo y evaluación de sistemas de liberación de fármacos por infiltración de nanopartículas (Tesis doctoral). UNAM, México.

Sánchez, C.F. (2016). Preparación y evaluación de nanoesferas de poli (ϵ -caprolactona) cargadas con clotrimazol (Tesis de licenciatura) FESC, UNAM, México.

Shekunov, B.Y., Chattopadhyay, P., Seitzinger, J., y Huff, R. (2006). Nanoparticles of Poorly Water-Soluble Drugs Prepared by Supercritical Fluid Extraction of Emulsions. *Pharmaceutical Research*, 23 (1): 196–204.

Shrestha, R., Palat, A., Punnoose, A.M., Joshi, S., Ponraju, D., y Solomon, F.D. (2016). Electrospun cellulose acetate phthalate nanofibrous scaffolds fabricated using novel solvent combinations biocompatible for primary chondrocytes and neurons. *Tissue and Cell*, 48 (1): 634-643.

Siepmann, J., y Peppas, N.A. (2011). Review Higuchi equation: Derivation, applications, use and misuse. *International Journal of Pharmaceutics*, 418: 6-12.

Sosnik, A., das Neves, J., y Sarmiento, B. (2014). Mucoadhesive polymers in the design of nano-drug delivery systems for administration by non-parenteral routes: A review. *Progress in Polymer Science*, 39 (1): 2030-2075.

Stenersen, J. (2004). Chemical Pesticides Mode of Action and Toxicology. USA. CRC Press Boca Raton.

Tiffert, T., Ginsburg, H., Krugliak, M., Elford, B.C., y Lew, V.L., (2000). Potent antimalarial activity of clotrimazole *in vitro* cultures of *Plasmodium falciparum*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97 (1): 331–336.

Toth, J., Kardos-Fodor, A., y Halasz-Peterfi, S. (2005). The formation of fine particles by *salting-out* precipitation. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*, 44 (2): 193-200.

van Eyk, A.D., and van der Bijl, P. (2005). Porcine vaginal mucosa as an *in vitro* permeability model for human vaginal mucosa. *International Journal Pharmaceutics*, 305 (1-2): 105-111.

Verma, P., y Ahuja, M. (2015). Optimization, characterization and evaluation of chitosan-tailored cubic nanoparticles of clotrimazole. *International Journal of Biological Macromolecules*, 73 (1): 138-145.

Wulff, H., Miller, M.J., Hansel, W., Grissmer, S., Cahalan, M.D., y Chandy, K.G. (2000). Design of a potent and selective inhibitor of the intermediate conductance Ca^{2+} -activated K^+ channel, *IKCa1*: A potential immunosuppressant. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97 (14): 8151–8156.

Zhang, Y., Chan, H.F., Kam, W. Leong (2013). Advanced materials and processing for drug delivery: The past and the future. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 65 (1), 104-120.

<https://www.drugbank.ca/drugs/DB00257>. Consultada el 23 de marzo de 2018

[https://www.w20.ssaver.gob.mx/guiapedia/index.php/VAGINITIS_AGUDA\(2018\)](https://www.w20.ssaver.gob.mx/guiapedia/index.php/VAGINITIS_AGUDA(2018)). Consultada el 11 de enero de 2018

ANEXO

En este apartado se presenta las tablas y gráficos correspondientes a la cuantificación por HPTLC de los perfiles de liberación *in vitro* de CLOT en los lotes de NP's de CAP (L1 y L2) utilizando como medio FVS con Tween® 20 al 3 %.

Tabla A 1. Resultados de la cuantificación por HPTLC de la liberación de CLOT (Áreas bajo la curva) de las NP's de CAP.

		mg NP's	Área bajo la curva				
			6h	8h	24h	48h	72h
L1	A	15.3	261.2	159.7	636.5	763.3	885.8
	B	16.2	305.4	263.1	664.9	855.9	1058.3
	C	15.7	307.5	295.9	593.5	1008.0	1296.6
L2	A	15.8	336.6	289.4	665.4	1057.8	1020.5
	B	15.8	268.3	212.0	764.2	876.2	979.1
	C	15.2	421.5	332.7	527.1	1060.8	1320.9

