



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

**Preparación y caracterización de una microemulsión
para el tratamiento de micosis vaginales**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

LICENCIADA EN FARMACIA

P R E S E N T A

MIRIAM GARCÍA PÉREZ

ASESORA

Dra. Elizabeth Piñón Segundo

CUAUTITLÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO, 2018



Universidad Nacional
Autónoma de México



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
SECRETARÍA GENERAL
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

ESCUELA DE ESTUDIOS
SUPERIORES CUAUTITLÁN

ASUNTO: VOTO APROBATORIO



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

ATN: I.A. LAURA MARGARITA CORTAZAR FIGUEROA
Jefa del Departamento de Exámenes Profesionales
de la FES Cuautitlán.

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

Preparación y caracterización de una microemulsión para el tratamiento de micosis vaginales.

Que presenta la pasante: Miriam García Pérez

Con número de cuenta: 413096289 para obtener el Título de la carrera: Licenciatura en Farmacia.

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

ATENTAMENTE

“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 28 de Septiembre de 2018.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Dra. Flora Ariana Ganem Rondero	
VOCAL	Dra. Elizabeth Piñón Segundo	
SECRETARIO	M.C. Guadalupe Álvarez Ávila	
1er. SUPLENTE	Dra. María Guadalupe Nava Arzaluz	
2do. SUPLENTE	Q.F.B. Elisa Pedraza Vázquez	

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

LMCF/cga*

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

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

AGRADECIMIENTOS

Gracias papá por siempre brindarme todo tu apoyo y amor incondicional en cada una de las etapas de mi vida, ayudándome a cumplir todas mis metas, y en especial mi más anhelado sueño de ser una Licenciada en Farmacia, eres el mejor, te quiero muchísimo.

Gracias mamá por siempre estar ahí cuando más lo he necesitado, en especial por preocuparte por mí durante la etapa inicial de este camino, haciendo hasta lo imposible por verme bien y feliz, gracias por todo tu cariño y confianza, te quiero mucho.

A mi hermano Luis Alberto, gracias por siempre preocuparte, creer y confiar en mí, pero sobre todo gracias por toda la ayuda que me brindaste para poder lograr esta meta, porque sé que lo hiciste de todo corazón y eso siempre lo voy a valorar y nunca lo voy a olvidar, te quiero mucho hermano y le agradezco mucho a dios por haberme dado un hermano como tú.

A mi abuelita Juana, por todos tus cuidados, preocupaciones y cariño que me brindaste durante los primeros dos años de la licenciatura y gracias por siempre seguir apoyándome, te quiero mucho abuelita.

A mi cuñada Andrea, gracias por brindarme tu casa y todas las atenciones que tuviste conmigo durante el proceso y desarrollo de este trabajo y siempre haber estado ahí incondicionalmente, muchas gracias, te quiero.

A mis sobrinitos Ian y Kimberly, espero que cuando sean más grandes y lean esto sepan que fueron parte importante, por todas las veces que me hicieron enojar, reír y jugar, inyectándole mucha felicidad a mis días, los quiero mucho.

A mi profesora Elizabeth Piñón Segundo, muchas gracias doctora, por haberme brindado todo su apoyo, conocimientos y atenciones durante el desarrollo de este trabajo, pero sobre todo por la confianza que me brindo, dándome la oportunidad de ser parte de su equipo de investigación. Fue un gran placer haber trabajado con usted y me siento muy afortunada de que haya

sido mi asesora guiándome en todo momento para lograr mi meta de ser una Licenciada en Farmacia.

A mis amigos de Farma 05 Luis ángel, Agustín, Abel, Magica, Marilyn y Anuar porque con ustedes pase los mejores momentos en la FESC, compartiendo alegrías, tristezas, enojos y diversión, siempre fueron los mejores integrantes de todos mis equipos de laboratorio, convirtiéndose en los mejores amigos de la universidad, los quiero mucho y gracias por acompañarme durante esta etapa de mi vida, que yo considero ha sido la mejor, espero siempre tenerlos muy cerca de mi vida.

A mis compañeros de laboratorio Nely, Andrea, Ana, Marco, Mayra, Fabiola y Joel, gracias por ayudarme en cada una de las etapas de la experimentación de este trabajo, compartiendo sus conocimientos y experiencias.

“Hay tantas cosas que se pueden complicar
pero antes muerto que dejar de soñar”

“Que corran todos los demás, nosotros vamos caminando;
para llegar no hay que correr, tan sólo hay que seguir andando” Caligaris.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE GENERAL.....	I
ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS.....	V
ÍNDICE DE FIGURAS.....	V
ÍNDICE DE TABLAS.....	VII
I INTRODUCCIÓN.....	1
II MARCO TEÓRICO.....	3
2.1. Aparato reproductor femenino.....	3
2.2. Vagina.....	3
2.2.1. Anatomía de la vagina.....	4
2.2.2. Fisiología de la vagina.....	4
2.2.3. Histología de la vagina.....	5
2.2.4. Flora vaginal.....	6
2.2.5. pH.....	7
2.3. Vulvovaginitis.....	7
2.3.1. Vaginitis bacteriana.....	8
2.3.2. Tricomoniasis.....	8
2.3.3. Candidiasis vulvovaginal.....	9
2.3.3.1. <i>Candida albicans</i> (<i>C. albicans</i>).....	9
2.4. Clotrimazol (CLOT).....	10

2.4.1.	Propiedades fisicoquímicas	11
2.4.2.	Actividad antimicótica	12
2.5.	Microemulsiones (MEs)	13
2.6.	Componentes de las MEs	13
2.6.1.	Fase acuosa.....	13
2.6.2.	Fase oleosa	13
2.6.2.1.	Miristato de isopropilo (MIP).....	14
2.6.3.	Tensoactivos.....	15
2.6.3.1.	Tensoactivos catiónicos.....	16
2.6.3.2.	Tensoactivos aniónicos.....	17
2.6.3.3.	Tensoactivos anfóteros o zwitteriónicos	17
2.6.3.4.	Tensoactivos no iónicos	17
2.6.3.4.1.	Tween [®] 80.....	18
2.6.4.	Co-tensoactivo.....	19
2.7.	Teorías de formación de las MEs	19
2.7.1.	Teoría interfacial	20
2.7.2.	Teoría termodinámica	20
2.7.3.	Teoría de la solubilización	22
2.8.	Tipos de MEs.....	22

2.9.	Comportamiento de fase.....	24
III	OBJETIVOS.....	27
3.1.	General.....	27
3.2.	Particulares	27
IV	PARTE EXPERIMENTAL.....	28
4.1.	Materiales y reactivos.....	28
4.2.	Material biológico.....	29
4.3.	Instrumentos y equipos.....	29
4.4.	Metodología.....	30
4.4.1.	Construcción del diagrama pseudoternario.....	30
4.4.2.	Capacidad de carga de CLOT	31
4.4.3.	Tamaño de glóbulo.....	31
4.4.4.	Conductividad eléctrica.....	32
4.4.5.	Viscosidad	33
4.4.6.	Estudios de liberación <i>in vitro</i>	34
4.4.7.	Pruebas de bioadhesión	35
4.4.7.1.	Método 1.....	35
4.4.7.2.	Método 2.....	36
V	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	37

5.1.	Construcción del diagrama pseudo-ternario.....	37
5.2.	Capacidad de carga de CLOT.....	40
5.3.	Tamaño de glóbulo	41
5.4.	Conductividad eléctrica	46
5.5.	Viscosidad	51
5.6.	Estudios de liberación <i>in vitro</i>	55
5.7.	Pruebas de bioadhesión	61
VI.	CONCLUSIONES.....	64
VII	PERSPECTIVAS	65
VIII.	REFERENCIAS	66
IX.	ANEXOS.....	72
9.1.	Anexo 1.....	72
9.2.	Anexo 2.....	75
9.3.	Anexo 3.....	77
9.4.	Anexo 4.....	82

SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

Símbolo/ abreviatura	Significado
MEs	Microemulsiones
ME	Microemulsión
ME1	Microemulsión 1
ME2	Microemulsión 2
ME3	Microemulsión 3
CLOT	Clotrimazol
o/w	Aceite en agua (por sus siglas en inglés)
w/o	Agua en aceite (por sus siglas en inglés)
MIP	Miristato de isopropilo
Tw [®] 80/Et (2:1)	Tween [®] 80/Etanol 2:1
FVS pH 4.2	Fluido vaginal simulado pH 4.2
FVS/Tw [®] 20 3% pH 4.2	Fluido vaginal simulado/Tween [®] 20 3% pH 4.2
<i>C. albicans</i>	<i>Candida albicans</i>

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Plano sagital medio del aparato reproductor femenino.....	3
Figura 2. Vista frontal de la vagina	4
Figura 3. Esquema de la pared vaginal.....	6
Figura 4. Micrográficas electrónicas de <i>C. albicans</i>	10
Figura 5. Estructura química del CLOT	11
Figura 6. Esquema del mecanismo de acción de CLOT	12

Figura 7. Estructura química del MIP	15
Figura 8. Organización de las moléculas de tensoactivo en dispersión	16
Figura 9. Estructura química del Tween [®] 80	18
Figura 10. Esquema de la energía involucrada en un sistema de ME	22
Figura 11. Clasificación de MEs según Winsor	24
Figura 12. Diagrama pseudoternario	26
Figura 13. Preparación de las MEs	30
Figura 14. Capacidad de carga de CLOT en la ME.	31
Figura 15. Equipo Zetasizer	32
Figura 16. Conductímetro	33
Figura 17. Viscosímetro Brookfield	34
Figura 18. Liberación de CLOT	35
Figura 19. Prueba de bioadhesión, método 1.	36
Figura 20. Prueba de bioadhesión, método 2.	36
Figura 21. Diagrama pseudoternario delimitado	38
Figura 22. MEs seleccionadas	38
Figura 23. Tamaño de glóbulo ME1 (w/o)	43
Figura 24. Tamaño de glóbulo ME2 (w/o)	43
Figura 25. Tamaño de glóbulo ME2 (o/w)	44
Figura 26. Tamaño de glóbulo ME3 (o/w)	44
Figura 27. Gráfica de conductividad eléctrica de las MEs	47
Figura 28. Comparación de medias de la ME2 y la ME3.	50

Figura 29. Conductividad eléctrica de las MEs sin CLOT y cargadas con CLOT.	51
Figura 30. Gráfica de viscosidad de las MEs.	52
Figura 31. Comparación de la viscosidad entre MEs sin CLOT y MEs con CLOT	54
Figura 32. Perfiles de liberación de ME3 1% CLOT y disolución de CLOT.	55
Figura 33. Gráfica de la ME3 por el modelo de Peppas.....	57
Figura 34. Gráfica de la ME3 por el modelo de Higuchi.	58
Figura 35. Prueba de bioadhesión, método 1.	62
Figura 36. Prueba de bioadhesión, método 2.	63
Figura 37. Espectro de absorción de CLOT en FVS/Tween [®] 20 3%.....	79
Figura 38. Gráfica de regresión lineal de la curva de calibración.....	81

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Propiedades fisicoquímicas del CLOT.....	11
Tabla 2. Formulación de las MEs seleccionadas.....	38
Tabla 3. Capacidad de carga de CLOT en las MEs.....	40
Tabla 4. Tamaño de glóbulo de las MEs	42
Tabla 5. Valor del exponencial “n” modelo de Peppas.	57
Tabla 6. Valor de “n”, “K _H ” y “r ² ” de la ME3.	58
Tabla 7. Reactivos para preparar FVS pH4.2.....	77
Tabla 8. Resultados de prueba de solubilidad de CLOT en tensoactivos.	78
Tabla 9. Valores de absorbancia de la curva de calibración de CLOT.	80

I INTRODUCCIÓN

La candidiasis vaginal es una infección micótica. En México se considera la única micosis de reporte obligatorio ante las autoridades sanitarias, esta enfermedad afecta a mujeres de diferentes grupos etarios: las tasas de incidencias registradas, por 100 000 habitantes son de 9.31 hasta 545.20; la tasa más baja corresponde al grupo etario de preescolares y la tasa más alta al grupo etario de mujeres adultas jóvenes, el correspondiente a 20–24 años de edad. Más del 70 % de los casos reportados son causados por el hongo *Candida albicans* (*C. albicans*) (Pineda, Cortés, Uribarrem, & Castañón, 2017).

Uno de los fármacos más eficaces para combatir este tipo de micosis es el CLOT (CLOT), un compuesto insoluble en agua. En estudios previos se ha demostrado que las microemulsiones (MEs) ayudan a mejorar la solubilidad de fármacos hidrofóbicos, tienen larga vida útil, son de fácil preparación y administración, además de que son excelentes vehículos para la liberación de fármacos.

Dentro del laboratorio de Sistemas Farmacéuticos de liberación modificada (L-13) de la Unidad de Investigación Multidisciplinaria (FES-Cuautitlán) se desarrolló con anterioridad una Tesis de Maestría (García, 2017) enfocada a la preparación de MEs; este trabajo de Tesis de licenciatura dió seguimiento a esa investigación, analizando la estabilidad física de la microemulsión (ME) cuando es sometida a las pruebas de liberación *in vitro*, proponiendo la formulación de una ME compuesta por agua, Miristato

de Isopropilo (MIP), Tween[®] 80–Etanol 2:1 (Tw[®] 80–Et (2:1)), para vía de administración vaginal; además se evaluó a detalle el diagrama pseudoternario del sistema, para definir cada una de las zonas que lo componen, caracterizando diferentes puntos de cada zona de acuerdo con el tamaño de glóbulo, capacidad de carga de CLOT, conductividad eléctrica, viscosidad y el perfil de liberación *in vitro* del fármaco microemulsionado. Finalmente se evaluaron las propiedades bioadhesivas de la ME sin la adición de algún agente gelificante, usando como modelo biológico tejido vaginal porcino.

