



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTILÁN

**Formulación y evaluación de un gel bioadhesivo
antifúngico de clotrimazol para administración vaginal.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICA FARMACEÚTICA BIÓLOGA

P R E S E N T A:

Ramírez Casiano Mayra

ASESORA

Dra. Elizabeth Piñón Segundo.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

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

ASUNTO: VOTO APROBATORIO

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

ATN: LA. 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

Formulación y evaluación de un gel bioadhesivo antifúngico de Clotrimazol para administración vaginal.

Que presenta la pasante: Mayra Ramírez Casiano

Con número de cuenta: 302326107 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 24 de Abril de 2018.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	D.E.S.S. Rodolfo Cruz Rodríguez	
VOCAL	M.A.E. Francisco Javier Flores Rivera	
SECRETARIO	Dra. Elizabeth Piñón Segundo	
1er. SUPLENTE	M. en C. Guadalupe Alvarez Avila	
2do. SUPLENTE	M. en C. Gabriela Rodríguez Patiño	

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

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.

Dedicatorias.

A **Dios**. Por darme las fuerzas que necesite para terminar esta etapa de mi vida, por darme la sabiduría para continuar en pie y por nunca dejarme sola en ningún momento.

A mi **Mamá, Bertha**, mi amiga, mi confidente, la mejor persona que hay en este mundo. Por siempre estar conmigo cuando más lo necesite, por su paciencia, por tu esfuerzo, siempre alentándome a ser mejor cada día TE AMO, este trabajo también es tuyo.

A mi **Papá, Benjamín** un extraordinario ser humano eres grande papi y tú lo sabes , gracias por hacerme creer que soy inteligente, por todo el esfuerzo que realizaste para terminar esto , por levantarte tan temprano para que nunca nos faltara nada TE AMO , este trabajo también es tuyo.

A mi **hermana, Alma** la mejor hermana mayor gracias por siempre ayudarme y acompañarme en este camino, por siempre creer en mí y por decirme que soy tu química favorita, ¿te digo un secreto? Tú eres mi pedagoga favorita, si yo pude, tú también puedes, échale ganas, yo confié en ti TE AMO Almiux.

A mi **hermana, Liliana** la mejor hermana de en medio gracias por ayudarme a terminar esto, la computadora donde hice este trabajo fue gracias a tu esfuerzo solo te faltó el celular ehheh, muchas gracias por confiar en mí, eres un gran ejemplo, échale ganas porque vas a llegar muy lejos. TE AMO Lilis.

A mis amigos de la FES: **Móni, Martuchis, Yola, Pam, Fabi Enriquez, Jobany, Laura, Blanca, Mayeli, Leonardo, Luis, Sandra, Lupis y Ana Rivera** Gracias a ustedes disfrute al máximo esta etapa desde estar en la biblioteca hasta ir a las fiestas juntos, gracias por las risas y los consejos. A **Fabiola Reyes**, la que me acompañó en mis triunfos y fracasos en la universidad y en la vida, aunque siempre tuvimos diferencias sé que estabas conmigo en cada momento no sabes cómo te agradezco que siempre estuviste ahí, gracias por decirme muchas veces no, porque así supe que podía yo sola.

A Mis compañeros del laboratorio L-13 **Marcos, Joel, Jorge, Nely, Andy, Ana, Miriam y Selene** Gracias por estar conmigo en todo este proceso porque con su compañía esto se hizo más fácil, gracias por brindarme su amistad lo valoro mucho.

“No importa lo lento que vayas mientras no te detengas”……………**Confucio**

Agradecimientos

A la **Dra. Elizabeth Piñón Segundo** por su ayuda y el apoyo en este trabajo, además de siempre alentarme a que lo podía lograr, gracias por dejarme conocer al ser humano y no solo a la dra.

A mis sinodales, **DESS Rodolfo Cruz Rodríguez**, **MAE Francisco Javier Flores Rivera**, **M en C Guadalupe Álvarez Ávila** y **M en C Gabriela Rodríguez Patiño**, por darme sus consejos y su tiempo en la revisión y corrección de esta tesis, son un gran ejemplo para mí.

A la **Dra. María de los Ángeles Cornejo Villegas** por su ayuda con el uso del Texturómetro en el L-11 de la Unidad de Investigación Multidisciplinaria de la FESC

A la **UNAM** en especial a la **FESC**

Porque desde el primer día me sentí orgullosa de pertenecer a una gran institución.

INDICE.

INDICE.

INDICE.	I
ÍNDICE DE FIGURAS.	V
INDICE DE TABLAS.	VII
ABREVIATURAS.....	IX
I. INTRODUCCIÓN.	XI
II. MARCO TEÓRICO	1
1 Anatomía y fisiología de la vagina.	1
1.1 Vagina.	1
1.2 Funciones de la vagina:.....	2
1.3 Características anatómicas.....	2
1.3.1 Medidas.....	2
1.3.2 Capas de la pared vaginal.....	3
1.3.3 Irrigación.....	3
1.3.4 Microflora vaginal	4
1.3.5 pH vaginal.....	4
1.3.6 Flujo vaginal.....	5
1.4 Enfermedades vaginales	6
1.5 Vaginitis.....	7
1.5.1 Vaginosis.....	7
1.5.2 Candidiasis.....	7
1.5.3 Trichomoniasis.....	8
1.6 Tratamientos para diferentes formas de vaginitis.	8
2 Formas Farmacéuticas Vaginales	9
2.1 Óvulos	9
2.2 Comprimidos vaginales.....	9
3 Sistemas Farmacéuticos Semisólidos.....	10
3.1 Generalidades.	10
3.2 Clasificación de sistemas farmacéuticos semisólidos	10
3.2.1 Pastas	10

Índice

3.2.2	Cremas	11
4	Geles	11
4.1	Definición de gel.....	11
4.2	Clasificación de geles.....	11
4.2.1	Hidrófobos.....	11
4.2.2	Hidrófilos.....	11
4.2.3	Según el número de fases en que están constituidos.....	12
4.3	Temperatura de gelificación.....	12
4.4	Propiedades mecánicas y reológicas.....	13
5	Clotrimazol	13
5.1	Propiedades fisicoquímicas.....	14
5.2	Mecanismo de acción.....	14
5.3	Farmacocinética.....	15
6	Adhesión, Bioadhesión y Mucoadhesión	15
6.1	Adhesión.....	15
6.2	Teorías de adhesión.....	15
6.2.1	Teoría electrónica.....	15
6.2.2	Teoría humectante.....	15
6.2.3	Teoría de adsorción.....	16
6.2.4	Teoría de la difusión.....	16
6.2.5	Teoría mecánica.....	16
6.2.6	Teoría de la fractura.....	16
6.3	Bioadhesivos.....	16
6.4	Mucoadhesivos.....	16
6.5	Evaluación de Bioadhesivos.....	18
6.5.1	Evaluaciones <i>in vitro</i>	18
6.5.2	Evaluaciones <i>in vivo</i>	18
6.5.3	Evaluaciones <i>ex vivo</i>	18
6.6	Medición de pH.....	18
6.7	Medición de viscosidad.....	19
6.8	Estudios de difusión <i>in vitro</i>	19
6.9	Prueba de solubilidad.....	20
6.10	Estudios de bioadhesión.....	20

Índice

6.11	Análisis de perfil de textura.	20
6.12	Prueba de fuerza de adhesión.....	21
6.13	Estudios de mucoadhesión.	21
7	Polímeros	22
7.1	Copolímeros	22
7.2	Poloxámeros.....	23
7.2.1	Poloxámero 407 o Pluronic [®] F-127.....	24
8	Formas Farmacéuticas de Liberación Modificada.	24
8.1	Liberación controlada.	25
8.2	Liberación retardada.....	25
8.3	Liberación acelerada.....	25
8.4	Ventajas.	26
8.5	Desventajas.	26
8.6	Pruebas realizadas a medicamentos para poder ser genéricos en México. NORMA Oficial Mexicana NOM-177-SSA1-1998	26
III.	OBJETIVOS.	29
1.	Objetivo General.	29
2.	Objetivos Particulares.	29
IV.	MATERIALES Y MÉTODOS.	30
1.	Materiales	30
1.1.	Reactivos.	30
1.2.	Equipos:.....	30
1.3.	Otros:	31
1.4.	Material biológico:.....	31
2.	Métodos	32
2.1.	Preparación de soluciones.	32
2.2.	Pruebas de solubilidad.....	33
2.3.	Barridos espectrofotométricos	33
2.4.	Desarrollo de métodos analíticos.....	33
2.5.	Preparación del Gel Pluronic [®] F-127.....	34
2.6.	Adición del principio activo	35
2.7.	Caracterización de los Geles.	35
2.8.	Perfil de liberación <i>in vitro</i>	36

Índice

2.9.	Cinética de permeación <i>in vitro</i>	36
2.10.	Pruebas de bioadhesión.....	38
V.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	40
VI.	CONCLUSIONES	69
VII.	PERSPECTIVAS	70
VIII.	REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	71
IX.	ANEXOS	77

ÍNDICE DE FIGURAS.

Figura 1. Útero y vagina (Tomada de Moore, 2003)	1
Figura 2. Medidas de la vagina (fertilab.net)	2
Figura 3. Adaptación del Dibujo esquemático de la mucosa vaginal 1: vasos capilares, 2: arterias, 3: venas (Modificada de Das Neves y Bahia. 2006)	3
Figura 4. Vasculatura de la vagina (Tomada de Moore 2003)	4
Figura 5. Tipos de flujos vaginales (reproduccionasistida.org)	6
Figura 6. Óvulos de Monistat 7 para la infección por levaduras (tomada de flujovaginal.com).....	9
Figura 7. Comprimidos vaginales (Tomada de sanareva.es)	9
Figura 8. Estructura del clotrimazol (NCBI, 2016)	13
Figura 9. Mecanismo de acción del clotrimazol (Modificado de cienciasdejoseleg.blogspot.mx) 14	
Figura 10. Representaciones esquemáticas del moco: (a) cadena de glicoproteínas (b) tetrámero de glucoproteína (Ahuja, Khar y Ali 1997)	17
Figura 11. Dibujo esquemático de los pasos involucrados en la teoría de interpenetración (1) Polímero en la capa mucosa (2) Interpenetración del polímero y el mucus (3) Consolidación de la fuerza de adhesión A: Partícula del polímero B: Capa mucosa C: Celular epitelial (Das Neves y Bahia, 2006).....	18
Figura 12. Simulación celdas de Franz (Modificada de Debandi, François y Daraio, 2011).....	19
Figura 13. Aparato para la prueba de bioadhesión (Modificada de Bachhav y Petravale 2009) ..	20
Figura 14. Tensiometro de Du Nouÿ (Quintanar-Guerrero 2001)	21
Figura 15. Contacto del gel y la mucosa en el Texturómetro (Modificada de Hägerström, 2004) 21	
Figura 16. Tipos de polímeros.....	22
Figura 17. Tipos de copolímeros; a: Al azar b: Dibloque c: Tribloque d: De injerto e: Estrella (Pasquali, Chiappetta y Bregni, 2005)	22
Figura 18. Estructura del poloxámero 407	24
Figura 19. Sistemas de liberación modificada. Representación de la concentración plasmática (Cp) en función del tiempo (Reyes y Rivera 2015)	25
Figura 20. Solución con tejido vaginal y FVS con Tween®20 al 3 % p/v.....	32
Figura 21. Viscosímetro DV3 Brookfield® usado para las pruebas reológicas de los geles de Pluronic®F-127	35
Figura 22. Muestra de la realización de los perfiles de liberación <i>in vitro</i>	36
Figura 23. Muestra del estudio realizado de permeaciones en celdas tipo Franz	36
Figura 24. Muestra de la prueba de residencia acoplada al aparato de desintegración	38
Figura 25. Muestra de la prueba realizada de la distancia recorrida método acoplado al de Nakamura y Otha 1996.....	38
Figura 26. Análisis de Textura con Texturómetro Brookfield®	39
Figura 27. Espectro de absorción de la solución de Tween®20 al 3 % p/v con CLOT	42
Figura 28. Curva de calibración del CLOT con Tween®20 al 3 % p/v pH 4.2	43
Figura 29. Curva de calibración con tejido vaginal a pH 4.2	44
Figura 30. Curva de calibración con tejido vaginal y Gelucire® 44/14 a pH 7.4	45
Figura 31. Curva de calibración del CLOT con metanol	46
Figura 32. Temperatura de gelificación en diferentes concentraciones del gel Pluronic® F-127 ..	47

Índice de figuras

Figura 33. Gel Pluronic® F-127 al 20 % p/v a temperatura ambiente (25 ± 2 °C)	48
Figura 34. Gel Pluronic® F-127 al 22 % p/v a temperatura ambiente (25 ± 2 °C)	49
Figura 35. Gel Pluronic® F-127 al 24 % p/v a temperatura ambiente (25 ± 2 °C)	49
Figura 36. Gel Pluronic® F-127 al 29 % p/v a temperatura ambiente (25 ± 2 °C)	50
Figura 37. Gráfica de viscosidades a diferentes temperaturas (azul: 25 ± 2 °C y rojo: 37 ± 2 °C) 51	
Figura 38. Gel Pluronic®F-127 24 % con CLOT al 1 % p/v (1) tres días después de prepararlo (2) recién preparado	52
Figura 39. Comparación de la temperatura de gelificación entre el gel Pluronic® F-127 al 24 % p/v y el gel Pluronic® F-127 al 24 % p/v con CLOT al 1 % p/v	53
Figura 40. Gráfico de viscosidades a diferentes temperaturas con Gel al 24 % y 29 % p/v adicionando CLOT al 1 % y 0.5 % p/v respectivamente	54
Figura 41. Gel Pluronic® F-127 al 29 % con CLOT al 0.5 % p/v	55
Figura 42. Gráfico del porcentaje de liberación en función del tiempo de la solución de CLOT ...	56
Figura 43. Gráfico del porcentaje liberado en función del tiempo del gel de CLOT al 1 % p/v	57
Figura 44. Gráfico comparativo del porcentaje liberado en función del tiempo entre la solución de CLOT y el gel con CLOT al 1 % p/v	58
Figura 45. Gráfico de Orden cero de la cantidad de CLOT en función del tiempo	59
Figura 46. Gráfico de Higuchi de la cantidad de CLOT en función del tiempo ^{1/2}	60
Figura 47. Gráfico del modelo matemático de Peppas del $\ln (M_t/M_\infty)$ en función del $\ln t$ (h)	61
Figura 48. Flujo μg de CLOT por unidad de área en función del tiempo.....	63
Figura 49. Porcentaje permeado a las 8 h del gel con CLOT (n=1, 2, 3 y 4)	64
Figura 50. Comparación del porcentaje permeado entre el gel y la solución del CLOT 64	
Figura A1. 1. Gráfico comparativo del Labrasol® al 3 % p/v y Labrasol® al 3 % p/v con CLOT	77
Figura A1. 2. Barrido espectrofotométrico con diferentes concentraciones de Tween® 20 y CLOT	77
Figura A1. 3. Barrido comparativo de Tween® 20 al 4% p/v y Tween® al 4% y CLOT	78
Figura A1. 4. Barrido del CLOT disuelto en metanol con tejido vaginal.	78
Figura A3. 1. Agujas utilizadas para la prueba de viscosidad, 1: aguja N. 62 y 2: Aguja N. 96 Helipath®	91
Figura A4. 1. Gráfico de la liberación del CLOT ajustado al modelo de orden cero	99
Figura A4. 2. Gráfico de la liberación del CLOT ajustado al modelo Higuchi	99
Figura A4. 3. Gráfico de la liberación del CLOT ajustado al modelo de Peppas.....	99

INDICE DE TABLAS.

Tabla 1. Enfermedades vaginales más frecuentes; cuadro clínico y agente causal. (Cires-Pujol et al., 2003)	8
Tabla 2. Solubilidad del CLOT en diferentes soluciones; FVS, FVS con Tween® 20 y Labrasol® ...	40
Tabla 3. Formulación de dos geles bioadhesivos para pruebas reológicas.....	52
Tabla 4. Valores obtenidos en los diferentes modelos matemáticos utilizados.....	58
Tabla 5. Valores de “n” Krosmeier- Peppas (Reyes, Rivera, 2015)	61
Tabla 6. Extracción del CLOT remanente en el tejido vaginal	65
Tabla 7. Porcentaje de recobro corregido en la extracción del CLOT remanente en la vagina ...	65
Tabla 8. Análisis de textura con Texturometro Brookfield®.....	67
Tabla 9. Datos de la prueba de residencia en tejido vaginal porcino	68
Tabla A2. 1. Curva de calibración con FVS y Tween®20 al 3 % p/v pH 4.2	79
Tabla A2. 2. Precisión del método 1	79
Tabla A2. 3. Tabla A2.3. Análisis de varianza para evaluar la linealidad del sistema en el método 1	80
Tabla A2. 4. Análisis de varianza para determinar si el intercepto es diferente a cero para el método 1.....	81
Tabla A2. 5. Curva de calibración con tejido vaginal a pH 4.2	81
Tabla A2. 6. Precisión del método 2	82
Tabla A2. 7. Análisis de varianza para determinar la linealidad del CLOT del método 2	82
Tabla A2. 8. Análisis de varianza para evaluar si el intercepto es diferente a cero para el metodo 2	83
Tabla A2. 9. Curva de calibración con Gelucire® y tejido vaginal porcino a pH 7.4	84
Tabla A2. 10. Precisión para el método 3	84
Tabla A2. 11. Análisis de varianza para evaluar la linealidad del sistema del método 3	85
Tabla A2. 12. Análisis de varianza para evaluar si el intercepto es diferente a cero para el método 3	86
Tabla A2. 13. Curva de calibración CLOT disuelto en metanol.....	87
Tabla A2. 14. Precisión para el método 4.	87
Tabla A2. 15. Análisis de varianza para evaluar linealidad del sistema para el método 4.....	88
Tabla A2. 16. Análisis de varianza para evaluar si el intercepto es diferente a cero para el método 4.	89
Tabla A3. 1. Parámetros utilizados para medir la viscosidad en los geles de Pluronic® F-127 a temperatura ambiente ($25 \pm 2^\circ \text{C}$)	90
Tabla A3. 2. Tabla A3.2. Parametros utilizados para pedir la viscosidad en los geles de Pluronic® F-127 a temperatura fisiológica ($37 \pm 2^\circ \text{C}$)	90
Tabla A4. 1. Perfiles de liberación del gel de Pluronic® F-127 al 24% y CLOT al 1% (n=1)	92
Tabla A4. 2. Perfiles de liberación del gel de Pluronic® F-127 al 24 % con CLOT al 1 % (n=2)	93
Tabla A4. 3. Perfiles de liberación del gel de Pluronic® F-127 al 24 % con CLOT al 1 % (n=3)	93

Índice de tablas

Tabla A4. 4. Promedio de los sistemas en los perfiles de liberación del gel	94
Tabla A4. 5. Perfiles de liberación de la solución de CLOT (n=1)	94
Tabla A4. 6. Perfiles de liberación en la solución de CLOT (n=2)	95
Tabla A4. 7. Perfiles de liberación de la solución de CLOT (n=3)	95
Tabla A4. 8. Perfiles de liberación de la solución de CLOT (n=4)	96
Tabla A4. 9. Promedios de los perfiles de liberación de la solución de CLOT	96
Tabla A4. 10. Aplicación de modelos matemáticos para el gel de Pluronic® F-127 al 24% y CLOT al 1% (n=1)	97
Tabla A4. 11. Aplicación de modelos matemáticos para el gel de Pluronic® F-127 al 24% y CLOT al 1% (n=2)	97
Tabla A4. 12. Aplicación de modelos matemáticos para el gel de Pluronic® F-127 al 24% y CLOT al 1% (n=3)	98
Tabla A5. 1. Cinética de permeación del gel de Pluronic® F-127 al 24 % con CLOT al 1 % p/v (n=1)	100
Tabla A5. 2. Cinética de permeación del gel de Pluronic® F-127 al 24 % con CLOT al 1 % p/v (n=2)	100
Tabla A5. 3. Cinética de permeación del gel de Pluronic® F-127 al 24 % con CLOT al 1 % p/v (n=3).	101
Tabla A5. 4. Cinética de permeación del gel de Pluronic® F-127 al 24 % con CLOT al 1 % p/v (n=4).	101
Tabla A5. 5. Cinética de permeación del gel de Pluronic® F-127 al 24 % con CLOT al 1 % p/v (n=5).	102
Tabla A5. 6. Cinética de permeación del gel de Pluronic® F-127 al 24 % con CLOT al 1 % p/v (n=6).	102

ABREVIATURAS.

Abreviación

Significado

FVS	Fluido Vaginal Simulado
CLOT	Clotrimazol
SSF	Solución Salina Fisiológica
w/o	“wáter/oil”, agua/aceite
o/w	“oil/wáter”, aceite/agua
FEUM	Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos
USP	Farmacopea de los Estados Unidos
D.E.	Desviación Estándar
Abs	Absorbancia
w/s	“wáter/silicone”, agua/silicona
p.p.	Precipitado
OXY	Oxybutina
HPMC	Hidroxipropilmetilcelulosa
H₀	Hipótesis nula
H₁	Hipótesis alterna
Mt	Cantidad de fármaco liberada al tiempo uno
M[∞]	Cantidad de fármaco liberado al equilibrio
PPO	Polioxipropileno
PEP	Polioxietileno
p/v	Peso/volumen
UV/Vis	Ultravioleta/Visible
C.V.	Coefficiente de Variación

Abreviaturas

K_H	Constante de Higuchi
r^2	Coefficiente de determinación
n	Valor de “ n ” en el modelos de Peppas
K_0	Constante de orden cero
λ_{\max}	Longitud de onda de máxima absorción

I. INTRODUCCIÓN.

En la actualidad la administración vaginal ha tenido gran relevancia debido a la forma fácil de administración, así como la irrigación de la zona y que evita el efecto del primer paso. Para esto se han diseñado varias formas farmacéuticas como los óvulos, tabletas, parches cremas y geles siendo estos últimos los más vanguardistas hoy en día debido a la utilización de polímeros bioadhesivos que hacen que incremente el tiempo de dosis farmacéutica.

Hoy en día, la mayoría de los "nuevos" patógenos oportunistas pertenece a la categoría de hongos estos colonizan el revestimiento mucoso de la vagina, uno de ellos es *Candida albicans* que contribuye al deterioro de la superficie de la mucosa, que, a su vez, sirve como un depósito o una fuente para futuras infecciones, lo que lleva a infecciones crónicas y graves y llegan a tener consecuencias como; infertilidad

El clotrimazol es uno de los antifúngicos más utilizados para infecciones vaginales causadas por hongos como *C. albicans*, sin embargo, puede causar hepatotoxicidad, por esta razón se buscan diferentes formas farmacéuticas con administración local y así evitar el paso sistémico.

Los geles son sistemas semisólidos de dos fases; la continua y la dispersa, tienen gran utilidad en la industria farmacéutica.

Los poloxámeros, son copolímeros compuestos de PEO y PPO, se han investigado como los sistemas de administración de fármacos, mostrando resultados prometedores de productos biofarmacéuticos, farmacodinámicos y farmacocinéticos

Una de las principales ventajas del Pluronic[®] F-127 es su capacidad de formar geles cerca de la temperatura corporal, debido a su autoensamblaje en micelas. En respuesta a la temperatura y concentración, las unidades hidrofóbicas PPO son deshidratadas y agregadas, mientras que las unidades hidrófilas de PEO permanecen hidratadas.

Para este trabajo se realizaron 4 concentraciones diferentes de Pluronic[®] F-127 a 20 %, 22 %, 24 % y 29 % p/v se utilizó el método en frío un vez realizados los geles se caracterizaron midiendo viscosidad y temperatura de gelificación.

El análisis reológico es una técnica poderosa para comprender investigar el proceso de gelificación y las propiedades viscoelásticas de geles termosensibles

II. MARCO TEÓRICO

1 Anatomía y fisiología de la vagina.

1.1 Vagina.

La vagina (del latín vagina, 'vaina') Es un órgano musculomembranoso que va desde el útero hasta la vulva, y constituye el órgano femenino (Latarjet, 2002), forma parte del aparato reproductor femenino. En las hembras de los mamíferos, se extiende desde el vestíbulo vaginal hasta el cérvix uterino. En la Figura 1 se muestra las partes del útero y de la vagina.

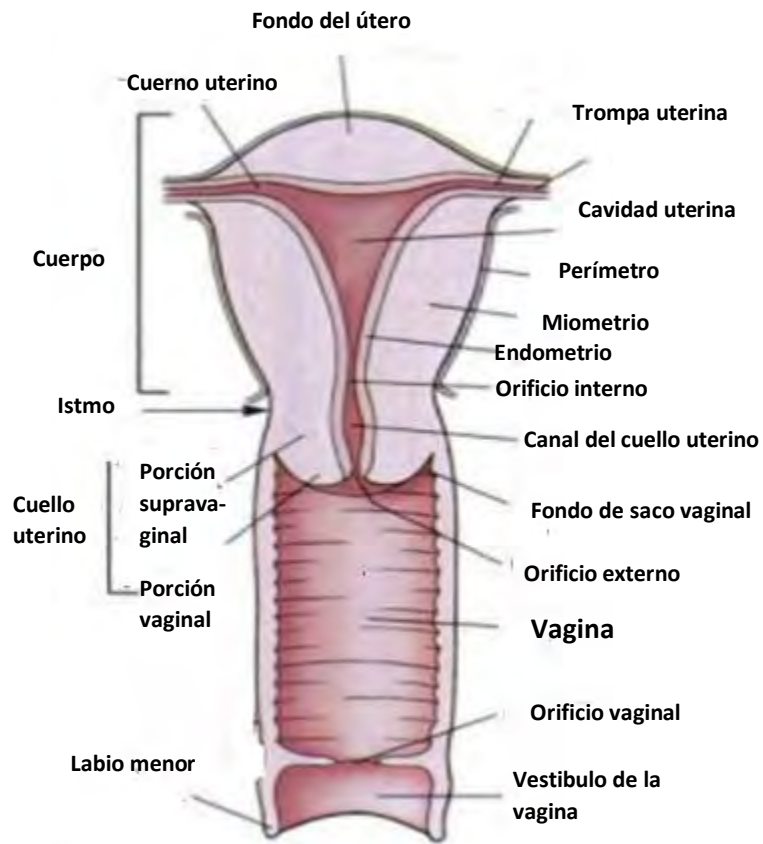


Figura 1. Útero y vagina (Tomada de Moore, 2003)

1.2 Funciones de la vagina:

- Sirve como conducto excretor para el líquido menstrual
- Forma la porción inferior del canal pélvico (canal de parto)
- Recibe al pene y al eyaculado durante el coito.
- Comunica superiormente con el conducto del cuello del útero que se extiende desde el istmo del útero hasta el orificio externo del útero e inferiormente con el vestíbulo de la vagina (Moore, 2003)
- Es la salida natural del flujo menstrual durante la regla y del moco cervical que genera el cuello del útero antes y después de la ovulación.
- Cumple con la función de facilitar la penetración mediante la lubricación que generan las secreciones de las glándulas de Bartolino.
- Se ubica el llamado punto G, cuya estimulación causa, junto al clítoris, la sensación de placer.
- La vascularización de la vagina permite el paso a la circulación sistémica de medicamentos sin atravesar previamente por hígado.

1.3 Características anatómicas.

1.3.1 Medidas.

La longitud de la vagina en humanos varía según razas y genotipos es de 8 a 11 cm como promedio. Tiene en su cara anterior una longitud de 7 cm, mientras la posterior, que es la más larga, mide 9 cm. En la Figura 2 se muestran las medidas del útero y la vagina Sin embargo puede dilatarse, aumentando su longitud tres o cuatro centímetros más de lo normal.

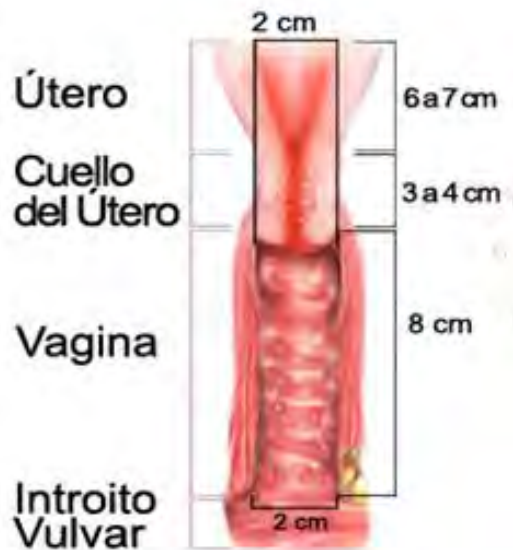


Figura 2. Medidas de la vagina (fertilab.net)

Marco Teórico

1.3.2 Capas de la pared vaginal

En la pared vaginal se pueden observar tres capas

1. Conjuntiva o profunda: Está formada por fibras conjuntivas y elásticas
2. Muscular o media: formada por fibras musculosas lisas
3. Capa superficial: está constituida por un epitelio plano poliestratificado parecido al de la piel. Esta capa sufre modificaciones por las hormonas de los ovarios

En la figura 3 se pueden observar las capas de la vagina.