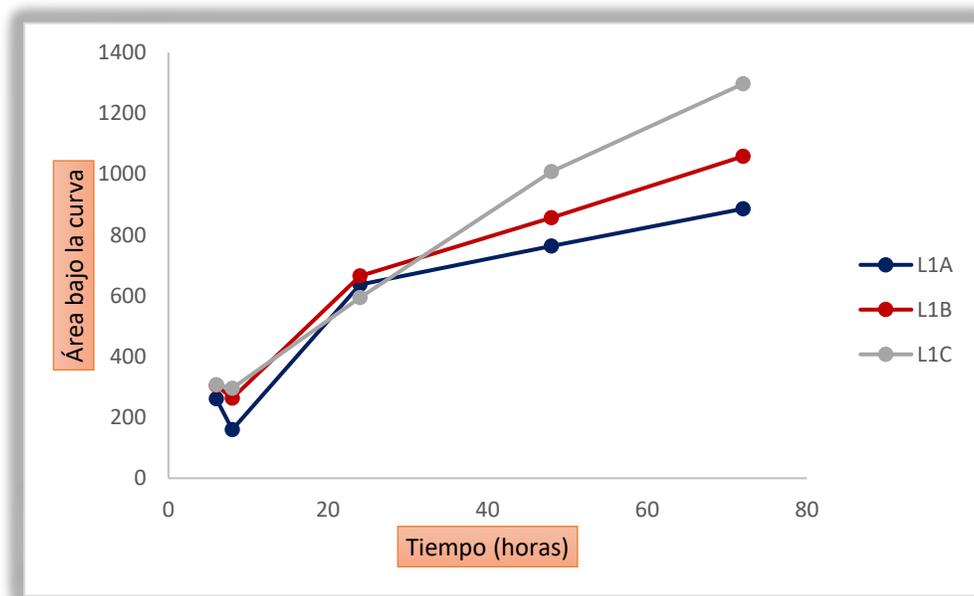


Fig. A 1. Resultados de la liberación de CLOT de las NP's de CAP (L1, n=3).

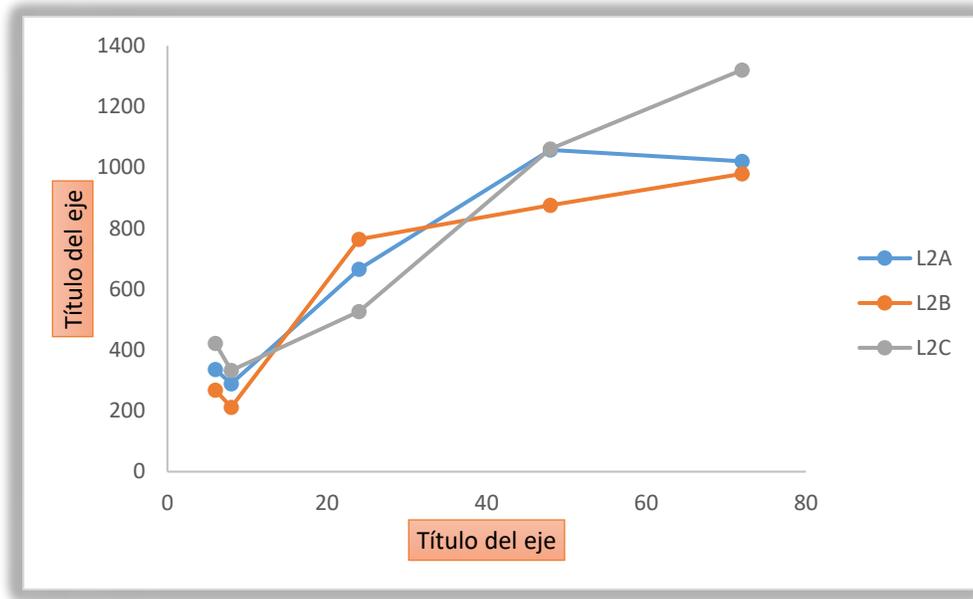


Fig. A 2. Resultados de la liberación de CLOT de las NP's de CAP (L2, n=3).

Tabla A 2. Corrección de las cantidades de la liberación de CLOT de las NP's de CAP (L1).

Cantidades (μg)			Cantidades retiradas			Cantidades retiradas acumuladas			Cantidad corregida liberada		
L1 A	L1B	L1C	L1 A	L1B	L1C	L1 A	L1B	L1C	L1 A	L1B	L1C
54.008	64.495	64.993	0	0	0	0	0	0	54.008	64.495	64.993
44.891	81.689	93.361	2.700	3.225	3.250	2.700	3.225	3.250	47.592	84.913	96.611
214.571	224.678	199.269	2.245	4.084	4.668	4.945	7.309	7.918	219.516	231.987	207.186
259.696	292.649	346.778	10.729	11.234	9.963	15.674	18.543	17.881	275.369	311.193	364.659
303.290	364.678	449.482	12.985	14.632	17.339	28.658	33.176	35.220	331.948	397.853	484.702

Tabla A 3. Corrección de las cantidades de la liberación de CLOT de las NP's de CAP (L2).