II MARCO TEÓRICO

2.1. Aparato reproductor femenino

Los órganos del aparato reproductor femenino se clasifican básicamente en órganos internos y órganos externos (Figura1). Los órganos genitales internos incluyen la vagina, el útero, oviductos y ovarios. Los órganos genitales externos, también conocidos como la vulva, se componen por las estructuras que rodean la entrada vaginal, que son visibles en la zona del perineo estos incluyen los labios mayores, labios menores y clítoris (Neves, Amaral, & Bahia, 2007).

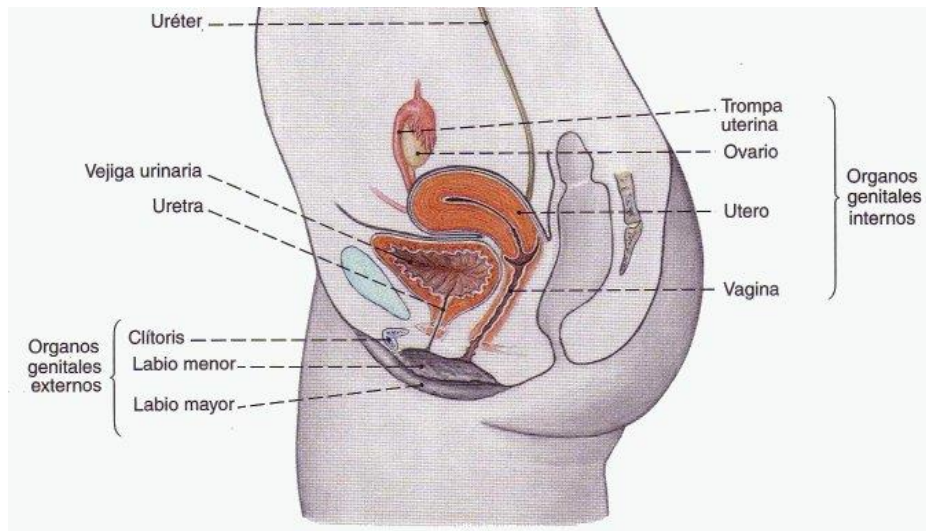


Figura 1. Plano sagital medio del aparato reproductor femenino
[Tomada de <https://www.ediciones.culturales.com.mx>]

2.2. Vagina

La vagina humana es un conducto fibromuscular que conecta la vulva con el cuello uterino (Figura 2). Mide aproximadamente de 8 a 10 cm de largo, y de ancho de 2 a 3 cm, consta de una pared anterior que mide aproximadamente 7.5 cm de largo, mientras que la

pared posterior se extiende hasta 9 cm, su superficie neta es de 80 a 110 cm² (Katz, Yuan, & Gao, 2015).



Figura 2. Vista frontal de la vagina
[Tomado de <https://medlineplus.gov.spanish>]

2.2.1. Anatomía de la vagina

En una mujer de pie, el tercio inferior de la vagina está dirigido oblicuamente hacia arriba y hacia atrás en un ángulo de aproximadamente 45 ° con respecto a un eje horizontal, los ejes de la vagina superior e inferior son diferentes, formando una ligera curva en forma de S (Figura 1). La vagina de una mujer en edad reproductiva contiene numerosos pliegues llamados *rugae*, estos proporcionan distensibilidad y apoyo, así como un aumento en el área superficial de la pared vaginal (Barnhart & Shalaby, 1998).

2.2.2. Fisiología de la vagina

La vagina es el órgano sexual femenino por definición, ya que es el receptáculo del pene durante las relaciones sexuales, el lugar de salida para el flujo menstrual y el canal de

parto (Tortora & Derickson, 2006). Aunque normalmente no alberga glándulas, por lo general se conoce como una mucosa, porque a pesar de no tener un papel secretor, la superficie epitelial vaginal en realidad está cubierta por una capa fina de líquidos endometriales, cervicales, residuos de orina, productos celulares y cantidades variables de transudado de la pared vaginal. Adicionalmente, la composición del fluido vaginal varía según la edad, ciclo menstrual y condición del estado de salud (Machado, Palmeira-de-Oliveira, Gaspar, Martinez-de-Oliveira, & Palmeira-de-Oliveira, 2015).

2.2.3. Histología de la vagina

La pared vaginal está constituida por tres capas (Figura 3):

1. Mucosa: posee un revestimiento de epitelio plano estratificado no queratonizado, el epitelio presenta células de Langerhans que actúan como presentadoras de antígenos. Debajo del epitelio se encuentra la lámina propia, constituida de tejido conjuntivo fibroelástico muy vascularizado en regiones más profundas, no presenta glándulas y posee una gran cantidad de células linfoides.
2. Muscular: formada de musculo liso dispuesta principalmente de forma longitudinal cuyos haces se entremezclan con fibras dispuestas en forma circular.
3. Adventicia: formada por tejido conjuntivo fibroelástico que la fija a las estructuras circundantes. Dentro de esta capa se encuentra una vasculatura abundante y haces nerviosos (López, 2013).

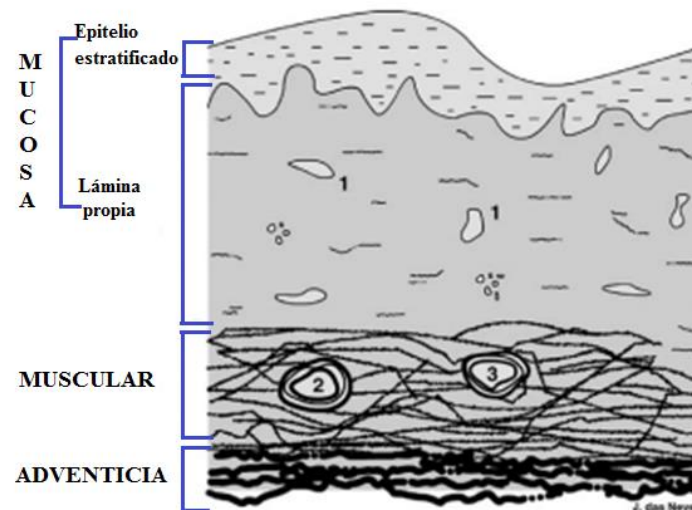


Figura 3. Esquema de la pared vaginal
[Modificada de Das Neves & Bahia, 2006]

2.2.4. Flora vaginal.

La mucosa vaginal presenta células descamadas, las cuales tienen un uso secundario que es: proporcionar una fuente de glucógeno intracelular que puede convertirse en ácido láctico por los lactobacilos que proliferan cerca del epitelio. Los lactobacilos son útiles para la salud vaginal porque compiten con los microbios exógenos por nutrientes. El papel protector se ve facilitado por la producción de ácido láctico y peróxido de hidrógeno (aunque no todas las cepas producen peróxido de hidrógeno). El peróxido de hidrógeno es tóxico para otros microorganismos que producen poca o ninguna enzima captadora de peróxido de hidrógeno (p. Ej., Catalasa), mejorando así la colonización vaginal por *Lactobacillus* principalmente *L. crispatus*, *L. iners*, *L. gasseri*, *L. jensenii* además de que se pueden encontrar en pequeñas cantidades otros microorganismos como *Staphylococcus aureus*, *Gardnerella vaginalis*, *Escherichia coli*, *Bacteroides spp.*, *Prevotella spp.*, *Clostridia spp.*, *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma urealyticum*,

Ureaplasma parvum, *Candida albicans* e inclusive virus como el virus de papiloma humano. Por lo tanto, los lactobacilos productores de peróxido de hidrógeno regulan el crecimiento de otra flora vaginal, haciendo que el ambiente sea menos hospitalario para otros microbios como bacterias, protozoos y hongos (Alexander et al., 2004).

2.2.5. pH

En mujeres sanas en edad reproductiva, el pH vaginal normal es de 3.5–4.5; este ambiente, naturalmente ácido, mantenido por la producción de ácido láctico de la microflora vaginal, cambia durante el ciclo menstrual, siendo más bajo en el ciclo medio y más alto alrededor de la menstruación. Además el pH vaginal puede verse alterado por varias condiciones, incluida la presencia de semen (pH 7.2 – 8.0) o infecciones donde el pH vaginal generalmente aumenta a valores de 5.0 a 6.5 (Alexander et al., 2004)

2.3. Vulvovaginitis

La vulvovaginitis es un término que describe enfermedades de etiología diversa del aparato urogenital femenino, que se caracterizan por inflamación de la vulva y/o vagina, existen las vulvovaginitis no infecciosas que suponen el 15 % y pueden ser debidas al aumento del pH vaginal, reacciones alérgicas, traumatismos, factores térmicos, hormonales, neoplásicos e iatrogenia. Cerca del 85 % de los casos son de origen infeccioso, en los que la transmisión sexual ocupa un papel importante. Las vulvovaginitis son comunes en las mujeres de todas las edades y por su frecuencia

destacan aquellas debidas a bacterias, hongos (*Candida*) y protozoarios (*Trichomonas*) (Pineda et al., 2017).

2.3.1. Vaginitis bacteriana.

La vaginitis bacteriana se caracteriza por un gran aumento en el número de bacterias endógenas, típicamente *Gardnerella vaginalis* y otros microorganismos patógenos como *Atopobium vaginae*, *Bacteroides spp.*, *Prevotella spp.*, *Peptostreptococcus spp.*, *Mobiluncus spp.* y *Mycoplasma hominis*, sus principales síntomas que presentan son flujo vaginal cremoso, adherente y abundante, olor a pescado, pH >4.5, el olor, es su síntoma más común, parece estar relacionado con los metabolitos, como las aminas, producidos por patógenos y al bajo contenido de ácido resultante de una disminución en la población de lactobacilos (Palmeira-de-Oliveira, Palmeira-de-Oliveira, & Martinez-de-Oliveira, 2015).

2.3.2. Tricomoniasis

Es una infección causada por el protozoo *Trichomonas vaginalis* y es la enfermedad de transmisión sexual más común en todo el mundo. Cuando los síntomas están presentes, se caracterizan por flujo vaginal maloliente de color amarillo-verdoso, con pH 5–6 e irritación vulvar. Los mecanismos patogénicos responsables para estos síntomas están mediados por varias adhesinas permitiendo que el parásito se adhiera al epitelio vaginal y cervical degradando las células. El desequilibrio de la flora parece ser otro mecanismo

importante relacionado con la tricomoniasis ya que reduce la colonización vaginal de lactobacilos (Palmeira-de-Oliveira et al., 2015).

2.3.3. Candidiasis vulvovaginal

La infección vaginal por especies de *Candida*, conocida como candidiasis vulvovaginal, constituye una enfermedad inflamatoria aguda y una razón frecuente de consulta ginecológica.

Los síntomas clínicos más frecuentes son prurito y comezón vulvar, acompañados de enrojecimiento, irritación, secreción vaginal blanca y espesa con de pH 4.0–4.5. Afecta al 75% de las mujeres en edad reproductiva al menos una vez en su vida. Esta enfermedad es la segunda causa más común de infecciones vaginales, precedida por las vaginitis bacterianas. La forma recurrente de esta micosis, conocida como candidiasis vulvovaginal recurrente, se define por la presencia de al menos cuatro episodios sintomáticos en un periodo de doce meses (Palmeira-de-Oliveira et al., 2015).

2.3.3.1. *Candida albicans* (*C. albicans*)

C. albicans es un microorganismo eucarionte con capacidad extraordinaria para adaptarse a diferentes condiciones ambientales. Esta propiedad permite el doble estilo de vida de *C. albicans* tanto como comensal y oportunista patógeno para humanos y otros mamíferos. Esta dualidad tiene una correspondencia morfológica en la capacidad de *C. albicans* para someterse a un cambio morfogenético de una célula de levadura típica redonda-ovoide (Y) a un micelio, organismo en crecimiento (H) (Figura 4). Esta transición es de gran

importancia para la patogenicidad de *C. albicans*. Hay suficiente evidencia de que la forma “Y” está predominantemente asociada con el comensalismo, mientras que la forma “H” está asociada con la patogenicidad. En la forma “Y” de *C. albicans* se puede encontrar en el intestino y la vagina en sujetos sanos asintomáticos, mientras que la forma “H” se encuentra invariablemente en muestras patológicas obtenidas de tejidos invadidos, incluidos los de mujeres con candidiasis vulvovaginal o candidiasis vulvovaginal recurrente (Cassone, 2015).

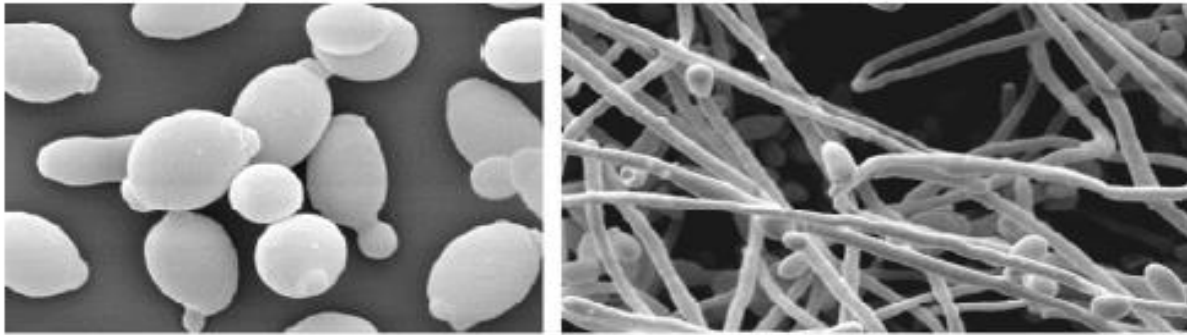


Figura 4. Micrografías electrónicas de *C. albicans*
Levadura forma “Y” (Imagen izquierda) y Micelio forma “H” (Imagen derecha)
[Tomada de Cassone, 2015]

2.4. Clotrimazol (CLOT)

Es un antimicótico de uso generalizado para el tratamiento de *C. albicans* y otras infecciones fúngicas, sus propiedades antimicóticas fueron descubiertos a finales de los años sesenta (Figura 5), además de su actividad antimicótica, se utiliza en el tratamiento de la tricomoniasis resistente al metronidazol y para aliviar los síntomas contra ciertas bacterias Gram-positivas (Crowley y Gallagher, 2014).