La vagina no posee formaciones glandulares y por lo tanto no está facultada para secretar, el líquido o exudado que contiene, no es una secreción si no una trasudación serosa que produce la descamación del epitelio. (Santos Ramos, 1996)



Figura 3. Adaptación del Dibujo esquemático de la mucosa vaginal 1: vasos capilares, 2: arterias, 3: venas (Modificada de Das Neves y Bahia. 2006)

1.3.3 Irrigación.

Los vasos sanguíneos que irrigan la porción superior de la vagina derivan de las arterias uterinas (Moore, 2003), cruza por delante del uréter de su mismo lado, y de las ramas cérvico vaginales originadas de la misma arteria uterina después de cruzar el uréter. En la figura 4 se observan las arterias y venas que se encuentran en la vagina

Marco Teórico

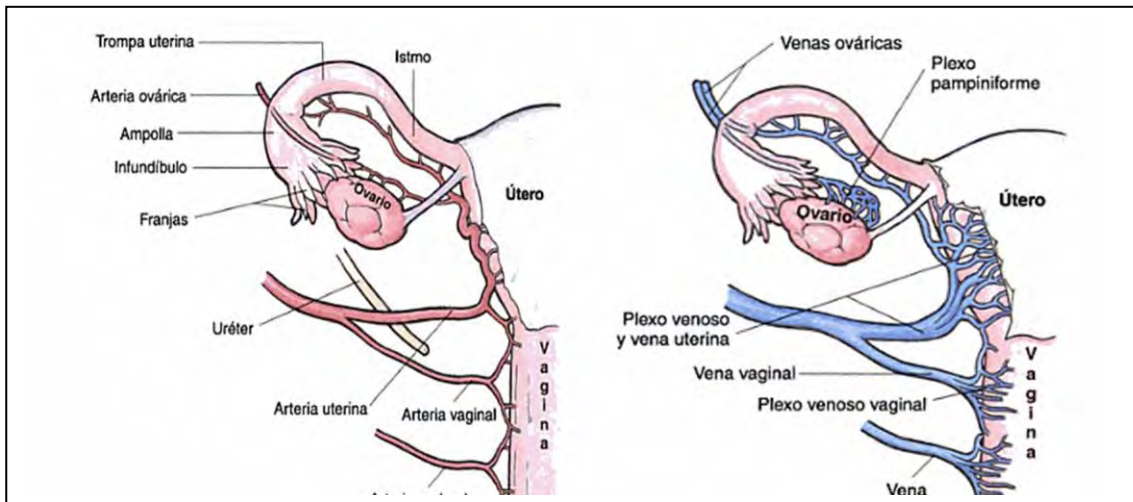


Figura 4. Vasculatura de la vagina (Tomada de Moore 2003)

Las arterias vaginales que irrigan las porciones medias e inferior de la vagina derivan de la arteria rectal media y la arteria pudenda interna. Las venas vaginales forman los plexos venosos vaginales a lo largo de las caras laterales vaginales y dentro de la mucosa vaginal. (Moore, 2003)

1.3.4 Microflora vaginal

La flora vaginal es un sistema dinámico que consiste principalmente en *Lactobacillus* que son el organismo más prevalente en el ambiente vaginal junto con muchos otros aerobios facultativos. El contenido de glucógeno del epitelio vaginal superficial mostró una tendencia a aumentar a lo largo del ciclo y luego cae en la fase premenstrual tardía. Esto era por la excreción de estrógenos a través del ciclo (Valenta, 2005)

1.3.5 pH vaginal.

La microflora normal produce demasiado ácido láctico para acidificar las secreciones vaginales el pH esta entre 3.5 y 4.5

El pH vaginal en la mujer adulta oscila entre 4 y 5 siendo responsable directo el bacilo de Döderlein, es un bacilo Gram positivo que coloniza la vagina degradando los carbohidratos en ácido láctico. El mantenimiento del pH ayuda a la defensa de ciertas patologías (Valenta, 2005)

Es distinto en cada momento y etapa de la vida, su alteración puede favorecer algún tipo de infección:

Marco Teórico

De niña a la pubertad: pH 7.0 (6.8 a 7.2)

De pubertad a menopausia: hay situaciones como:

- ✓ Fase menstrual pH 7.0
- ✓ Fase premenstrual pH 4.0 (3.8 a 4.2)
- ✓ El resto del ciclo el pH varía entre 4.0 y 5.0
- ✓ Época gestacional es igual que a la premenstrual $\text{pH} \leq 4.5$
- ✓ Menopausia pH similar al de la niñez 7.0 (6.8 a 7.2)
- ✓ El pH de secreción endocervical y moco cervical esta entre 6.3 y 6.9

1.3.6 Flujo vaginal

Se refiere a las secreciones provenientes de la vagina y puede variar en:

- ✓ Consistencia (espeso, pastoso, líquido)
- ✓ Color (transparente, turbio, con sangre, blanco, amarillo, verde)
- ✓ Olor (normal, inodoro, maloliente).

El fluido vaginal se compone de moco proveniente del cuello uterino, el cual es una estructura altamente viscosa que regula la penetración de espermatozoides y bacterias al tracto reproductivo superior.

La composición del moco varía ampliamente según la especie animal, la ubicación anatómica y el estado normal o patológico del organismo. Es secretada por las células caliciformes que recubren el epitelio o por glándulas exocrinas especiales con células mucosas acini. Las propiedades de lubricación de las secreciones de moco son el resultado de sus propiedades viscosas y formadoras de gel. El moco vaginal tiene la siguiente composición general (Ahuja, Khar y Ali, 1997)

Agua	95%
Glicoproteínas y lípidos	0.5-5%
Sales minerales	1%
Proteínas libres	0.5-1%

Las siguientes situaciones pueden aumentar la cantidad de flujo vaginal normal:

- ✓ Estrés emocional
- ✓ Ovulación (la producción y liberación de un óvulo del ovario en la mitad del ciclo menstrual)
- ✓ Embarazo
- ✓ Excitación sexual

Marco Teórico

El flujo vaginal anormal puede deberse a:

- ✓ Vaginitis atrófica se observa en mujeres que han pasado por la menopausia y tienen niveles bajos de estrógenos
- ✓ Vaginosis bacteriana (VB): las bacterias que normalmente viven en la vagina se multiplican en forma exagerada, lo que causa un flujo grisáceo y un olor a pescado que empeora después de una relación sexual. Esta afección por lo general no se transmite sexualmente.
- ✓ Cáncer vaginal o de cuello uterino (rara vez es una causa de flujo excesivo)
- ✓ Clamidia
- ✓ Vaginitis descamativa
- ✓ Un tampón o un objeto extraño olvidado
- ✓ Gonorrea
- ✓ Otras infecciones e infecciones de transmisión sexual (ITS)
- ✓ Trichomoniasis
- ✓ Candidiasis vaginal

En la Figura 5 se muestran los diferentes flujos vaginales en las diferentes etapas del ciclo de la mujer

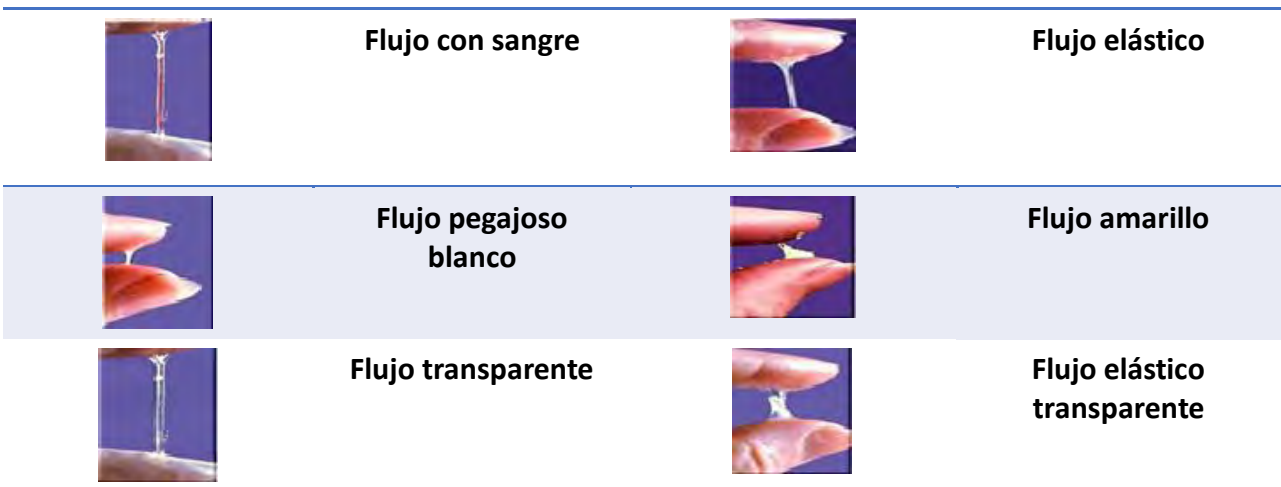


Figura 5. Tipos de flujos vaginales (reproduccionasistida.org)

1.4 Enfermedades vaginales

Las enfermedades vaginales son la causa más común de visitas al ginecólogo entre las que destacan las enfermedades de transmisión sexual (ETS), sin embargo, estas no son las únicas. Las enfermedades de transmisión sexual pueden presentar síntomas como: (Cires-Pujol *et al.*, 2003)

Marco Teórico

- ✓ Picazón
- ✓ Ardor
- ✓ Dolor
- ✓ Sangrado anormal
- ✓ Secreción

Un problema común es la vaginitis, la inflamación de la vagina. Otros problemas de la vagina incluyen enfermedades de transmisión sexual, cáncer vaginal y el cáncer de la vulva. El tratamiento de las enfermedades de la vagina depende de la causa.

1.5 Vaginitis

La vaginitis es común, especialmente en las mujeres en edad reproductiva. Por lo general, ocurre cuando hay un cambio en el equilibrio de bacterias o levaduras que normalmente se encuentran en su vagina. Hay diferentes tipos de vaginitis, las que tienen distintas causas, síntomas y tratamientos (Cires-Pujol *et al.*, 2003) entre estas se encuentran:

1.5.1 Vaginosis

La vaginosis bacteriana es la infección vaginal más común en las mujeres entre 15 y 44 años. Ocurre cuando hay un desequilibrio entre las bacterias "buenas" y "malas" que normalmente se encuentran en la vagina de una mujer. Muchas cosas pueden cambiar el equilibrio de estas bacterias, incluyendo:

- ✓ Tomar antibióticos
- ✓ Duchas vaginales
- ✓ Usar un dispositivo intrauterino
- ✓ Tener relaciones sexuales sin protección con una nueva pareja
- ✓ Tener muchas parejas sexuales

1.5.2 Candidiasis

Las infecciones por *Candida* (candidiasis) ocurren cuando demasiada de esta levadura crece en la vagina. Su nombre científico es *Cándida albicans*. Es un hongo que vive en casi todas partes, incluso en el cuerpo. Se puede tener demasiado crecimiento de esta levadura en la vagina debido a:

- ✓ Antibióticos
- ✓ Embarazo
- ✓ Diabetes, especialmente si no está bien controlada
- ✓ Medicamentos corticoides

Marco Teórico

1.5.3 Trichomoniasis

La trichomoniasis también puede causar vaginitis. Es una enfermedad de transmisión sexual común causada por un parásito llamado *Trichomonas vaginalis*

También se puede contraer vaginitis si se es alérgica o es sensible a ciertos productos. Ejemplos incluyen aerosoles vaginales, duchas, espermicidas, jabones, detergentes o suavizantes de telas. Pueden causar ardor, picazón y secreción.

Los cambios hormonales también pueden causar irritación vaginal. Por ejemplo, por el embarazo o estar amamantando, o cuando está pasando por la menopausia.

En la Tabla 1 se muestra el cuadro clínico y su agente causal de algunas enfermedades vaginales más comunes.

Tabla 1. Enfermedades vaginales más frecuentes; cuadro clínico y agente causal. (Cires-Pujol *et al.*, 2003)

Cuadro clínico	Agente causal
Flujo blanquecino escaso, pH<4,5 Prurito vulvar y/o irritación, eritema	<i>Candida albicans</i>
Flujo amarillo profuso, pH>5 Prurito vulvar	<i>Trichomonas vaginalis</i>
Flujo fétido blanco-grisáceo, pH>4,5 Olor a aminas (pescado)	<i>Gardnerella vaginalis</i>
Después de la adición de hidróxido de potasio 10 % presencia de células guías (criterios de Amsel)	Anaerobios (bacteroides, peptoestreptococos, porphyromonas) <i>Mobiluncus spp</i> <i>Mycoplasma hominis</i>
Flujo anormal, sangramiento poscoital/intermenstrual, dolor abdominal bajo, ardor al orinar	<i>Chlamydia trachomatis</i>
Flujo purulento, dolor y dificultad al orinar, fiebre escasa	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>
Flujo, ardor o sensación quemante genital y perineal, dolor y lesiones vesiculares y pústulas, fiebre e inflamación perineal	Herpes genital

1.6 Tratamientos para diferentes formas de vaginitis.

El tratamiento depende del tipo de enfermedad que tenga.

La vaginitis bacteriana se trata con antibióticos. Se pueden recetar píldoras, crema o gel para colocar en la vagina. Mientras dure el tratamiento se debe usar condón mientras tenga relaciones sexuales o no tenerlas.

Las infecciones por levaduras generalmente se tratan con una crema o geles que contengan algún antifúngico como fluconazol, metronidazol y clotrimazol entre otros.

El tratamiento de la trichomoniasis suele ser un antibiótico de dosis única.

Si la vaginitis se debe a una alergia o sensibilidad a un producto, se debe determinar qué producto está causando el problema para evitar el uso.

Si la vaginitis es por problemas hormonales se debe usar una crema con estrógenos.

2 Formas Farmacéuticas Vaginales

Las formas farmacéuticas vaginales buscan un efecto local aunque algunos como los anovulatorios tienen un efecto sistémico. Existen varios tipos de formas vaginales algunos de ellos son:

2.1 Óvulos

Son formas sólidas, unidas, generalmente ovoides y de tamaño comprendido entre 1 g a 15 g en la Figura 6 se observa la forma de un óvulo, como excipientes generalmente se emplean los mismos para supositorios especialmente los hidrofílicos empleando la glicerina y polietilglicoles solo en casos excepcionales se emplean grasas.



Figura 6. Óvulos de Monistat 7 para la infección por levaduras (tomada de flujovaginal.com)

2.2 Comprimidos vaginales

Poseen formas variadas (ovoides, cilíndrica de barra biconvexa elíptica) y de tamaño mucho menor que los óvulos en la Figura 7 se observa el comprimido vaginal para una infección. Generalmente van provistos de un aplicador y están destinados a ceder el principio activo lentamente. Presentan las mismas características de los comprimidos y se elaboran con los mismos excipientes y empleando los mismos métodos que los convencionales

Existen también comprimidos destinados a disolverse o dispersarse en agua en el momento de su aplicación



Figura 7. Comprimidos vaginales (Tomada de heraldo.es)

3 Sistemas Farmacéuticos Semisólidos.

Son preparaciones de consistencia semisólida destinadas a ser aplicadas sobre la piel o en algunas mucosas con el fin de ejercer una acción local o dar lugar a la aplicación percutánea de principios activos o por su propia acción emoliente y protectora. Tienen un aspecto homogéneo.

3.1 Generalidades.

Las bases utilizadas pueden ser sustancias de origen natural o sintético y estar constituida por un sistema de una o varias fases

De acuerdo con la preparación pueden tener características hidrofílicas o hidrofóbicas

La preparación puede contener excipientes adecuados como agentes antimicrobianos antioxidantes estabilizantes emulgentes y espesantes.

Los sistemas semisólidos satisfacen una exigencia de las preparaciones de aplicación tópica ya que poseen buena adherencia lo que hace que permanezcan en la superficie de aplicación un mayor tiempo.

3.2 Clasificación de sistemas farmacéuticos semisólidos.

En la FEUM se clasifican en

- Pomadas
- Cremas
- Geles
- Pastas

3.2.1 Pastas

Constan de un excipiente de una sola fase en el que se pueden dispersar sólidos y líquidos.

3.2.1.1 Hidrófobas

No pueden absorber más que pequeñas cantidades de agua.

Las sustancias que más se emplean en su formulación es vaselina, parafina aceites vegetales ceras y siliconas líquidas.

3.2.1.2 Absorbentes de agua

Pueden absorber grandes cantidades de agua. Sus excipientes son los de las pomadas hidrófobas a los cuales se incorporan emulgente w/o como lanolinas alcoholes grasos.

Marco Teórico

3.2.1.3 Hidrófilas

Se elaboran con excipientes miscibles en agua como los polietilglicoles líquidos y sólidos. Pueden contener cantidades adecuadas de agua.

3.2.2 Cremas

Son formas farmacéuticas constituidas por dos fases una lipofílica y otra acuosa. Tienen consistencia blanda y flujo newtoniano o Pseudoplástico por su alto contenido acuoso.

3.2.2.1 Hidrofílicas

La fase externa es de contenido acuoso debido a la presencia en su composición de emulgentes de tipo w/o tales como jabones sódicos o de alcoholes grasos sulfatados y polisorbatos a veces combinados con cantidades suficientes de emulgentes tipo o/w

3.2.2.2 Hidrófobas

La fase continua o externa es la fase lipófila debido a la presencia de emulgentes w/o.

4 Geles

4.1 Definición de gel.

La FEUM define al gel como: Preparación semisólida, que contiene el o los fármacos y aditivos, constituido por lo general por macromoléculas dispersas en un líquido que puede ser agua, alcohol o aceite, que forman una red que atrapa al líquido y que le restringe su movimiento, por lo tanto son preparaciones viscosas (bucal, oral, tópica).

Reemplazando el líquido con gas es posible crear aerogeles, materiales con propiedades excepcionales como densidades muy bajas, elevada porosidad y excelente aislamiento térmico.

4.2 Clasificación de geles

4.2.1 Hidrófobos

Están constituidos por la parafina líquida adicionada de polietileno aceites grasos gelificados con sílice coloidal y jabones de aluminio o zinc

4.2.2 Hidrófilos

Se elaboran con excipientes hidrófilos como el agua el glicerol y los polietilglicoles gelificados con sustancias como goma de tragacanto almidón derivados de la celulosa polímeros carboxivinílicos silicatos de aluminio y magnesio. (USP 35 NF 30, 2012)

4.2.3 Según el número de fases en que están constituidos

- ✓ Geles monofásicos: el medio líquido lo constituye una sola fase o líquidos miscibles; agua-alcohol, alcohol, solución hidroalcohólica, aceite, etc.
- ✓ Geles bifásicos: constituidos por dos fases líquidas inmiscibles, formándose una estructura transparente con propiedades de semisólido.

Estos sistemas forman una matriz polimérica tridimensional en la cual se ha incluido un alto grado de reticulación física (a veces, química), están formados por cadenas largas y desordenadas que están conectadas en puntos específicos, pero las conexiones deben ser reversibles. Los mecanismos moleculares de gelificación son poco conocidos, pero los investigadores están tratando de diseñar y mejorar las moléculas con estas propiedades. Los geles pueden presentar varias ventajas sobre otros sistemas de administración de fármacos vaginales, como una mayor biodisponibilidad, seguridad, versatilidad y ahorro económico (Das Neves y Bahia, 2006)

Los geles son productos bien aceptados, utilizados para aplicaciones vaginales de diversos medicamentos tienen un efecto hidratante y lubricante, restaurador del pH fisiológico, anticonceptivo, inductor para labor de parto y actividad microbicida (Caramella *et al.*, 2005)

Los geles sensibles al medio ambiente son sistemas que pueden alterar dramáticamente sus características físicas como resultado de la exposición a cambios ambientales. De particular importancia para la administración vaginal son geles termosensibles. Estos geles son sistemas capaces de gelificar en respuesta al cambio de temperatura, generalmente desde la temperatura ambiente hasta la corporal. Por lo general, las temperaturas de gelificación se han considerado adecuadas si están en el rango de 25-37 °C (Das Neves y Bahia, 2006)

4.3 Temperatura de gelificación.

Es la temperatura a la cual la fase líquida hace una transición al gel. Los principales enfoques empleados para la determinación de la temperatura de gelificación están basados en la inspección visual o en pruebas reológicas.

El enfoque basado en el análisis reológico proporciona muestras donde se miden las oscilaciones realizadas a una frecuencia constante (0.01 y 1 Hz son los más utilizados) y los valores de temperatura que van en un intervalo que incluye la temperatura fisiológica (generalmente entre 7 y 70 °C). Algunos autores señalaron la temperatura de gelificación por el aumento de una pendiente al aumentar la temperatura, y otros lo definieron como el punto cuando la viscosidad estaba a medio camino entre la solución y el gel (Caramella *et al.*, 2005)

4.4 Propiedades mecánicas y reológicas.

Muchos autores caracterizaron el gel formado a temperatura fisiológica en términos de resistencia del gel, viscosidad y viscoelasticidad. Los parámetros medidos fueron: el tiempo necesario para que una sonda penetre en el gel a una distancia fija, dureza del gel (fuerza requerida para alcanzar una deformación), compresibilidad (trabajo requerido para deformar la muestra), cohesión del gel (relación entre el área bajo la curva producido en el segundo y primer ciclo de compresión) y elasticidad en gel (velocidad a la que la muestra deformada recupera la deformación después de la eliminación de la fuerza). La viscosidad generalmente se investiga a velocidades de cizallamiento que van desde 0.5/10 a 100/300 s⁻¹. El comportamiento viscoelástico del gel formado es comúnmente determinado por mediciones de oscilación, realizadas mediante la aplicación de un esfuerzo cortante (elegido en la región viscoelástica lineal), a una valor temperatura constante correspondiente a la temperatura de gelificación (Caramella *et al.*, 2005)

5 Clotrimazol.

El clotrimazol (Figura 8) 1-[(2-clorofenil)-difenil-metil] imidazol es un fármaco antimicótico comúnmente usado para el tratamiento de infecciones (de humanos como de otros animales) tales como las infecciones vaginales por levaduras, candidiasis oral, y dermatofitosis (tiña). También se utiliza para tratar el pie de atleta y tinea cruris.

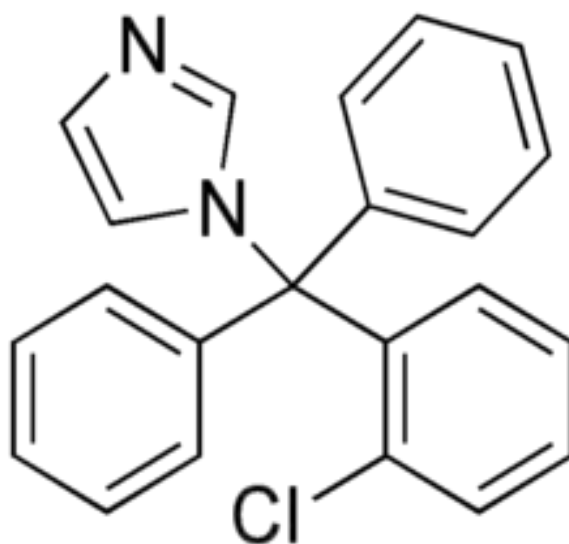


Figura 8. Estructura del clotrimazol (NCBI, 2016)

5.1 Propiedades fisicoquímicas.

- ✚ **Peso molecular** 344.8 g/mol
- ✚ **Fórmula** C₂₂H₁₇ClN₂
- ✚ **Log P** 6.30
- ✚ **pKa** 4.70 y 6.02
- ✚ **Naturaleza** Base débil
- ✚ **Punto de fusión** 141 – 145 °C
- ✚ **Solubilidad en agua** 0.49 µg/ml
- ✚ **Biodisponibilidad** Baja absorción oral
- ✚ **Unión proteica** 90%
- ✚ **Metabolismo** Hepático
- ✚ **Vida media** 2 horas

5.2 Mecanismo de acción.

El mecanismo principal de acción del clotrimazol es la inhibición de la división y crecimiento de hongos. El clotrimazol altera la permeabilidad de la pared celular fúngica e inhibe la actividad de enzimas dentro de la célula (Figura 9). Estudios demuestran que las concentraciones mínimas de clotrimazol causan la fuga de compuestos de fósforos intracelulares hacia el medio ambiente junto con la descomposición de los ácidos nucleicos celulares y una aceleración en la salida de K⁺. Esto conduce eventualmente a la muerte de la célula. No se propaga apreciablemente a través del cuerpo del usuario, pero se mantiene en el punto de aplicación.

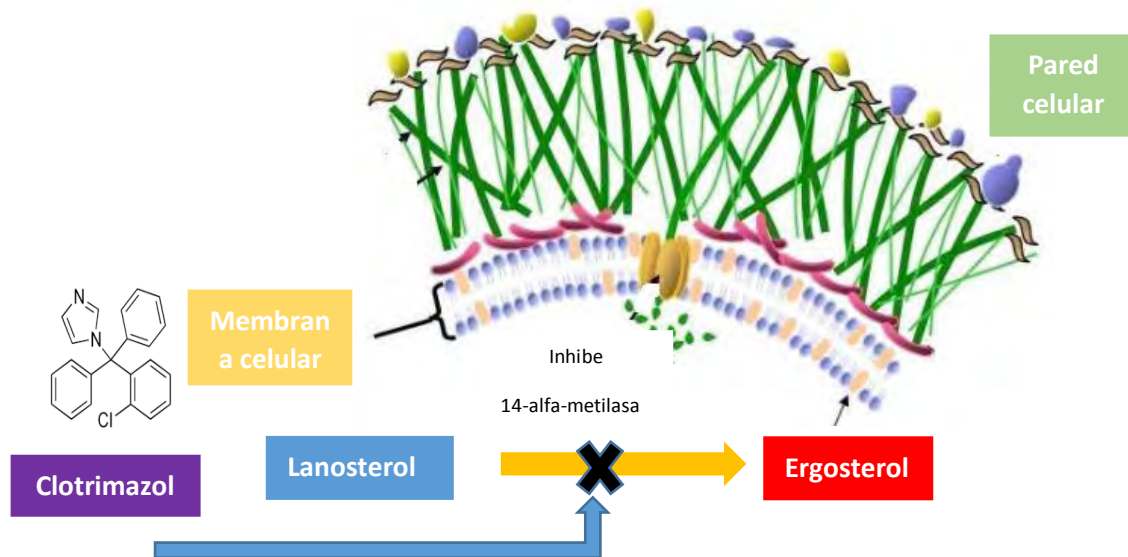


Figura 9. Mecanismo de acción del clotrimazol (Modificado de cienciasdejoseleg.blogspot.mx)

5.3 Farmacocinética.

Después de la aplicación tópica sobre la piel o la vagina las concentraciones plasmáticas son mínimas.

Por vía vaginal se absorbe entre el 5 % y 10 % de la dosis, pero las concentraciones plasmáticas son muy pequeñas. Debido a que el CLOT se fija a las mucosas oral y vaginal se detectan concentraciones del fármaco significativas hasta 3 días después de la aplicación.

Las pequeñas concentraciones que se absorben son metabolizadas por el hígado y excretadas por la bilis.

6 Adhesión, Bioadhesión y Mucoadhesión.

6.1 Adhesión.

El término adhesión se puede definir como el puente producido por el contacto entre un adhesivo sensible a la presión y una superficie. La sociedad americana de pruebas y materiales define el término como el estado entre dos superficies que se mantienen unidas por fuerzas interfaciales que pueden consistir en fuerzas de valencia, acción de enclavamiento o ambas (Ahuja, Khar y Ali, 1997)

6.2 Teorías de adhesión.

Hay diferentes teorías que tratan de explicar los fundamentos de los mecanismos de adhesión:

6.2.1 Teoría electrónica

La transferencia de electrones se produce tras el contacto de las superficies de la adhesión debido a las diferencias en su estructura electrónica. Esto se propone para dar lugar a la formación de una doble capa eléctrica en la interfase, con la posterior adhesión debido a fuerzas de atracción.

6.2.2 Teoría humectante

Se aplica principalmente a los sistemas de líquidos y considera superficie y las energías interfaciales. Se trata de la capacidad de un líquido a extenderse espontáneamente sobre una superficie como un requisito previo para el desarrollo de la adherencia. La afinidad de un líquido para una superficie se puede encontrar usando técnicas tales como goniometría del ángulo de contacto para medir el ángulo de contacto del líquido sobre la superficie, siendo la regla general que cuanto menor es el ángulo de contacto, mayor es la afinidad del líquido al sólido.

Marco Teórico

6.2.3 Teoría de adsorción

La teoría o modelo de adsorción explica el fenómeno de la adhesión a partir de conceptos como ángulo de contacto, mojado y tensión superficial. Cuando el adhesivo dispone de una tensión superficial inferior a la energía superficial del sustrato, este es capaz de mojar la superficie generando un ángulo de contacto inferior a 90° y creando por tanto la adhesión entre el adhesivo y el sustrato.

6.2.4 Teoría de la difusión

Describe la interdifusión de las cadenas de polímeros a través de una interfaz de adhesivo. Se impulsa por gradientes de concentración y se ve afectada por las longitudes de cadena molecular disponibles y sus movilidades. La profundidad de interpenetración depende del coeficiente de difusión y el tiempo de contacto. Suficiente profundidad de penetración crea una unión adhesiva semipermanente.

6.2.5 Teoría mecánica

Asume que la adhesión surge de un enclavamiento de un adhesivo líquido (en ajuste) en irregularidades en una superficie rugosa. Sin embargo, las superficies rugosas también proporcionan una mayor área de superficie disponible para la interacción junto con un viscoelástico mejorada y la disipación de plástico de energía durante el fallo de la junta, que se piensa que es más importante en el proceso de adhesión de un efecto mecánico.

6.2.6 Teoría de la fractura

Difiere un poco de los otros cinco en que se relaciona la resistencia adhesiva a las fuerzas requeridas para el desprendimiento de las dos superficies mencionadas, después de la adhesión. Esto supone que el fallo de la unión adhesiva se produce en la interface. Sin embargo, el fallo normalmente ocurre en el componente más débil, que es típicamente un fallo de cohesión dentro de una de las superficies adheridas.

6.3 Bioadhesivos.

Se denominan sistemas bioadhesivos a aquellos polímeros que presentan la capacidad de unirse a sistemas biológicos. Estos sistemas pueden ser comprimidos, polvos, hidrogeles, gránulos, cristales, microcápsulas, microesferas y liposomas.

6.4 Mucoadhesivos.

Si el sustrato biológico al que se une es un moco entonces se llamará mucoadhesión.

Las formas mucoadhesivas cuentan con ciertas ventajas más que apoyan su creciente interés entre ellas se encuentra sus diversas y abundantes vías de

Marco Teórico

administración desde donde puede obtenerse efectos terapéuticos sistémicos y/o localizados.

La mucoadhesión es una interacción atractiva que involucra a una forma farmacéutica interactuando con una mucosa secretada o una mucosa de membrana. Los principales componentes del moco secretado son las mucinas solubles. Estas son glicoproteínas como se muestran en la Figura 10 son altamente glicosiladas que consisten en subunidades de aproximadamente 500 kDa articulado por puentes disulfuro para dar estructuras grandes que atrapan gran cantidad de agua para dar una capa protectora viscoelástica sobre la superficie de la mucosa. Las propiedades mucoadhesivas permiten un mejor contacto de la formulación con la superficie vaginal y tiempos de residencia más largos (Caramella et al., 2005)

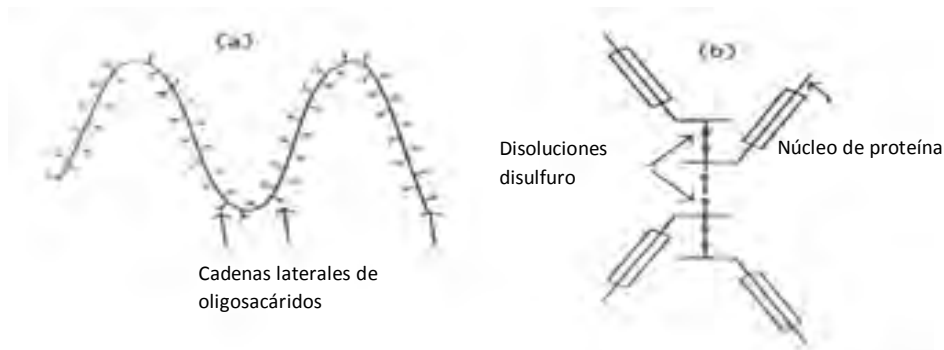


Figura 10. Representaciones esquemáticas del moco: (a) cadena de glicoproteínas (b) tetrámero de glucoproteína (Ahuja, Khar y Ali 1997)

Los lugares potencialmente aptos para la aplicación de los mucoadhesivos incluyen las cavidades gastrointestinal, rectal y bucal, la nariz y la vía respiratoria, el ojo y la zona vaginal. En relación con las características fisicoquímicas del fármaco es posible presentarle varias formas farmacéuticas bioadhesivas adaptadas a la vía de administración óptima que den respuesta a las necesidades terapéuticas del paciente. Con tal motivo se han estudiado y puesto en mercado comprimidos, formas multiparticulares (pelet, micro y nanopartículas), pomadas, geles y películas o parches mucoadhesivos (Rodríguez *et al.*, 2000)

Los bioadhesivos son desarrollados para incrementar el tiempo de contacto entre el fármaco y el sitio de acción, con esto se puede reducir la dosificación y aumentar la biodisponibilidad.