Cantidades (μg)			Cantidades retiradas			Cantidades retiradas acumuladas			Cantidad corregida liberada		
L2A	L2B	L2C	L2A	L2B	L2C	L2A	L2B	L2C	L2A	L2B	L2C
71.897	55.693	92.039	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	71.897	55.693	92.039
91.048	63.504	266.143	3.595	2.785	1.264	3.595	2.785	1.264	94.643	66.288	267.407
224.856	260.016	175.639	4.552	3.175	5.323	8.147	5.960	6.587	233.003	265.976	182.226
364.500	299.874	365.568	11.243	13.001	8.782	19.390	18.961	15.369	383.890	318.834	380.936
351.226	336.493	458.130	18.225	14.994	18.278	37.615	33.954	33.647	388.841	370.447	491.777

Tabla A 4. Resultados de la liberación de CLOT de las NP's de CAP (L1) ajustado al modelo de Peppas.

ln (t)	ln(Mt/Ma)			D.S.	Promedio
	L1A	L2A	L3A		
1.792	-1.816	-1.820	-2.009	0.111	-1.882
2.079	-1.942	-1.544	-1.613	0.213	-1.579
3.178	-0.414	-0.539	-0.850	0.225	-0.601
3.871	-0.187	-0.246	-0.285	0.049	-0.239

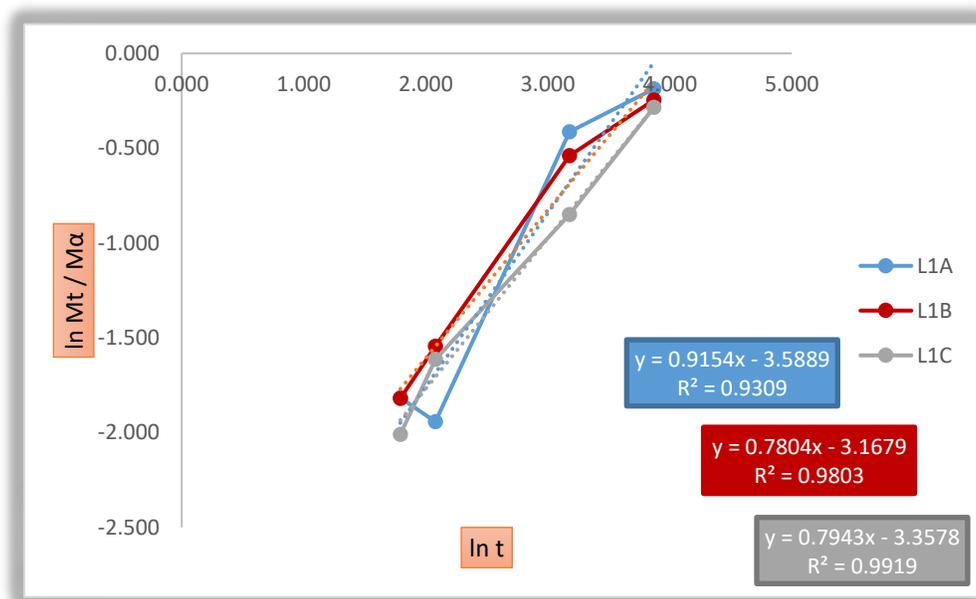


Fig. A 3. Resultados de la liberación de CLOT de las NP's de CAP ajustado al modelo de Peppas (L1, n=3).

Tabla A 5. Resultados de la liberación de CLOT de las NP's de CAP (L1) ajustado al modelo de Higuchi.

$t^{1/2}$	Mt			D.S.	Promedio
	L1A	L2A	L3A		
2.449	54.008	64.495	64.993	6.203	61.165
2.828	47.592	84.913	96.611	25.601	76.372
4.899	219.516	231.987	207.186	12.400	219.563
6.928	275.369	311.193	364.659	44.934	317.074
8.485	331.948	397.853	484.702	76.616	404.835