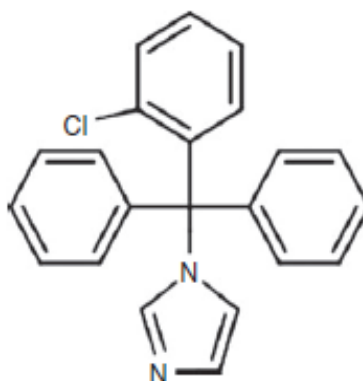


Figura 5. Estructura química del CLOT
(1-[(2-clorofenil)Difenilmetil]-1H-imidazol)
[Tomada de Crowley & Gallagher, 2014]

2.4.1. Propiedades fisicoquímicas

Dentro de las principales características fisicoquímicas del CLOT (Tabla 1), destaca la pobre solubilidad acuosa y alta lipofilia. Estudios de preformulación indican que el CLOT tiene buena solubilidad en disolventes como etanol, además presenta una solubilidad mejorada en pH ácido y una alta lipofilia indicativo de una buena permeabilidad pasiva (Borhade, Pathak, Sharma, & Patravale, 2012).

Tabla 1. Propiedades fisicoquímicas del CLOT

Propiedad	Valor
Peso molecular	344.8 g/mol
Log P	6.30
pKa's	4.7 y 6.2
Naturaleza	Base débil
Intervalo de punto de fusión	141-145 °C
Solubilidad en agua	0.49 µg/ml

2.4.2. Actividad antimicótica

Todos los antimicóticos de tipo azol interfieren con la biosíntesis de ergosterol, que es un componente importante de la membrana citoplasmática de hongos. Específicamente, los azoles, incluyendo el CLOT que inhiben el citocromo microsomal P450 (CYP450), evento dependiente de la enzima 14- α -desmetilasa, responsable de la conversión de lanosterol a 4,4-dimetil-ergostetanol (Figura 6), que es un paso vital en la biosíntesis de ergosterol para los hongos, el resultante agotamiento del ergosterol y su sustitución por la especie de esterol aberrante, 14- α -metilesterol, perturba la permeabilidad de la membrana y su fluidez. Estos efectos incluyen actividad disminuida de las enzimas unidas a la membrana que participan en la síntesis de la pared celular, aumentando la fuga de la pared celular y del contenido celular (Crowley & Gallagher, 2014).

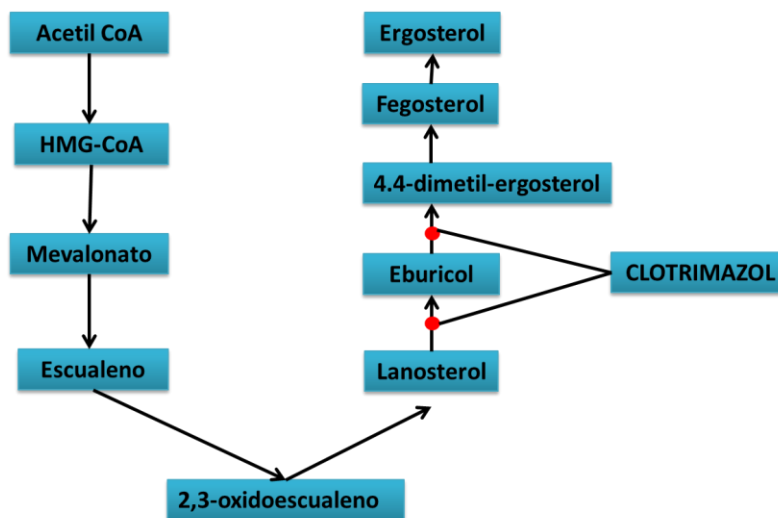


Figura 6. Esquema del mecanismo de acción de CLOT
[Modificada de Crowley & Gallagher, 2014]

2.5. Microemulsiones (MEs)

Son dispersiones de “aceite en agua” o “agua en aceite” estabilizadas por un tensoactivo puro o mezclas de ellos (co-tensoactivo), estos últimos son generalmente alcoholes de cadena corta, que se requieren para disminuir la tensión interfacial del aceite-agua por medio de su adsorción interfacial, dando como resultado MEs isotrópicas, de baja viscosidad y termodinámicamente estables, su tamaño de glóbulo promedio se encuentra en el rango de 5–100 nm (Moulik & Paul, 1998).

2.6. Componentes de las MEs

Una ME es un sistema heterogéneo constituido por dos fases inmiscibles, una fase acuosa y una fase oleosa, con la presencia de sustancias anfifílicas como los tensoactivos y co-tensoactivos, los cuales pueden ser de diferentes naturalezas.

2.6.1. Fase acuosa

La fase acuosa puede contener un cierto número de sustancias hidrófilas como glicoles, azúcares, sales minerales y orgánicas, mezclas disolventes hidrófilos y disoluciones amortiguadoras (Álvarez, 2008).

2.6.2. Fase oleosa

La fase oleosa constituye un componente fundamental en las MEs, los aceites y aceites esenciales derivados de fuentes naturales son utilizados principalmente como fase oleosa en la ME. Estos se consideran seguros y biocompatibles; sin embargo, los derivados semisintéticos de los aceites naturales son, en su mayoría, aún explorados como fase

oleosa. Químicamente, los aceites son ácidos grasos insaturados o derivados de ésteres poligliceridos de ácidos grasos en estado líquido.

La fase oleosa para una ME tópica, no debe de ser tóxica, irritante y mucho menos tener efecto terapéutico. Considerando que los aceites esenciales son emolientes, tienen aroma y efecto de suavidad sobre la piel, se utilizan con frecuencia como vehículos en las MEs.

Por otra parte, en la selección del aceite también se deben tener en cuenta ciertos criterios que dependen de las características fisicoquímicas del aceite, como el aumento de la solubilidad del fármaco, la velocidad de penetración del fármaco a través de la piel y la miscibilidad mutua entre tensoactivo y co-tensoactivo (Singh et al., 2014).

2.6.2.1. Miristato de isopropilo (MIP)

El MIP es un líquido transparente, incoloro, prácticamente inodoro de baja viscosidad (5–7 cP) que se congela a aproximadamente 5° C. Consiste en ésteres de alcohol isopropílico y ácidos grasos saturados de alto peso molecular, principalmente ácido mirístico (Figura 7). Es soluble en acetona, cloroformo, etanol (95 %), acetato de etilo, grasas, alcoholes grasos, tolueno y ceras; y es prácticamente insoluble en glicerina, glicoles y agua.

El MIP es un emoliente no graso que se absorbe fácilmente por la piel. Se usa como un componente de bases semisólidas y como disolvente para muchas sustancias aplicadas por vía tópica. Se usa en formulaciones cosméticas y farmacéuticas tópicas como: aceites de baño, maquillaje, productos para el cuidado del cabello y las uñas; cremas, lociones,

productos labiales, productos de afeitado, lubricantes para la piel, desodorantes, suspensiones óticas, y cremas vaginales.

Es un excelente potenciador de penetración para formulaciones transdérmicas y MEs. También ha sido utilizado en microesferas, para aumentar significativamente la liberación del fármaco que contengan. (Rowe, Sheskey & Quinn ,2009).

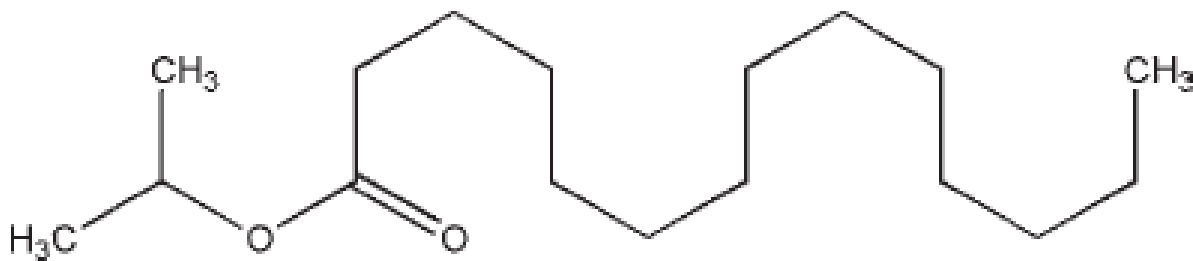


Figura 7. Estructura química del MIP
[Tomada de Rowe, Sheskey & Quinn ,2009]

2.6.3. Tensioactivos

Son compuestos que se utilizan para bajar la tensión superficial o interfacial. Tienen una afinidad por los disolventes polares y no polares. Son moléculas que contienen una cabeza polar y una cola no polar. Las moléculas tensioactivas se autoasocian debido a diversas fuerzas inter e intramoleculares, así como a consideraciones de entropía cuando se dispersan en agua.

Por ejemplo, cuando el tensioactivo se mezcla con aceite y agua, se acumulan en la interfaz aceite/agua, ya que es termodinámicamente favorable. Las moléculas de tensioactivo pueden organizarse en una variedad de formas. Pueden formar micelas

esféricas, fases hexagonales, fases lamelares, micelas en forma de varilla, micelas inversas o micelas inversas hexagonales (Figura 8) (Lawrence & Rees, 2012).

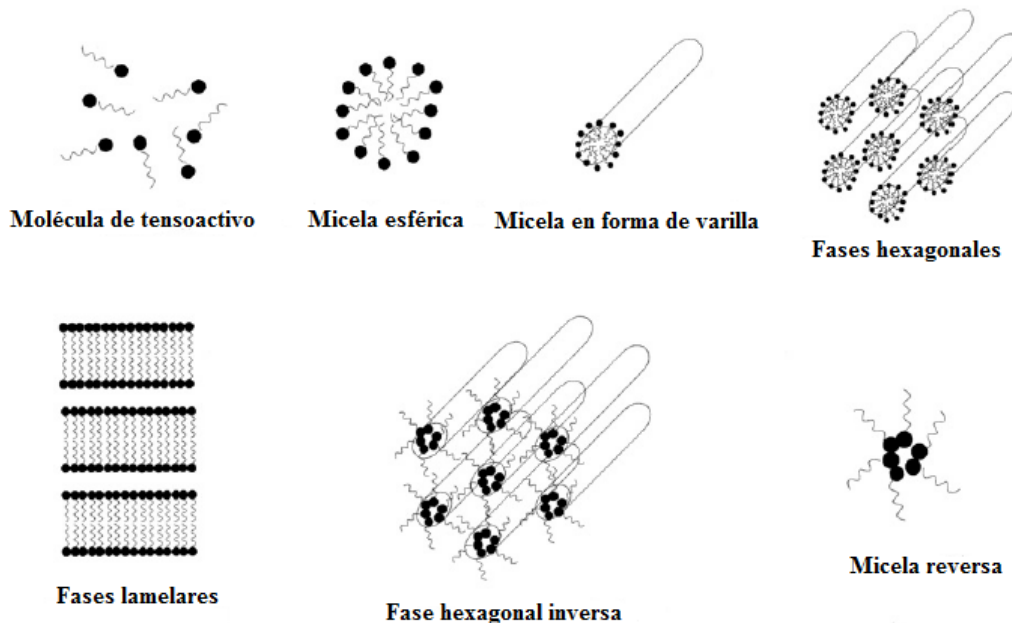


Figura 8. Organización de las moléculas de tensoactivo en dispersión [Modificada de Lawrence & Rees, 2012]

Los tensoactivos se pueden clasificar de acuerdo a su naturaleza molecular en tensoactivos catiónicos, aniónicos, anfóteros o zwitteriónicos y no iónicos.

2.6.3.1. Tensoactivos catiónicos

Son moléculas que cuando entran en contacto con el agua, forman el catión anfifílico y una forma aniónica que la mayoría de las veces es un halógeno. Una gran cantidad de esta clase de tensoactivos se asemeja a compuestos de nitrógeno como amonio cuaternario y sales de amina grasa, con una o varias cadenas largas del tipo alquilo, que a menudo provienen de ácidos grasos naturales (Mehta, Rathod, Mehta, Rathod, & Shah, 2015).

2.6.3.2. Tensoactivos aniónicos

Cuando los tensoactivos aniónicos se disocian en agua forman un anión anfifílico y un catión, que es generalmente un metal alcalino (Na^+ , K^+) o un amonio cuaternario. La carga aniónica en estos tensoactivos proviene de grupos ionizables como el grupo carboxilo. Estos son el tipo de agentes tensoactivos más conocidos en lo que respecta a su forma y función. Los tres grupos aniónicos más importantes en todos estos tensoactivos son los grupos carboxilato, sulfonato y sulfato (Mehta et al., 2015).

2.6.3.3. Tensoactivos anfóteros o zwitteriónicos

Son una especie de combinación entre los tensoactivos aniónicos y catiónicos. Es decir son sustancias que presentan en sus moléculas grupos aniónicos y catiónicos, que en su aplicación pueden según el medio de trabajo proporcionar ciertas características químicas y físicas, actuando en medio básico como aniónicos y en medio ácido como catiónicos (Álvarez, 2008).