La teoría de la interpenetración esquematizada en la Figura 11 es el tipo de adhesión más utilizada en los sistemas semisólidos.

Marco Teórico

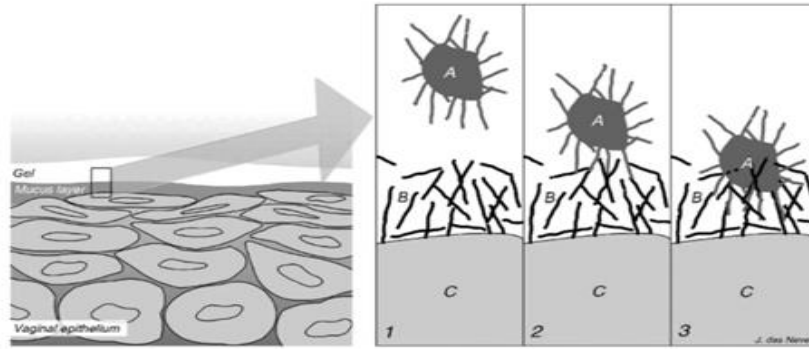


Figura 11. Dibujo esquemático de los pasos involucrados en la teoría de interpenetración (1) Polímero en la capa mucosa (2) Interpenetración del polímero y el mucus (3) Consolidación de la fuerza de adhesión A: Partícula del polímero B: Capa mucosa C: Celular epitelial (Das Neves y Bahia, 2006)

6.5 Evaluación de Bioadhesivos.

Se han reportado varias maneras de evaluar a los bioadhesivos, dentro de estas evaluaciones podemos encontrar evaluación *in vivo*, *ex vivo* e *in vitro*

6.5.1 Evaluaciones *in vitro*.

Las evaluaciones *in vitro* son aquellas que se realizan en un laboratorio fuera de cualquier organismo vivo, entre ellas están; Viscosidad, reología, medición de pH, estudios de difusión, análisis de perfil de textura, permeación (Tuğcu-Demiroz, Acartürk y Erdoğan, 2013)

6.5.2 Evaluaciones *in vivo*.

Las evaluaciones *in vivo* se refieren a las pruebas realizadas dentro de unos organismos vivos como son recopilación y análisis de la muestra, manejo de animales y administración del fármaco, estudios histológicos (Tuğcu-Demiroz, Acartürk y Erdoğan, 2013)

6.5.3 Evaluaciones *ex vivo*.

Las evaluaciones *ex vivo* quieren decir fuera de un organismo vivo este tipo de experimentos se hacen en tejido de animales en un ambiente artificial entre estas están las pruebas de bioadhesividad las evaluaciones realizadas por Tuğcu-Demiroz y colaboradores 2013, en geles vaginales bioadhesivos de acción prolongada de OXY, se prepararon utilizando diferentes tipos de quitosán, la preparación del gel mucoadhesivo es mediante el método en frío utilizando HPMC.

6.6 Medición de pH.

Se utiliza un pHmetro y las mediciones se hacen a temperatura ambiente después de 24h realizada la formulación.

6.7 Medición de viscosidad.

La viscosidad de una formulación en gel se determina con un viscosímetro a una temperatura de 25 °C, la velocidad del cabezal es ajustada para proporcionar un porcentaje alto de 10 a 100 %, se recomienda leer el manual del viscosímetro.

Se hace mediante curvas comparativas de viscosidad contra el corte de cizalla para esto se utiliza un reómetro con velocidad controlada variando las velocidades de cizallamiento, se varia la temperatura para comprobar el efecto de esta (Chang *et al.*, 2002) La reología estudia la relación entre el esfuerzo de los materiales que son capaces de fluir por lo tanto es de suma importancia tomarla en cuenta para evaluar los bioadhesivos que están hechos de polímeros.

6.8 Estudios de difusión *in vitro*.

Se utilizan las celdas de Franz de difusión. El área de sección transversal fue de 1 cm². Fue usada una membrana de diálisis con un tamaño de poro de 12000 Da, se agito a 800 rpm, la fase receptora contiene solución amortiguadora de citratos pH 4.5 a una temperatura de 37 °C. El compartimento donante contiene 0,5 ml del gel, se toma una muestra de 2.5 ml de la fase receptora y se reemplaza con el mismo volumen de solución amortiguadora las concentraciones se determinan con HPLC (Tuğcu-Demiroz, Acartürk y Erdoğan, 2013)

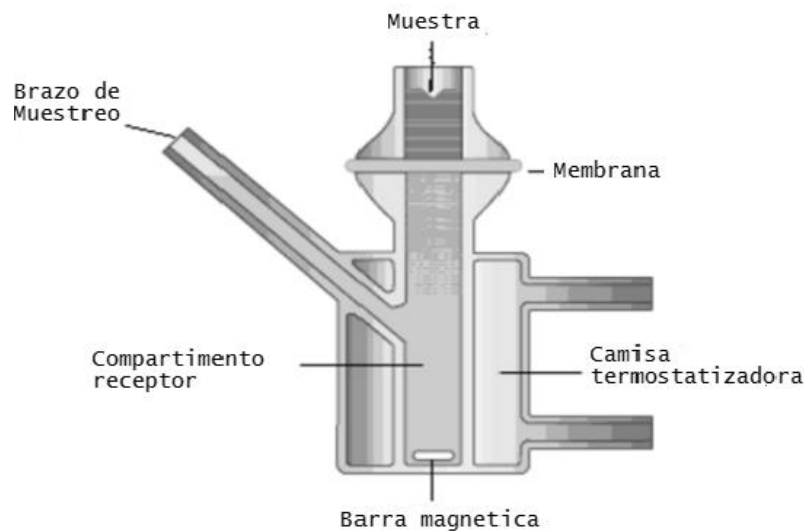


Figura 12. Simulación celdas de Franz (Modificada de Debandi, François y Daraio, 2011)

6.9 Prueba de solubilidad.

La solubilidad se determina mediante el uso de diferentes tensoactivos si el fármaco a estudiar es poco soluble en agua. Las mezclas se agitan durante 72 h en un agitador isotérmico, estas se mantienen a una temperatura de 37 ± 1 °C. Las mezclas se centrifugaron a 5000 rpm durante 15 min, seguido por una filtración a través del filtro de membrana de 0,45 m, 13 mm. Después de esto se determina la concentración.

6.10 Estudios de bioadhesión.

En la Figura 13 se muestra el estudio de bioadhesión *in vitro* se hacen mediante el método descrito por Nakamura 1996, que consiste en una placa de agar y una solución amortiguadora de fosfatos pH 4.5; se coloca una muestra del bioadhesivo en la placa de agar, esta se coloca en un aparato de desintegración, se sumerge y se saca de la solución amortiguadora de fosfatos, debe de tener una temperatura de 37°C, se observa el tiempo de desintegración (Bachhav y Patravale, 2009)

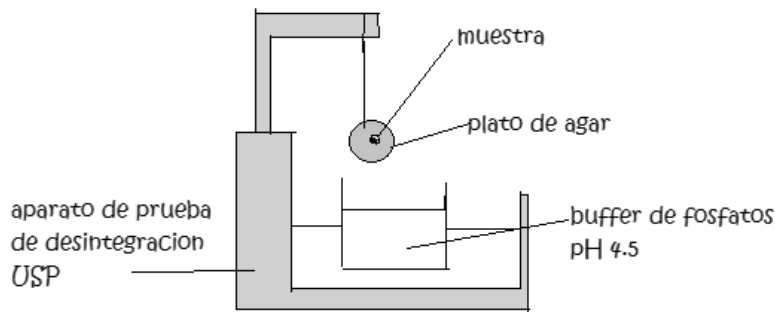


Figura 13. Aparato para la prueba de bioadhesión (Modificada de Bachhav y Petravale 2009)

6.11 Análisis de perfil de textura.

Para esta prueba se usa un analizador de textura, cada formulación se transfiere a un bote universal a una altura fija de 8 cm y se mantiene en baño de agua en el ultrasonido por 20 min y la temperatura se ajusta a 37 °C. Una sonda analítica de 10 mm de diámetro se comprime dos veces a una velocidad de 2 mm seg^{-1} con una profundidad de 15 mm permitiendo un retraso de 15 s entre el principio y el final de la compresión. Los datos se calculan mediante un software. Los resultados son basados en la fuerza tiempo con los parámetros de compresibilidad adhesividad y elasticidad del gel (Tuğcu-Demiroz, Acartürk y Erdoğan, 2013)

6.12 Prueba de fuerza de adhesión.

Para medir fuerza de adhesión se utilizan tejidos de animales por medio de la modificación del tensiómetro de Du Noüy (Figura 14), el anillo fue sustituido por una placa cuadrada metálica de 4.00 cm, unas cuerdas de piano de un calibre de 0.22, se calibro usando pesos de referencia, cada sección de la mucosa se coloca en la placa con la mucosa expuesta sujetado por un soporte de plástico y 4 grapas, se humedecieron discos de gel con solución amortiguadora de fosfatos, se utiliza flujo vaginal simulado Después del periodo de humectación los discos son unidos rápidamente a la plataforma del tensiómetro, los geles están en contacto por 30 s, se obtiene la lectura de fuerzas de adherencia cuando el disco de gel se separa de la mucosa (Quintanar-Guerrero, *et al.*, 2001)

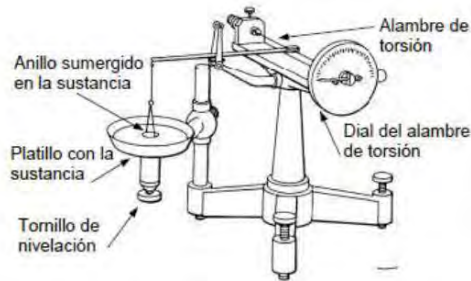


Figura 14. Tensiómetro de Du Noüy (Quintanar-Guerrero 2001)

6.13 Estudios de mucoadhesión.

Se realiza con diferentes preparaciones vaginales como lo reporto (Das Neves y Bahia, 2006) se utilizó un analizador de textura con una carga de 50 N la mucosa vaginal se congela a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, se toma una sección de 2 mm de la parte interna de la superficie de la mucosa vaginal congelada se sumerge en fluido vaginal simulado se mantiene por 10 min antes del comienzo del experimento (Tuğcu-Demiroz, Acartürk y Erdoğan, 2013)

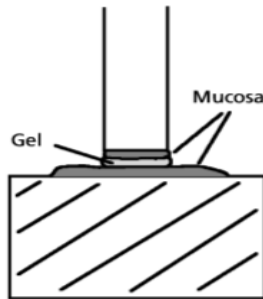


Figura 15. Contacto del gel y la mucosa en el Texturómetro (Modificada de Hägerström, 2004)

7 Polímeros

Los polímeros son macromoléculas (generalmente orgánicas) formadas por la unión mediante enlaces covalentes de una o más unidades simples llamadas monómeros. Estos forman largas cadenas que se unen entre sí por fuerzas de Van der Waals, puentes de hidrógeno o interacciones hidrofóbicas.

En el caso de que el polímero provenga de un único tipo de monómero se denomina homopolímero y si proviene de varios monómeros se llama copolímero o heteropolímero.

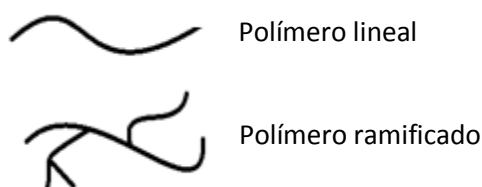


Figura 16. Tipos de polímeros

7.1 Copolímeros

Los copolímeros en bloque son sustancias formadas por macromoléculas constituidas por bloques en una secuencia lineal.

Existen copolímeros de dos o tres bloques a los que suelen simbolizar como AB y ABA o BAB donde A y B son bloques poliméricos

También son posibles copolímeros en bloques constituidos por la repetición de unidades formadas por dos bloques, $(AB)_n$ y por la incorporación a un polímero de dos bloques de una tercera cadena $(ABC)_2$. Otros tipos de copolímeros formados por bloques son los copolímeros injertados (en inglés, graft copolymer) y los copolímeros estrella.

Los copolímeros injertados están constituidos por macromoléculas con uno o más tipos de bloques conectados a una cadena principal formando cadenas laterales; estas cadenas laterales tienen características constitutivas o configuracionales diferentes a las de la cadena principal (Pasquali, Chiappetta y Bregni, 2005).

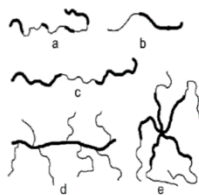


Figura 17. Tipos de copolímeros; a: Al azar b: Dibloque c: Tribloque d: De injerto e: Estrella (Pasquali, Chiappetta y Bregni, 2005)

Entre los copolímeros en bloques con aplicaciones farmacéuticas se destacan los anfifílicos, que consisten de macromoléculas formados por bloques lipofílicos unidos a bloques hidrofílicos. Este tipo de copolímeros en bloques, que poseen propiedades tensoactivas, forma distintas clases de asociaciones, tales como micelas y estructuras líquido cristalinas, que pueden actuar como excelentes vehículos de principios activos. Entre las fases líquido cristalinas se destacan, por sus aplicaciones farmacéuticas, las que se presentan como geles, cuya estructura corresponde a un ordenamiento cúbico de sus moléculas.

Entre los copolímeros en bloques anfifílicos más utilizados en formulaciones farmacéuticas se encuentran los compuestos por bloques derivados de los óxidos de etileno (hidrofílicos) y de propileno (lipofílicos), a los que se conoce con el nombre genérico de poloxámeros y los nombres comerciales Pluronic[®] (Pasquali, Chiappetta y Bregni, 2005).

7.2 Poloxámeros.

Los copolímeros EO_a-PO_b-EO_a, conocidos bajo el nombre genérico de poloxámeros y el nombre comercial de pluronics, constan de más de 30 diferentes agentes de superficie no iónicos. Estos polímeros son copolímeros tribloque compuesto de (óxido de etileno)_a (óxido de propileno)_b. Los poloxámeros que tienen pesos moleculares que varían en el intervalo 1,100-14,000 Da y relaciones de peso de óxido de etileno-óxido de propileno variando de 1: 9 a 8: 2 están disponibles comercialmente (Caramella *et al.*, 2005) la palabra "poloxámero" fue acuñada por el inventor, Irving Schmolka, que recibió la patente para estos materiales en 1973. Los poloxámeros son también conocidos por los nombres comerciales Synperonics[®], Pluronics[®], y Kolliphor[®].

Debido a que las longitudes de los bloques de polímero pueden personalizarse, existen muchos poloxámeros diferentes que tienen propiedades ligeramente diferentes. Para el término genérico "poloxámero", estos copolímeros se denominan comúnmente con la letra "P" (para poloxámero) seguido de tres dígitos: los dos primeros dígitos x 100 dan la masa molecular aproximada del núcleo de polioxipropileno y el último dígito x 10 da el porcentaje de contenido de polioxietileno (por ejemplo, P407 = poloxámero con una masa molecular de polioxipropileno de 4.000 g / mol y un contenido de polioxietileno del 70 %). Para los nombres comerciales de Pluronic[®] y Synperonic[®], la codificación de estos copolímeros comienza con una letra para definir su forma física a temperatura ambiente (L = líquido, P = pasta, F = sólido) seguido de dos o tres dígitos. Dos dígitos en un número de tres dígitos en la designación numérica, multiplicada por 300, indica el peso molecular aproximado del hidrófobo; Y el último dígito x 10 da el porcentaje de contenido de polioxietileno (por ejemplo, L61 indica una masa molecular de polioxipropileno de 1.800 g / mol y un contenido de polioxietileno al

Marco Teórico

10%). En el ejemplo dado, poloxámero 181 (P181) = Pluronic® L61 y Synperonic® PE / L 61.

La hidratación de los bloques hidrofílicos de poli (óxido de etileno) se debe a su fácil acomodamiento en la estructura del agua. Esta hidratación es altamente dependiente de la temperatura, por lo cual la solubilidad y la formación de agregados de los polímeros en bloques que contienen este grupo polar pueden ser reguladas por variaciones de la temperatura (Pasquali, Chiappetta y Bregni, 2005).

7.2.1 Poloxámero 407 o Pluronic® F-127

El poloxámero 407 es un copolímero tribloque con una cadena hidrofóbica central de polioxipropileno (PPO) y dos cadenas hidrofílicas laterales idénticas de polioxietileno (PEO). Tiene un peso molecular de 12 500 Da y una relación PEO / PPO de 2: 1

El poloxámero 407 es biocompatible y debido a su estabilidad se usa en preparaciones farmacéuticas; Baja toxicidad y propiedades inmunogénicas débiles lo convierten en un vehículo adecuado para la administración de fármacos. Una solución acuosa de poloxámero 407 es un líquido inyectable cuando se enfría (5-108 °C) y forma un gel in situ a temperaturas fisiológicas.

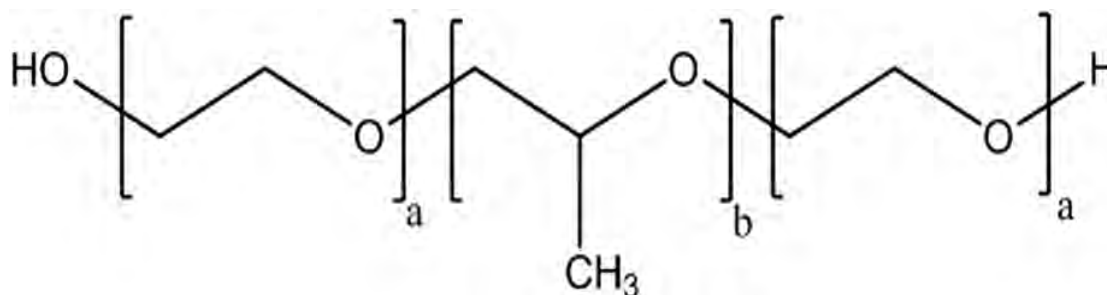


Figura 18. Estructura del poloxámero 407

8 Formas Farmacéuticas de Liberación Modificada.

Son formas farmacéuticas con diferente velocidad de liberación a la convencional sabiendo que una forma farmacéutica convencional es aquella que libera el fármaco después de su administración.

Existen varios tipos de liberación modificada estos se realizan mediante procesos tecnológicos para asegurar los diferentes sitios y velocidades de liberación del fármaco que lo contenga. Algunos de ellos son:

8.1 Liberación controlada.

El fármaco se libera gradualmente en el tiempo a una velocidad limitada por el sistema de liberación, alargándose el efecto terapéutico.

8.2 Liberación retardada.

El fármaco es liberado en un momento distinto al de la administración, pero no se prolonga el efecto terapéutico. Son las formas con cubierta entérica, en las que el principio activo se libera en un lugar concreto del intestino delgado

8.3 Liberación acelerada.

El fármaco se disuelve instantáneamente en la cavidad bucal sin necesidad de la administración de agua o líquidos.

En la Figura 19 se muestran los sistemas de liberación modificada en concentración plasmática con respecto al tiempo

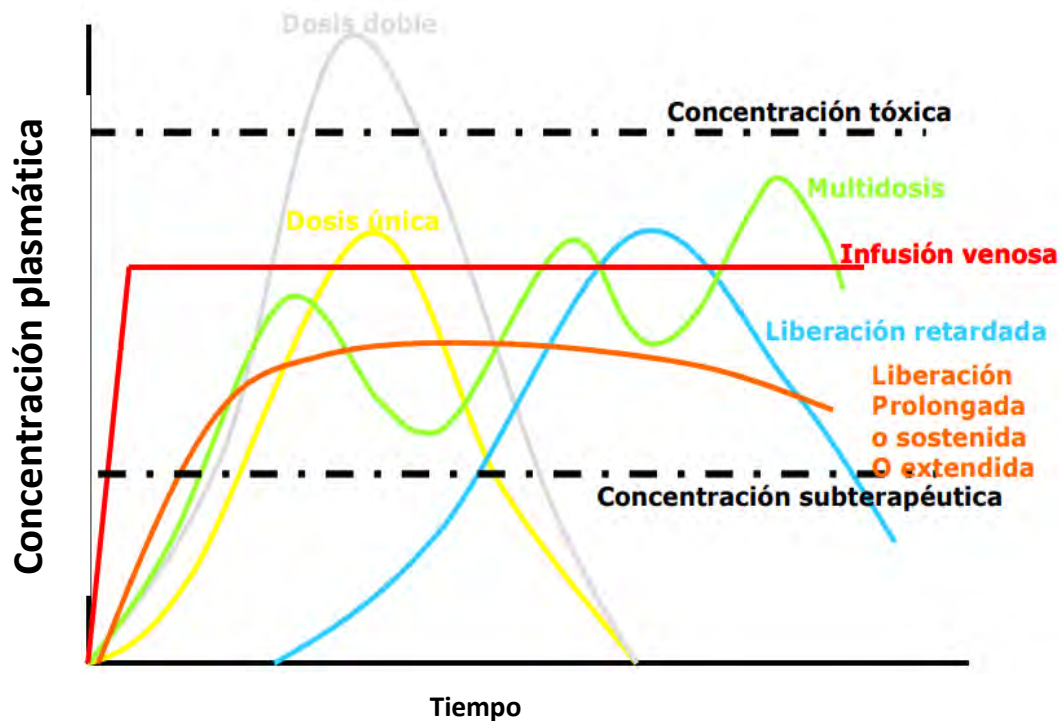


Figura 19. Sistemas de liberación modificada. Representación de la concentración plasmática (Cp) en función del tiempo (Reyes y Rivera 2015)

8.4 Ventajas.

- Minimizar efectos secundarios indeseables
- Aumentar la eficacia del principio activo
- Evitar la biodegradación del fármaco durante su distribución
- Posibilitar el acceso a biofase del principio activo
- Complacencia del paciente
- Liberación constante del activo, cinética de orden

8.5 Desventajas.

- Fármacos poco solubles: Liberación lenta intrínseca.
- Especificidad de lugar: absorción limitada por el tránsito gastrointestinal.
- Baja potencia: Tamaño prohibido por la dosis.
- Larga vida media: Acción sostenida intrínsecamente (>8hrs)
- Vida media corta: Dosis múltiple excesiva (<3hr)
- Estrecho índice terapéutico: Riesgo de alcanzar dosis adversas
- Falta de correlación entre niveles plasmáticos y duración de la acción terapéutica.

8.6 Pruebas realizadas a medicamentos para poder ser genéricos en México.

NORMA Oficial Mexicana NOM-177-SSA1-1998

- Todos los pasos involucrados en los métodos de análisis para realizar las pruebas de intercambiabilidad deben describirse en PNO.
- Utilizar como medicamento de referencia el indicado por la Secretaría a través del área competente, el cual debe estar comercialmente disponible y vigente.
- Para aquellos medicamentos que se presentan en más de una concentración, en la misma forma farmacéutica se puede realizar el estudio de bioequivalencia con una de las concentraciones y los resultados pueden ser extrapolables para las otras concentraciones, siempre y cuando exista proporcionalidad en la fórmula cualicuantitativa, se observe una farmacocinética lineal, los procesos de fabricación estén validados y su perfil de disolución sea similar
- El perfil de disolución o el estudio de bioequivalencia del medicamento de prueba se debe realizar con un lote estándar de producción o bien con un lote escalado, que asegure que no se modifica significativamente la reproducibilidad de los perfiles de disolución, cuando lotes subsecuentes del medicamento se elaboren de acuerdo con la NOM-059-SSA1-1993, y que cuente con un certificado de aprobación conforme a la FEUM vigente. Cuando en ésta no aparezca la información, puede recurrirse a farmacopeas de otros países cuyos procedimientos de análisis se realicen

Marco Teórico

conforme a especificaciones de organismos especializados u otra bibliografía científica reconocida internacionalmente.

- En caso de realizarse la prueba de bioequivalencia se deben realizar perfiles de disolución, ambas pruebas deben llevarse a cabo con los mismos lotes del producto de prueba y el de referencia.
- . Además de la comparación de los perfiles de disolución o del estudio de bioequivalencia, se deben realizar las pruebas de valoración y uniformidad de dosis expresada como uniformidad de contenido.
- Cuando el medicamento contenga más de un fármaco, se debe evaluar el perfil de disolución o la bioequivalencia para cada uno de ellos.
- Las conclusiones de la prueba de intercambiabilidad son válidas para todos los lotes subsecuentes del medicamento de prueba que se elaboren de acuerdo con la NOM-059-SSA1-1993, que incluyan la validación del proceso de producción. En caso de que el proceso de producción, equipo, calidad de los componentes y criterios de aceptación se modifiquen significativamente, o bien, haya algún cambio significativo en la formulación, es necesario realizar nuevamente la prueba.
- Deben llevarse registros de recepción, uso, destino y balance de los medicamentos de prueba y de referencia.
- Los medicamentos de prueba y de referencia deben tener al menos un año de vigencia antes de su fecha de caducidad al momento de realizar el estudio.
- Los medicamentos de prueba y de referencia deben almacenarse de acuerdo con las indicaciones de la etiqueta, desde su recepción hasta dos años posteriores a la conclusión del estudio, o hasta el vencimiento de la fecha de caducidad, lo que ocurra primero.
- Los medicamentos de prueba y de referencia deben almacenarse en cantidad suficiente para realizar tres veces el estudio.
- Las pruebas de valoración y uniformidad de dosis deben realizarse siguiendo los métodos descritos en la FEUM, en farmacopeas reconocidas internacionalmente o métodos validados.
- Los métodos de análisis para evaluar las pruebas de intercambiabilidad de medicamentos, deben ser adecuados para cumplir con el propósito del estudio y validarse conforme a esta Norma y demás disposiciones aplicables en la materia, así como estar aprobados por el responsable sanitario.
- El porcentaje de valoración del medicamento de prueba debe estar dentro de los límites farmacopeicos y no debe diferir en más del 5% del medicamento de referencia.
- Los medicamentos de referencia y de prueba deben cumplir con los criterios de uniformidad de contenido descritos en el método general de análisis de uniformidad de dosis MGA 0299 de la FEUM.
- Utilizar sustancias de referencia trazables con patrones de referencia de reconocimiento nacional o internacional.

Marco Teórico

- Registrar todos los acontecimientos ocurridos durante la realización de las pruebas y almacenar toda la información generada durante el estudio, aun cuando pertenezca a alguna corrida analítica rechazada.
- Los registros deben resguardarse para evitar su alteración o deterioro, por lo menos durante tres años o un año después de la fecha de caducidad de cualquiera de los medicamentos, lo que ocurra más tarde.
- Los instrumentos de medición deben estar calibrados.

III. OBJETIVOS.

1. Objetivo General.

- ❖ Desarrollar y evaluar un gel con propiedades bioadhesivas mediante caracterización para la administración vaginal de un fármaco antifúngico.

2. Objetivos Particulares.

- ❖ Desarrollar un gel bioadhesivo y desarrollar métodos analíticos espectrofotométrico para la cuantificación de clotrimazol en fluido vaginal simulado pH 4.2 y en solución amortiguadora de fosfatos pH 7.4 con y sin tejido vaginal porcino.
- ❖ Preparar un gel bioadhesivo con Pluronic[®] F-127 mediante el método en frío para la administración vaginal de clotrimazol.
- ❖ Caracterizar el gel mediante pruebas de bioadhesión, mediciones de viscosidad y tiempo de gelificación para determinar su comportamiento a temperatura ambiente (25 ± 2 °C) y fisiológica (37 ± 2 °C).
- ❖ Realizar el perfil de liberación *in vitro* con membranas de diálisis a temperatura fisiológica (37 ± 2 °C). para obtener el porcentaje liberado del gel propuesto y mediante los diferentes modelos matemáticos determinar el mecanismo de liberación.
- ❖ Evaluar la permeación del principio activo en tejido vaginal porcino usando celdas de difusión tipo Franz para determinar la cantidad de fármaco que atraviesa y que cantidad se queda en el tejido vaginal porcino mediante el porcentaje de recobro.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS.

1. Materiales

1.1. Reactivos.

- Clotrimazol (Sigma-Aldrich[®] Life Science)
- Tween[®]20 (Droguería Cosmopolita, S.A. de C.V.)
- Alcohol Metílico (REASOL^{MR})
- Alcohol Etílico (REASOL^{MR})
- Cloruro de sodio (Farmacia Paris, S.A. de C.V)
- Hidróxido de potasio (Farmacia Paris, S.A. de C.V)
- Hidróxido de calcio (Farmacia Paris, S.A. de C.V)
- Ácido láctico (Farmacia Paris, S.A. de C.V)
- Ácido acético glacial (Farmacia Paris, S.A. de C.V)
- Urea (Farmacia Paris, S.A. de C.V)
- Glucosa (Farmacia Paris, S.A. de C.V)
- Glicerina (Farmacia Paris, S.A. de C.V)
- Ácido clorhídrico (FERMONT, S.A. de C.V.)
- Fosfato monobásico de potasio (FERMONT, S.A. de C.V.)
- Hidróxido de sodio (Droguería Cosmopolita, S.A. de C.V.)
- Labrasol[®] (GATTEFOSSÉ)
- Pluronic[®] F-127 (Sigma-Aldrich[®])

1.2. Equipos:

- Balanza analítica VE-204 VELAB[®] México
- Espectrofotómetro UV-Vis 10S Genesys[®] USA.
- Ultrasonido UP200Ht, Hielscher[®]

- Reometro DV3 Brookfield[®]

Material y métodos

- Helipath[®] stand Brookfield[®]
- Multímetro pH /°C HI 211 (HANNA INSTRUMENTS[®]) Rumania
- Parrilla eléctrica con agitación MSH-20A WISESTIR[®]
- Agitador magnético multiplazas IKA[®] - WERKE
- Recirculador de líquidos con termostato S001 EH BASICIKA[®].
- Micropipeta de 5000 µL (Nichipet EXII)
- Texturómetro CT3 Brookfield[®]
- Desintegrador BJ-2 Vanguard Pharmaceutical Machinery inc.