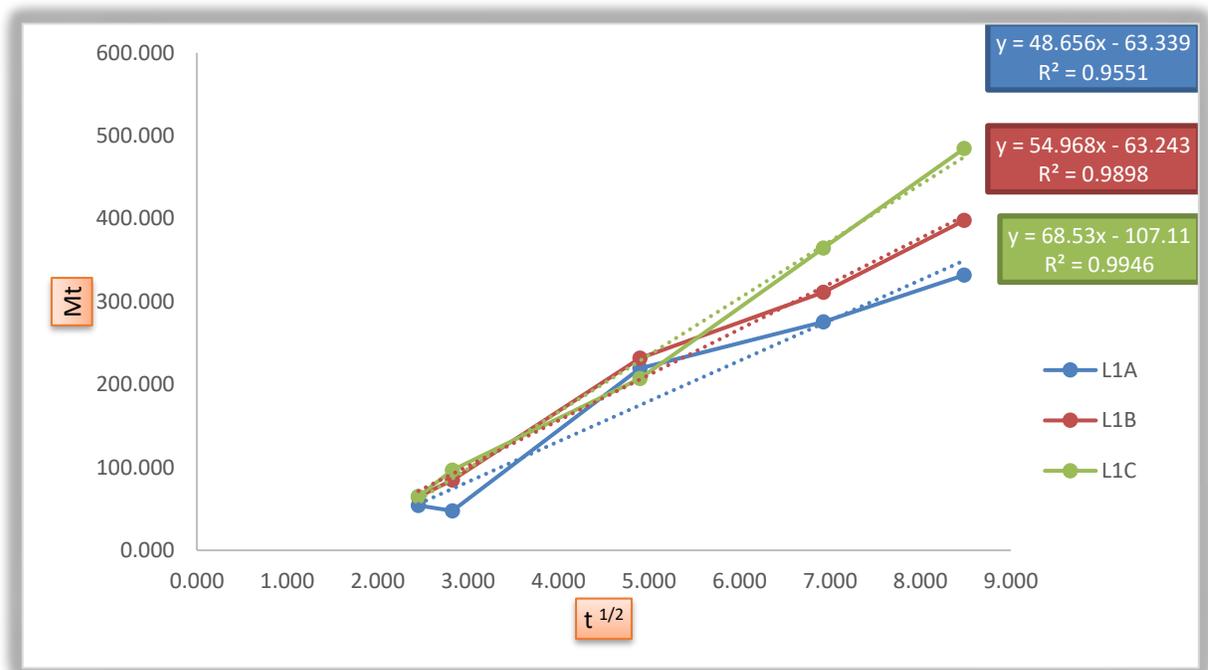


Fig. A 4. Resultados de la liberación de CLOT de las NP's de CAP ajustado al modelo de Higuchi (L1, n=3).

Tabla A 6. Resultados de la liberación de CLOT de las NP's de CAP (L2) ajustado al modelo de Peppas.

ln (t)	ln (Mt / M α)		D.S.	Promedio
	L2A	L2B		
1.792	-2.747	-2.920	0.122	-2.833
2.079	-2.472	-2.746	0.194	-2.609
3.178	-1.571	-1.356	0.152	-1.464
3.871	-1.072	-1.175	0.073	-1.123