2.6.3.4. Tensoactivos no iónicos

Los tensoactivos no iónicos se estabilizan mediante interacciones de dipolo y enlace de hidrógeno con la capa de hidratación del agua en su superficie hidrofílica. No se ionizan en solución acuosa, ya que su grupo hidrófilo es de tipo no dissociable, como fenol, alcohol, éster o amida. El ejemplo más característico de estos tensoactivos, son los compuestos que presentan cadenas polioxietilénicas (Mehta et al., 2015).

2.6.3.4.1. Tween[®] 80

Conocido como monooleato de polioxietilen sorbitano o polisorbato 80 (Figura 9), es un líquido aceitoso color amarillo. La columna vertebral es una estructura de anillo sorbitán con polímeros de óxido de etileno en tres diferentes posiciones en las que se ubican los grupos hidroxilo, las fracciones de los ácido oleico se adjuntan a la molécula del tensoactivo a través de un enlace éster con el oxígeno del óxido de etileno en posición z. Es un tensoactivo hidrofílico no iónico con un valor de HLB de 15, se usa ampliamente como agente emulsionante en la preparación de emulsiones farmacéuticas aceite en agua. También se pueden usar como agente solubilizante para una variedad de sustancias, incluidos aceites esenciales y vitaminas solubles en aceite, y agentes humectantes en la formulación de suspensiones orales y parenterales. (Rowe, Sheskey & Quinn ,2009).

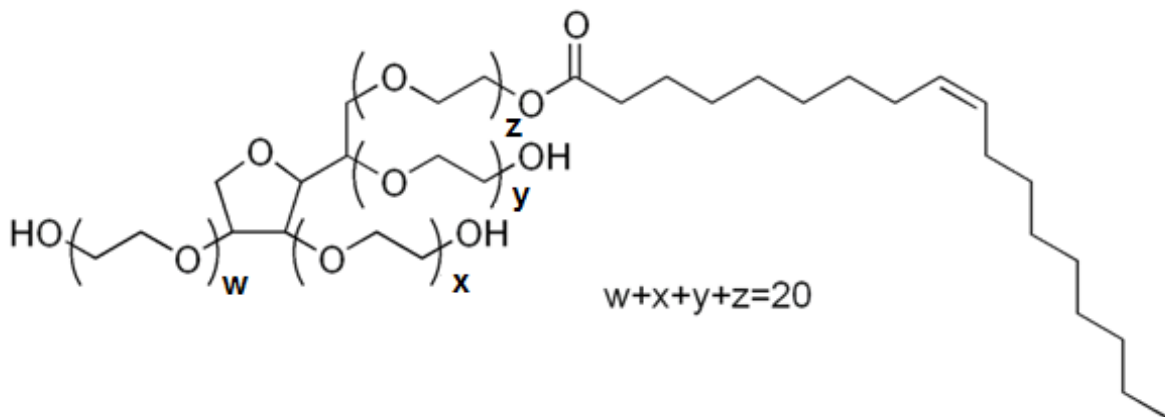


Figura 9. Estructura química del Tween[®] 80
[Tomada de Rowe, Sheskey & Quinn, 2009]

2.6.4. Co-tensoactivo

En la mayoría de los casos, los tensoactivos de cadena simple son incapaces de reducir la tensión interfacial aceite/agua lo suficiente como para formar una ME, debido a su naturaleza anfifílica, pero con la adición de un co-tensoactivo el cual se acumula en la interfase, provocando un aumento en la fluidez de la película interfacial al penetrar en la capa de tensoactivo.

Los alcoholes de cadena corta o media, generalmente se agregan como co-tensoactivos, entre los alcoholes de cadena corta, se puede utilizar el etanol por ser un potenciador de la permeabilización. En alcoholes de cadena media se usa 1- butanol y glicoles tales como propilenglicol, aminas o ácidos (Saini, Nautiyal, Kumar, Singh, & Anwar, 2014).

2.7. Teorías de formación de las MEs

Se han desarrollado tres diferentes teorías para explicar la formación de MEs; la interfacial, el enfoque termodinámico y la teoría de solubilización. En general, termodinámicamente es importante considerar que el área interfacial de una ME es muy grande, debido a los numerosos glóbulos pequeños que se forman. Estos sistemas termodinámicamente estables se forman espontáneamente por el bajo valor de la tensión superficial debido a la difusión de tensoactivo en la capa interfacial, pero no puede ser realizado por un solo tensoactivo, y al adicionar un co-tensoactivo anfifílico este penetra en la capa interfacial aumentando la curvatura y fluidez de la película de tensoactivos (Bonacucina, Cespi, Misici-Falzi, & Palmieri, 2009).

2.7.1. Teoría interfacial

Según esta teoría, la ME se forma instantáneamente cuando se genera una tensión interfacial negativa con el trabajo conjunto del tensoactivo y el co-tensoactivo formando una película que se considera como un líquido capaz de estar en equilibrio con el agua y el aceite. De acuerdo con la película dúplex la tensión interfacial viene dada por la siguiente expresión:

$$\gamma_T = \gamma(O/W)$$

Dónde:

γ = Tensión interfacial

T = Temperatura

$\gamma(O/W)$ = Tensión interfacial entre el aceite y agua

$\gamma(O/W)_a$ = Tensión Interfacial (reducida por la presencia del alcohol).

Por lo tanto:

$\gamma(O/W)_a$ es significativamente menor que $\gamma(O/W)$ con la ausencia del alcohol (Singh, Kashif Iqbal, Shukla, & Shuaib, 2014).

2.7.2. Teoría termodinámica

La formulación y estabilidad de la ME puede ser expresada sobre la base de un mecanismo termodinámico.

La energía libre de formación de la ME puede depender del grado en que el tensoactivo baja la tensión de la interfaz aceite-agua y el cambio en la entropía del sistema:

$$\Delta G_f = \gamma \Delta A - T \Delta S$$

Dónde:

ΔG_f = Energía libre de formación

γ = Tensión superficial de la interfase aceite-agua

ΔA = Cambio en el área interfacial en la microemulsificación,

ΔS = Cambio de entropía del sistema que es efectivamente la entropía de dispersión.

T = Temperatura

Se ha encontrado que cuando se forma una ME el ΔA cambia en gran medida debido al gran número de pequeños glóbulos formados. Mientras que el valor de γ es positivo en todo momento y muy pequeño pero es compensada por la entropía de los componentes. La entropía de dispersión es muy grande derivada de la mezcla de una fase en la otra en forma de grandes cantidades de pequeños glóbulos, sin embargo, contribuciones entrópicas favorables también proceden de otros procesos dinámicos como monómero-micela y la difusión del tensoactivo en la capa interfacial. Cuando hay grandes reducciones de la tensión superficial se da un cambio entrópico significativamente favorable, en este caso la ME se forma espontáneamente y la dispersión es termodinámicamente estable (Figura 10) (Lawrence & Rees, 2012).

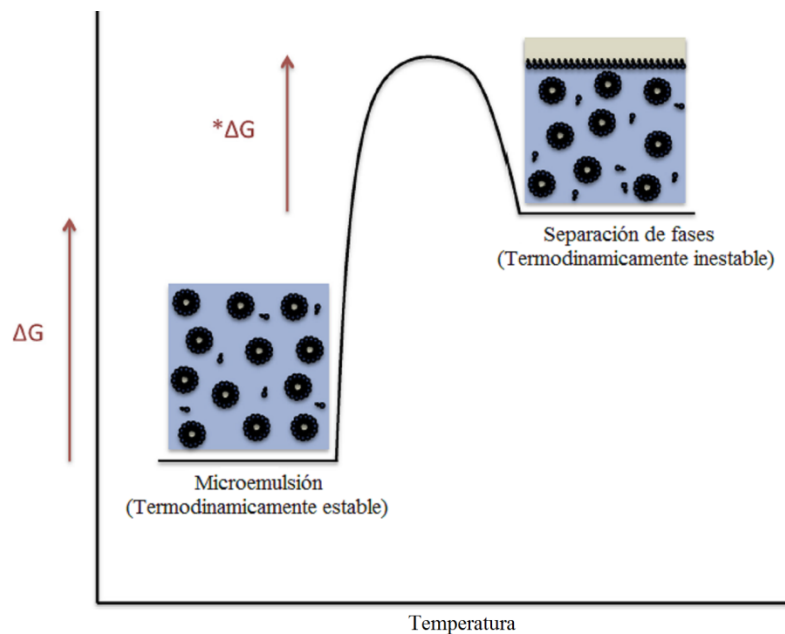


Figura 10. Esquema de la energía involucrada en un sistema de ME
 Una ME tiene un estado de energía más bajo que el de su producto separado (fases o componentes) esto contribuye a su estabilidad termodinámica. [Modificada de Callendera, Mathews, Kobernyka & Wettiga, 2017]

2.7.3. Teoría de la solubilización

Se forma la ME con la solubilización de la fase oleosa y la fase acuosa por micelas o micelas reversas resultando un rango de tamaño que aumenta gradualmente conforme se hinchan (Singh et al., 2014).

2.8. Tipos de MEs

Según la clasificación de Winsor, puede haber cuatro tipos de MEs también se denominan fases Winsor (Figura 11) y son:

1. MEs aceite en agua (o/w) o Winsor I

En el tipo de MEs aceite en agua, glóbulos de aceite están rodeadas por un tensoactivo y co-tensoactivo que forman la fase interna distribuidas en la fase continua de agua, o/w (por sus siglas en inglés).

2. ME agua-en-aceite (w/o) o Winsor II

En este tipo de MEs hay glóbulos de agua distribuidas en una fase continua de aceite (w/o). Son sistemas también conocidos como "micelas reversas", donde los grupos de cabeza polares del tensoactivo se enfrentan con los glóbulos de agua y las colas de ácidos grasos quedan mirando hacia la fase de aceite.

3. ME bicontinua o Winsor III

En el sistema de ME bicontinua, la cantidad de agua y aceite presentes son similares, en este caso, tanto el agua como el aceite existen como una fase continua. Un canal irregular de aceite y agua se combinan. Transiciones de w/o a o/w pasan por el estado bicontinuo. La ME bicontinua, puede mostrar un flujo y una plasticidad no newtonianos, estas propiedades las hacen especialmente útiles para la administración tópica de fármacos o por vía de administración intravenosa.

4. Mezcla homogénea monofásica o Winsor IV

Es una mezcla homogénea monofásica de aceite, agua y los tensoactivos al ser mezclados (Singh et al., 2014).

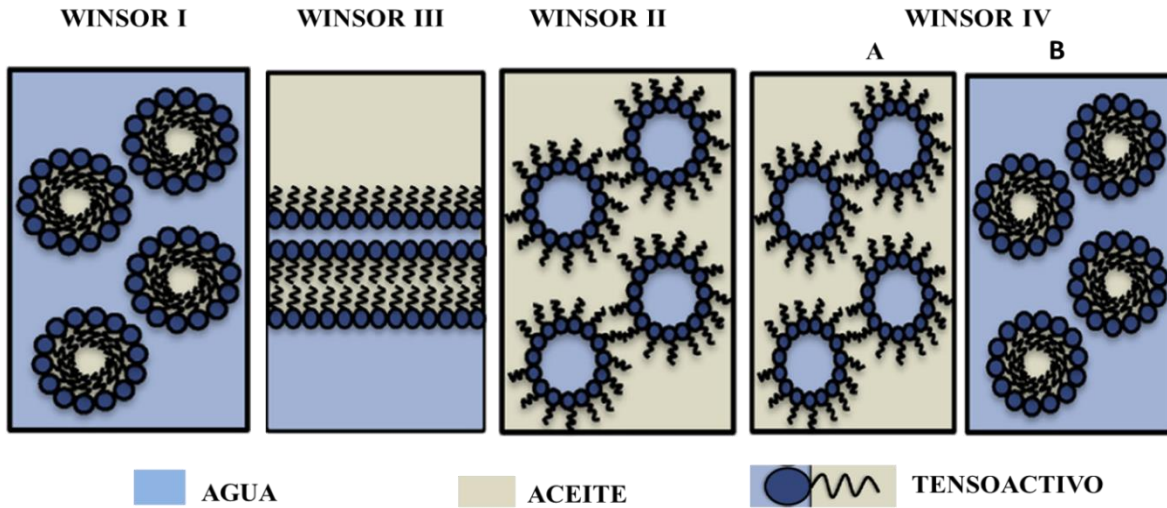


Figura 11. Clasificación de MEs según Winsor
[Modificada de Moulik & Paul, 1998]

2.9. Comportamiento de fase

Las fases de los sistemas de ME simples que comprenden aceite, agua y tensoactivo, se pueden estudiar con la ayuda de un diagrama ternario de fases en el que cada esquina del diagrama representa el 100 % de un componente particular; sin embargo, en el caso de MEs de aplicaciones farmacéuticas, la ME contendrá componentes adicionales tales como un co-tensoactivo y/o fármaco. El co-tensoactivo es también un anfifilo con una afinidad tanto para el aceite como para las fases acuosas y las particiones en la monocapa interfacial presente en el tensoactivo. En el caso donde se investigan cuatro o más componentes, se utilizan diagramas de fase pseudo-ternarios donde una esquina normalmente representa una mezcla binaria de dos componentes (figura 12). Cabe señalar que no todas las combinaciones de componentes producen MEs en todo el rango de posibles composiciones, en algunos casos la extensión de la formación de MEs puede ser

muy limitada. La construcción de diagramas de fase lleva mucho tiempo pero el objetivo es delinear con precisión un límite de fase.

El procedimiento más empleado es preparar una serie de (Pseudo) composiciones binarias y titular con el tercer componente, evaluando la mezcla después de cada adición, se hacen observaciones visuales sobre los sistemas, sin embargo el tiempo impone un límite físico sobre los sistemas y en consecuencia, la eliminación de estados metaestables puede ser difícil de asegurar.