1.3. Otros:

- Filtros Millex[®] -GV de 2.5 cm de diámetro y poro de 0.45 µm (Millipore[®]).
- Membrana de celulosa para diálisis (SIGMA - ALDRICH[®])
- Cronómetro.
- Material de cristalería.

1.4. Material biológico:

- Tejido vaginal de cerda sin tratamiento térmico obtenido del rastro Nueva Distribuidora de porcino TIF 194, ubicado en Av. Adolfo López Mateos No. 39 San Lorenzo Riotenco, Cuautitlán Izcalli, Estado de México.

2. Métodos

2.1. Preparación de soluciones.

✓ Fluido Vaginal Simulado (FVS).

Se pesaron 3.51 g de NaCl, 1.4 g de KOH, 0.22 g de Ca (OH)₂, 2 g de ácido láctico, 1 g de ácido acético, 0.16 g de glicerina, 0.4 g de urea y 5 g de glucosa todo se disuelve aproximadamente 800 ml de agua desionizada, se mide el pH y se ajusta con HCl hasta llegar a 4.2 posteriormente se afora en un matraz de un 1000 ml.

✓ Solución de FVS con Tween[®]20 al 3 % p/v

Se pesó 30 g de Tween[®]20 en un matraz aforado de 1000 ml y se llevó a la marca de aforo con FVS.

✓ Solución stock

Se pesó aproximadamente 40 mg de CLOT y se disolvió en 100 ml de la solución de FVS con Tween[®]20 al 3 % p/v dejándola en agitación 12 h.

✓ Solución amortiguadora de fosfatos pH 7.4

Se pesó 6.80 g de KH₂PO₄ y 1.58 g de NaOH se disolvieron en 500ml de agua desionizada ajustando el pH con HCl se trasladó aun matraz aforado de 1000 ml llevándose a la marca de aforo con agua desionizada.

✓ Solución con tejido vaginal

En un vaso de precipitado de 500 ml se agregó la solución de Tween[®] 20 al 3 % p/v y cubriendo al vaso se colocó el tejido vaginal colocando la parte interna en contacto con la solución (Figura 20) dejando en agitación durante 12 h para posteriormente filtrarla con membrana de poro de 0.45 μm



Figura 20. Solución con tejido vaginal y FVS con Tween[®]20 al 3 % p/v

2.2. Pruebas de solubilidad

✓ pH 4.2

En matraces de 25 ml se pesó 15 mg de CLOT y se disolvió con 25 ml de las soluciones de FVS, FVS con Tween®20 al 3 % de p/v y FVS con Labrasol® al 3 % de p/v, después de 24 h agitándose se observaban turbios por lo que se le agrego 25 ml más a cada uno teniendo un volumen total de 50 ml, se dejó en agitación 24 h más.

✓ pH 7.4

Se prepararon diferentes concentraciones de Gelucire® 44/14 con la solución amortiguadora de fosfatos al 2 %, 3 % y 5 % p/v posteriormente se pesaron 5 mg de CLOT y se llevó a un aforo de 10 ml de la solución se dejaron 24 h en agitación constante.

2.3. Barridos espectrofotométricos

Se realizaron los barridos espectrofotométricos de las soluciones anteriores; se leyeron de 200 a 400 nm en el espectrofotómetro UV/vis utilizando como blanco las soluciones de tensoactivos con FVS, con esto se eligió al que tuviera menos interferencias dentro de la misma longitud de onda; y se determinó la longitud de máxima absorción (λ_{max}).

2.4. Desarrollo de métodos analíticos

Se desarrollaron 4 métodos analíticos mediante espectrofotometría UV/Vis para determinar la cantidad de CLOT en los estudios de liberaciones *in vitro*, cinética de permeación *in vitro* y cantidad retenida en la vagina de cerda

✓ Método 1

Se preparó FVS pH 4.2 con Tween®20 al 3 % p/v

✓ Método 2

El FVS pH 4.2 con Tween®20 al 3% p/v en contacto con la cara interna de la vagina de cerda, se colocó en agitación durante 24 h, transcurrido ese tiempo se filtró la solución con una membrana de 0.45 μm

✓ Método 3

Se preparó solución amortiguadora de fosfatos pH 7.4 con Gelucire® 44/14 al 5% p/v en contacto con la cara interna de la vagina de cerda en agitación durante 24 h, transcurrido el tiempo se filtró con una membrana de 0.45 μm

✓ Método 4

Metanol en contacto con porciones de vagina. Se colocan trozos de vagina de cerda en metanol durante 24 h con agitación constante y posteriormente se filtró a través de una membrana de 0.45 μm .

Las longitudes de onda de máxima absorción para el clotrimazol se determinaron en los cuatro diferentes medios de disolución.

Se prepararon soluciones stock con una concentración aproximada de 380 $\mu\text{g/ml}$ y a partir de esta se toman alícuotas de 2 ml, 4 ml, 6 ml, 8 ml y 10 ml llevándolas a un aforo de 10ml con la solución de Tween[®]20, Gelucire[®] 44/14 y metanol para tener diferentes concentraciones las cuales se prepararon por triplicado evaluando selectividad, linealidad y precisión de acuerdo a la Guía de Validación de Métodos Analíticos editada por el Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos de México, A.C., Edición 2002.

2.5. Preparación del Gel Pluronic[®] F-127

✓ Gel al 20%

Se pesó 10 g de Pluronic[®] F-127 en balanza analítica después se agregó 50 ml de agua desionizada fría, se disolvió con una varilla de vidrio refrigerándose por 12 h hasta que la solución fuera transparente dejándose otras 12 h a temperatura ambiente para que gelificara.

✓ Gel al 22%

Se pesó 11 g de Pluronic[®] F-127 en balanza analítica después se agregó 50 ml de agua desionizada fría, se disolvió con una varilla de vidrio refrigerándose por 12 h hasta que la solución fuera transparente dejándose otras 12 h a temperatura ambiente para que gelificara.

✓ Gel al 24%

Se pesó 12 g de Pluronic[®] F-127 en balanza analítica después se agregó 50 ml de agua desionizada fría, se disolvió con una varilla de vidrio refrigerándose por 12 h hasta que la solución fuera transparente dejándose otras 12 h a temperatura ambiente para que gelificara.

✓ Gel al 29%

Se pesó 14.5 g de Pluronic[®] F-127 en balanza analítica después se agregó 50 ml de agua desionizada fría, se disolvió con una varilla de vidrio refrigerándose por 12

h hasta que la solución fuera transparente dejándose otras 12 h a temperatura ambiente para que gelificara.

Los cuatro geles fueron observados para ver su consistencia y así decidir cuál era el mejor para el propósito que queríamos

2.6. Adición del principio activo

Se pesó 0.1 g de CLOT y se disolvieron en 5 ml de metanol agitándose con una varilla de vidrio una vez que el CLOT estaba totalmente disuelto se agregó al gel al 24% aun frio agitándolo suavemente y dejándolo en refrigeración 1 h más, posteriormente se llevó a temperatura ambiente hasta gelificar.

2.7. Caracterización de los Geles.

✓ Temperatura de Gelificación.

Se colocaron 5 ml de gel aun frio de diferentes concentraciones en un baño de agua con una temperatura de 40 °C, con un termómetro se midió la temperatura cada 3 min hasta que se observara totalmente gelificado se realizó por triplicado.

✓ Medición de viscosidad.

Una vez obtenidos los geles se midió la viscosidad a temperatura ambiente (25 ± 2 °C) y fisiológica (37 ± 2 °C) en el viscosímetro Brookfield® DV (Figura 21) con un adaptador de agujas de Helipath® durante 3 min tomando muestra cada 5 seg obteniendo un torque de 50 ± 5 % la prueba se hizo por quintuplicado.

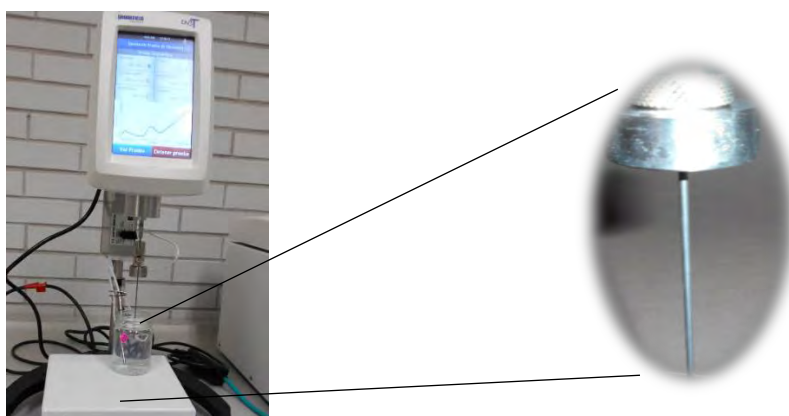


Figura 21. Viscosímetro DV3 Brookfield® usado para las pruebas reológicas de los geles de Pluronic®F-127

2.8. Perfil de liberación *in vitro*.

Se utilizaron membranas de diálisis; en ellas se colocó 1 g del gel y las bolsas se colocaron dentro de un volumen de 50 ml de FVS con Tween[®]20 al 3 % de p/v dejándolas en agitación constante en un baño de agua a 37 °C (Figura 22) tomando una muestra de 3 ml cada 5 min, 10 min, 15 min, 20 min, 25 min, 30 min posteriormente cada hora hasta las completar 8 h, reponiéndola con la misma solución para mantener las condiciones *sink* y después una muestra a las 24 h. Cada muestra se leyó en el espectrofotómetro UV/Vis a λ_{max} 261 nm. La prueba se realizó por triplicado

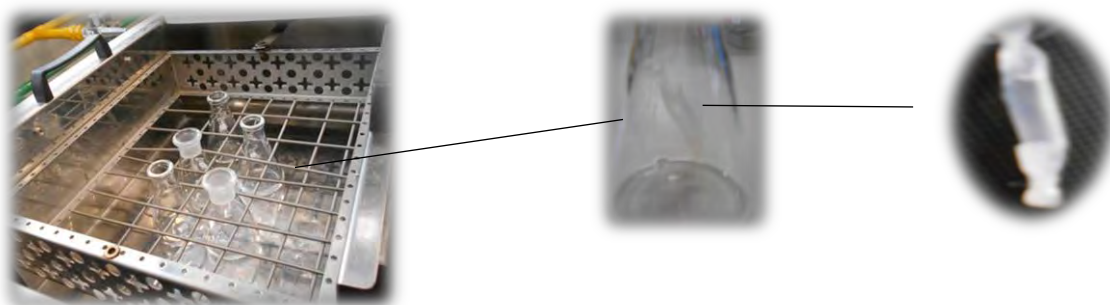


Figura 22. Muestra de la realización de los perfiles de liberación *in vitro*

2.9. Cinética de permeación *in vitro*

Se utilizaron celdas tipo Franz colocando en el medio donador 2g de gel, en la parte receptora 20 ml de FVS y Tween[®] 20 al 3 % de p/v en la parte de en medio el tejido vaginal de cerda en un baño de agua a 37 °C (Figura 23). Tomando muestra cada hora durante 8 h Se realizó por sextuplicado reponiendo el volumen para mantener condiciones *sink*.

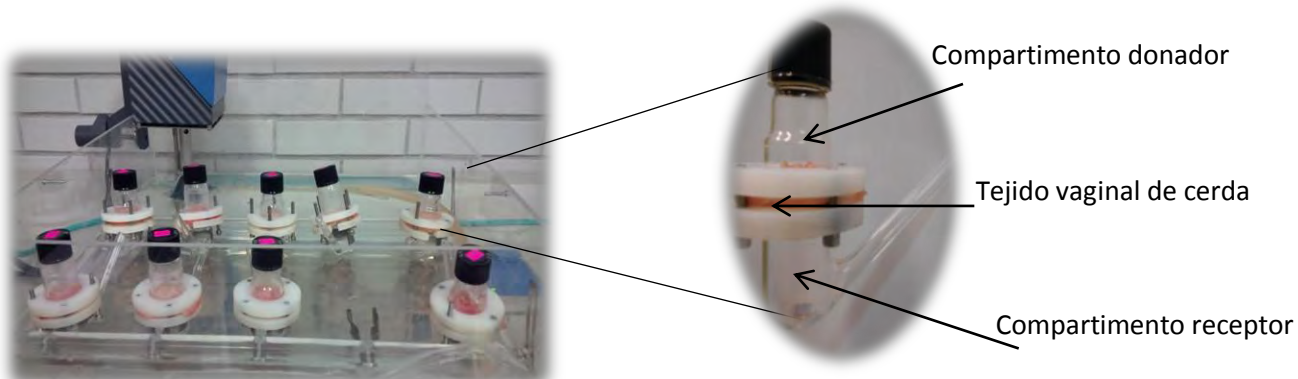


Figura 23. Muestra del estudio realizado de permeaciones en celdas tipo Franz

✓ Extracción del CLOT remanente en el tejido vaginal de cerda

Después de realizar la cinética de permeación, el tejido vaginal de cerda se lavó con agua desionizada para retirar el excedente del fármaco, se cortó en trozos muy pequeños y se dejó con metanol en agitación durante 24 h. Al concluir las 24 horas se filtró por gravedad, retirando los trozos de tejido, las soluciones se filtraron con membrana de 0.45 μm , de estas soluciones se tomaron 1 ml aforándose con 10 ml de FVS y Tween[®]20 al 3% p/v leyéndose en el espectrofotómetro UV/Vis a λ_{max}

Para determinar el porcentaje de recobro del método de extracción, se disolvió una cantidad conocida de CLOT en un solvente volátil, esta solución se pone sobre una membrana de vagina de cerda previamente montada en una celda de Franz, se dejó evaporar el disolvente y se extrajo el CLOT utilizando metanol. El porcentaje de recobro fue calculado por la siguiente ecuación.

Ecuación 1.

$$\% \text{ recobro} = \frac{\text{CLOT extraído}}{\text{CLOT inicial}} \times 100$$

Ecuación 2.

$$\% \text{ de CLOT retenido corregido} = \frac{\% \text{ de CLOT retenido}}{\% \text{ recobro}} \times 100$$

2.10. Pruebas de bioadhesión

✓ Prueba 1.

La prueba de residencia se realizó como la adaptación del modelo de Bacchav y Patravale (2009) en este método se quiere saber el tiempo de bioadhesión del gel en la vagina de cerda para esto se utilizó el aparato de desintegración de tabletas en una placa de acero con el tejido vaginal (Figura 24) se colocó 0.4 g del gel de CLOT al 1 % p/v dejándolo en posición vertical durante 3 min, posteriormente se sumergió en FVS a 37 °C midiendo el tiempo que tarda en desprender todo el gel del tejido vaginal de cerda las determinaciones se realizaron por quintuplicado.

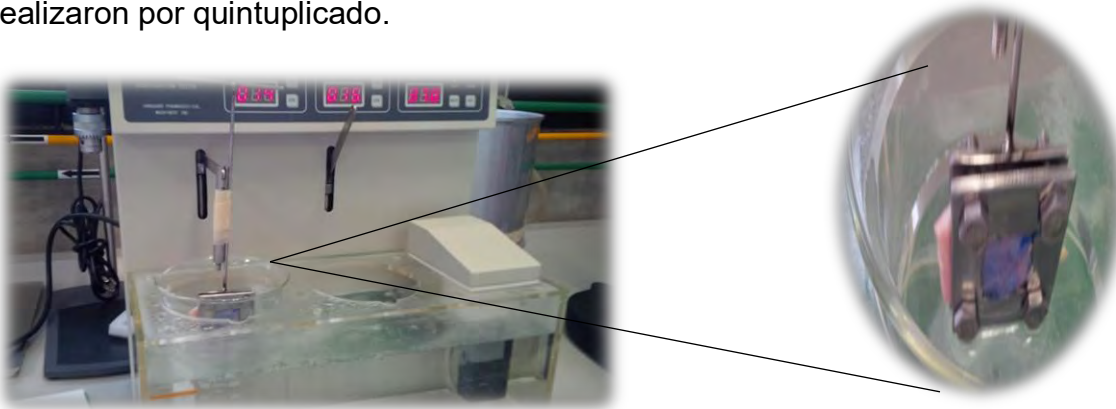


Figura 24. Muestra de la prueba de residencia acoplada al aparato de desintegración

✓ Prueba 2.

Esta prueba se realizó mediante la modificación de Nakamura y Otha 1996; se utilizó un recipiente de aproximadamente 500 ml y una placa con una inclinación de 45° (Figura 25). En la placa se colocó el tejido vaginal y una gota del gel y se sumergió por completo en la solución de FVS y Tween® 20 al 3 % p/v dejando pasar 10 min se midió la distancia recorrida del gel.

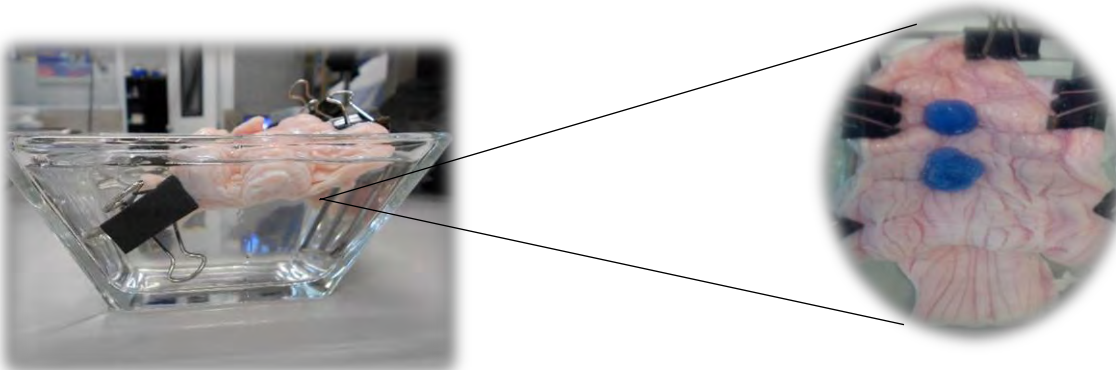


Figura 25. Muestra de la prueba realizada de la distancia recorrida método acoplado al de Nakamura y Otha 1996

✓ Prueba 3

Para esta prueba se utilizó el Texturómetro CT3 Brookfield® (Figura 26) Se cortaron trozos de tejido vaginal porcino y se humectaron el FVS y Tween®20 al 3 % de p/v se colocó el texturómetro y en una parte de este se colocó gel se puso en contacto aplicando una fuerza de 0.50 N se midió el trabajo total, fuerza adhesiva y adhesividad la prueba se realizó por quintuplicado

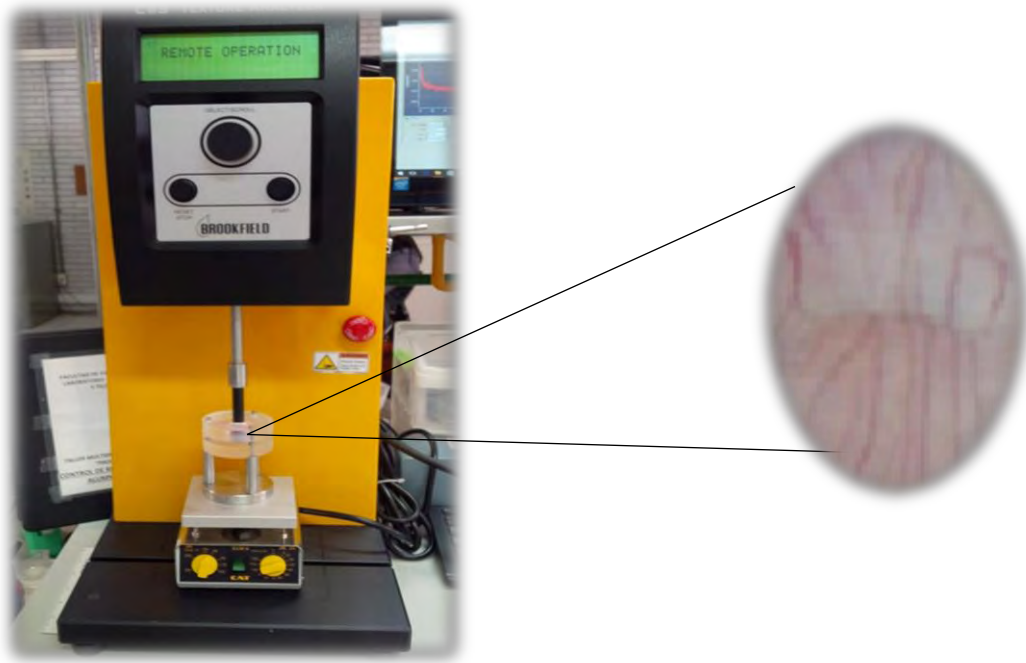


Figura 26. Análisis de Textura con Texturómetro Brookfield®

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se decidió formular un gel bioadhesivo con Pluronic® F-127 con clotrimazol al 1 % p/v que se ha demostrado que tiene buenas propiedades bioadhesivas para reducir el tiempo de administración ya que queda adherido por mucho más tiempo al moco vaginal.

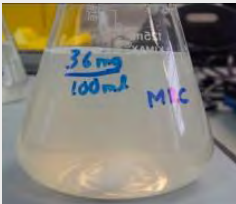
Prueba de solubilidad



Para poder desarrollar el gel se realizaron pruebas de solubilidad del principio activo, en este caso se utilizó el clotrimazol, primero se probó solubilizarlo en FVS a pH 4.2 y como no se logró se decidió utilizar diferentes tensoactivos que estaban reportados para ayudar a la solubilización del CLOT; se utilizaron tensoactivos no iónicos como el Labrasol® al 3 % y Tween® 20 al 3 % 4 % y 5 % p/v dejándolos en agitación un día y observando que tanto se solubilizarían.

El clotrimazol es insoluble en agua, la solubilidad también depende del pH; la solubilidad del clotrimazol incrementa cuando desciende el pH (Borhade, *et al.*, 2012)

En la Tabla 2 se muestra que tanto solubilizó el clotrimazol en los diferentes tensoactivos utilizados. Como se puede observar el sistema 1 no tuvo una buena solubilidad por lo que la solución era blanca, mientras en el sistema 1 y 2 utilizando Tween® 20 y Labrasol® respectivamente la solución se volvió trasparente dando indicios de una buena solubilidad del clotrimazol.

Tabla 2. Solubilidad del CLOT en diferentes soluciones; FVS, FVS con Tween® 20 y Labrasol®

Sistema		Observaciones
1	15 mg de Clotrimazol y FVS	Turbio 

2	15 mg de Clotrimazol 50 ml FVS con Tween [®] 20 al 3 % de p/v	<p>Translúcido</p> 
3	15 mg de Clotrimazol 50ml FVS con Labrasol [®] al 3 % de p/v	<p>Translúcido</p> 

Una vez realizadas las pruebas de solubilidad y descartando a la solución de FVS solamente se realizaron los barridos espectrofotométricos con solución de Tween[®]20; 2, 3 y 4 % p/v y Labrasol[®] al 3 % p/v que fueron los que tuvieron mayor solubilidad para determinar interferencias y saber cuál es el más selectivo. Los barridos obtenidos se muestran en el Anexo 1.

Desarrollo de métodos analíticos.

En la FEUM se escribe como hacer la cuantificación del CLOT, sin embargo, en el laboratorio no contamos con HPLC y las condiciones del estudio deben de ser con FVS y Tween 20 al 3 % por esta razón desarrollamos estos diferentes métodos.

- **Método 1**

Se realizaron varios métodos para la cuantificación del CLOT, el primero se realizó con FVS y Tween[®]20 al 3 %

Se realizó un barrido espectrofotométrico (ver Anexo 1) se puede observar que no hay interacción entre el Tween[®] 20 con el Tween[®]20 al 3 % con CLOT por lo que se determinó que el método es selectivo, también se determinó la longitud de onda

de máxima de absorción (λ_{\max}) del CLOT que fue de 261 nm (Figura 27) con la cual se hicieron todas las lecturas.

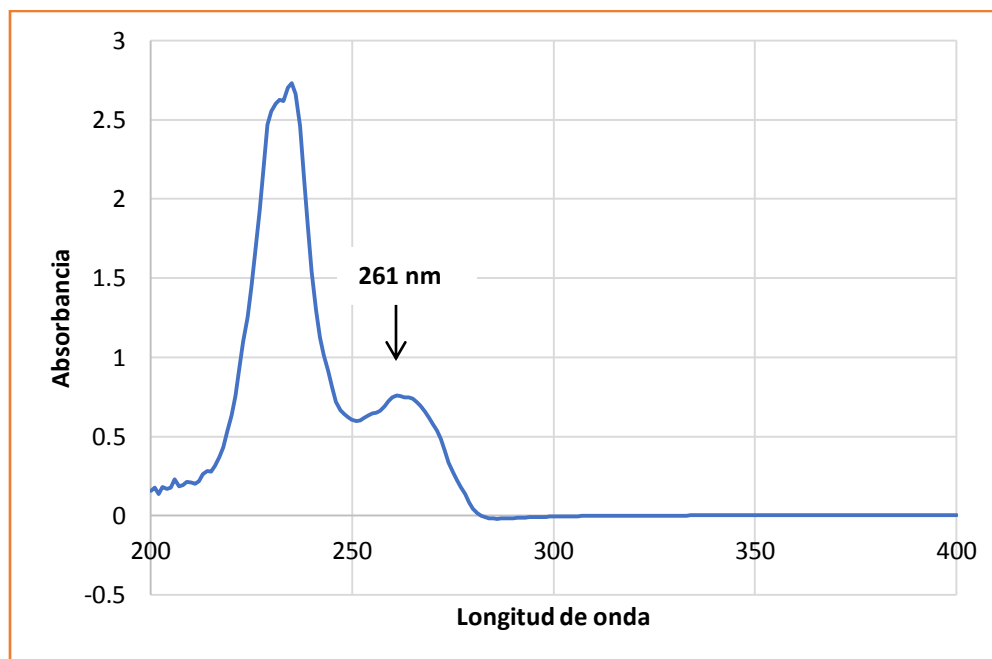


Figura 27. Espectro de absorción de la solución de Tween®20 al 3 % p/v con CLOT

Una vez realizado el espectro de absorción se realizó una curva de calibración partiendo de una solución stock de 389 $\mu\text{g/ml}$ con 5 sistemas teniendo un rango de concentraciones de 77.8 a 389 en un pH de 4.2 se leyó a la λ_{\max} de absorción de 261 nm. La curva de calibración se realizó para determinar si el método es lineal y así poder cuantificar el clotrimazol en las pruebas que se van a realizar, los datos de la curva se muestran en el Anexo 2.

En la Figura 28 se muestra la curva de calibración del CLOT a pH de 4.2 dando un coeficiente de variación de 1.257 el coeficiente de regresión y determinación es 0.99, realizando un análisis estadístico (ANOVA) existe una relación lineal entre la concentración del CLOT y su absorbancia, el intercepto es diferente a cero, el método resulto ser repetible con un coeficiente de variación de 1.601 (ver Anexo 2)

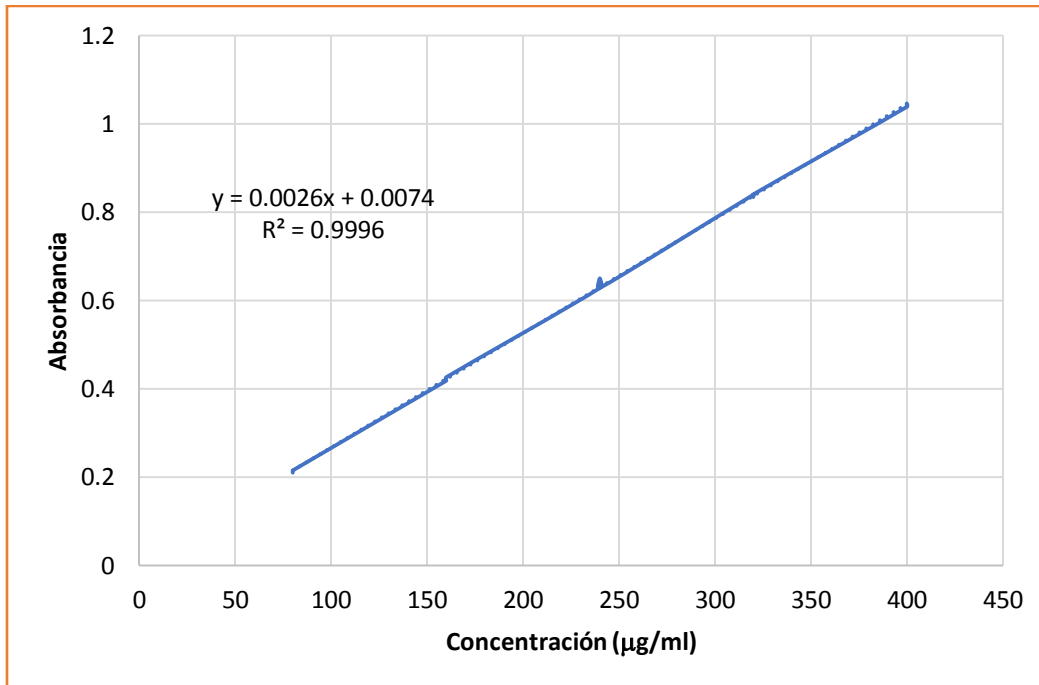


Figura 28. Curva de calibración del CLOT con Tween®20 al 3 % p/v pH 4.2

◦ **Método 2**

El método 2 se realizó con tejido vaginal porcino a un pH 4.2, se utilizó la mucina que se encuentra en el tejido vaginal porcino

En la Figura 29 se muestra la curva de calibración con un rango de concentraciones entre 64.4 a 322 µg/ml. Dando un coeficiente de variación de 0.566 un coeficiente de regresión y correlación de 0.99, realizando el análisis estadístico (ANOVA) se determinó que existe una relación lineal entre la concentración del CLOT y la absorbancia y el intercepto es diferente a cero. El método resulto ser repetible con un coeficiente de variación de 0.587 (ver Anexo 2)

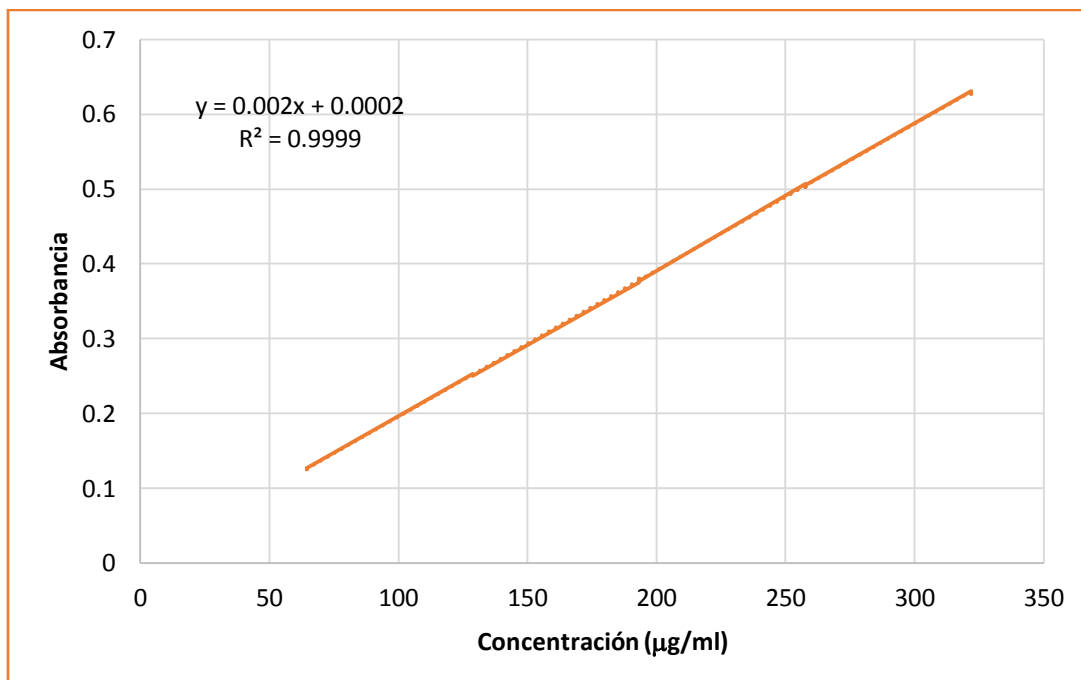


Figura 29. Curva de calibración con tejido vaginal a pH 4.2

◦ **Método 3.**

La tercer curva que se realizo fue a pH de 7.4 de acuerdo al pH fisiológico no se pudo utilizar el Tween® 20 ya que en las pruebas de solubilidad antes realizada no se tomó en cuenta el pH fisiológico solo el pH vaginal que fue de 4.2

Realizando pruebas de solubilidad a pH 7.4 con Gelucire® 44/14 se decidió utilizar este al 5% porque tuvo una buena solubilidad y espectro de absorción no tuvo interferencia el espectro se muestra en el anexo 1.