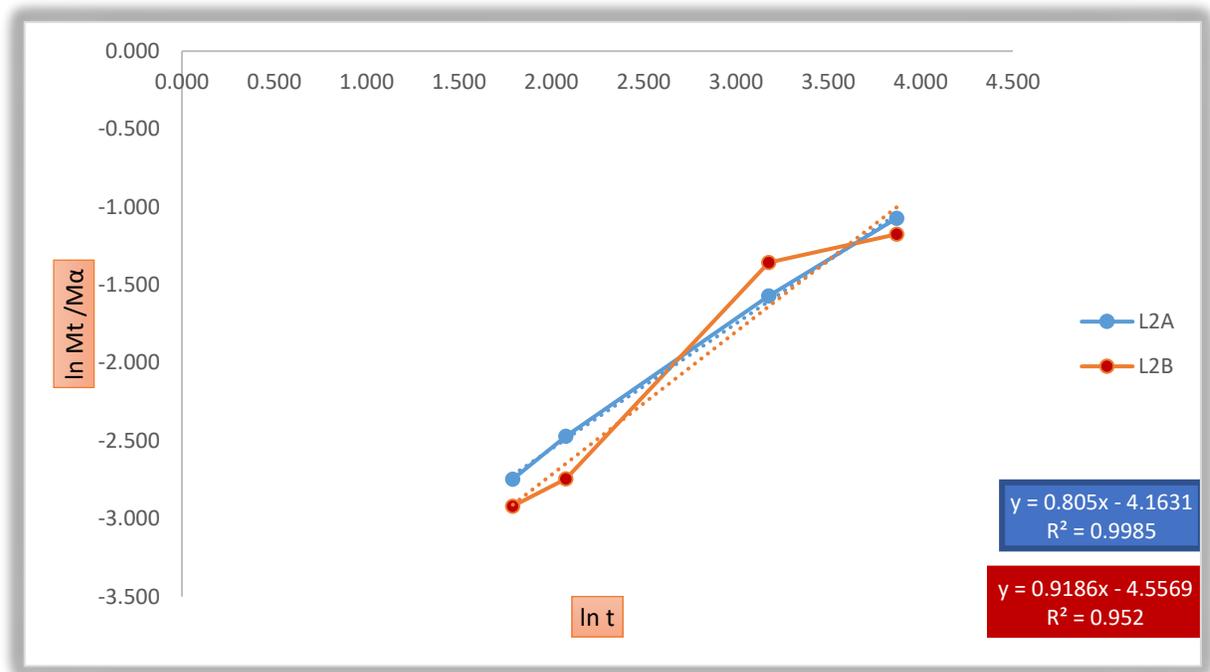


Fig. A 5. Resultados de la liberación de CLOT de las NP's de CAP ajustado al modelo de Peppas (L2, n=2).

Tabla A 7. Resultados de la liberación de CLOT de las NP's de CAP (L2) ajustado al modelo de Higuchi.

$t^{1/2}$	Mt		D.S.	promedio
	L2A	L2B		
2.449	71.897	55.693	11.458	63.795
2.828	94.643	66.288	20.050	80.466
4.899	233.003	265.976	23.315	249.489
6.928	383.890	318.834	46.001	351.362
8.485	388.841	370.447	13.006	379.644

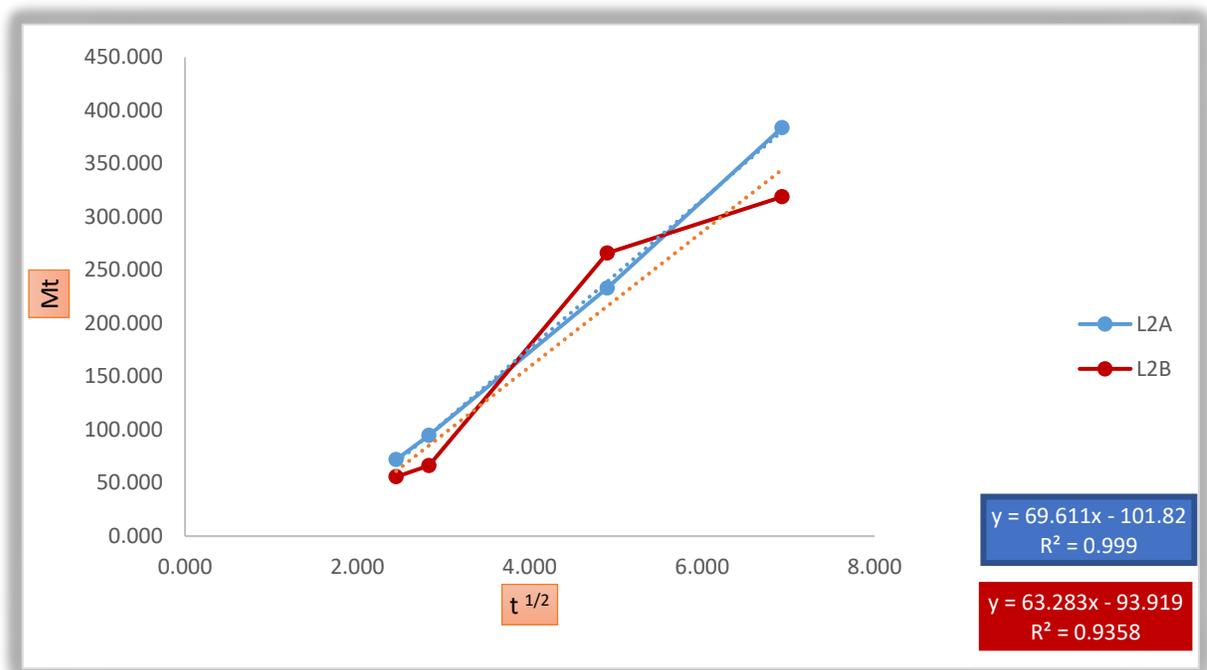


Fig. A 6. Resultados de la liberación de CLOT de las NP's de CAP ajustado al modelo de Higuchi (L2, n=2).