Fuera de la región de microemulsión, particularmente para composiciones cerca del eje binario aceite-agua, no hay suficiente tensoactivo para facilitar la formación de una sola fase de ME en este caso pueden existir múltiples fases, cuya complejidad aumenta con el número de componentes en la mezcla, dentro de esta región, y de hecho, otras regiones multifásicas del diagrama de fases ternario, las MEs pueden existir en equilibrio con el exceso de agua o fases oleosas, estos sistemas multifásicos se pueden describir convenientemente usando la clasificación de Winsor (Lawrence & Rees, 2012).

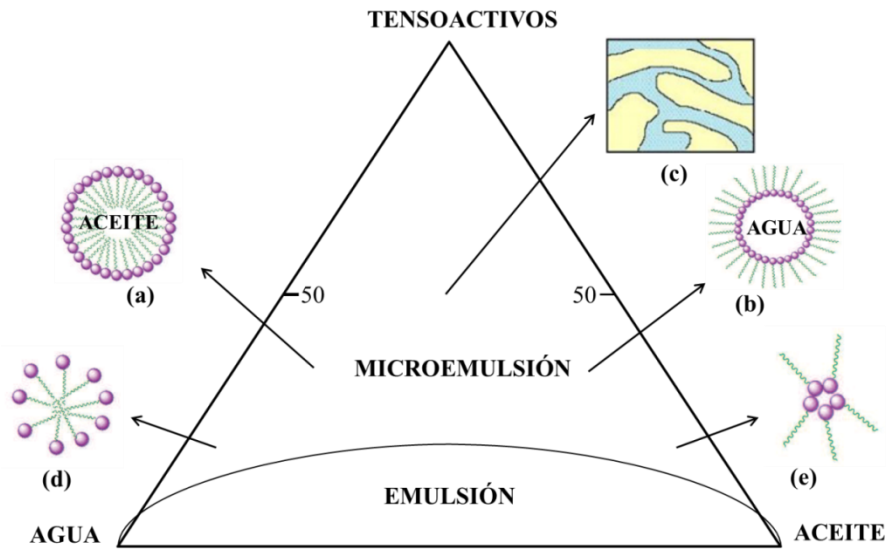


Figura 12. Diagrama pseudoternario
a) ME o/w, b) ME w/o, c) ME bicontinua d) Micelas normales, e) Micelas reversas.
[Modificada de Lawrence & Rees, 2012]

III OBJETIVOS

3.1. General

Preparar y caracterizar una ME para la administración vaginal de CLOT, haciendo uso de excipientes biocompatibles con el fin de obtener un sistema submicrónico estable, que mejore la eficacia y el tiempo de residencia del fármaco en la zona afectada.

3.2. Particulares

1. Preparar MEs de CLOT para vía de administración vaginal mediante la elaboración de un diagrama pseudoternario.
2. Delimitar cada una de las zonas del diagrama pseudoternario para identificar el área de formación de MEs.
3. Caracterizar las MEs de acuerdo a la capacidad de carga de CLOT, distribución de tamaño de glóbulo, conductividad eléctrica y viscosidad.
4. Llevar a cabo los perfiles de liberación *in vitro* de las MEs utilizando bolsas de diálisis de membrana de celulosa y fluido vaginal simulado (FVS pH 4.2) como medio de disolución.
5. Determinar el tiempo de residencia de las MEs mediante pruebas de bioadhesión, usando como modelo biológico tejido vaginal porcino.
6. Implementar métodos analíticos espectrofotométricos para la cuantificación del fármaco.

IV PARTE EXPERIMENTAL

4.1. Materiales y reactivos

- CLOT (Sigma-Aldrich[®])
- MIP (Droguería Cosmopolita, S.A. de C.V.)
- Tween[®] 80 (Droguería Cosmopolita, S.A. de C.V.)
- Tween[®] 20 (Droguería Cosmopolita, S.A. de C.V.)
- Alcohol etílico (REASOL[®])
- 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 (FERMONT, 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.)
- Hidróxido de sodio (Droguería Cosmopolita, S.A. de C.V.)
- Membrana de celulosa para diálisis (Sigma-Aldrich[®])
- Agua desionizada

4.2. Material biológico

- Vagina de cerda sin tratamiento térmico obtenido del rastro Nueva Distribuidora de porcino TIF 194, ubicado en Av. Adolfo López Mateos N° 39 San Lorenzo Riotenco, Cuautitlán Izcalli, Estado de México.

4.3. Instrumentos y equipos

- Balanza analítica (VELAB VE-204, Estados Unidos)
- Agitador magnético (WiseStir[®], Corea del sur)
- Micropipeta eppendorf (Multipette[®] M4, Alemania)
- Zetasizer Nano series (ZS90 Malvern, Inglaterra)
- Conductímetro (Hanna Instruments, Estados Unidos)
- Viscosímetro (DV3TLV, Brookfield, Estados Unidos) con cámara para medir viscosidad de muestras pequeñas (SC4-18)
- Baño Dubnoff (Digital microprocesal, Brasil)
- Espectrofotómetro UV-Vis (Genesys 10S UV/VIS, Estados Unidos)
- Desintegrador de tabletas (Pharmaceutical Machinery, China)
- Estructura de metal con inclinación de 45°
- Cronómetro
- Material de cristalería diverso

4.4. Metodología

4.4.1. Construcción del diagrama pseudoternario.

Se llevó a cabo mediante la técnica de titulación con agua, haciendo adiciones sucesivas de 50 μ l de agua desionizada, a frascos que contenían diferentes proporciones de MIP y una mezcla de Tw[®] 80/Et (2:1), bajo agitación magnética constante, seguida de un periodo de reposo de 5 minutos tras cada adición. La titulación con agua se detuvo al observar turbidez en el sistema o bien, separación de fases, los sistemas que tuvieron una apariencia traslúcida fueron considerados como MEs (Figura 13). Se determinó la proporción de cada uno de los componentes y fueron ubicados dentro del diagrama pseudoternario para la delimitación de la zona de formación de ME.

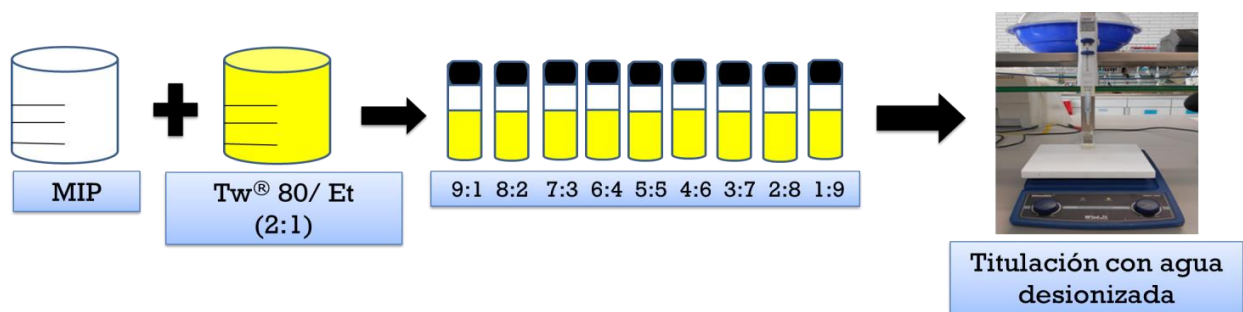


Figura 13. Preparación de las MEs

Una vez delimitado el diagrama pseudoternario se seleccionaron tres MEs de la zona de formación de ME, considerando que el sistema no incluyera más del 60% de la mezcla de tensoactivo/co-tensoactivo y que tuviera la mayor cantidad posible de fase oleosa, a estas MEs se les realizó la caracterización, de capacidad de carga de CLOT, tamaño de glóbulo, conductividad eléctrica, viscosidad, estudios de liberación *in vitro* y pruebas de

bioadhesión, la metodología de estas pruebas son descritas en las secciones 4.4.2 a la 4.4.7.

4.4.2. Capacidad de carga de CLOT

Para estimar la máxima capacidad de carga de CLOT en las MEs, se hicieron adiciones sucesivas de 5 mg de CLOT a cada una de las MEs seleccionadas. Los sistemas se mantuvieron con agitación magnética constante tras cada adición, hasta disolver el fármaco. La adición de CLOT se detuvo al observar turbidez o precipitados en el fondo del frasco que contenía la ME (Figura 14).



Figura 14. Capacidad de carga de CLOT en la ME.

4.4.3. Tamaño de glóbulo.

Se determinó el tamaño de glóbulo tomando una pequeña muestra de la ME y depositándola en una celda de vidrio que se introdujo en el Zetasizer ZS-90 Malvern para su análisis. Las condiciones del análisis fueron: ángulo de incidencia de 90°, temperatura de 25 °C y se determinaron 11 corridas para cada una de las tres réplicas analizadas. El equipo utilizado se muestra en la figura 15.



Figura 15. Equipo Zetasizer

4.4.4. Conductividad eléctrica

Se llevó a cabo utilizando el conductímetro Hanna Instruments, introduciendo el electrodo en la ME (Figura 16). Se registró una lectura inicial en la ME recién formada y para evaluar cómo se modificaba este parámetro por la captación de agua adicional que pudiera alterar la estructura de la ME, se hicieron adiciones sucesivas de 50 μl de agua desionizada, agitando el sistema y tomando la lectura de conductividad después de cada adición. Se consideró como la conductividad final del sistema, la lectura obtenida justo antes de observar turbidez o separación de fases.

Posteriormente se cargaron las MEs con CLOT de acuerdo a la cantidad máxima que pueden soportar y se midió solo la conductividad inicial de cada una de las MEs.



Figura 16. Conductímetro

4.4.5. Viscosidad

Se determinó con un viscosímetro rotativo marca Brookfield modelo DV3TLV con cámara para medir viscosidad de muestras pequeñas (SC4-18) para volúmenes de 6.7 ml, se utilizaron agujas del N° 18 y 16 dependiendo de la fluidez de cada ME, posteriormente se seleccionó la velocidad óptima para medir la viscosidad de cada ME de acuerdo a las especificaciones del viscosímetro (Figura 17). Las mediciones se hicieron por triplicado a 37° C, se determinaron dos valores de viscosidad; el primero (Viscosidad inicial) para las tres MEs seleccionadas en el punto 4.4.1, justo después del momento en que fueron preparadas. El segundo valor de viscosidad (Viscosidad final) se registró para las tres MEs con la máxima cantidad de agua que soporta cada sistema antes de romperse.

También se determinó la viscosidad de las MEs cargadas con CLOT, una vez determinada la capacidad de carga obtenida en la sección 4.4.2.



Figura 17. Viscosímetro Brookfield

4.4.6. Estudios de liberación *in vitro*

Se usaron bolsas de diálisis de membrana de celulosa, a las cuales se les adicionó 1 ml de ME que contenía 10 mg de CLOT, fueron colocadas dentro de un vial de centelleo de 40 ml y puestas en contacto directo con 35 ml de FVS/Tw[®] 20 3 % pH 4.2. Los viales se mantuvieron dentro de un baño Dubnoff a 37° C con agitación horizontal constante (Figura 18).

Se tomaron muestras de 3 ml a las 0.25, 0.5, 1, 2, 3, 4, 6, 8 y 24 horas, reponiendo con FVS/Tw[®] 20 3% pH 4.2 fresco, tras cada toma de muestra. Las alícuotas fueron analizadas en un espectrofotómetro UV-Vis (Genesys 10S UV/VIS) y posteriormente se determinó la cantidad de CLOT liberado como se muestra en el anexo 3.

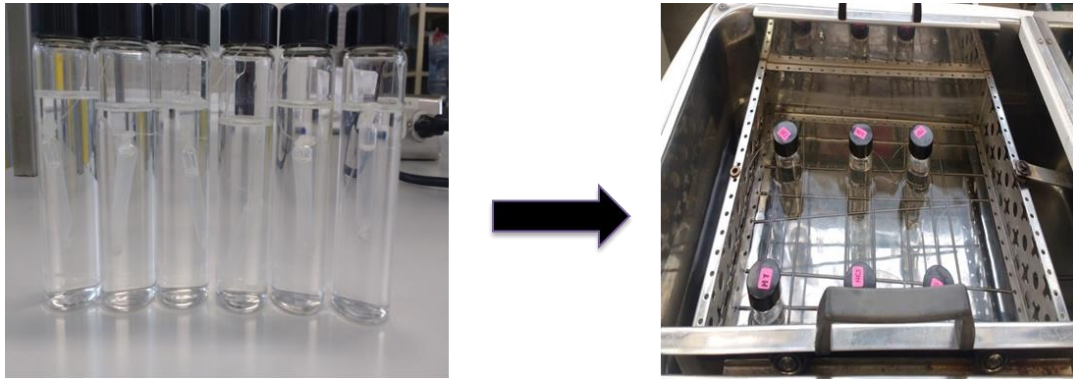


Figura 18. Liberación de CLOT

4.4.7. Pruebas de bioadhesión

Los tiempos de residencia de la ME se determinaron *ex vivo* utilizando tejido vaginal porcino, mediante la modificación de dos métodos de bioadhesión previamente reportados: el método 1 desarrollado por Nakamura Ohta Machida & Nagai (1996) y el método 2 modificado y desarrollado por Bachhav & Patravale (2009).

4.4.7.1. Método 1

Se utilizó una estructura de acero inoxidable para colocar el tejido vaginal porcino con una inclinación de 45° la cual se introdujo en un recipiente de vidrio en contacto directo con FVS pH 4.2 (Figura 19); Sobre el tejido fijado en la estructura, se colocó una muestra de 0.5 ml de ME y se midió el tiempo que tardó en desplazarse 5 cm a partir del punto de colocación inicial. La ME fue teñida con un colorante hidrosoluble únicamente para facilitar su visualización durante la prueba.