El rango de las concentraciones fue de 101 a 505 mg/ml, el coeficiente de variación es de 2.547 y el coeficiente de regresión y correlación es de 0.99 en el análisis estadístico se demostró que existe una relación lineal entre la concentración del CLOT y la absorbancia y que el intercepto es diferente a cero, el método resulto ser repetible con un coeficiente de variación de 1.609 los datos se muestran en el Anexo 2.

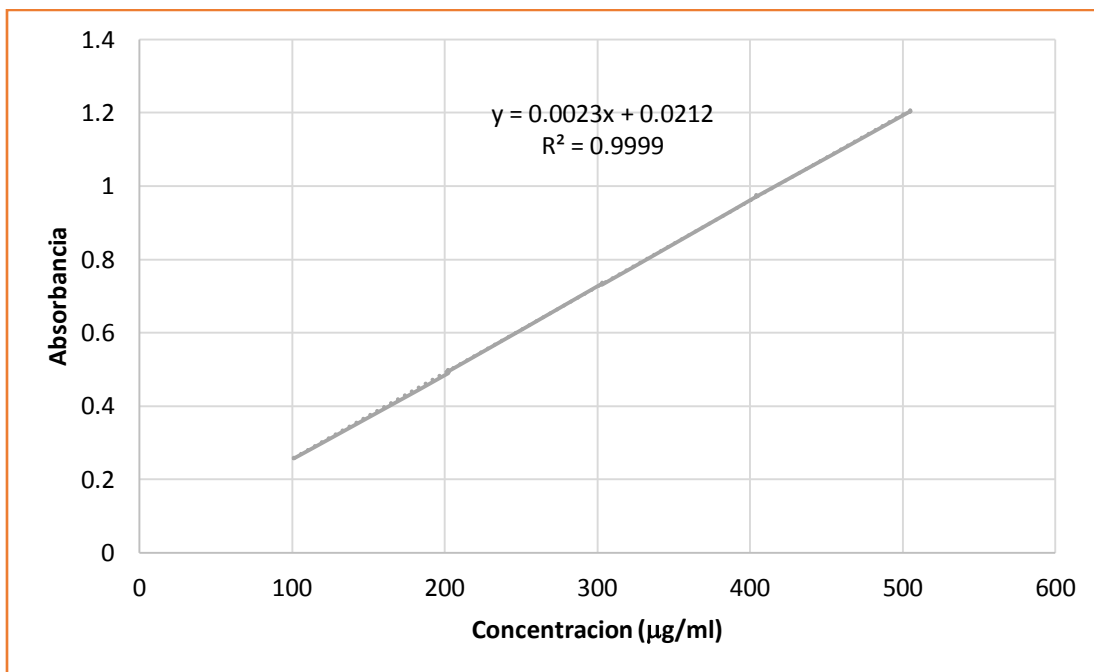


Figura 30. Curva de calibración con tejido vaginal y Gelucire® 44/14 a pH 7.4

- **Método 4.**

Este método se utilizó para determinar el clotrimazol retenido en la vagina al final de los estudios de permeación. En este caso fue el CLOT disuelto en metanol. Se realizó un barrido espectrofotométrico de 200 a 400 nm para el clotrimazol disuelto en la matriz biológica no encontrándose interferencias a las condiciones de estudio por lo que el método es selectivo. La longitud de onda de máxima absorción para el clotrimazol fue de 261 nm (ver Anexo 1).

En la figura 31 se muestra la curva de calibración presentando linealidad en un intervalo de 33.8 a 169 µg/ml dando un coeficiente de variación de 0.9491, un coeficiente de determinación de 0.999 El método mostro ser repetible con un coeficiente de variación de 1.509. (Ver anexo 2)

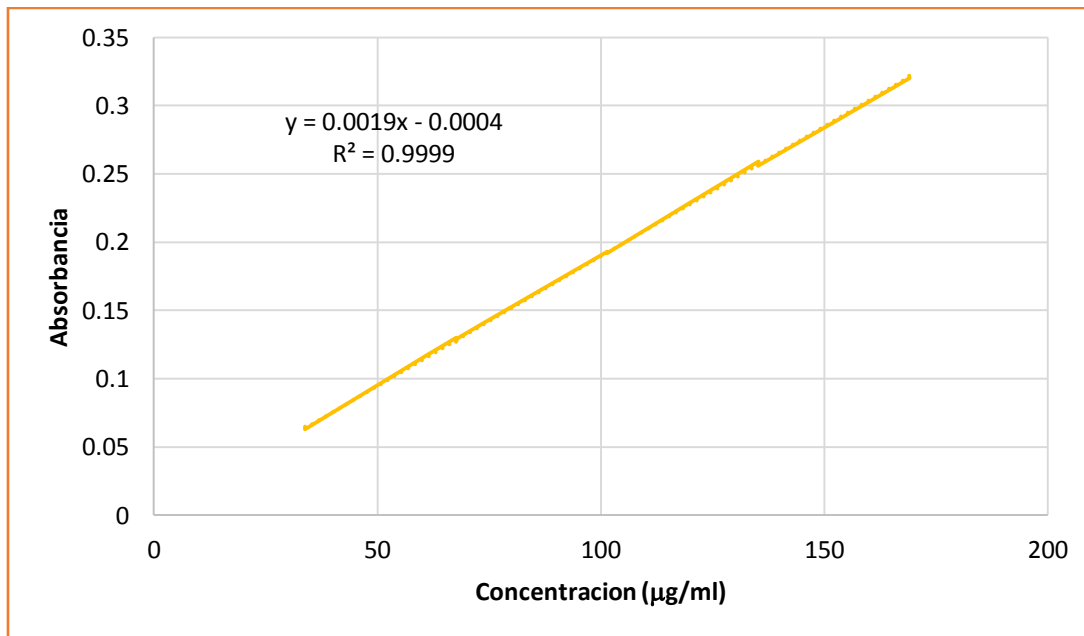


Figura 31. Curva de calibración del CLOT con metanol

Temperatura de gelificación

El Pluronic[®] F-127 tiene propiedades de gelificación reversibles por encima de una concentración particular del polímero

El proceso sol-gel es un método de producción de materiales sólidos a partir de moléculas pequeñas. El proceso implica la conversión de monómeros en una solución coloidal (sol) que actúa como precursor de una red integrada (o gel) de partículas discretas o polímeros reticulados.

Una vez realizados los geles a diferentes concentraciones se colocaron en un baño de agua a 40° C observándolos en todo momento, tomando la temperatura en cada momento hasta que gelificara.

En la Figura 32 se muestra la temperatura de gelificación de los geles a diferentes concentraciones, se puede observar que mientras más concentración de polímero su temperatura de gelificación es un poco más baja, visualmente la consistencia es líquida en concentraciones menores a temperatura ambiente (25 ± 2 °C)

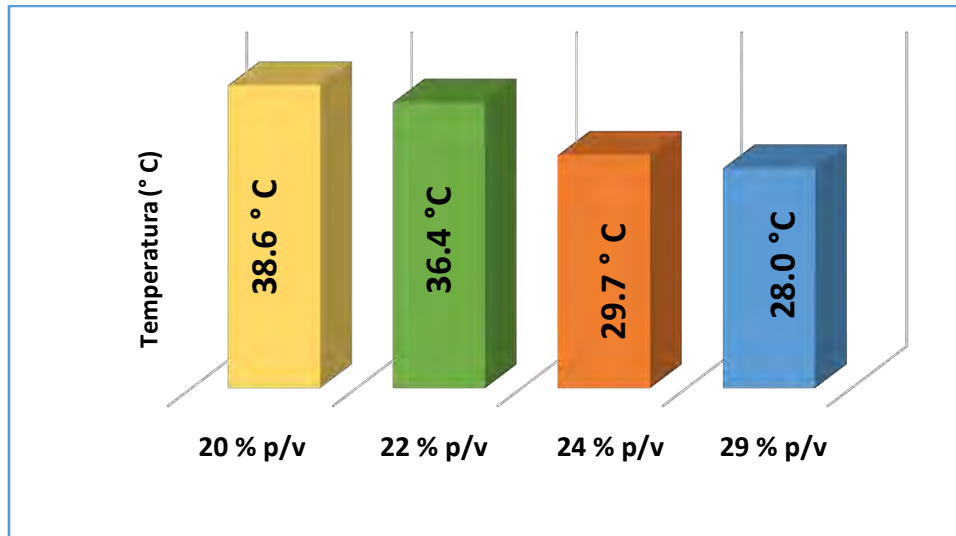


Figura 32. Temperatura de gelificación en diferentes concentraciones del gel Pluronic® F-127

Liu y colaboradores 2009 realizaron un estudio con Pluronic® F-127 al 20%. Hicieron dos lotes al primero le agregaron carragenina al 0.2 % y al segundo Carbopol® al 0.2 %, midiendo la temperatura de gelificación está aumento con la adición del Carbopol® sugiriendo un cambio microestructural del Pluronic® F-127.

En el 2013 Tuğcu-Demiroz y colaboradores realizaron el mismo estudio pero ahora le agregaron HPMC al 0.2 % y 0.5 % no teniendo diferencias significativas con la temperatura de gelificación solo del Pluronic® F-127.

La interacción entre las micelas se vuelve fuerte cuando la temperatura aumenta, y la interacción de micelas a micelas juega un papel como un entrecruzador físico para la formación del gel (Seo *et al.*, 2012) por esta razón al aumentar la temperatura aumentaba la viscosidad,

Viscosidad.

La viscosidad se define como la resistencia que tiene un sistema a fluir. Una característica que tienen los geles es que son sustancias viscosas así entre más concentración de polímero aumentara sus viscosidad.

Una vez realizados los geles se observaron a temperatura ambiente para ver cuál era su consistencia y así elegir el gel que más nos convenía para el objetivo del trabajo, este era el gel que fuera más viscoso.

En la Figura 33 se puede observar que el gel al 20 % p/v no está viscoso por el contrario tiene una apariencia líquida a temperatura ambiente ($25 \pm 2^\circ \text{C}$) En la Figura 34 muestra la concentración de 22 % p/v tiene una apariencia viscosa a temperatura ambiente ($25 \pm 2^\circ \text{C}$) aunque no del todo porque al voltear la espátula este se cae.

En la Figura 35 se muestra el gel con la concentración del 24 % p/v está totalmente viscoso tanto que si volteamos la espátula permanece en su lugar sin que se caiga. Por esta razón se eligió trabajar con la concentración más alta debido al sitio de acción donde lo necesitamos para que permanezca más tiempo en la vagina sin que escurra el gel.

Sin embargo se realizó una concentración más alta ahora de 29 % p/v en la Figura 36 se muestra el gel con una apariencia muy parecida a la concentración 24 % p/v todo esto a temperatura ambiente ($25 \pm 2^\circ \text{C}$).

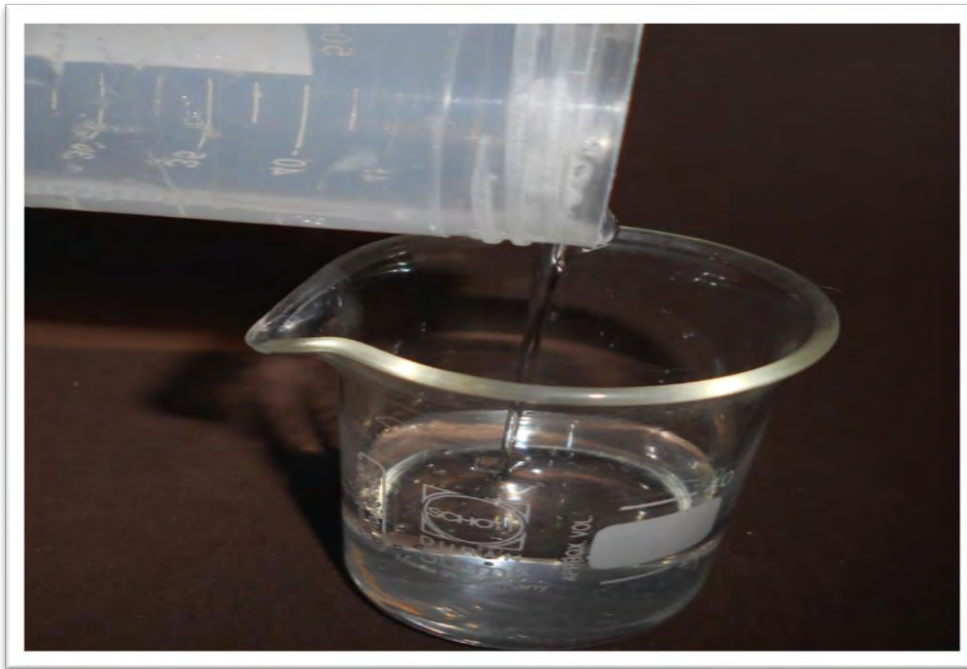


Figura 33. Gel Pluronic® F-127 al 20 % p/v a temperatura ambiente ($25 \pm 2^\circ \text{C}$)



Figura 34. Gel Pluronic® F-127 al 22 % p/v a temperatura ambiente ($25 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$)



Figura 35. Gel Pluronic® F-127 al 24 % p/v a temperatura ambiente ($25 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$)



Figura 36. Gel Pluronic® F-127 al 29 % p/v a temperatura ambiente ($25 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$)

Si la viscosidad del estado líquido es demasiado baja, es probable que ocurra una fuga inmediatamente después de la administración, mientras que si la viscosidad es demasiado alta, la aplicación con los dispositivos sería difícil en el momento de la administración (Liu *et al.*, 2009).

Dado que la concentración alta es más viscosa decidimos utilizar las dos concentraciones más altas 24 % y 29 % p/v para agregar el principio activo por sus características ya que como es una administración vaginal necesitamos que aumente el tiempo de residencia en la cavidad vaginal y que a temperaturas fisiológicas no escurra evitando así pérdida del gel.

La prueba de viscosidad se realizó con un reómetro Brookfield® DV3 a temperatura ambiente $25^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ y a temperatura fisiológica $37^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ mientras aumentaba la concentración y la temperatura se hacían más viscosos por esta razón se utilizaron agujas Helipath® para ayudar a medir la viscosidad.

En la Figura 37 se muestra las diferentes curvas de viscosidad con respecto al tiempo la viscosidad se midió por aproximadamente 2 min tomando medición cada 5 segundos, como se observa la viscosidad iba en aumento mientras más concentrado estaba y las viscosidades a temperatura fisiológica que están en color rojo siempre fueron superiores con respecto a las de temperatura ambiente

RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

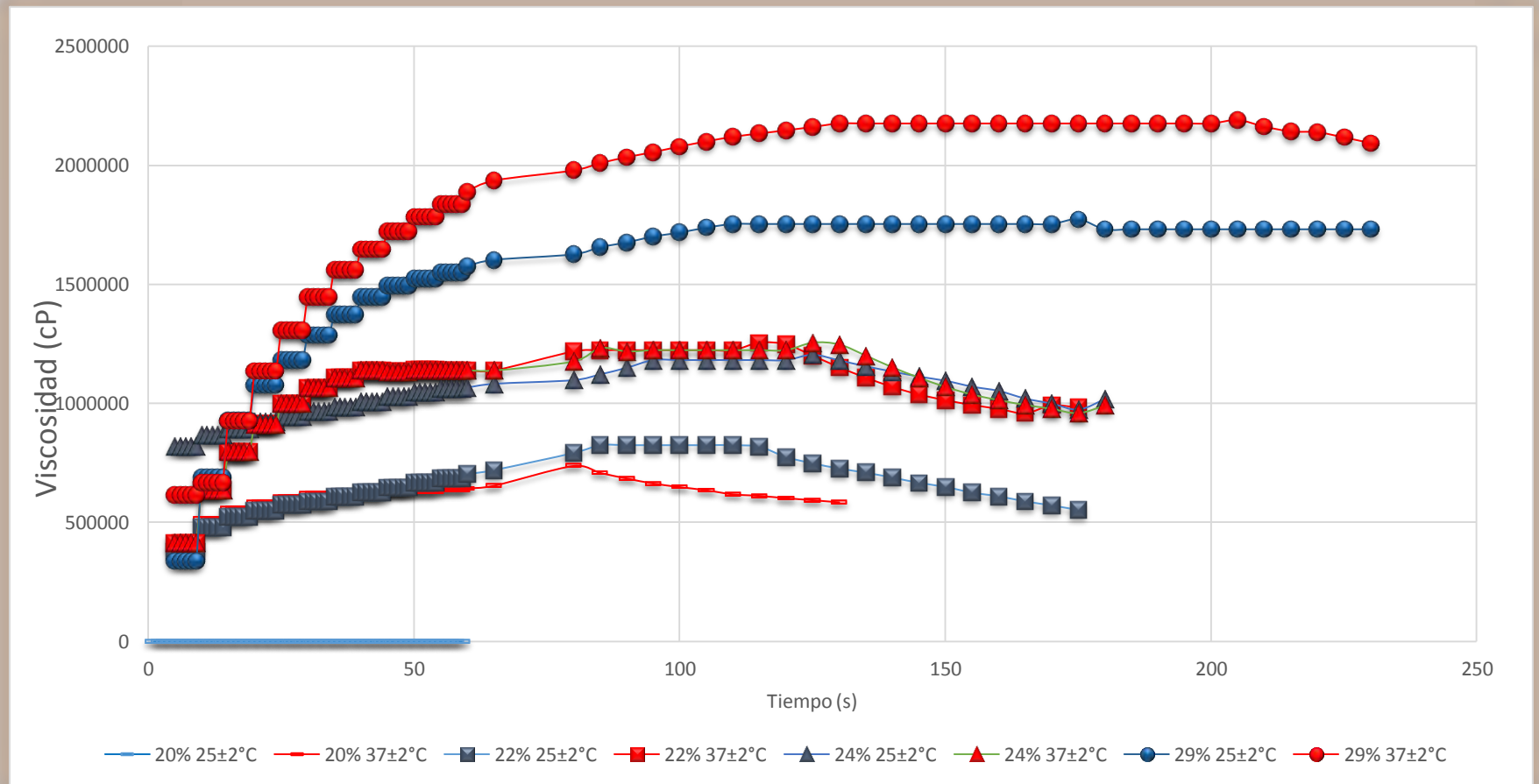


Figura 37. Gráfico de viscosidades a diferentes temperaturas (azul: $25 \pm 2^\circ \text{C}$ y rojo: $37 \pm 2^\circ \text{C}$)

Adición del principio activo.

El clotrimazol es el antifúngico más utilizado para infecciones vaginales causadas por hongos.

Los poloxámeros son copolímeros tribloque, sintéticos de poli (etileno) óxido) -b-poli (óxido de propileno) -b-poli (óxido de etileno) que tienen comportamiento termorreversible en soluciones acuosas. El uso de tales sistemas para la administración tópica de agentes terapéuticos en la vagina ofrece varias ventajas, incluida la fácil aplicación, alta capacidad de extensión en temperaturas por debajo de la temperatura sol-gel y estructuración reológica y, por lo tanto, retención mejorada a temperatura corporal (Baloglu *et al.*, 2011).

Se decidió utilizar las dos concentraciones más altas para formular el gel bioadhesivo en la Tabla 3 se muestra las formulaciones utilizadas para las pruebas reológicas, primero se realizó la de 24 % utilizando metanol pero a los dos días de realizada, el P.A. empezó a precipitar haciendo que el gel tuviera una consistencia más líquida impidiendo así la futura administración como se muestra en la Figura 38.

Tabla 3. Formulación de dos geles bioadhesivos para pruebas reológicas.

Formulación	Concentración de Pluronic® F-127	Concentración del CLOT	Solubilizante
Gel 1	24 % p/v	1 % p/v	Metanol
Gel 2	29 %p/v	0.5 % p/v	Etanol-agua 90:10

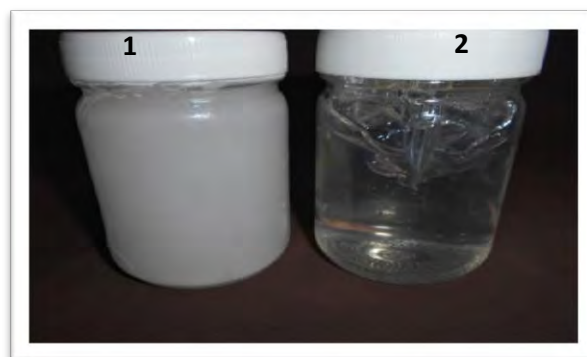


Figura 38. Gel Pluronic®F-127 24 % con CLOT al 1 % p/v (1) tres días después de prepararlo (2) recién preparado

Después de observar que el CLOT se precipitaba se decidió utilizar etanol; se hizo una mezcla de etanol agua al 90:10 para disolver el CLOT e incorporarlo al gel. Se cubrió y se almaceno en un lugar donde no sufriera de cambios bruscos de temperatura durante 15 días no observando cambios significativos en la formulación 2.

Temperatura de gelificación con CLOT.

En la Figura 39 se muestra la temperatura de gelificación del gel con el principio activo se puede observar que a diferencia del gel sin principio activo la temperatura aumento esto es debido a que se solubilizo el principio activo en metanol y esto hizo que disminuyera la viscosidad

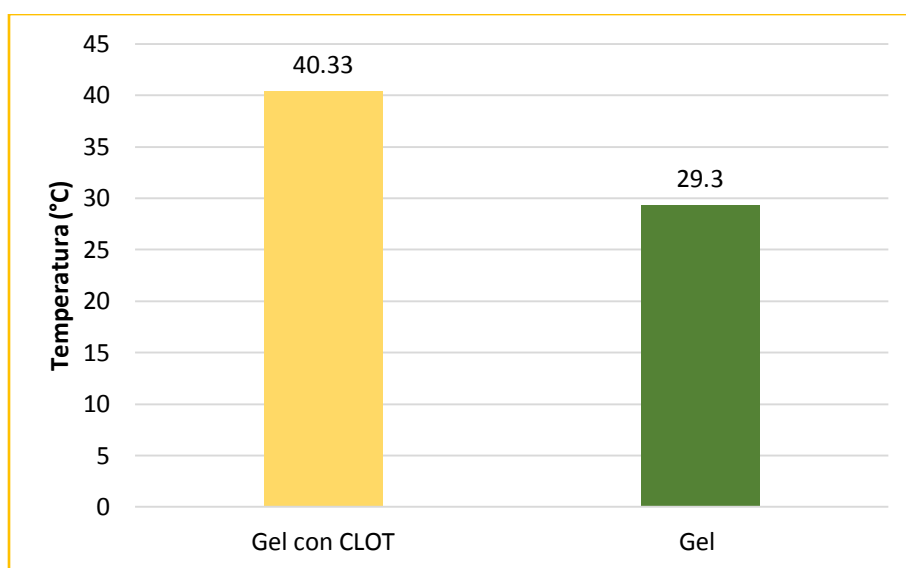


Figura 39. Comparación de la temperatura de gelificación entre el gel Pluronic® F-127 al 24 % p/v y el gel Pluronic® F-127 al 24 % p/v con CLOT al 1 % p/v

En el 2012 Jin Seo y colaboradores realizaron un estudio con PG y PL. La temperatura de gelificación aumenta con aumento de la concentración de alcoholes. Los segmentos PPO y PEO serían solvatados por los alcoholes por lo que la interacción del segmento hidrofóbico PPO podría ser suprimida y el PG era más eficaz que el etanol en el aumento de la temperatura de gelificación. PPO es un residuo de PG y, debido a la similitud en sus estructuras químicas, PPO podría ser solvatado más fácilmente por PG que por etanol. (Jin Seo *et al.*, 2012)

Viscosidad con principio activo

Se midió la viscosidad en las dos formulaciones y se compararon con el gel sin principio activo como se muestra en la Figura 40 la viscosidad es más baja a

Resultados y discusión

temperatura ambiente al aumentar la temperatura la viscosidad aumenta en las dos formulaciones la viscosidad disminuyo a temperatura ambiente y fisiológica, esto se pudo deber a que al disolver en CLOT en un volumen elevado esto disminuyo la concentración del gel llegando a una concentración de 20 % p/v.

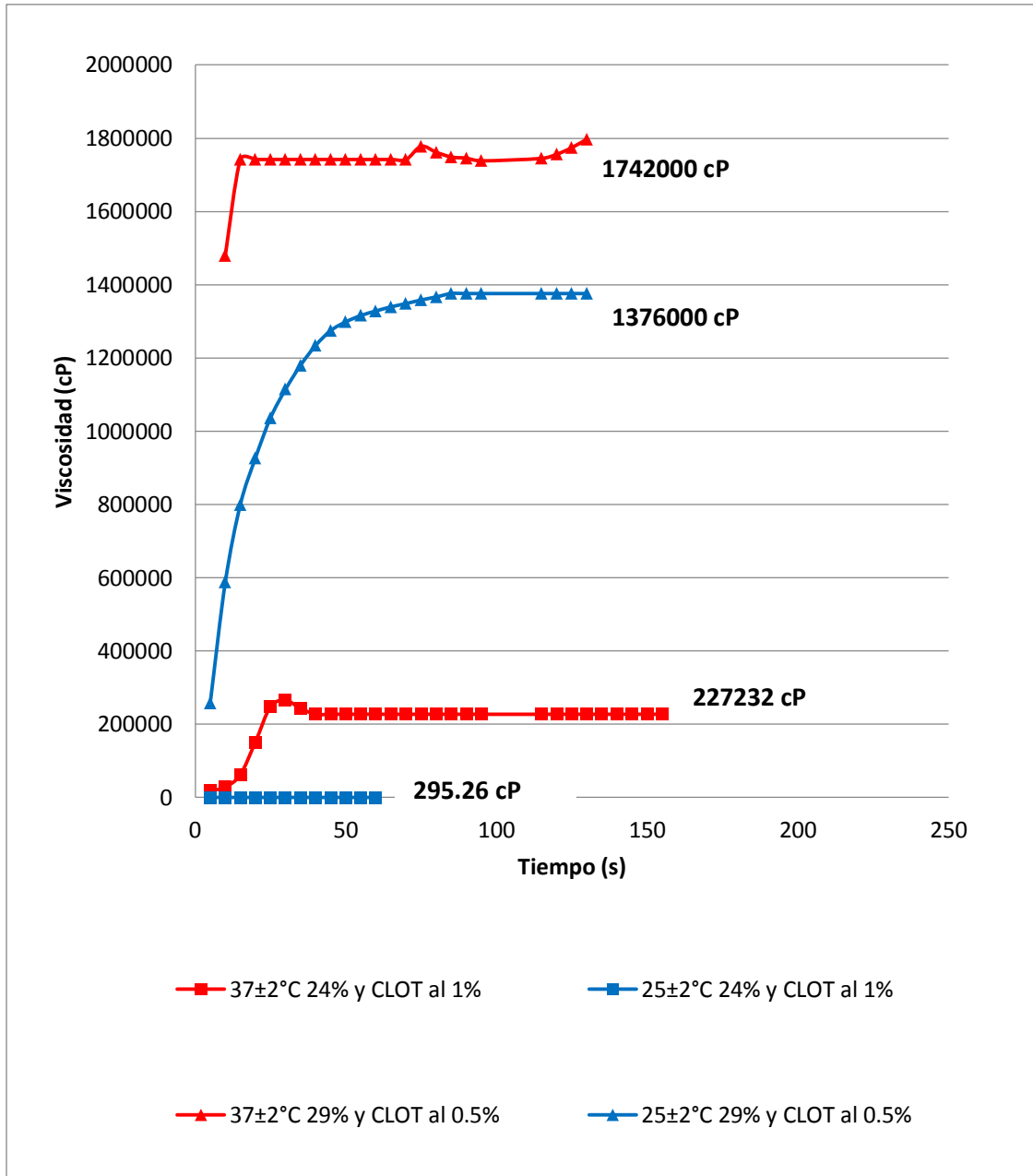


Figura 40. Gráfico de viscosidades a diferentes temperaturas con Gel al 24 % y 29 % p/v adicionando CLOT al 1 % y 0.5 % p/v respectivamente

En la Figura 41 se muestra el gel a una concentración de 29 % disminuyéndose la concentración del CLOT a un 0.5 % disolviéndolo en la mezcla de etanol:agua al 90:10 formándose el gel, es muy parecido al de la concentración 24 % . Sin embargo se utilizó el Gel 1 para efectuar las pruebas restantes debido a que no se tomó en cuenta la estabilidad del gel.



Figura 41. Gel Pluronic® F-127 al 29 % con CLOT al 0.5 % p/v

Perfil de liberación *in vitro*

La liberación del fármaco comienza desde el momento en el que el medicamento entra al cuerpo y el principio activo es liberado de la forma farmacéutica. Para que esto suceda hay tres pasos que son: desintegración, disgregación y disolución. Es muy importante la forma farmacéutica y los excipientes que contienen debido a que juegan un papel fundamental para crear el ambiente adecuado para que se absorba el fármaco.