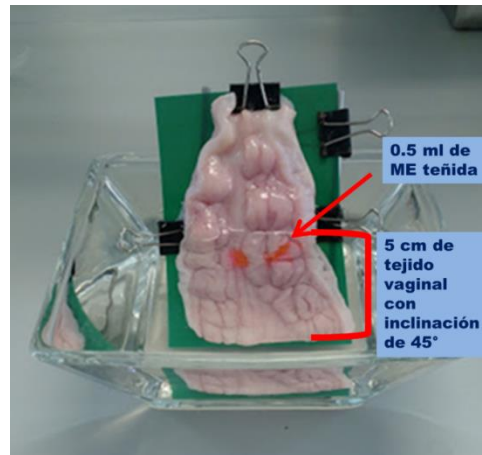


Figura 19. Prueba de bioadhesión, método 1.

4.4.7.2. Método 2

Se utilizó un aparato desintegrador de tabletas (Figura 20), en el que fue adaptada una placa de acero inoxidable para sujetar 4 cm² de tejido vaginal porcino. Se colocó 1 ml de ME teñida de color anaranjado sobre el tejido en posición horizontal durante 1 minuto, posteriormente se colocó verticalmente en el desintegrador, se sumergió en FVS pH 4.2, haciendo funcionar el equipo, sometiendo la ME a movimientos constantes de arriba hacia abajo, se midió el tiempo que tardó la ME en desprenderse por completo del tejido vaginal porcino.

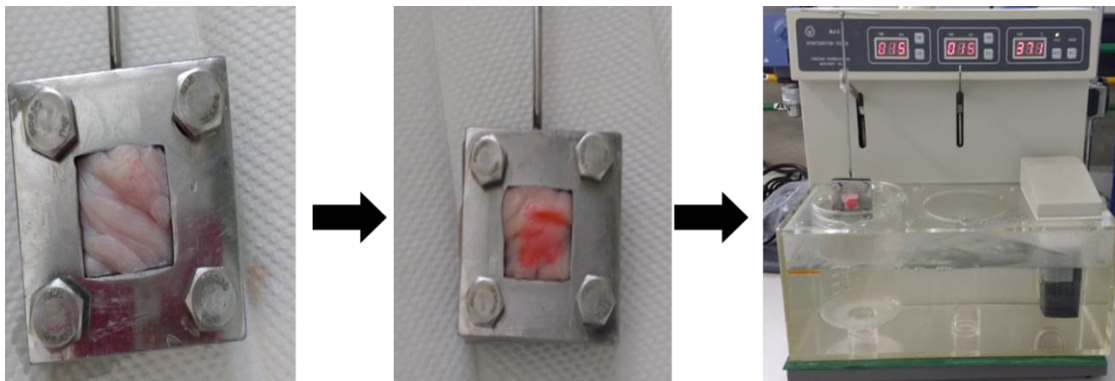


Figura 20. Prueba de bioadhesión, método 2.

V RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Construcción del diagrama pseudo-ternario.

Teniendo en consideración los componentes de la ME previamente seleccionados: Agua, MIP y Tw[®] 80/ Et (2:1) (García, 2017), se llevó a cabo la elaboración de un diagrama pseudoternario. Éste tiene una forma de triángulo equilátero cada uno de sus vértices representa el 100 % de los componentes, disminuyendo hasta 0 % hacia el vértice opuesto, como se muestra en la Figura 21, donde la zona sombreada representa la zona de formación de ME, los puntos unidos con líneas simbolizan la composición final de los sistemas que se titularon con agua desionizada y delimitan el área donde fue factible la obtención de MEs.

Se seleccionaron tres MEs, las cuales se encuentran señaladas con un punto rojo dentro del diagrama (Figura 21), se eligieron con la finalidad de obtener un sistema con no más del 60 % de la mezcla de tensoactivo, co-tensoactivo y con una mayor cantidad de MIP en la cual el CLOT es soluble; además de una mayor robustez basada en la posibilidad de captar la mayor cantidad de agua sin comprometer la estabilidad física de la ME y salir de la zona de formación de MEs. La formulación de las MEs seleccionadas quedó constituida de acuerdo con la Tabla 2, obteniendo MEs translúcidas de color amarillo como se muestra en la Figura 22.

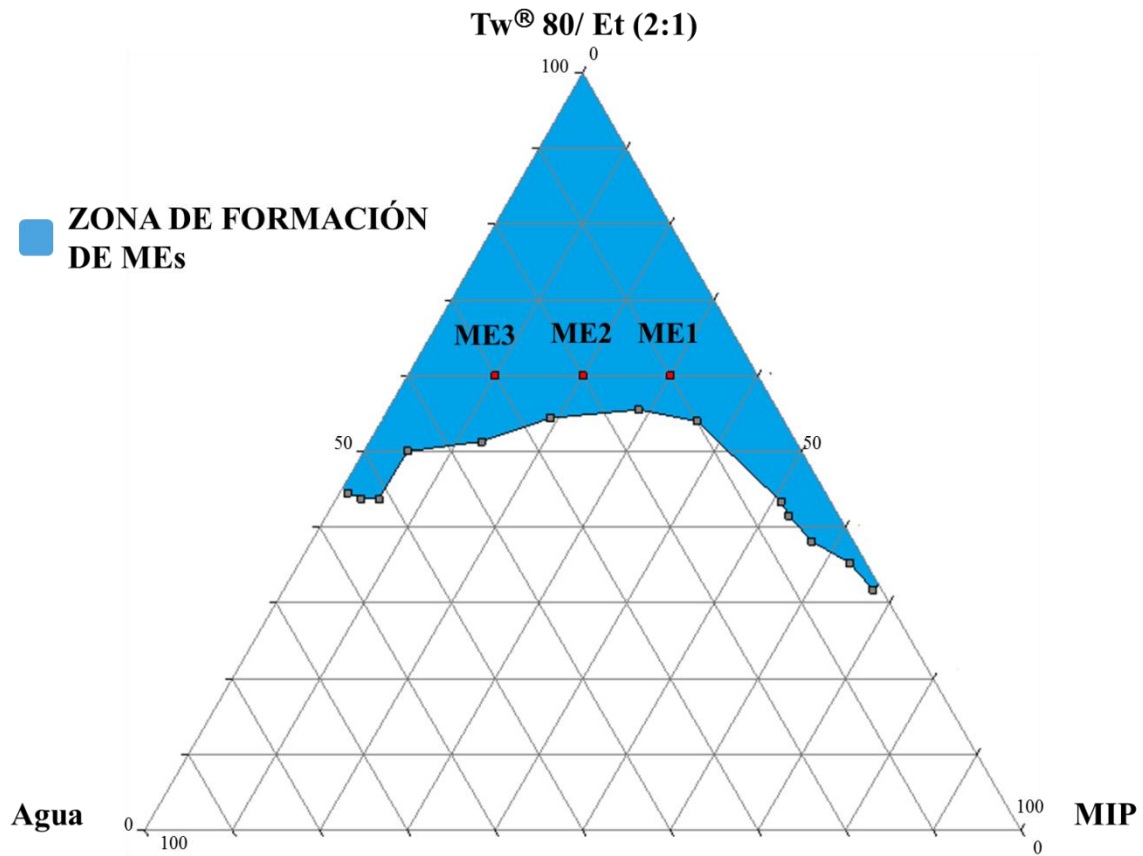


Figura 21. Diagrama pseudoternario delimitado

Tabla 2. Formulación de las MEs seleccionadas.

Componente	ME1	ME2	ME3
Agua	10%	20%	30%
MIP	30 %	20%	10%
Tw® 80/Et (2:1)	60%	60%	60%



Figura 22. MEs seleccionadas

Por otra parte, la selección del MIP como fase oleosa fue debida a la solubilidad que presentó el CLOT de acuerdo con las pruebas realizadas por García (2017) en nuestro grupo de investigación. Además de que es un aceite utilizado frecuentemente en formulaciones cosméticas y farmacéuticas, por ser considerado como ingrediente inactivo según la base de datos de la FDA (Rowe, 2009). Y en un estudio realizado por Hashem, Shaker, Ghorab, Nasr, & Ismail (2011) la solubilidad del CLOT en MIP, para formular una ME de administración tópica de CLOT, fue de 10.11 mg/g.

La elección del Tween[®] 80 como tensoactivo y etanol como co-tensoactivo fue determinada también por la solubilidad del CLOT en estos excipientes y de acuerdo a un estudio de preformulación de una nanoemulsión de CLOT realizado por Borhade, Pathak, Sharma, & Patravale. (2012), donde mencionaron que la selección de tensoactivos y cotensoactivos se rige principalmente por su eficiencia de emulsificación para fases oleosas y su potencial capacidad para solubilizar el CLOT, capacidad que fue evaluada por García (2017) y retomada en este trabajo de investigación. Además de ser un tensoactivo no iónico, el Tween[®] 80 es menos irritante y menos citotóxico que tensoactivos aniónicos y catiónicos (Rowe, 2009). Por último, la selección se agua se consideró debido a la zona de aplicación para la cual se de desarrollo la ME, y a que la mucosa vaginal es irrigada por un medio acuoso, buscándose un efecto local para el tratamiento de la micosis.

5.2. Capacidad de carga de CLOT

De acuerdo con los resultados mostrados en la Tabla 3, la carga de CLOT es mayor en la ME1 por el hecho de que contiene una mayor cantidad de fase oleosa (30%). Debido a que el CLOT tiene un valor de Log P de 6.3, indicando un carácter hidrófobo, es decir, que tiene menor tendencia a solubilizarse en disolventes polares como el agua, pero que es altamente soluble en disolventes orgánicos (Moffat, 2011). Por lo anterior, puede afirmarse que en las tres MEs el CLOT se encuentra disuelto en el MIP, disminuyendo la cantidad de carga de CLOT en la ME2 y ME3 por la proporción de MIP del 20% y 10% respectivamente.

Tabla 3. Capacidad de carga de CLOT en las MEs.

Sistema	Carga de CLOT mg/ml
ME1	36.14
ME2	23.22
ME3	15.39

Por otra parte, para el tratamiento de la candidiasis vulvovaginal, las formas de dosificación más comerciales son óvulos de 500 mg, 200 mg o 100 mg de CLOT, estos se administran diariamente durante 1, 3 o 6 días respectivamente, también existen cremas con dosis similares de CLOT al 1 % y 2 % (Crowley & Gallagher, 2014). Por lo tanto las MEs obtenidas pueden cargar la dosis del 1 % y 2 %, como posible tratamiento para esta micosis.

5.3. Tamaño de glóbulo

Una de las características principales de las MEs es el tamaño del glóbulo que se forma cuando la mezcla de tensoactivo y co-tensoactivo envuelven ya sea aceite o agua, según sea el caso del tipo de ME presente. Los tamaños de glóbulo van desde los 5–50 nm (Moulik & Paul, 1998) , lo que hace que las MEs se tornen traslúcidas y permitan el paso de la luz, observándose como una solución homogénea.

Los tamaños de glóbulo se determinaron de acuerdo al porcentaje de número registrado por el equipo Zetasizer (ZS90 Malvern), este parámetro muestra el resultado como una distribución numérica de los tamaños presentes en una muestra. Sin embargo, se obtuvieron índices de polidispersidad mayores a 0.5, indicando que las MEs pueden presentar agregados de diferentes tamaños, por lo tanto, para obtener un índice de polidispersidad más pequeño y la medición fuera más confiable, las especificaciones del equipo recomiendan la dilución de la muestra para una mejor medición, lo cual no es conveniente para los sistemas de ME estudiados ya que una dilución con agua cambiaría la estructura del sistema. Por lo que se realizaron diversas mediciones para determinar la tendencia de los tamaños, observándose que siempre disminuían por un aumento en el contenido de agua en las MEs, disminuyendo en el siguiente orden ME1>ME2>ME3 por un contenido de agua del 10 %, 20 % y 30 %, respectivamente. Mostrando como resultados los promedios de los tamaños en la Tabla 4 y Figuras 23-26.

Tabla 4. Tamaño de glóbulo de las MEs

Microemulsión	Tamaño (nm) Número	PDI
ME1 (w/o) ^{*1}	7.242	0.510
	5.180	0.618
	7.025	0.530
	\bar{x}	6.482
ME1 2 % CLOT (w/o) ^{*1}	6.025	0.520
	5.962	0.613
	4.043	0.640
	\bar{x}	5.343
ME2 (w/o) ^{*1}	5.660	0.678
	5.567	0.457
	6.103	0.432
	\bar{x}	5.776
ME2 2 % CLOT (w/o) ^{*1}	2.466	0.451
	1.191	0.635
	2.105	0.547
	\bar{x}	1.192
ME2 (o/w) ^{*2}	3.999	0.610
	2.075	0.530
	2.875	0.621
	\bar{x}	2.983
ME2 2 % CLOT (o/w) ^{*2}	1.311	0.765
	0.665	0.511
	0.762	0.655
	\bar{x}	0.916
ME3 (o/w) ^{*2}	1.030	0.653
	0.830	0.599
	0.930	0.539
	\bar{x}	0.930
ME3 1 % CLOT (o/w) ^{*2}	0.880	0.578
	0.630	0.593
	1.389	0.404
	\bar{x}	0.966

*1 Considerando como fase continua el MIP al hacer la medición en el Zetasizer

*2 Considerando como fase continua al Agua al hacer la medición en el Zetasizer

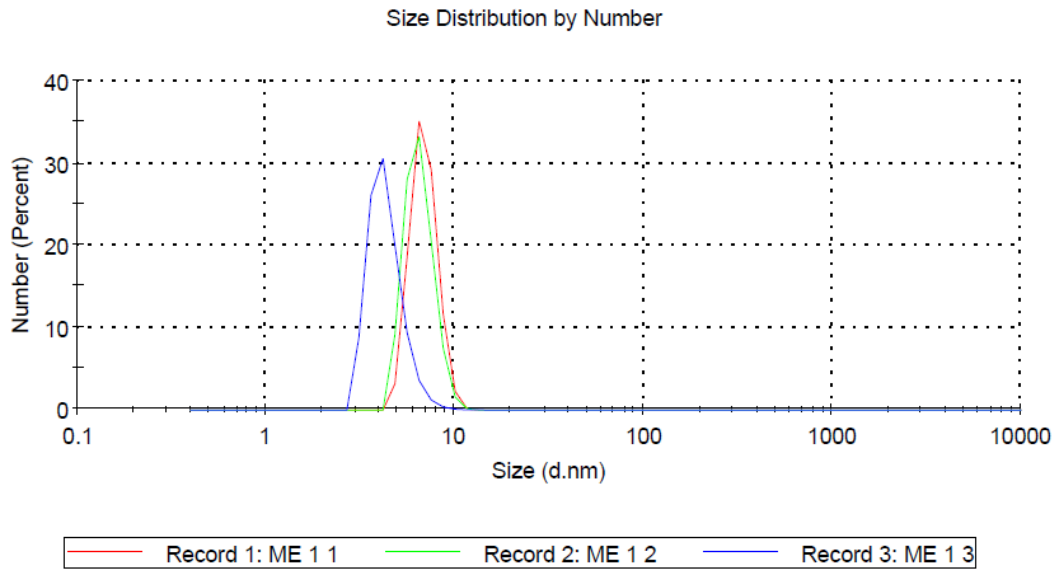


Figura 23. Tamaño de glóbulo ME1 (w/o)

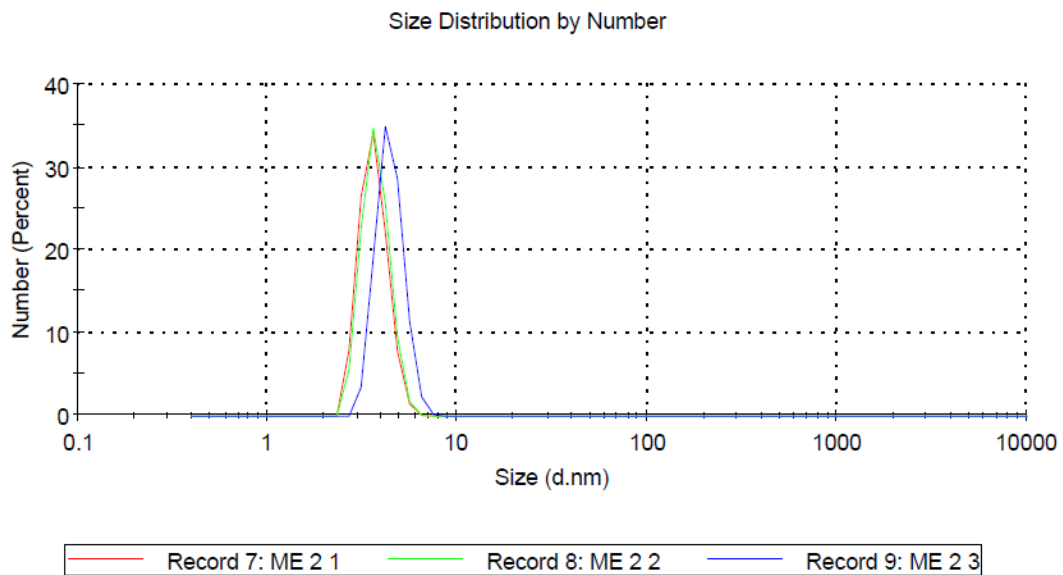


Figura 24. Tamaño de glóbulo ME2 (w/o).

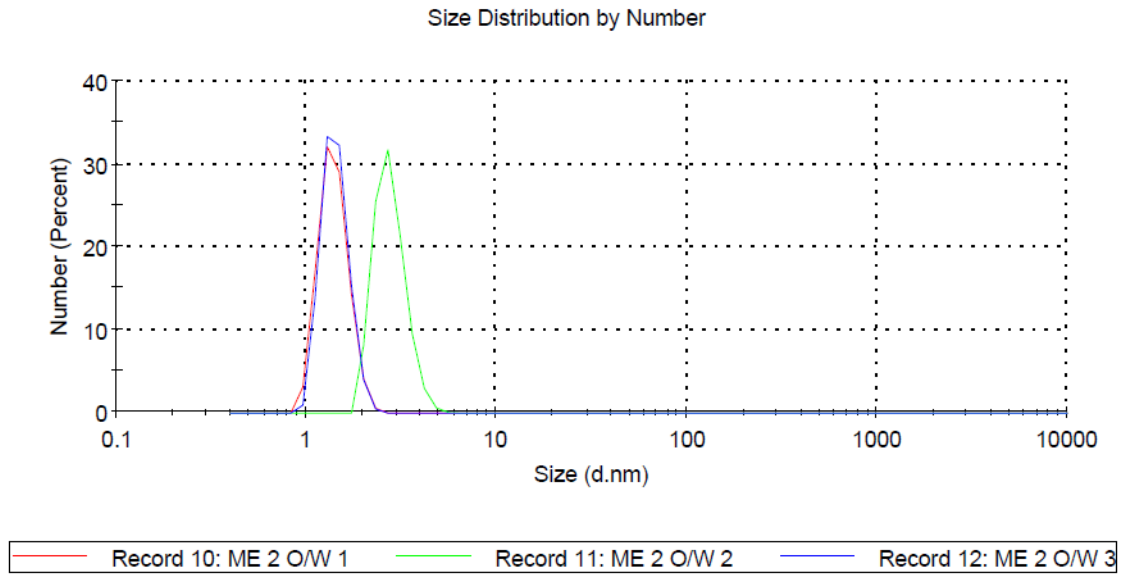


Figura 25. Tamaño de glóbulo ME2 (o/w)

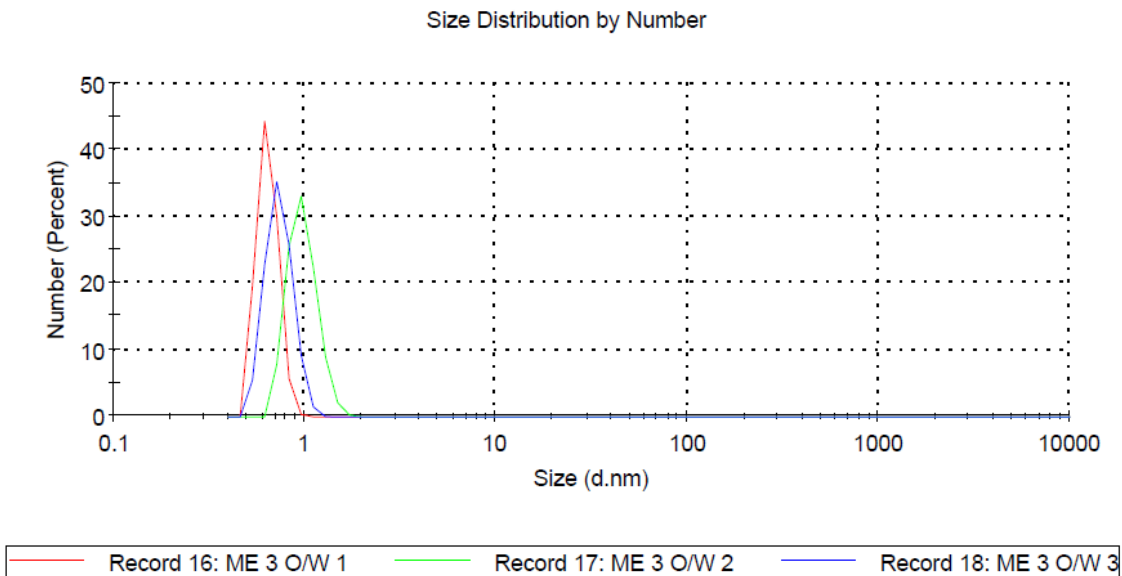


Figura 26. Tamaño de glóbulo ME3 (o/w)

De acuerdo con los resultados obtenidos, la ME1 presenta tamaños de glóbulo promedio de 6.482 nm y considerando las proporciones de la fase oleosa (30 %) y la fase acuosa

(10%), se puede clasificar como una ME w/o. Este tamaño de glóbulo es cercano al reportado por Lou et al. (2012) quienes desarrollaron una ME w/o para administración transdérmica de yoduro, obteniendo valores de 1.48 – 5.57 nm.

Por otro lado, la ME2 y ME3 presentan tamaños de glóbulo muy pequeños de 5.776 a 0.930 nm que pueden ser parecidos a los mencionados anteriormente, pero en estas MEs el contenido de agua es mayor, lo cual puede sugerir la presencia de una estructura bicontinua, es decir, que tanto el agua como el aceite forman dominios continuos separados por películas interfaciales de tensoactivos (Podlogar, Gašperlin, Tomšič, Jamnik, & Rogač, 2004).

También es posible que por la alta concentración de tensoactivos en este caso el Tween[®] 80, se pudiera haber estado presentando la formación de micelas, por lo que se llevó a cabo la preparación de dispersiones de Tween[®] 80 en agua a tres diferentes concentraciones y posteriormente se midió el tamaño de las micelas en el equipo Zetasizer, obteniendo tamaños de 0.8256, 12.32 y 122.8 nm para las concentraciones de 0.0040, 0.0102, 0.4083 mol/L respectivamente.

Se observó que para la concentración de 0.0102 mol/L la cual es cercana a la reportada para la C.M.C del Tween[®] 80 que es de 0.0150 mol/L (Rowe, Sheskey & Quinn, 2009) el tamaño de micela obtenido fue de 12.32 nm, siendo un tamaño superior al obtenido en las tres MEs, por lo tanto, es posible inferir que no se estuvieron formando micelas de Tween[®] 80 en las MEs.

Por otra parte en la Tabla 4 se muestran los tamaños de glóbulo de las MEs cargadas con CLOT, donde se observa que el tamaño de glóbulo decrece para todas las MEs cuando estas contienen fármaco, el CLOT es soluble en todos los excipientes de la ME a excepción del agua, por lo tanto, este se encuentra soluble en la fase continua (MIP) de la ME1 e inmerso en los dominios formados por la fase oleosa (MIP) en la ME2 y ME3; y al mismo tiempo interacciona con el Tween[®] 80 y el etanol, ayudando a disminuir la tensión interfacial entre el agua y el aceite. Ya que existen reportes de la preparación de un gel a base de ME de isotretinoína para administración tópica, que indican que el tamaño de glóbulo de la ME sin fármaco fue de 22.4 nm, disminuyendo con la adición del fármaco a valores de 16.9 nm, debido a que el fármaco actúa como tensoactivo a causa de la deposición de partículas de fármaco en la interfaz de la ME (Patel, Patel, Parikh, & Patel, 2016) y posiblemente esta sea la causa de la disminución del tamaño de glóbulo en todas las MEs.

5.4. Conductividad eléctrica

La medición de la conductividad eléctrica en MEs proporciona información sobre la estructura del sistema y las transformaciones observadas como resultado de la temperatura o la proporción de fases de agua y aceite. Por lo que en esta investigación se llevó a cabo la medición de la conductividad eléctrica de las tres MEs seleccionadas, con un porcentaje inicial del 60 % de la mezcla de tensoactivos, obteniendo dos mediciones, una inicial y una final (Figura 27). La conductividad final corresponde a las mediciones

de las MEs con la máxima cantidad de agua que pueden soportar antes de romperse, proporción mostrada en la tabla de la Figura 27. Se observa que la conductividad eléctrica aumentó al incrementarse la cantidad de agua en las MEs. Es importante señalar que en la investigación realizada por García (2017) se observó que las MEs constituidas por agua, MIP y Tw® 80/Et (2:1) que eran sometidas a las pruebas de liberación *in vitro* se volvían más viscosas al término de la prueba, por esta razón se evaluó la capacidad de captación de agua de la ME1, ME2 y ME3 midiendo la conductividad eléctrica con el fin de relacionar este parámetro con el tipo de estructura de las MEs.

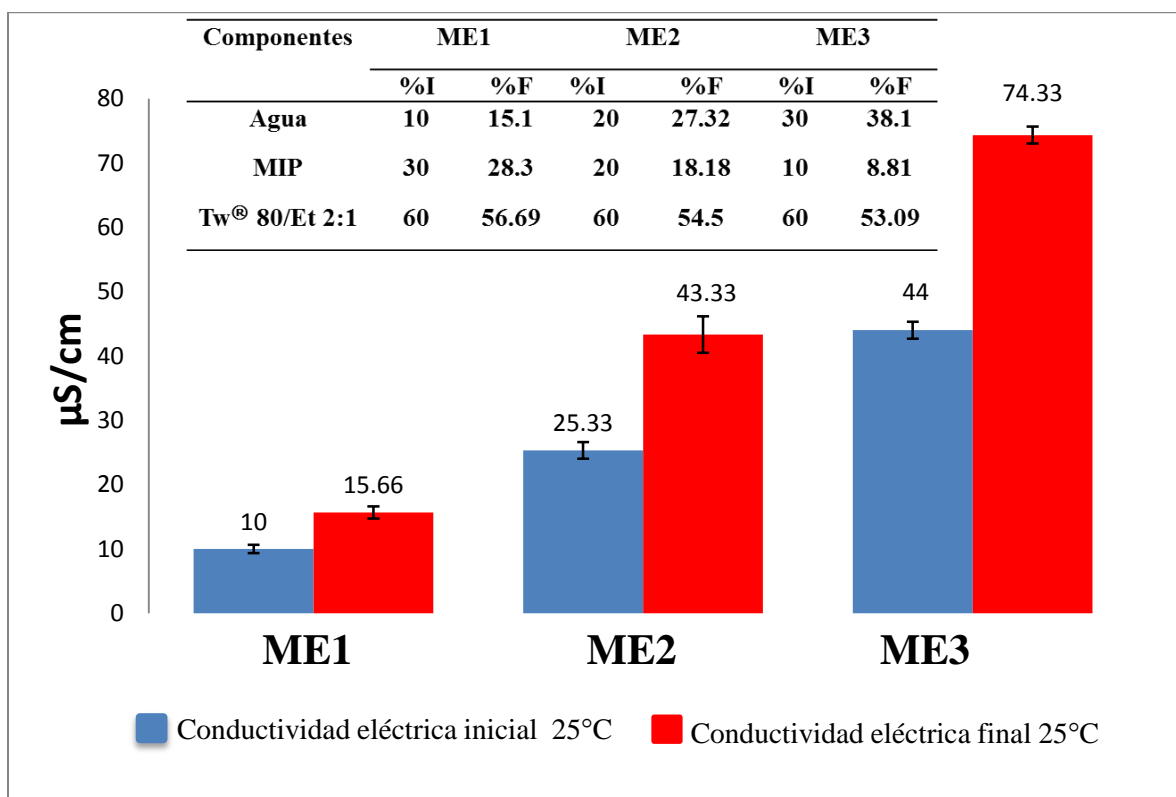


Figura 27. Gráfica de conductividad eléctrica de las MEs
 % I: Porcentaje inicial; % F: Porcentaje final.