El uso de tales sistemas para la administración tópica vaginal ofrece varias ventajas, incluida la facilidad de aplicación, alta capacidad de extensión en temperaturas por debajo de la temperatura sol-gel y estructuración reológica, por lo tanto, retención mejorada a temperatura corporal (Baloglu *et al.*, 2011).

Se realizó la liberación en membranas de diálisis con la solución del clotrimazol de concentración conocida durante 24 h En la Figura 42 se puede observar el perfil del liberación de la solución del CLOT alcanzando su máxima liberación a las 8 horas empezado el estudio.

Resultados y discusión

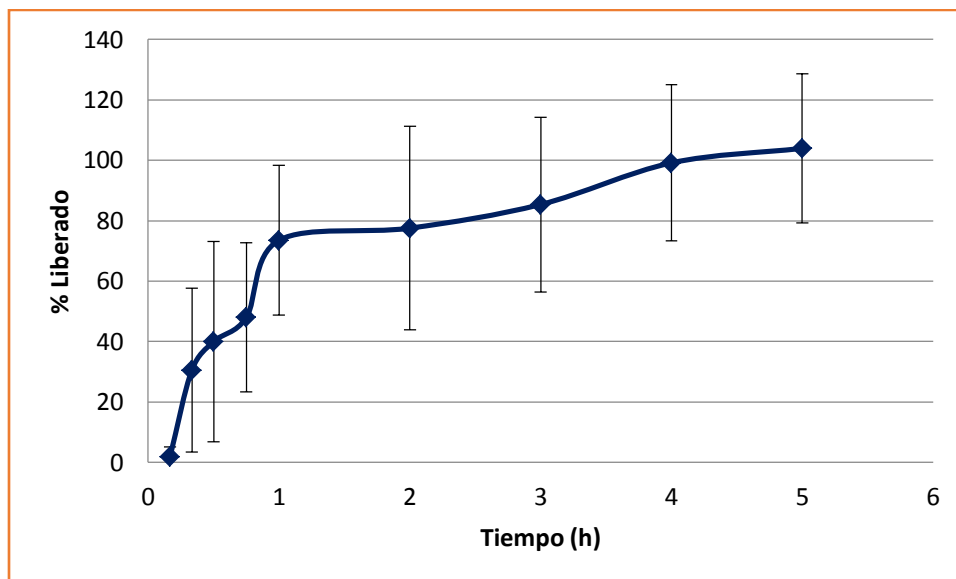


Figura 42. Gráfico del porcentaje de liberación en función del tiempo de la solución de CLOT

El mecanismo de liberación del fármaco de matrices poliméricas hidrófilas implica la penetración del disolvente, la hidratación y el hinchamiento del polímero, la difusión del fármaco disuelto en la matriz y la erosión de la capa de gel.

Se realizó el perfil de liberación *in vitro* en el gel propuesto al 1 % de CLOT por triplicado con membranas de diálisis en las cuales se colocó 1 ml del gel sumergiéndolas en FVS con Tween®20 al 3 % p/v manteniendo condiciones *sink*. Es importante mantener las condiciones *sink* para asegurar que el medio de disolución no se va a saturar y así asegurar que la liberación máxima es del principio activo

Se efectuaron los cálculos necesarios para obtener los porcentajes de fármaco liberado, estos cálculos y porcentajes se muestran en el Anexo 3

En la Figura 43 se muestra el porcentaje promedio de liberación del clotrimazol en función del tiempo (h) obtenido en los tres sistemas analizados. Se puede observar que a las 6 horas había liberado menos de 10 por ciento. En el 2013 Tuğcu-Demiroz y colaboradores realizaron un estudio evaluando los perfiles de liberación con diferente polímeros como Quitosano, HPMC y Poloxámeros a cada uno de ellos se le agregó OXY, El poloxámero 407 lo prepararon en una concentración al 20 % dando el 100% liberado a las 50 h de haber empezado el estudio.

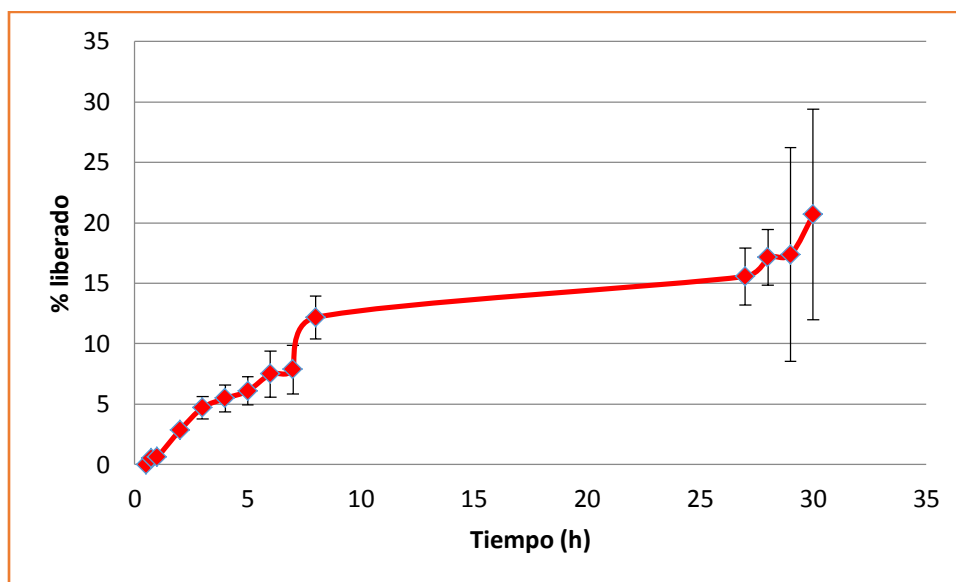


Figura 43. Gráfico del porcentaje liberado en función del tiempo del gel de CLOT al 1 % p/v

Como se utilizó la concentración al 24 % este es más viscoso a temperatura fisiológica lo que pudo suceder es que el CLOT se quedó atrapado en las redes del polímero y eso dificultó la liberación más rápida, sin embargo en el estudio de Tuğcu-Demiroz utilizaron una concentración al 20 % y esta es poco viscosa y por eso atravesó un poco más rápido.

La liberación del CLOT es baja esto se puede deber a que la viscosidad del gel es alta en temperaturas mayores a 30 °C por lo que el fármaco quedó atrapado en las redes del polímero haciendo difícil la liberación. Otro factor importante es que el CLOT es lipófilico

En el Figura 44 se muestra la comparación de la cinética de liberación que sigue la solución y el gel con CLOT como se puede observar la liberación es mucho mayor a los geles esto se debe a que el fármaco contiene Tween®20 y este ayuda a la solubilidad del fármaco y así puede liberarse fácilmente

Resultados y discusión

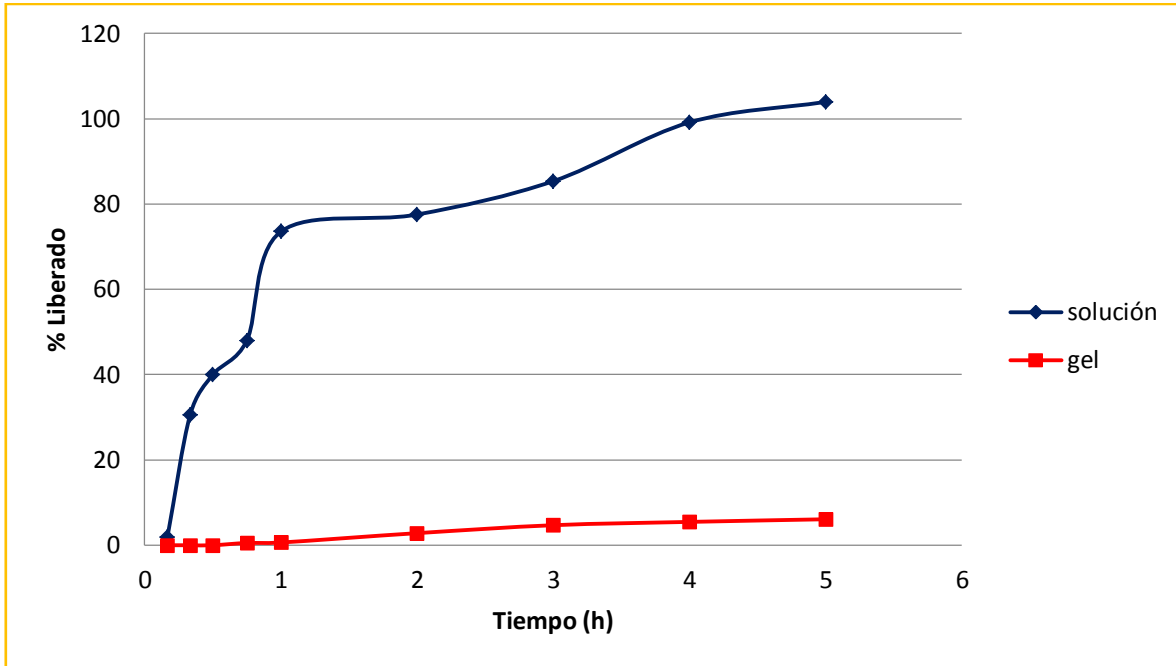


Figura 44. Gráfico comparativo del porcentaje liberado en función del tiempo entre la solución de CLOT y el gel con CLOT al 1 % p/v

Se analizaron los datos obtenidos de los perfiles de disolución usando tres modelos matemáticos para determinar el mecanismo y velocidad de liberación del fármaco. Se hicieron los siguientes gráficos: M_t vs t (Orden cero), M_t/M_∞ vs $t^{1/2}$ (Higuchi) y $\ln M_t/M_\infty$ vs $\ln t$ (Peppas) donde M_t es la cantidad de fármaco liberada en cierto tiempo y M_∞ es la cantidad máxima liberada. En la Tabla 4 se muestran los datos obtenidos en los tres modelos matemáticos.

Tabla 4. Valores obtenidos en los diferentes modelos matemáticos utilizados

	Higuchi		Peppas		Orden cero	
	K_H	r^2	n	r^2	K_0	r^2
n=1	345.78	0.9602	0.8438	0.9496	116.42	0.8747
n=2	459.45	0.9459	1.1919	0.909	152.04	0.8792
n=3	596.68	0.9761	1.0073	0.9756	210.99	0.9808
Prom.	471.78	0.9839	0.9987	0.9739	158.27	0.9400

El modelo matemático de orden cero es utilizado para describir la disolución del fármaco en diferentes formas de dosificación farmacéutica en este caso los valores del coeficiente de determinación (r^2) están por debajo de 0.96 por lo que la velocidad de liberación del fármaco no es independiente de la concentración de este en el sistema.

En la Figura 45 se muestra el gráfico del modelo de orden cero de la cantidad de CLOT liberado en función del tiempo los datos se reportan en el Anexo 3.

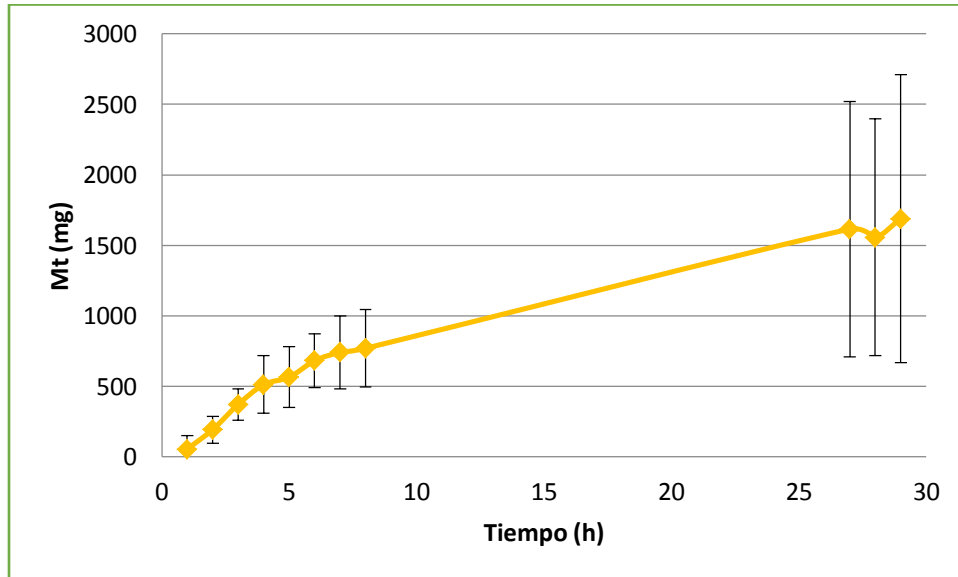


Figura 45. Gráfico de Orden cero de la cantidad de CLOT en función del tiempo

Otro modelo matemático que se analizó fue el propuesto por Higuchi que es aplicado para la liberación de fármacos a partir de sistemas matriciales

La ecuación de Higuchi es:

$$\frac{Mt}{M_{\infty}} = kt^{1/2}$$

Donde $\frac{Mt}{M_{\infty}}$ es la cantidad de fármaco liberado al tiempo y k es la constante de Higuchi esta indica la velocidad con la que difunde el fármaco en el medio.

En la Figura 46 se muestra el gráfico del modelo de Higuchi aplicado a los perfiles de liberación del CLOT los datos se muestran en el anexo 3.

Como se muestra en la Tabla 3 la constante de determinación de Higuchi es mayor a 0.97 por lo que el perfil de liberación de CLOT se ajusta a este modelo esto quiere decir que la difusión está relacionada con el transporte de fármacos

desde el matriz de gel en el entorno medio *in vitro*, y depende de la concentración del fármaco por lo tanto a medida que el gradiente varía, se libera el medicamento y la distancia para la difusión aumenta. Esto podría explicar por qué el fármaco se difunde a un ritmo comparativamente más lento.

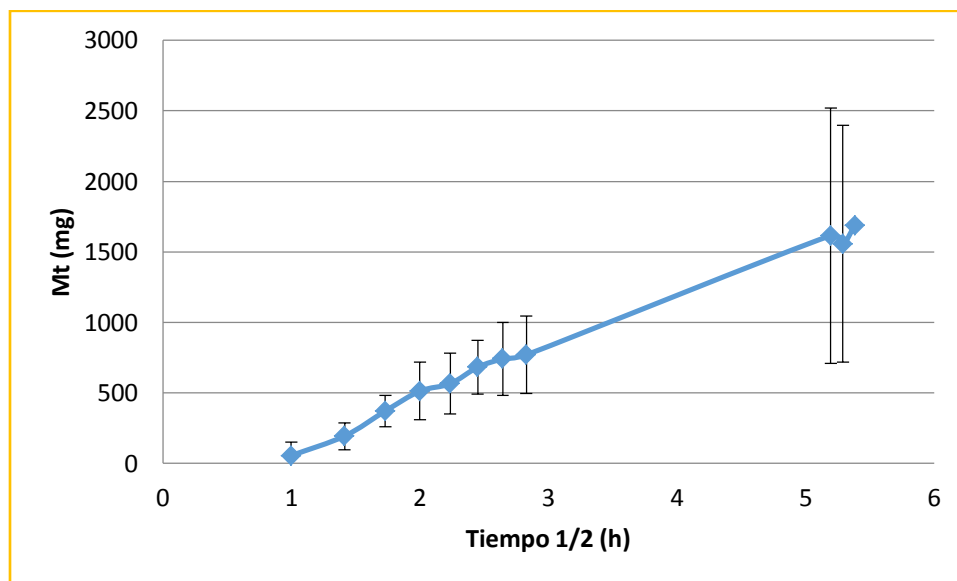


Figura 46. Gráfico de Higuchi de la cantidad de CLOT en función del tiempo $\frac{1}{2}$

Para determinar el mecanismo de liberación del CLOT en el Gel se usó el modelo de Peppas graficando el $\ln (Mt/M_{\infty})$ con respecto al $\ln t$ donde Mt es la cantidad de liberada del fármaco en el tiempo y M_{∞} es la cantidad máxima liberada.

La ecuación de Peppas es la siguiente:

$$\ln \frac{Mt}{M_{\infty}} = \ln k + n \ln t$$

Donde $\ln \frac{Mt}{M_{\infty}}$ es el logaritmo natural de la velocidad de liberación, k es la constante de Peppas y n es el exponente de liberación

Resultados y discusión

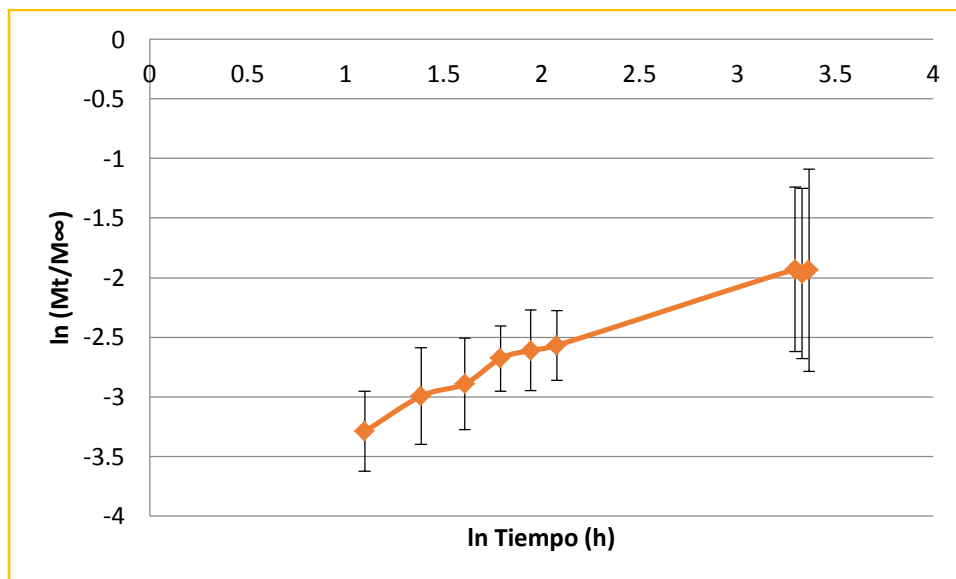


Figura 47. Gráfico del modelo matemático de Peppas del $\ln (Mt/M_{\infty})$ en función del $\ln t$ (h)

De acuerdo con la Tabla 5 los valores de “n” son muy cercanos a 1 por los cual se puede decir que el mecanismo de transporte del fármaco no sigue un comportamiento Fickiano y el mecanismo de liberación es anómalo dependiente del tiempo

Tabla 5. Valores de “n” Krosmeier- Peppas (Reyes, Rivera, 2015)

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

Tuğcu-Demiroz y colaboradores realizaron el estudio en geles de poloxámero y quitosan siendo estos últimos los que liberaban el fármaco en menor tiempo. Los dos se ajustaron al modelo de Higuchi

Liu y colaboradores 2007 realizaron experimentos de liberaciones con poloxámero. Para el experimento de lanzamiento, el modelo sin membrana era seleccionado porque tal método de liberación podría permitir el contacto directo entre el gel y el medio de liberación y tomar la erosión de gel en consideración. Tal modelo se cree que es muy adecuado para geles basados en poloxámero 407 en los que generalmente se usa la erosión de gel esto juega un papel clave en el proceso de liberación de fármacos, siendo ampliamente utilizado en la investigación de geles de poloxámero 407 (Liu *et al.*, 2007)

Cinética de permeación *in vitro*

Cuando se considera una aplicación local, se debe comprobar que Ningún fármaco pasa a través de la mucosa vaginal, limitando así la toxicidad. Esta reportado que el CLOT ejerce toxicidad hepática y puede inducir resistencia especialmente en pacientes con alguna enfermedad crónica (Ravani, *et al.*, 2013)

Las permeaciones *in vitro* se realizaron en celdas tipo Franz donde se colocó una porción de tejido de vagina de cerdo en el medio donador había 3 ml de gel con CLOT al 1 % y en el compartimento receptor FVS con Tween[®] 20 al 3 % p/v así como con la solución de CLOT.

Como el CLOT es altamente lipófilo por lo tanto en la solución no atravesó la capa mucosa que recubre el tejido vaginal, sin embargo en el gel es muy alto debido a que este contiene gran cantidad de agua lo que hace que los glóbulos puedan atravesar la mucosa vaginal

La cualidad con la que se formuló el gel es que sea un bioadhesivo local por lo que su sitio de acción debe de ser en la vagina y este permeo demasiada cantidad a nivel sistémico.

Con los valores obtenidos (ver Anexo 5) se construyó una gráfica del CLOT permeado por unidad expuesta de área en función del tiempo se muestra en la Figura 48, para poder obtener una recta solo se tomaron en cuenta las primeras ocho horas para así obtener un flujo del CLOT en el estudio de permeación.

Resultados y discusión

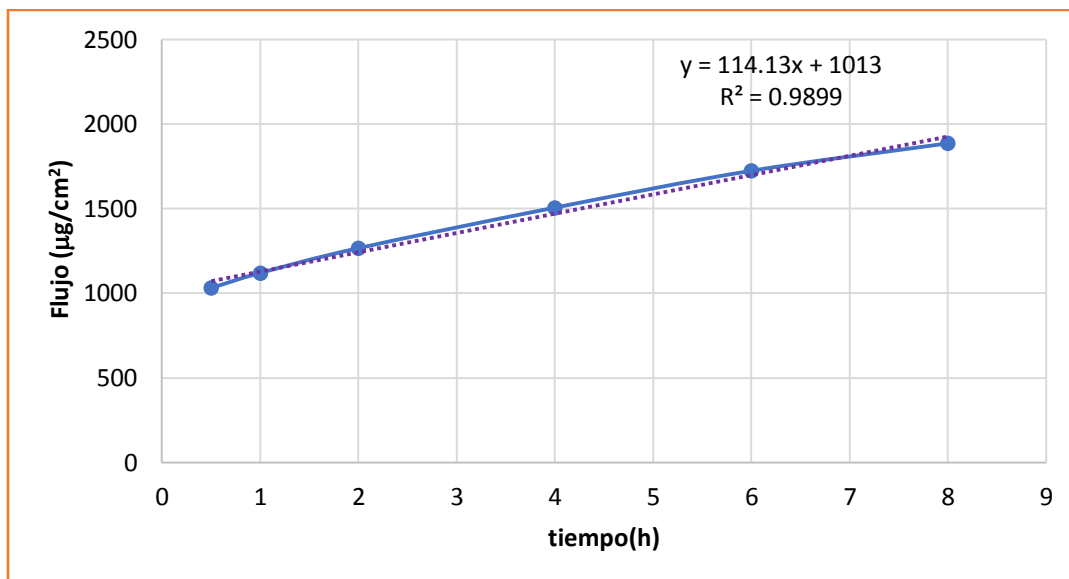


Figura 48. Gráfico del flujo μg de CLOT por unidad de área en función del tiempo

A partir del gráfico de la Figura 48 se obtuvo un flujo de $114.13 \mu\text{g cm}^{-2} \text{h}^{-1}$ con un coeficiente de correlación de 0.9899.

En la Figura 49 se muestra el porcentaje permeado del gel a las 8 horas en las cuatro repeticiones se puede observar que hay diferencias significativas esto se debió a que algunas muestras se voltearon durante la agitación provocando que se derramara la solución receptora y por ende no se mantuvieron las condiciones *sink*

En la Figura 50 se muestra el porcentaje permeado del gel y la solución del CLOT observando que el gel permeo más de 50 % en comparación con la solución esto se puede deber a que el gel en su mayoría es agua y en la solución el CLOT está disuelto el FVS y Tween[®] 20 al 3 %

Resultados y discusión

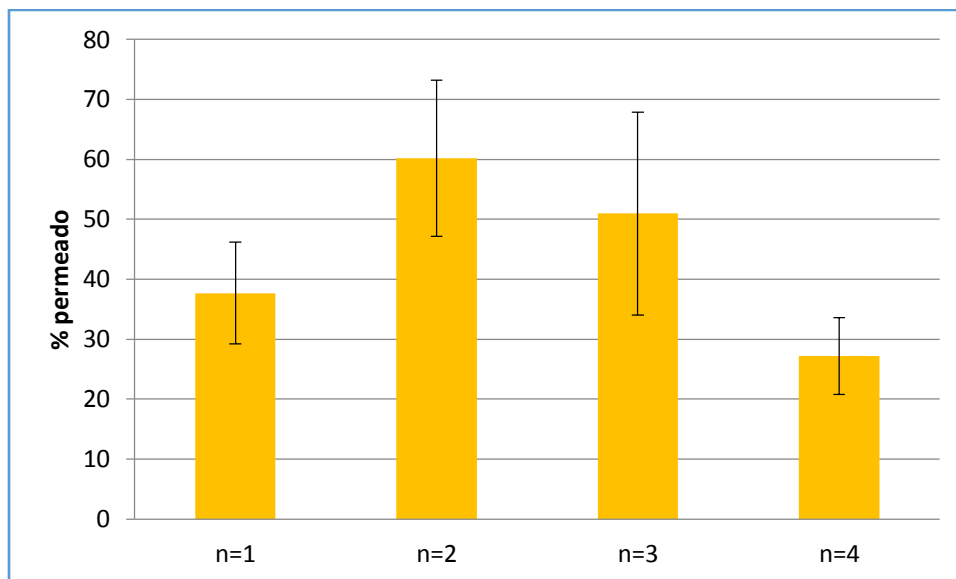


Figura 49. Porcentaje permeado a las 8 h del gel con CLOT (n=1, 2, 3 y 4)

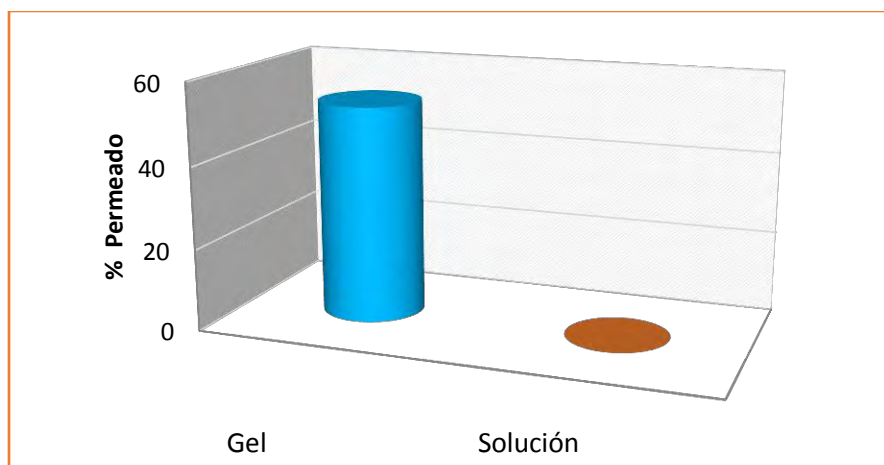


Figura 50. Comparación del porcentaje permeado entre el gel y la solución del CLOT

Factores fisiológicos como cambios cíclicos, espesor y porosidad del epitelio, viscosidad y Ph del fluido vaginal, también, propiedades fisicoquímicas del fármaco como el peso molecular, la lipofilia y la ionización afecta la absorción del fármaco a través del epitelio vaginal (Valenta, 2005).

Para geles vaginales destinados a lograr la absorción sistémica, se deben realizar pruebas de permeabilidad. La mucosa vaginal humana y animal han sido usados como modelos de permeabilidad para estudios *in vitro*.

Extracción del CLOT remanente en el tejido vaginal de cerda

Una vez realizada la prueba de permeación se hizo la extracción del CLOT remanente en la vagina para esto se utilizó el tejido de las celdas de Franz, después de 24 horas, se lavó perfectamente con agua desionizada se cortó en pequeños trozos y se puso en contacto con metanol dejando en agitación por 24 horas, posteriormente se leyó a su longitud de máxima absorción de 261 nm y se procedió a hacer los cálculos necesarios para obtener el porcentaje de recobro y así determinar la cantidad que se quedó atrapada en el tejido vaginal porcino

En la Tabla 6 se muestra el porcentaje de recobro este es demasiado alto por lo que se utilizó la curva de calibración del método 4 para ajustar los valores de acuerdo con la ecuación 2.

Tabla 6. Extracción del CLOT remanente en el tejido vaginal

	Abs.	Conc (mg/ml)	mg de CLOT	% de recobro
n=1	0.253	126.4	18960	140.170
n=2	0.335	167.4	25110	185.630
n=3	0.41	204.9	30735	244.551
			Promedio	190.117

En la Tabla 7 se muestra los valores del porcentaje de recobro corregido y se puede ver que el 49% del fármaco se quedó en el tejido vaginal porcino

Tabla 7. Porcentaje de recobro corregido en la extracción del CLOT remanente en la vagina

	Abs.	Conc (µg/ml)	µg de CLOT	% de recobro corregido
n=1	0.576	302.947	45442.105	45.965
n=2	0.821	431.894	64784.210	65.530
n=3	0.472	248.210	37231.578	37.660
			Promedio	49.718

Pruebas de bioadhesión

La mucoadhesión se define esencialmente como la fuerza interfacial entre el sistema de administración de fármacos poliméricos y el moco capa que recubre un epitelio (Peppas, 1985).

Por lo tanto, se piensa que es el resultado de la presencia de grupos de enlaces de hidrógeno, fuertes cargas aniónicas / catiónicas, alta masa molecular, flexibilidad de la cadena e interacciones superficiales de energía que favorecen la difusión en la parte del tejido vaginal (Tuğcu-Demiroz, Acartürk, Erdoğan, 2013). Teorías básicas como electrónica, adsorción, humectación y fenómenos de difusión han sido descritos y asociados con los mecanismos por los cuales ocurre la mucoadhesión (Hagerstrom y Edsman, 2003)

La mucoadhesión es donde dos superficies, una de las cuales es una membrana mucosa, se adhieren entre sí. Esto ha sido de interés en las ciencias farmacéuticas para mejorar la administración localizada de medicamentos, o para moléculas difíciles (proteínas y oligonucleótidos) en la circulación sistémica (Smart, 2005).

La vagina no es una excepción, siendo formulaciones mucoadhesivas de particular interés debido a las particularidades anatómicas y fisiológicas. De hecho, la utilización de varios polímeros mucoadhesivos es común en formulaciones de fármacos vaginales, con varias ventajas características tales como retención prolongada, absorción mejorada del fármaco y liberación controlada o protección de sustancias activas lábiles (Das Neves, 2008).

Las pruebas de mucoadhesión se realizaron con la finalidad de saber que tan bioadhesivo es el gel propuesto en contacto con tejido vaginal porcino.

Debemos recordar que la mucoadhesión está definida como la capacidad que tiene un polímero natural o sintético para adherirse a un tejido biológico.

El Moco o mucus ha sido reconocido como una barrera para la difusión de fármacos ya por mucho tiempo. Esto es particularmente cierto para fármacos lipófilos (es decir, pobremente soluble en agua) fármacos que interactúan con las glicoproteínas y lípidos en el moco, lo que finalmente conduce a una absorción reducida y biodisponibilidad

La ruta vaginal demuestra un desafío significativo para preparaciones semisólidas ya que una jeringa o aplicador son necesarios para tener éxito en la administración del fármaco. Además, la descarga rápida de el moco cervical de los sistemas vaginales es una desventaja para muchas formas de dosificación (Tuğcu-Demiroz,

Acartürk y Erdogan, 2013). Por esta razón es importante realizar el análisis de textura para determinar algunas propiedades mecánicas de los geles tales como fuerza de adhesión, trabajo y adhesividad para así saber que tan bueno es para administración vaginal.

Para analizar la capacidad bioadhesiva se utilizó el texturometro CT3 Brookfield® utilizando tejido vaginal porcino previamente hidratado en FVS con un grosor entre 5 a 7 mm y el gel de Pluronic® F-127 al 24 % p/v.

Esta prueba no puede ser comprobada para geles que tienen baja viscosidad y, por lo tanto, el análisis de textura no proporciona resultados precisos para este tipo de gel. Se informó que aumentando la concentración de polímero aumentó significativamente la dureza, la adhesividad, valores de elasticidad y compresibilidad. Por esta razón solo se utilizó el gel que tenía una mayor concentración del polímero

En la Tabla 8 se muestran los resultados obtenidos en el análisis de textura, la carga de activación fue de 0.50 N y el grosor del tejido vaginal porcino fue de aproximadamente 6 mm

Tabla 8. Análisis de textura con Texturometro Brookfield®

Mediciones	n=1	n=2	n=3	n=4	n=5	Promedio.
Trabajo total (Mj)	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3
Fuerza adhesiva (N)	0.10	0.14	0.08	0.10	0.10	0.104
Adhesividad(Mj)	0.2	0.5	0.4	0.3	0.3	0.34

La dureza introduce la fuerza necesaria para proporcionar la deformación de los geles. Este parámetro expresa la aplicabilidad del gel en el sitio deseado. Los geles deberían tener un valor de dureza bajo para ser administrados al mucosa fácilmente; existe una relación obvia entre la viscosidad y la dureza de las formulaciones. (Tuğcu-Demiroz, Acartürk, y Erdoğan, 2013)

Tuğcu-Demiroz y colaboradores realizaron un análisis de textura con tres geles diferentes como; quitosano, HPMC y Pluronic® F-127 obteniendo valores muy semejantes entre el quitosano y el Pluronic® F-127 dado que no hay muchos

estudios de 68ucoadhesión de Poloxámeros por si solos, pero de quitosano si, podemos decir que el Pluronic[®] F-127 tiene buenas propiedades bioahesivas.

Tiempo de residencia

En esta prueba se utilizó el desintegrador de tabletas acoplado a una base que sostenía la vagina en contacto con el gel y sumergiendo en FVS y Tween[®] 20 al 3 % p/v la prueba se realizó por quintuplicado tomando en cuenta el tiempo en lo que se retiraba el gel de la vagina en la tabla se muestran el tiempo obtenido en esta prueba.

El tiempo de residencia es una prueba importante debido a que se desea que la forma farmacéutica permanezca adherida al tejido vaginal evitando escurrimientos y pérdidas del fármaco, además que no sea incomodo al momento de administrarse.

Tuğcu-Demiroz y colaboradores realizaron el estudio de tiempo de residencia con 3 tipos de polímeros; quitosano, HPMC y Poloxamero 407 los geles preparados con Poloxamero 407 mejoraron la fuerza bioadhesiva, ya que el Pluronic[®] F-127 con un grupo de óxido hidrófilo podría unirse a cadenas de oligosacáridos en mucosa vaginal.

En la Tabla 9 se muestra los resultados de la prueba de residencia en tejido vaginal dando un tiempo de 903 segundos

Tabla 9. Datos de la prueba de residencia en tejido vaginal porcino

	Tiempo (s)
<i>n</i> =1	995
<i>n</i> =2	832
<i>n</i> =3	889
<i>n</i> =4	914
<i>n</i> =5	886
Prom.	903.2
D.E	59.4

Como se puede observar en la Tabla 9 el tiempo de residencia fue bastante prolongado esto se puede deber a que la viscosidad del gel aumenta a temperaturas cercanas a la temperatura fisiológica a aproximadamente a los 37°C esto es bastante bueno porque quiere decir que se evitará el escurrimiento por la posición donde se encuentra la vagina.

VI. CONCLUSIONES.

Se desarrollaron métodos analíticos espectrofotométrico para la cuantificación de clotrimazol en fluido vaginal simulado pH=4.2 y en solución amortiguadora de fosfatos pH=7.4.

Se formuló y se evaluó un gel con buenas propiedades bioadhesivas mediante caracterización para la administración vaginal de un fármaco antifúngico.

Se realizaron pruebas reológicas demostrando que en geles termorreversibles influye la temperatura en su viscosidad y eso nos ayuda a la administración del fármaco en la vagina y a que tenga una mejor retención.

En la liberación *in vitro* se demostró que influye la matriz para la liberación del fármaco y su mecanismo de liberación es dependiente del tiempo y tiene un comportamiento no Fickiano independiente del tiempo

Las pruebas de permeación hubo demasiada cantidad del fármaco

Con las pruebas de mucoadhesión se demostró que el Pluronic® F-127 es bioadhesivo, en cuanto al tiempo de retención es bastante bueno para poder administrarse y que dure bastante tiempo adherido al tejido vaginal, en la prueba de la distancia recorrida no se mostraron resultados debido a que el gel no se movió para nada después de 20 min

VII. PERSPECTIVAS.

Con base a los resultados en esta investigación se hacen las siguientes recomendaciones:

- Realizar todas las pruebas reológicas al gel propuesto para saber su comportamiento tixotrópico.
- Realizar prueba de estabilidad al gel propuesto.
- Modificar la incorporación del principio activo con otros solubilizantes diferentes al metanol o cambiando las proporciones.
- En cuanto a la liberación *in vitro* tratar de forma diferente los datos es decir hay diferentes mecanismos de liberación.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.

1. Ahuja, A., Khar, R. K., y Ali, J. (1997). Mucoadhesive drug delivery systems. *Drugs Development and Industrial Pharmacy*, 5(23), 489-515
2. Arbelaez-Camargo, D., Suñé-Negre, J. M., Roig-Carreras, M., Garcia-Montoya, E., Perez-Lozano, P., Miñarro-Carmona, M., y Ticó-Grau, J. (2016). "Preformulation and characterization of a lidocaine hydrochloride and dexamethasone sodium phosphate thermo-reversible and bioadhesive long-acting gel for intraperitoneal administration". *International Journal of Pharmaceutics*; 498, 142-152
3. Bachhav, Y. V. y Patravale, V. B. (2009). "Microemulsion based vaginal gel of fluconazole: Formulation, in vitro and in vivo evaluation". *International Journal of Pharmaceutics*; 365; 175-179.
4. Baloğlu, E., Özyazıcı, M., Hızarcıoğlu, S.Y., y Karavana H.A. (2003). An in vitro investigation for vaginal bioadhesive formulations: bioadhesive properties and swelling states of polymer mixtures. *IL Farmaco*; 58, 391-396
5. Bassi, P., y Kaurt, G. (2015). Bioadhesive vaginal drug delivery of nystatin using a derivatized polymer: development and characterization. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*; 96, 173-184
6. Boonlai, W., Tantishaiyakul, V., Hirun, N., Phaisan, S., y Uma, T. (2017). The effect of the preservative methylparaben on the thermoresponsive gelation behavior of aqueous solutions of poloxamer 407. *Journal of Molecular Liquids*; 240, 622-629
7. Borhade, V., Pathak, S., Sharma, S., y Patravale, V. (2012). Clotrimazole nanoemulsion for malaria chemotherapy. Part I: Preformulation studies, formulation design and physicochemical evaluation. *International Journal of Pharmaceutics*; 431, 138-148
8. Braga, P. C., Dal Sasso M., Spallino A., Sturla C., y Culici M. (2009). Vaginal gel adsorption and retention by human vaginal cells: visual analysis by means of inorganic and organic markers. *International Journal of Pharmaceutics*; 373, 10-15.
9. Caramella, M. C., Rossi, S., Ferrari, F., Bonferoni, M. C., y Sandri, G. (2015). Mucoadhesive and thermogelling systems for vaginal drug delivery. *Advance Drug Delivery Reviews*; 92, 39-52

Referencias

10. Chang, Y. Y., Oh, Y. K., Choi, H. G., Kim, Y. B., y Kim, C. K. (2002). "Rheological evaluation of thermosensitive and mucoadhesive vaginal gels in physiological conditions". *International Journal of Pharmaceutics*; 241, 155-16.
11. Ci L., Huang, Z., Liub Y., Liu, Z., Wei, G., y Lu, W. (2017). "Amino-functionalized poloxámer 407 with both mucoadhesive and thermosensitive properties: preparation, characterization and application in a vaginal drug delivery system" *Acta Pharmaceutica Sinica B*; 7(5), 593-602
12. Cires-Pujol, M., Freijoso-Santiesteban, E., Silva-Herrera, L., Vergara-Fabián, E., Cutié-Leon, E., Ortega-Blanco, M., Sansó-Soberat, F., Francisco-Martínez, W., y Lantero-Abreu, M. A., (Enero-Abril 2003) "Guía para la práctica clínica de las infecciones vaginales" *Revista Cubana de Farmacia*; vol 31 n.1 recuperado de http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-75152003000100006
13. Costa, P., y Sousa Lobo. J. M. (2001). "Modeling comparison of dissolution profiles" *European Journal of Pharmaceutical Sciences*; 13, 123-133.
14. Das Neves, J., Amaral, M. H, y Bahia, M. F. (2008). "Performance of an in vitro mucoadhesión testing method for vaginal semisolid: Influence of different testing conditions and instrumental parameters". *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*; 90, 622-632.
15. Das Neves, J., y Bahia, M. F. (2006). "Gels as vaginal drug delivery systems" *International Journal of Pharmaceutics*; 318, 1-14.
16. Debandi V., François J., y Deraio E. (2011). "Evaluation of different membranes for in vitro release of anticellulitic actives" *ACI*; 2(2); 97-105.
17. Debrassi, A., Burger, C., Rodrigues, C.A., Nedelko, N., Slawskar-Waniewska, A., Dluzewski, D., Sobczak, K., Greneche, J. M. (2011). "Synthesis characterization and in vitro drug release of magnetic N-benzyl-O-carboxymethylchitosan nanoparticles based with indomethacin" *Acta Biomaterialia*, 7(8), 3078-3085
18. Dewan, M., Sarkar, G., Bhowmik, M., Das, B., Chattoapadhyay, K., Rana, D., Chattopadhyaya, D. (2017). "Effect of gellan gum on the thermogelation property and drug release profile of Poloxamer 407 based ophthalmic

Referencias

- formulation". *International Journal of Biological Macromolecules*, 102, 258-265.
19. Dumortier, G., Grossiord, J. L., Agnely, F., y Chaumeil J. C. (2006). "A Review of Poloxamer 407 Pharmaceutical and Pharmacological Characteristics". *Pharmaceutical Research*, 23(12), 2709-2728.
20. Escobar, J. L., García, D. M., Zaldivar, D., e Issa Katime. (2002). "Hidrogeles. principales características en el diseño de sistemas de liberación controlada de fármacos". *Revista Iberoamericana Polimeros*; 3(3); 1-25.
21. Fakhari, A., Corcoran, M., y Schwarz, A. (2017). "Thermogelling properties of purified poloxamer 407" *Heliyon*, 3, 1-27.
22. Gafițanu, C. A., Filip, D., Cernătescu, C., Ibănescu, C., Danu, M., Pâslaru, E., Rusu, D., Tuchilus, C., y Mocacinschi, D. (2016). "Formulation and Evaluation of anise-based bioadhesive vaginals gels". *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 83, 485-495.
23. Hägerström, A., Bergström, C., y Edsman, K. (2003). "The importance of gel properties for mucoadhesion measurements: a multivariate data analysis approach". *Journal of Pharmacy and Pharmacology*; 56, 1589-1599.
24. Hall, D. J., Khurtoryanskaya, O. V., y Khutoryanskiy, V. V. (2011). "Developing synthetic mucosa-mimetic hydrogels to replace animal experimentation in characterization of mucoadhesive drug delivery systems". *Soft matter* 7; 9620-9623.
25. http://www.fertilab.net/ginecopedia/ginecologia/problemas_de_la_mujer/vagina/vagina_1 (Accesado Enero 25, 2017)
26. <https://www.flujovaginal.com/uso-metronidazol-tratamiento-infeccion-vaginal/> (Accesado Diciembre 8, 2017)
27. https://www.heraldo.es/tratamientopara_infecciones_favinales.html (Accesado mayo 25, 2018)
28. Leyva-Gómez, G., Santillan-Reyes, E., Lima, E., Madrid-Martínez, A., Kröttsch, E., Quintanar-Guerrero, D. Garciadiego-Cazares, C., Martínez-Jimenez, A., Hernández-Morales, M, Ortega-Peña, S., Contreras-Figueroa, Cortina-Ramirez, G., y Abarca-Buis. R. F., (2017). "A novel hydrogel of

Referencias

- poloxamer 407 and chitosan obtained by gamma irradiation exhibit physicochemical properties for wound management". *Materials Science and Engineering C*, 74, 36-46.
29. Liu, Y, Zhu, Y. Y., Wei, G., y Lu, W. Y. (2009) "Effect of carrageenan on poloxamer-based in situ gel for vaginal use: improved in vitro and in vivo sustained-release properties". *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 37, 306-312.
30. Liu, Y., Lu, W. L., Wang, J. C., Zhang, X., Zhang, H., Wang, X.Q., Zhou, T. Y, y Zhang, Q. (2007) "Controlled delivery of recombinant hirudin based on thermo-sensitive Pluronic® F127 hydrogel for subcutaneous administration: In vitro and in vivo characterization" *Journal of Controlled Release*, 117(3), 387-395.
31. Lu, C., Liu, M., Fu, H., Zhang, W., Peng, G., Zhang, Y., Cao, H., y Luo, L. (2015). Novel thermosensitive in situ gel based on poloxamer for uterus delivery. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*; 77, 24-28
32. McCarron, P. A., Donnelly, R. F, Zawislak, A., y Woolfson, D. (2006). "Desing and evaluation of a water-soluble bioadhesive patch formulation for cutaneous delivery of 5-aminolevulinic acid to superficial neoplastic lesions". *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 27, 268-279
33. Moore Keith L. (2003). Fundamentos de anatomia: con orientación clínica, 2a edición editorial Panamericana Buenos Aires Argentina pp 237-241
34. Nakamura, F., Ohta, R., Machida, Y., y Nagai Y. (1996). "In vitro and in vivo nasal mucoadhesion of some water-soluble polymers" *International Journal Pharmaceutics*, 134, 173-181.
35. National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Database; CID=2812, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/2812> (Accesado Abril 21, 2017).
36. Pasquali, R., Chiappetta, D. A., y Bregni, C. (2005). "Los copolímeros en bloques anfifílicos y sus aplicaciones farmacéuticas" *Acta Farm. Bonaerense*, 24 (4), 610-618.
37. Pavelic, Z., Skalka-Bosnet, N., y Jalsenjak, I. (2005). "Characterization and in vitro evaluation of bioadhesive liposome gels for local therapy of vaginitis". *International Journal of Pharmaceutics*, 301(1-2), 140-148.

Referencias

38. Quintanar, D., Villalabos, R., Alvarez, E., y Cornejo, J.M. (2001). In vitro evaluation of the bioadhesive properties of hydrophobic polybasic gels containing N, N-dimethylaminoethyl methacrylate-co-methyl methacrylate. *Biomaterials*. 22, 957-961.
39. Ravani, L., Esposito, E., Bories, C., Lievin-le Moal, V., Loiseau P., Djabourov, M., Cortesi, R., y Bouchemal, K. (2013). "Clotrimazol-loaded nanostructured lipid carrier hydrogels: Thermal analysis and in vitro studies". *International Journal of Pharmaceutics*; 454; 695-702.
40. Reproduccion asistida: flujo vaginal, <https://www.reproduccionasistida.org/flujo-vaginal/aspecto-del-moco-cervical/> (Accesado Febrero 5, 2017).
41. Reyes, G. O., Rivera, G. M. (2015) "Preparación y caracterización de nanopartículas poliméricas de clotrimazol por el método de desplazamiento del solvente para aplicación vaginal" Tesis de licenciatura, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlan, Universidad Nacional Autónoma de México, México
42. Rodríguez, I. C., Cerezo, A., Salem I. (2000) "Sistemas de liberación bioadhesivos", Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica, Facultad de Farmacia Universidad de Granada. España. *Ars Pharmaceutics*, 41, 115-128.
43. Ruiz Alfredo, Latarjet Michel. (2004) "Anatomía Humana" 4ª edición Editorial Panamericana Buenos Aires Argentina p.p 1637-1648.
44. Sáez, V., Hernández, E., Sanz, L. (Marzo del 2004) "Mecanismos de liberación de fármacos desde materiales poliméricos" *Revista Iberoamericana de polímeros*; 5(1), recuperado de <http://www.ehu.eus/reviberpol/pdf/MAR04/Virginia2004.pdf>
45. Santos, R. B., Guerrero, A. (1994) "Administración de medicamentos teoría y práctica" Ediciones Dias de Santos S.A, Madrid España, 123-130
46. Seo, H. J., y Kim, J. C. (2012). "Effects of additives on phase transition of Poloxamer 407/Poloxamer 188 mixture and release property of monoolein cubic phase containing the poloxamers." *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*; 18; 88-91.

Referencias

47. Smart D John. (2005) the basics and underlying mechanisms of mucoadhesion, *Advanced drug delivery reviews*; 57; 1556-1568.
48. Tuğcu-Demiroz, F. Acartürk, T., y Erdoğan, D. (2013) “Development of long-acting bioadhesive vaginal gels of oxybutynin: formulation, in vivo and in vitro evaluation”. *International Journal of Pharmaceutics*; 457; 25-39.
49. Valence, M. K., Ndesendo, V. P., Yahya, E., Riaz, K., y Leith M. (2009) “In vitro and in vivo bioadhesivity analysis of polymeric intravaginal caplets using physicomechanics and computational structural modeling”. *International Journal of Pharmaceutics*; 370; 153-155.
50. Valenta, C. (2005). “The use of mucoadhesive polymers in vaginal delivery” *Advance Drug Delivery Reviews*; 57; 1692-1712.
51. Wei G. y Gao P. (2010)” Handbook of Non-Invasive Drug Delivery Systems: Microemulsions for Topical and Transdermal Drug Delivery. Elsevier Inc”. *Chapter 3*: 59-91.
52. Woertz C., Preis M., Breitzkreutz J. y Kleinebudde P. (2013) “Assessment of test methods evaluating mucoadhesive polymers and dosage forms: An overview” *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 85, 843-853.
53. Woolfson A. D., Malcolm R. K., y Gallagher R. (2000) “Drug delivery by the intravaginal route”. *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*. ; 17, 509–555.

IX. ANEXOS.

ANEXO 1.

❖ **BARRIDOS ESPECTROFOTOMETRICOS**

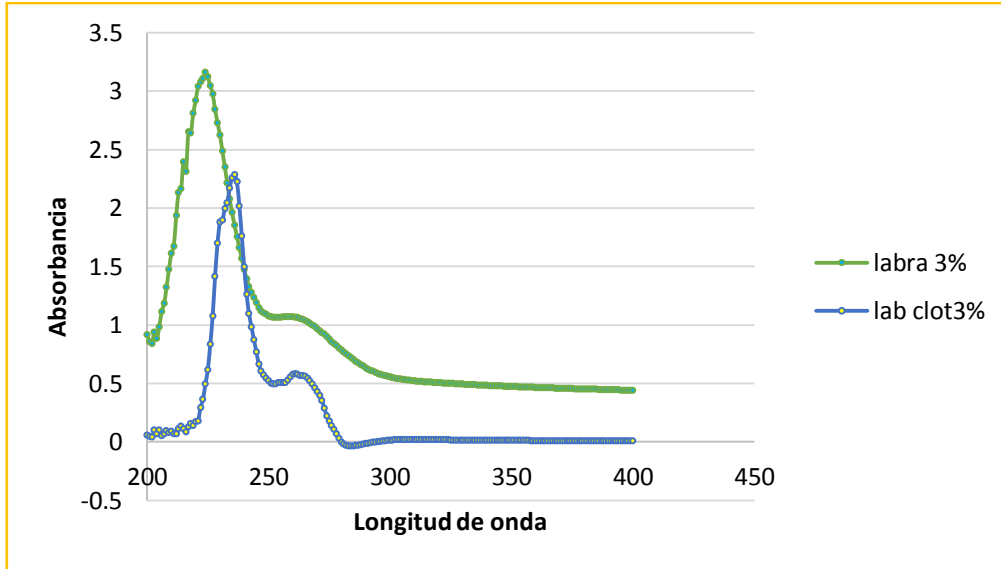


Figura A1. 1. Gráfico comparativo del Labrasol® al 3 % p/v y Labrasol® al 3 % p/v con CLOT

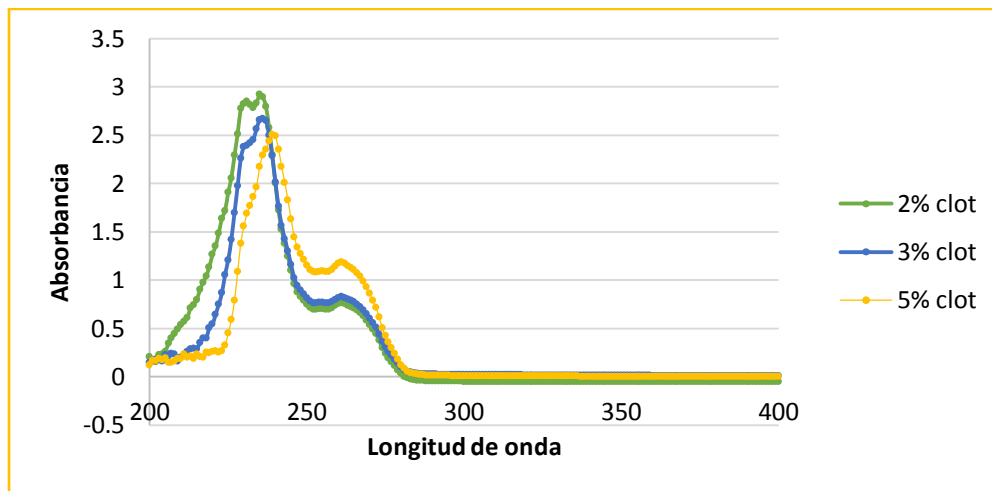


Figura A1. 2. Barrido espectrofotométrico con diferentes concentraciones de Tween® 20 y CLOT

Anexos

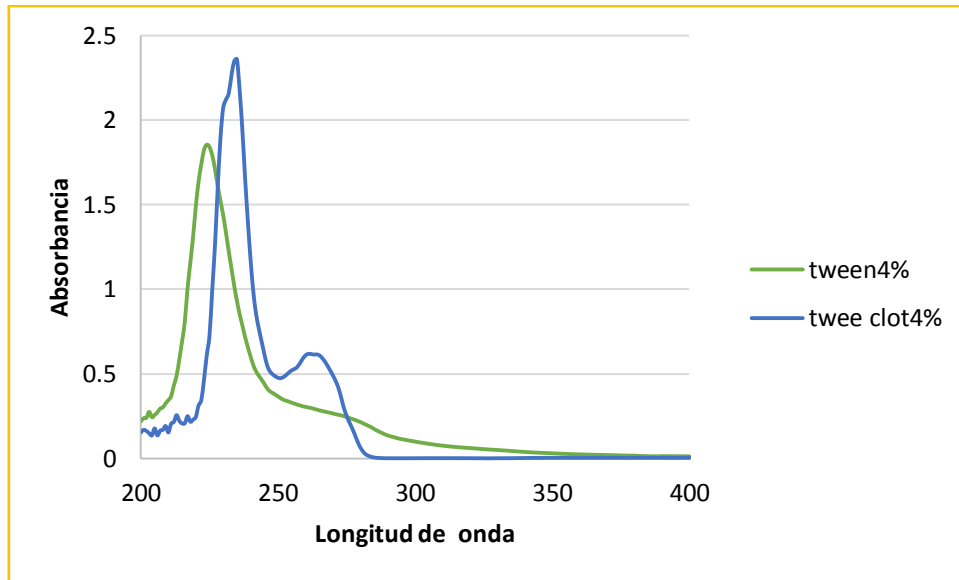


Figura A1. 3. Barrido comparativo de Tween® 20 al 4% p/v y Tween® al 4% y CLOT

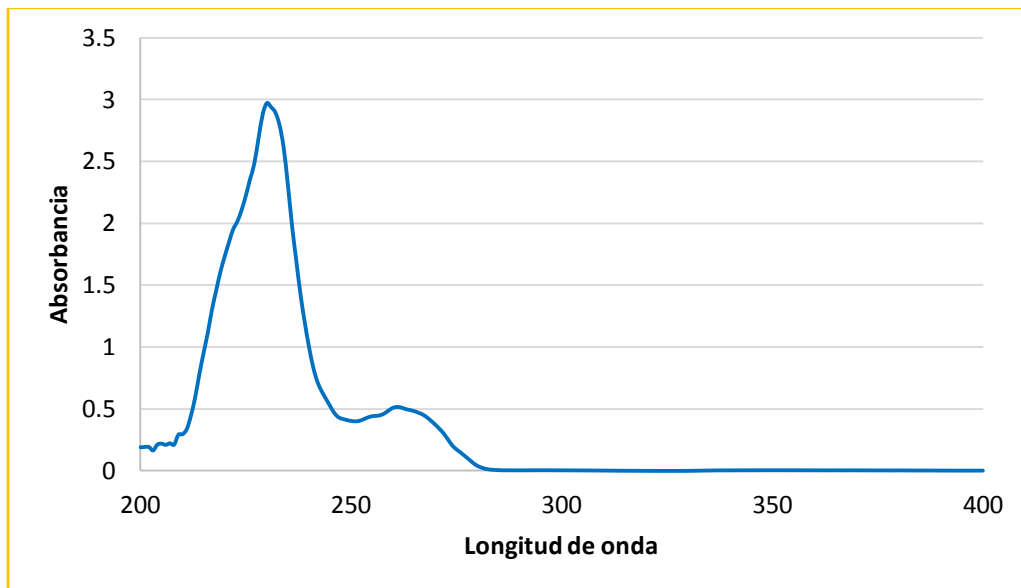


Figura A1. 4. Barrido del CLOT disuelto en metanol con tejido vaginal.

ANEXO 2.

❖ DESARROLLO DE MÉTODOS ANALÍTICOS.

Método 1. Solución de CLOT disuelto en FVS y Tween® 20 al 3 % en pH 4.2

Tabla A2. 1. Curva de calibración con FVS y Tween®20 al 3 % p/v pH 4.2

Conc. µg/ml	Abs	Abs/Conc
77.8	0.21	0.0027
77.8	0.213	0.0027
77.8	0.215	0.0028
155.6	0.418	0.0027
155.6	0.419	0.0027
155.6	0.426	0.0027
233.4	0.628	0.0027
233.4	0.65	0.0028
233.4	0.628	0.0027
311.2	0.839	0.0027
311.2	0.834	0.0027
311.2	0.84	0.0027
389	1.038	0.0027
389	1.046	0.0027
389	1.04	0.0027
	Prom.	0.0027
	D.E.	3.40E-05
	CV	1.257

Tabla A2. 2. Precisión del método 1

Conc(µg/ml)	Abs	Abs/Conc
240	0.511	0.2611
240	0.506	0.2560
240	0.502	0.2520
240	0.507	0.2570
240	0.501	0.2510
240	0.501	0.2510
	Prom.	0.2547
	D.E.	0.0041
	CV	1.601

Análisis de varianza para evaluar la linealidad del sistema

Prueba de hipótesis

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

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

Criterio de aceptación

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

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

Análisis de Varianza

Tabla A2. 3. Tabla A2.3. Análisis de varianza para evaluar la linealidad del sistema en el método 1

Modelo	Suma de Cuadrados	GI	Cuadrado Medio	F Calculada	F Crítica
Regresión	1.2904	1	1.2904	29185.38	0.0000
Residuo	0.0006	13	0.00004		
Total	1.2910	14			

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

Prueba de intercepto

Prueba de hipótesis

H_0 : La ordenada al origen es igual a cero.

H_i : La ordenada al origen es diferente de cero.

Criterio de aceptación

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

Coeficientes

Tabla A2. 4. Análisis de varianza para determinar si el intercepto es diferente a cero para el método 1

Modelo		Coeficientes no estandarizados		Coeficientes estandarizados	t calculada	t crítica
		B	Error estándar	Beta		
1	Intercepto	0.0074	0.0040		1.8378	0.0890
	Pendiente	0.0027	0.00001	1.000	170.83	0.000

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

Método 2. Solución de CLOT disuelto en FVS y Tween® 20 al 3 % en contacto con tejido vaginal a pH 4.2.

Tabla A2. 5. Curva de calibración con tejido vaginal a pH 4.2

Conc µg/ml	Abs	Abs/Conc
64.4	0.127	0.0020
64.4	0.125	0.0019
64.4	0.127	0.0020
128.8	0.253	0.0020
128.8	0.253	0.0020
128.8	0.25	0.0019
193.2	0.375	0.0019
193.2	0.38	0.0020
193.2	0.377	0.0019
257.6	0.507	0.0020
257.6	0.503	0.0019
257.6	0.505	0.0020
322	0.631	0.0019
322	0.631	0.0019
322	0.627	0.0019
	Prom	0.00195
	D.E.	1.11E-05
	C.V.	0.5661

Anexos

Tabla A2. 6. Precisión del método 2

Conc ($\mu\text{g/ml}$)	Abs	Abs/conc
199.2	0.428	0.0021
199.2	0.425	0.0021
199.2	0.423	0.0021
199.2	0.425	0.0021
199.2	0.427	0.0021
199.2	0.43	0.0021
	Prom	0.0021
	D.E.	1.26E-05
	CV	0.587

Análisis de varianza para evaluar la linealidad del sistema

Prueba de hipótesis

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

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

Criterio de aceptación

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

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

Análisis de Varianza

Tabla A2. 7. Análisis de varianza para determinar la linealidad del CLOT del método 2

Modelo	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	F calculada	F crítica
Regresión	0.476028	1	0.476028	137825.49	0.0000
Residuo	0.0000449	13	0.000003453		
Total	0.476073	14			

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

Prueba de intercepto

Prueba de hipótesis

H_0 : La ordenada al origen es igual a cero.

H_i : La ordenada al origen es diferente de cero.

Criterio de aceptación

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

Coefficientes

Tabla A2. 8. Análisis de varianza para evaluar si el intercepto es diferente a cero para el metodo 2

Modelo		Coeficientes no estandarizados		Coeficientes estandarizados	t calculada	t critica
		B	Error estándar	Beta		
1	Intercepto	0.000166667	0.001125		0.14810	0.8845
	Pendiente	0.001956	0.0000052	1.000	371.248	0.000

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

Anexos

Método 3. Solución de CLOT disuelto en FVS y Gelucire® 14/44 al 5 % en contacto con tejido vaginal a pH 7.4

Tabla A2. 9. Curva de calibración con Gelucire® y tejido vaginal porcino a pH 7.4

Conc µg/ml	Abs	Abs/Conc
101	0.258	0.0025
101	0.259	0.0026
101	0.257	0.0025
202	0.489	0.0024
202	0.499	0.0025
202	0.494	0.0024
303	0.734	0.0024
303	0.737	0.0024
303	0.731	0.0024
404	0.971	0.0024
404	0.976	0.0024
404	0.971	0.0024
505	1.204	0.0024
505	1.206	0.0024
505	1.203	0.0024
	Prom	0.0024
	D.E.	6.22E-05
	C.V.	2.547

Tabla A2. 10. Precisión para el método 3

Conc µg/ml	Abs	Abs/Conc
196.8	0.18	0.0009
196.8	0.182	0.0009
196.8	0.182	0.0009
196.8	0.189	0.0010
196.8	0.181	0.0010
196.8	0.181	0.0009
	Prom	0.0009
	D.E.	1.66E-05
	C.V.	1.792

Análisis de varianza para evaluar la linealidad del sistema

Prueba de hipótesis

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

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

Criterio de aceptación

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

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

Análisis de Varianza

Tabla A2. 11. Análisis de varianza para evaluar la linealidad del sistema del método 3

Modelo	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	F calculada	F crítica
Regresión	1.68697	1	1.68697	147119.17	0.0000
Residuo	0.00014906	13	0.0000114667		
Total	1.68712	14			

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

Prueba de intercepto

Prueba de hipótesis

H_0 : La ordenada al origen es igual a cero.

H_i : La ordenada al origen es diferente de cero.

Criterio de aceptación

Anexos

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

Tabla A2. 12. Análisis de varianza para evaluar si el intercepto es diferente a cero para el método 3

Modelo		Coeficientes no estandarizados		Coeficientes estandarizados	t calculada	t crítica
		B	Error estándar	Beta		
1	Intercepto	0.0212	0.002050		10.3391	0.000
	Pendiente	0.00234785	0.0000061	1.000	383.561	0.000

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

Anexos

❖ Método 4. Solución de CLOT disuelto en metanol

Tabla A2. 13. Curva de calibración CLOT disuelto en metanol

Conc ($\mu\text{g/ml}$)	Abs	Abs/con
33.8	0.065	0.0019
33.8	0.063	0.0019
33.8	0.063	0.0019
67.6	0.13	0.0019
67.6	0.127	0.0019
67.6	0.129	0.0019
101.4	0.193	0.0019
101.4	0.192	0.0019
101.4	0.192	0.0019
135.2	0.259	0.0019
135.2	0.257	0.0019
135.2	0.256	0.0019
169	0.32	0.0019
169	0.321	0.0019
169	0.322	0.0019
	Prom.	0.0019
	D.E.	1.80E-05
	C.V.	0.949

Tabla A2. 14. Precisión para el método 4.

Conc ($\mu\text{g/ml}$)	Abs	Abs/conc
116.4	0.211	0.0018
116.4	0.22	0.0019
116.4	0.211	0.0018
116.4	0.212	0.0018
116.4	0.212	0.0018
116.4	0.213	0.0018
	Prom	0.0018
	D.E.	2.95E-05
	C.V.	1.509

Análisis de varianza para evaluar la linealidad del sistema

Prueba de hipótesis

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

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

Criterio de aceptación

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

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

Análisis de Varianza

Tabla A2. 15. Análisis de varianza para evaluar linealidad del sistema para el método 4

Modelo	Suma de Cuadrados	GI	Cuadrado Medio	F calculada	F crítica
Regresión	1.68697	1	1.68697	147119.17	0.0000
Residuo	0.00014906	13	0.000011466		
Total	1.68712	14			

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

Prueba de intercepto

Prueba de hipótesis

H_0 : La ordenada al origen es igual a cero.

H_i : La ordenada al origen es diferente de cero.

Criterio de aceptación

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

Anexos

Tabla A2. 16. Análisis de varianza para evaluar si el intercepto es diferente a cero para el método 4.

Modelo		Coeficientes no estandarizados		Coeficientes estandarizados	t calculada	t critica
		B	Error estándar	Beta		
1	Intercepto	0.0212	0.002050		10.3391	0.000
	Pendiente	0.002347	0.0000061	1.000	383.561	0.000

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

ANEXO 3.**❖ PARÁMETROS USADOS EN LAS MEDICIONES DE LAS VISCOSIDADES.**

Tabla A3. 1. Parámetros utilizados para medir la viscosidad en los geles de Pluronic® F-127 a temperatura ambiente (25 ± 2 ° C)

Parámetros	Concentración del gel			
	20 %	22 %	24 %	29 %
Revoluciones por minuto (rpm)	75	0.9	0.45	0.3
Número de aguja	62	96	96	96
Torque (%)	50 ± 5	50 ± 5	50 ± 5	50 ± 5

Tabla A3. 2. Tabla A3.2. Parámetros utilizados para medir la viscosidad en los geles de Pluronic® F-127 a temperatura fisiológica (37 ± 2 °C)

Parámetros	Concentración del gel			
	20 %	22 %	24 %	29 %
Revoluciones por minuto (rpm)	0.8	0.5	0.4	0.15
Número de aguja	96	96	96	96
Torque (%)	50 ± 5	50 ± 5	50 ± 5	50 ± 5

Anexos

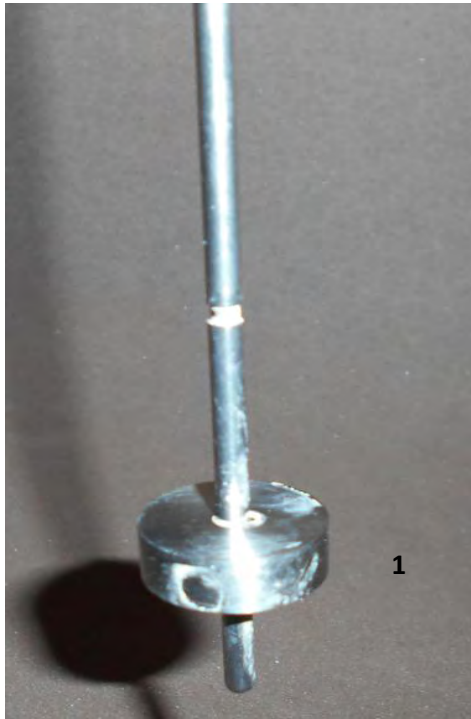


Figura A3. 1. Agujas utilizadas para la prueba de viscosidad, 1: aguja N. 62 y 2: Aguja N. 96 Helipath®

ANEXO 4.❖ **Perfiles de liberación *in vitro* para el gel Pluronic® F-127 con clotrimazol****Tabla A4. 1. Perfiles de liberación del gel de Pluronic® F-127 al 24% y CLOT al 1% (n=1)**

Tiempo (h)	Abs	Conc µg/mL	Cantidad CLOT µg	Cantidad Retirada µg	Cantidad Retirada Acumulada	Cantidad Corregida µg	% liberado
0.083	0.001	0	0	0	0	0	0
0.167	0.009	0.615	30.769	1.846	1.846	32.615	0.323
0.25	0.011	1.384	69.230	4.153	6	75.230	0.746
0.333	0.011	1.384	69.230	4.153	10.153	79.384	0.787
0.417	0.011	1.384	69.230	4.153	14.307	83.538	0.828
0.5	0.011	1.384	69.230	4.153	18.461	87.692	0.870
0.75	0.015	2.923	146.153	8.769	27.230	173.384	1.720
1	0.02	4.846	242.307	14.538	41.769	284.076	2.818
1.5	0.024	6.384	319.230	19.153	60.923	380.153	3.771
2	0.028	7.923	396.153	23.769	84.692	480.846	4.770
3	0.03	8.692	434.615	26.076	110.769	545.384	5.410
4	0.032	9.461	473.076	28.384	139.153	612.230	6.074
5	0.032	9.461	473.076	28.384	167.538	640.615	6.355
6	0.032	9.461	473.076	28.384	195.923	669	6.637

Anexos

Tabla A4. 2. Perfiles de liberación del gel de Pluronic® F-127 al 24 % con CLOT al 1 % (n=2)

Tiempo (h)	Abs	Conc µg/mL	Cantidad CLOT µg	Cantidad Retirada µg	Cantidad Retirada Acumulada	Cantidad Corregida µg	% liberado
0.083	-0.001	0	0	0	0	0	0
0.167	0.006	0	0	0	0	0	0
0.25	0.008	0.230	11.538	0.694	0.692	12.230	0.123
0.334	0.009	0.615	30.769	1.846	2.538	33.307	0.336
0.416	0.011	1.384	69.230	4.153	6.692	75.923	0.767
0.5	0.012	1.769	88.461	5.307	12	100.461	1.015
0.75	0.013	2.153	107.692	6.461	18.461	126.153	1.275
1	0.017	3.692	184.615	11.076	29.538	214.153	2.164
1.5	0.02	4.846	242.307	14.538	44.076	286.384	2.895
2	0.036	11	550	33	77.076	627.076	6.338
3	0.036	11	550	33	110.076	660.076	6.672
4	0.038	11.769	588.461	35.307	145.384	733.846	7.418
5	0.038	11.769	588.461	35.307	180.692	769.153	7.775
6	0.039	12.153	607.692	36.461	217.153	824.846	8.338

Tabla A4. 3. Perfiles de liberación del gel de Pluronic® F-127 al 24 % con CLOT al 1 % (n=3)

Tiempo (h)	Abs	Conc µg/mL	Cantidad CLOT µg	Cantidad Retirada µg	Cantidad Retirada Acumulada	Cantidad Corregida µg	% liberado
0.083	0.001	0	0	0	0	0	0
0.167	0.009	0.615	30.769	1.846	1.846	32.615	0.321
0.25	0.011	1.384	69.232	4.153	6	75.230	0.742
0.333	0.011	1.384	69.230	4.153	10.153	79.384	0.783
0.417	0.011	1.384	69.230	4.153	14.307	83.538	0.824
0.5	0.011	1.384	69.230	4.153	18.461	87.692	0.865
0.75	0.013	2.153	107.69	6.461	24.923	132.615	1.309
1	0.015	2.923	146.156	8.769	33.692	179.846	1.775
1.5	0.028	7.923	396.15	23.769	57.461	453.615	4.477
2	0.032	9.461	473.07	28.384	85.846	558.923	5.516
3	0.038	11.769	588.461	35.307	121.153	709.615	7.004
4	0.043	13.692	684.615	41.076	162.230	846.846	8.358
5	0.05	16.384	819.230	49.153	211.384	1030.61	10.172
6	0.059	19.846	992.307	59.538	270.923	1263.23	12.468

Anexos

Tabla A4. 4. Promedio de los sistemas en los perfiles de liberación del gel

Tiempo (h)	n=1	n=2	n=3	Prom. % gel liberado
0.0833	0	0	0	0
0.167	0.323	0	0.321	0.215
0.25	0.746	0.123	0.742	0.537
0.333	0.787	0.336	0.783	0.635
0.417	0.828	0.767	0.824	0.806
0.5	0.870	1.015	0.865	0.917
0.75	1.720	1.275	1.309	1.434
1	2.818	2.164	1.775	2.2528
1.5	3.771	2.895	4.477	3.714
2	4.770	6.338	5.516	5.542
3	5.410	6.672	7.004	6.362
4	6.074	7.418	8.358	7.283
5	6.355	7.775	10.172	8.101
6	6.637	8.338	12.468	9.148

❖ Perfiles de liberación de la solución de clotrimazol

Tabla A4. 5. Perfiles de liberación de la solución de CLOT (n=1)

Tiempo (h)	Abs	Conc. (µg/mL)	Cantidad CLOT µg	Cantidad Retenida µg	Cantidad Retenida Acumulada	Cantidad Corregida µg	% liberado
0	0	0	0	0	0	0	0
0.016	0.011	3.391	135.652	0	0	135.652	38.980
0.083	0.012	3.826	153.043	10.173	10.173	163.217	46.901
0.16	0.013	4.260	170.434	11.478	21.652	192.087	55.197
0.25	0.013	4.260	170.434	12.782	34.434	204.869	58.870
0.5	0.014	4.695	187.826	12.782	47.217	235.043	67.541
0.75	0.015	5.130	205.217	14.086	61.304	266.521	76.586
1	0.017	6	240	15.391	76.695	316.695	91.004
2	0.018	6.434	257.391	18	94.695	352.086	101.174
3	0.016	5.565	222.608	19.304	114	336.608	96.726
4	0.015	5.130	205.217	16.695	130.695	335.913	96.526
6	0.014	4.695	187.826	15.391	146.086	333.913	95.952
8	0.013	4.260	170.434	14.086	160.173	330.608	95.002

Anexos

Tabla A4. 6. Perfiles de liberación en la solución de CLOT (n=2)

Tiempo (h)	Abs	Conc. (µg/mL)	Cantidad CLOT µg	Cantidad Retenida µg	Cantidad Retenida Acumulada	Cantidad Corregida µg	% liberado
0	0	0	0	0	0	0	0
0.016	0.008	2.086	83.478	6.260	6.260	89.739	25.787
0.083	0.009	2.521	100.869	7.565	13.826	114.695	32.958
0.16	0.01	2.956	118.260	8.869	22.695	140.956	40.504
0.25	0.011	3.391	135.652	10.173	32.869	168.521	48.425
0.5	0.012	3.826	153.043	11.478	44.347	197.391	56.721
0.75	0.015	5.130	205.217	15.391	59.739	264.956	76.136
1	0.015	5.130	205.217	15.391	75.130	280.347	80.559
2	0.016	5.565	222.608	16.695	91.826	314.434	90.354
3	0.016	5.565	222.608	16.695	108.521	331.130	95.152
4	0.017	6	240	18	126.521	366.521	105.322
6	0.016	5.565	222.608	16.695	143.217	365.826	105.122
8	0.015	5.130	205.217	15.391	158.608	363.826	104.547

Tabla A4. 7. Perfiles de liberación de la solución de CLOT (n=3)

Tiempo (h)	Abs	Conc. (µg/mL)	Cantidad CLOT µg	Cantidad Retenida µg	Cantidad Retenida Acumulada	Cantidad Corregida µg	% liberado
0	0	0	0	0	0	0	0
0.016	0.011	3.391	135.652	10.173	10.173	145.826	41.904
0.083	0.012	3.826	153.043	11.478	21.652	174.695	50.199
0.16	0.013	4.260	170.434	12.782	34.434	204.869	58.870
0.25	0.013	4.260	170.434	12.782	47.217	217.652	62.543
0.5	0.014	4.695	187.826	14.086	61.304	249.130	71.589
0.75	0.015	5.130	205.217	15.391	76.695	281.913	81.009
1	0.017	6	240	18	94.695	334.695	96.176
2	0.018	6.434	257.391	19.304	114	371.391	106.721
3	0.016	5.565	222.608	16.695	130.695	353.304	101.524
4	0.015	5.130	205.217	15.391	146.086	351.304	100.949
6	0.014	4.695	187.826	14.086	160.173	348	100
8	0.013	4.260	170.434	12.782	172.956	343.391	98.675

Anexos

Tabla A4. 8. Perfiles de liberación de la solución de CLOT (n=4)

Tiempo (h)	Abs	Conc. (µg/mL)	Cantidad CLOT µg	Cantidad Retenida µg	Cantidad Retenida Acumulada	Cantidad Corregida µg	% liberado
0	0	0	0	0	0	0	0
0.016	0.011	3.391	135.652	10.173	10.173	145.826	41.904
0.083	0.012	3.826	153.043	11.478	21.652	174.695	50.199
0.16	0.013	4.260	170.434	12.782	34.434	204.869	58.870
0.25	0.013	4.260	170.434	12.782	47.217	217.652	62.543
0.5	0.014	4.695	187.826	14.086	61.304	249.130	71.589
0.75	0.015	5.130	205.217	15.391	76.695	281.913	81.009
1	0.017	6	240	18	94.695	334.695	96.176
2	0.018	6.434	257.391	19.304	114	371.391	106.721
3	0.016	5.565	222.608	16.695	130.695	353.304	101.524
4	0.015	5.130	205.217	15.391	146.086	351.304	100.949
6	0.014	4.695	187.826	14.086	160.173	348	100
8	0.013	4.260	170.434	12.782	172.956	343.391	98.675

Promedios de liberación de la solución de clotrimazol

Tabla A4. 9. Promedios de los perfiles de liberación de la solución de CLOT

Tiempo (h)	n=1	n=2	n=3	n=4	Prom % sln liberado
0	0	0	0	0	0
0.016	41.904	25.787	41.904	41.904	37.874
0.083	50.199	32.958	50.199	50.199	45.889
0.16	58.870	40.504	58.870	58.870	54.279
0.25	62.543	48.425	62.543	62.543	59.014
0.5	71.589	56.721	71.589	71.589	67.872
0.75	81.009	76.136	81.009	81.009	79.791
1	96.176	80.559	96.176	96.176	92.272
2	106.721	90.354	106.721	106.721	102.629
3	101.524	95.152	101.524	101.524	99.931
4	100.949	105.322	100.949	100.949	102.042
6	100	105.122	100	100	101.280
8	98.675	104.547	98.675	98.675	100.143

Anexos

❖ Modelos matemáticos

Tabla A4. 10. Aplicación de modelos matemáticos para el gel de Pluronic® F-127 al 24% y CLOT al 1% (n=1)

Tiempo (h)	ln tiempo	$t^{1/2}$	Mt μg	Mt/M ∞ μg	ln (Mt/M ∞)	(Mt/M ∞)*100
0.083	-2.484	0.288	0	0	0	0
0.167	-1.791	0.408	32.615	0.003	-5.733	0.323
0.25	-1.386	0.5	75.230	0.007	-4.897	0.746
0.333	-1.098	0.577	79.384	0.007	-4.843	0.787
0.417	-0.875	0.645	83.538	0.008	-4.792	0.828
0.5	-0.693	0.707	87.692	0.008	-4.744	0.870
0.75	-0.287	0.866	173.384	0.017	-4.062	1.720
1	0	1	284.076	0.028	-3.569	2.818
1.5	0.405	1.224	380.153	0.037	-3.277	3.771
2	0.693	1.414	480.846	0.047	-3.042	4.770
3	1.098	1.732	545.384	0.054	-2.916	5.410
4	1.386	2	612.230	0.060	-2.801	6.074
5	1.609	2.236	640.615	0.063	-2.755	6.355
6	1.791	2.449	669	0.066	-2.71	6.637

Tabla A4. 11. Aplicación de modelos matemáticos para el gel de Pluronic® F-127 al 24% y CLOT al 1% (n=2)

Tiempo (h)	ln tiempo	$t^{1/2}$	Mt μg	Mt/M ∞ μg	ln (Mt/M ∞)	(Mt/M ∞)*100
0.083333	-2.484	0.288	0	0	0	0
0.166667	-1.791	0.408	0	0	0	0
0.25	-1.386	0.5	12.230	0.001	-6.695	0.123
0.333333	-1.098	0.577	33.307	0.003	-5.693	0.336
0.416667	-0.875	0.645	75.923	0.007	-4.869	0.767
0.5	-0.693	0.707	100.469	0.010	-4.589	1.015
0.75	-0.287	0.866	126.153	0.012	-4.362	1.275
1	0	1	214.153	0.021	-3.832	2.164
1.5	0.405	1.224	286.384	0.028	-3.542	2.895
2	0.693	1.414	627.076	0.063	-2.758	6.338
3	1.098	1.732	660.076	0.066	-2.707	6.672
4	1.386	2	733.846	0.074	-2.601	7.418
5	1.609	2.236	769.153	0.077	-2.554	7.775
6	1.791	2.449	824.846	0.083	-2.484	8.338

Anexos

Tabla A4. 12. Aplicación de modelos matemáticos para el gel de Pluronic® F-127 al 24% y CLOT al 1% (n=3)

Tiempo (h)	ln tiempo	$t^{1/2}$	Mt μg	Mt/M ∞ μg	ln (Mt/M ∞)	(Mt/M ∞)*100
0.083	-2.484	0.288	0	0	0	0
0.166	-1.791	0.408	32.615	0.003	-5.738	0.321
0.25	-1.386	0.5	75.23	0.007	-4.902	0.742
0.333	-1.098	0.577	79.384	0.007	-4.849	0.783
0.416	-0.875	0.645	83.538	0.008	-4.798	0.824
0.5	-0.693	0.707	87.692	0.008	-4.749	0.865
0.75	-0.287	0.866	132.615	0.013	-4.335	1.309
1	0	1	179.846	0.017	-4.031	1.775
1.5	0.405	1.224	453.615	0.044	-3.106	4.477
2	0.693	1.414	558.923	0.055	-2.897	5.516
3	1.098	1.732	709.615	0.07	-2.658	7.004
4	1.386	2	846.846	0.083	-2.481	8.358
5	1.609	2.236	1030.615	0.101	-2.285	10.172
6	1.791	2.449	1263.23	0.124	-2.081	12.468

Anexos

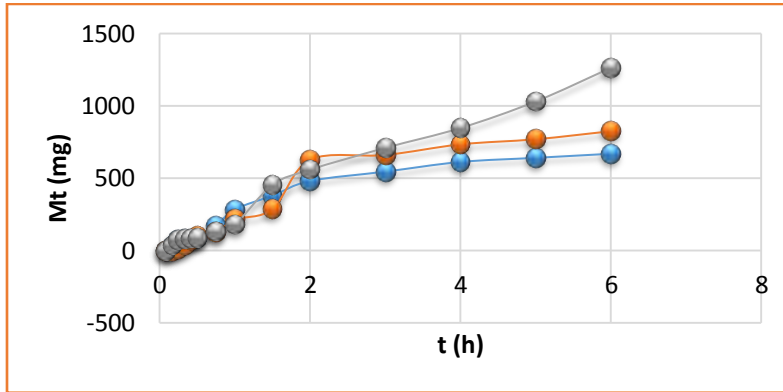


Figura A4. 1. Gráfico de la liberación del CLOT ajustado al modelo de orden cero

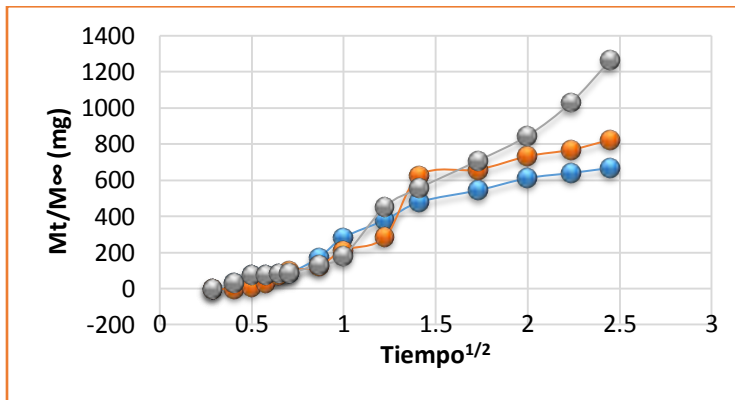


Figura A4. 2. Gráfico de la liberación del CLOT ajustado al modelo Higuchi

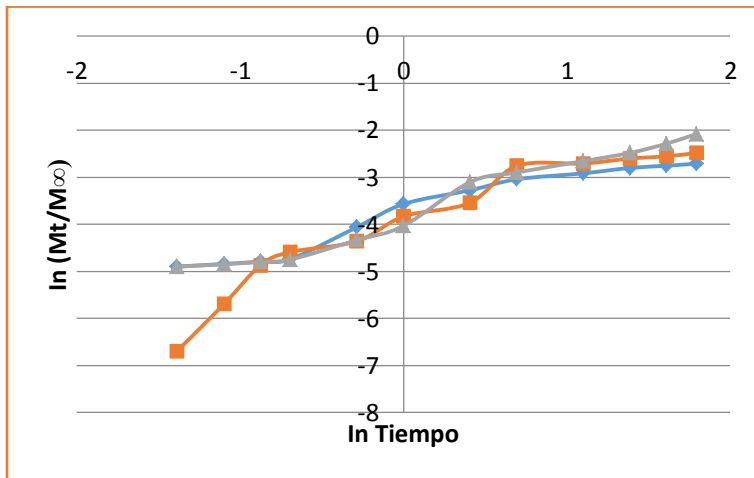


Figura A4. 3. Gráfico de la liberación del CLOT ajustado al modelo de Peppas.

ANEXO 5.**CINÉTICA DE PERMEACIÓN DEL CLOTRIMAZOL**

Tabla A5. 1. Cinética de permeación del gel de Pluronic® F-127 al 24 % con CLOT al 1 % p/v (n=1)

Tiempo (h)	Abs	Conc µg/ml	Cantidad CLOT µg	Cantidad Retirada µg	Cantidad Retirada Acumulada	Cantidad Corregida µg	% Permeado	µg CLOT/cm ²
0.5	0.59	294.9	5898	0	0	5898	25.716	1102.429
1	0.654	326.9	6538	884.7	884.7	7422.7	32.364	1222.056
2	0.688	343.9	6878	980.7	1865.4	8743.4	38.123	1285.607
4	0.783	391.4	7828	1031.7	2897.1	10725.1	46.764	1463.177
6	0.82	409.9	8198	1174.2	4071.3	12269.3	53.497	1532.336
8	0.85	424.9	8498	1229.7	5301	13799	60.166	1588.411
24	1.82	909.9	18198	1274.7	6575.7	24773.7	108.019	3401.495

Tabla A5. 2. Cinética de permeación del gel de Pluronic® F-127 al 24 % con CLOT al 1 % p/v (n=2)

Tiempo (h)	Abs	Conc µg/ml	Cantidad CLOT µg	Cantidad Retirada µg	Cantidad Retirada Acumulada	Cantidad Corregida µg	% Permeado	µg CLOT/cm ²
0.5	0.336	167.9	3358	0	0	3358	14.199	627.663
1	0.39	194.9	3898	503.7	503.7	4401.7	18.612	728.598
2	0.412	205.9	4118	584.7	1088.4	5206.4	22.015	769.719
4	0.448	223.9	4478	617.7	1706.1	6184.1	26.149	837.009
6	0.491	245.4	4908	671.7	2377.8	7285.8	30.807	917.383
8	0.58	289.9	5798	736.2	3114	8912	37.683	1083.73
24	0.902	450.9	9018	869.7	3983.7	13001.7	54.977	1685.607

Anexos

Tabla A5. 3. Cinética de permeación del gel de Pluronic® F-127 al 24 % con CLOT al 1 % p/v (n=3).

Tiempo (h)	Abs	Conc $\mu\text{g/ml}$	Cantidad CLOT μg	Cantidad Retirada μg	Cantidad Retirada Acumulada	Cantidad Corregida μg	% Permeado	$\mu\text{g CLOT/cm}^2$
0.5	0.474	236.9	4738	0	0	4738	20.859	885.607
1	0.584	291.9	5838	710.7	710.7	6548.7	28.831	1091.214
2	0.769	384.4	7688	875.7	1586.4	9274.4	40.832	1437.009
4	1.156	577.9	11558	1153.2	2739.6	14297.6	62.947	2160.373
6	1.549	774.4	15488	1733.7	4473.3	19961.3	87.883	2894.953
8	1.747	873.4	17468	2323.2	6796.5	24264.5	106.829	3265.046
24	3.378	1688.9	33778	2620.2	9416.7	43194.7	190.172	6313.644

Tabla A5. 4. Cinética de permeación del gel de Pluronic® F-127 al 24 % con CLOT al 1 % p/v (n=4).

Tiempo (h)	Abs	Conc $\mu\text{g/ml}$	Cantidad CLOT μg	Cantidad Retirada μg	Cantidad Retirada Acumulada	Cantidad Corregida μg	% Permeado	$\mu\text{g CLOT/cm}^2$
0.5	0.212	105.9	2118	0	0	2118	9.619	395.887
1	0.25	124.9	2498	317.7	317.7	2815.7	12.788	466.915
2	0.377	188.4	3768	374.7	692.4	4460.4	20.257	704.299
4	0.57	284.9	5698	565.2	1257.6	6955.6	31.59	1065.046
6	0.763	381.4	7628	854.7	2112.3	9740.3	44.237	1425.794
8	0.797	398.4	7968	1144.2	3256.5	11224.5	50.978	1489.345
24	1.18	589.9	11798	1195.2	4451.7	16249.7	73.8	2205.233

Anexos

Tabla A5. 5. Cinética de permeación del gel de Pluronic® F-127 al 24 % con CLOT al 1 % p/v (n=5).

Tiempo (h)	Abs	Conc $\mu\text{g/ml}$	Cantidad CLOT μg	Cantidad Retirada μg	Cantidad Retirada Acumulada	Cantidad Corregida μg	% Permeado	$\mu\text{g CLOT/cm}^2$
0.5	1.478	738.9	14778	0	0	14778	66.135	2762.242
1	1.4	699.9	13998	2216.7	2216.7	16214.7	72.564	2616.448
2	1.457	728.4	14568	2099.7	4316.4	18884.4	84.512	2722.99
4	1.509	754.4	15088	2185.2	6501.6	21589.6	96.618	2820.186
6	1.54	769.9	15398	2263.2	8764.8	24162.8	108.134	2878.13
8	1.69	844.9	16898	2309.7	11074.5	27972.5	125.183	3158.504
24	2.084	1041.9	20838	2534.7	13609.2	34447.2	154.159	3894.953

Tabla A5. 6. Cinética de permeación del gel de Pluronic® F-127 al 24 % con CLOT al 1 % p/v (n=6).

Tiempo (h)	Abs	Conc $\mu\text{g/ml}$	Cantidad CLOT μg	Cantidad Retirada μg	Cantidad Retirada Acumulada	Cantidad Corregida μg	% Permeado	$\mu\text{g CLOT/cm}^2$
0.5	0.22	109.9	2198	0	0	2198	9.393	410.841
1	0.317	158.4	3168	329.7	329.7	3497.7	14.948	592.149
2	0.363	181.4	3628	475.2	804.9	4432.9	18.945	678.13
4	0.369	184.4	3688	544.2	1349.1	5037.1	21.527	689.345
6	0.371	185.4	3708	553.2	1902.3	5610.3	23.977	693.084
8	0.39	194.9	3898	556.2	2458.5	6356.5	27.166	728.598
24	0.769	384.4	7688	584.7	3043.2	10731.2	45.863	1437.009