Se llevó a cabo una análisis de varianza mostrado en el anexo 1 ($\alpha=0.05$) para determinar si existía un cambio en la conductividad inicial y la conductividad final de todas las MEs con respecto al aumento en el contenido de agua, obteniendo como resultado que sí existe una diferencia estadísticamente significativa (para todas las MEs), confiriéndoles por lo tanto un cambio en su estructura por efecto de la cantidad de agua añadida.

Está bien documentado que el aumento gradual de la cantidad de fase acuosa conduce a la transformación de MEs w/o (glóbulos de agua en una fase continua de aceite) a un sistema bicontinuo (dominios de agua y dominios de aceite), por lo que un aumento adicional de la cantidad de agua en el sistema puede conducir a la transformación a un sistema o/w (glóbulos de aceite suspendidos en una fase continua de agua), la transición de estas estructuras se describen con frecuencia como fenómenos de percolación donde se reflejan cambios estructurales por un aumento en los valores de la conductividad eléctrica, relacionados con las diferencias en las propiedades eléctricas de las fases de baja y alta polaridad (Moulik & Paul, 1998), siendo observado este comportamiento por todas las MEs debido al aumento de agua.

Por lo cual se puede inferir que la ME1 es de tipo w/o por su baja conductividad eléctrica (10 $\mu\text{s/cm}$) debido al bajo porcentaje de agua (10 %), y de acuerdo a lo reportado por Clause et al. (1987) los valores de conductividad eléctrica de MEs w/o son muy bajos, casi nulos, de tan solo 10^{-5} – 10^{-2} S/m (0.1–100 $\mu\text{s/cm}$) quedando prácticamente todas las MEs dentro del rango de conductividad mencionado por estos investigadores.

Sin embargo, de acuerdo a lo reportado por Lawrence & Reesse (2012) es más probable que se forme una estructura bicontinua, cuando exista la misma proporción de fase oleosa y fase acuosa, siendo el caso de la ME2 (20 % ambas fases) coincidiendo también con lo mencionado previamente por Moulik & Paul (1998).

Por otra parte, como se mencionó con anterioridad los tamaños de glóbulo de la ME2 y ME3 no son comunes en las MEs (más pequeños a los habituales). Al hacer un análisis estadístico de los valores de conductividad eléctrica entre la ME2 (43.33 $\mu\text{s}/\text{cm}$) con la máxima cantidad de agua que puede soportar sin que se rompiera y la ME3 sin agua adicional (44 $\mu\text{s}/\text{cm}$), se encontró que no hay diferencia estadísticamente significativa, esto se muestra en la Figura 28, por lo tanto es posible que también la ME3 presente una estructura bicontinua.

Esta caracterización de estructura de las MEs estudiadas, coincide con la clasificación de tipos de MEs comentada por Lagourrete et al. (1979) quienes plantean que la elaboración de MEs con tensoactivos no iónicos, pueden dividirse en dos; la tipo S y la tipo U.

Las MEs de tipo S, son sistemas separados en distintas regiones del diagrama de fases, mientras que en el sistema de tipo U con un aumento en la proporción de agua, la ME se invierte estructuralmente de la zona rica en aceite a través de una estructura bicontinua sin separación de fases. Siendo del tipo U las MEs estudiadas, porque un aumento en el contenido de agua mantiene estable el sistema de ME.

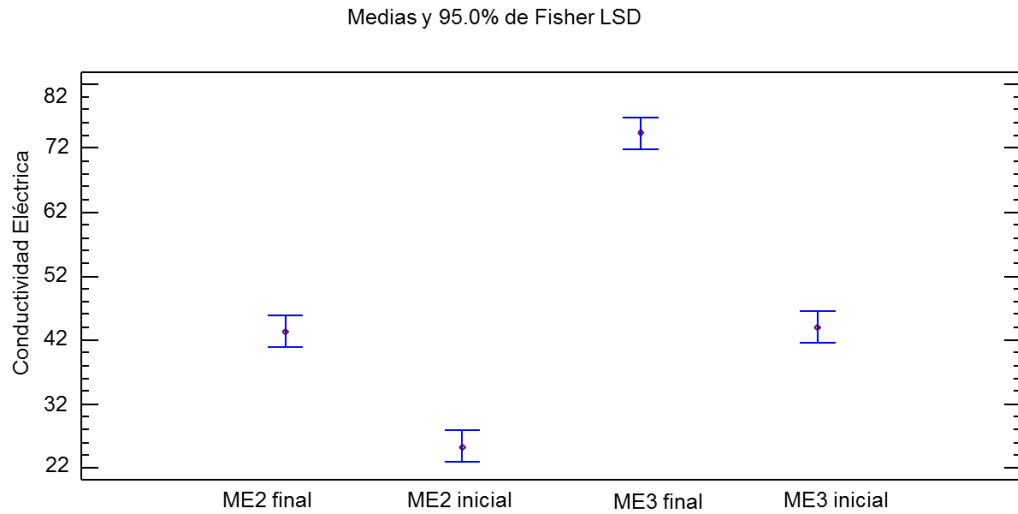


Figura 28. Comparación de medias de la ME2 y la ME3.

Por otra parte, se llevó a cabo un análisis estadístico de los valores de conductividad eléctrica entre las MEs sin CLOT y cargadas con CLOT mencionado en el anexo 1, obteniendo que no existe diferencia estadísticamente significativa ($\alpha= 0.05$) en el cambio de los valores de conductividad eléctrica que puedan afectar la estructura de la ME cuando estas contienen CLOT (Figura 29).

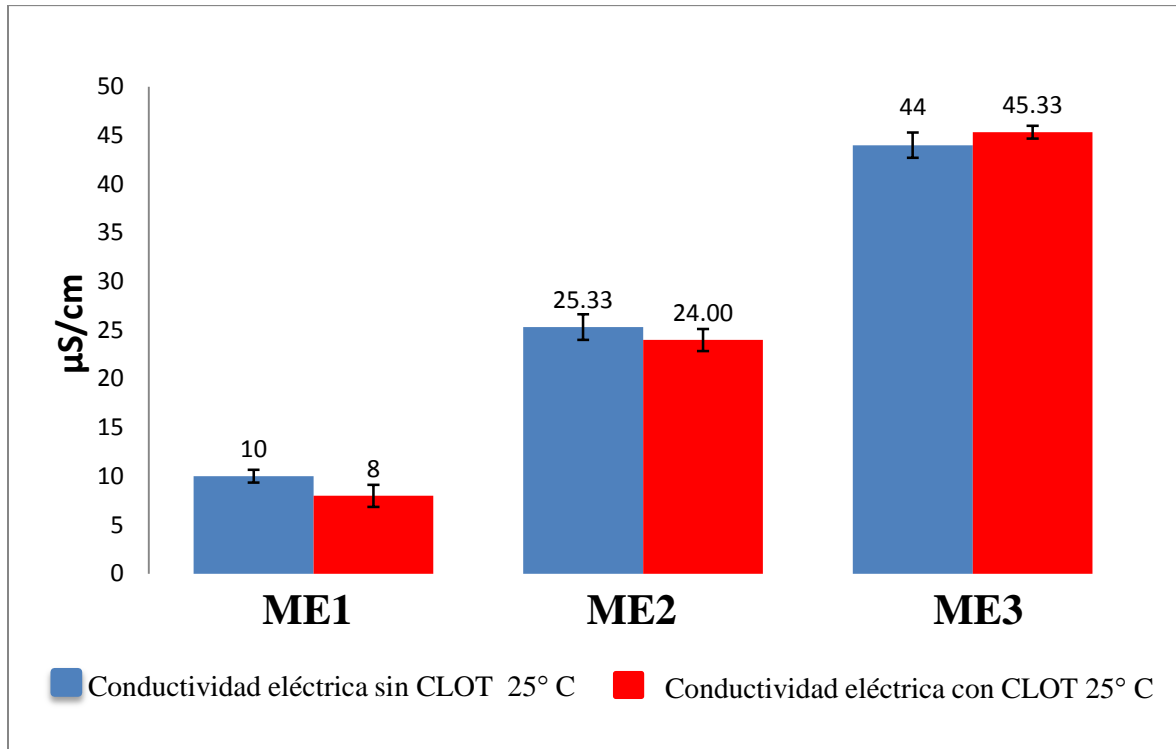


Figura 29. Conductividad eléctrica de las MEs sin CLOT y cargadas con CLOT.

5.5. Viscosidad

Se realizaron mediciones de viscosidad a las MEs iniciales y finales, obtenidas de la conductividad eléctrica. Se sabe que las mediciones de viscosidad sirven para observar la ocurrencia del fenómeno de inversión de fases en el sistema de ME, que se presenta conforme cambia el contenido de volumen de los componentes del sistema, ya que la viscosidad depende del tipo y tamaño de glóbulos (Rahman et al., 2017).

En la Figura 30, las columnas de color azul representan la viscosidad inicial de la ME1, ME2 y ME3 a una temperatura de 37° C; se observa que la viscosidad tiende a aumentar conforme incrementa el contenido de agua.

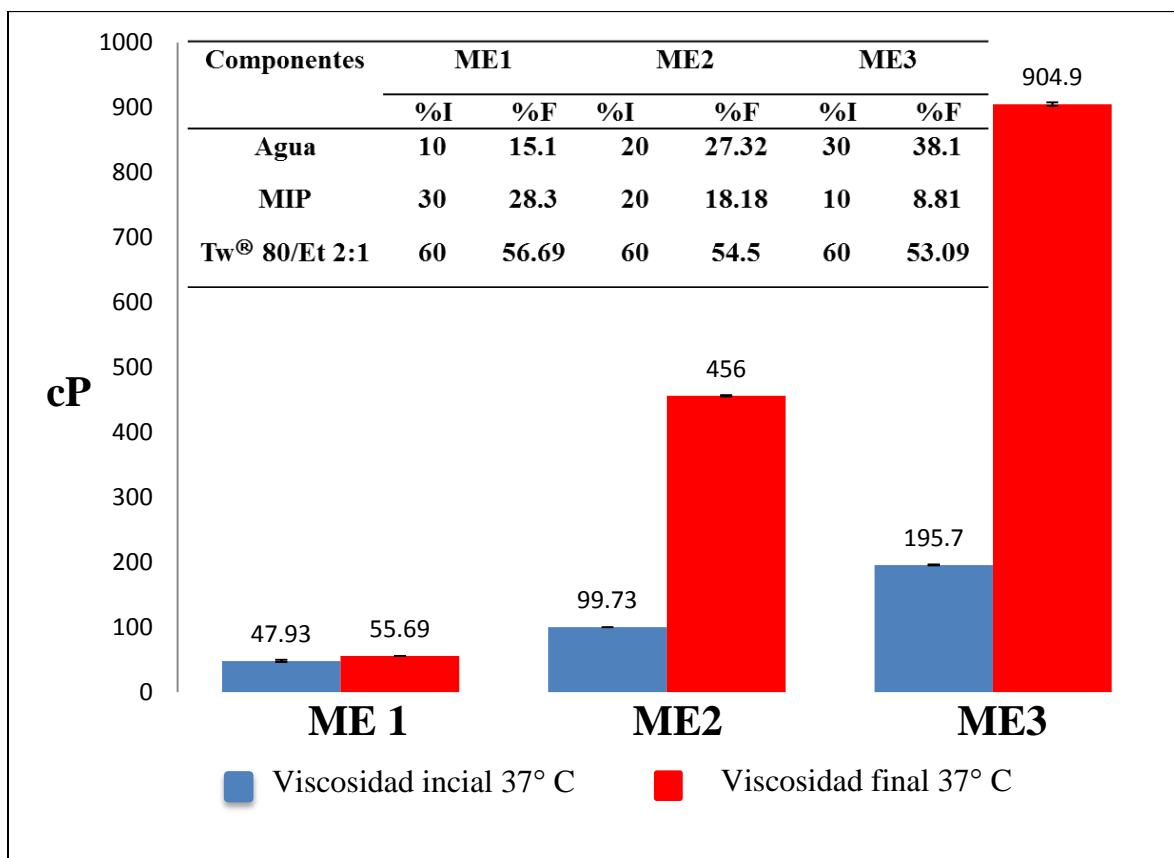


Figura 30. Gráfica de viscosidad de las MEs.
%I: Porcentaje inicial; %F: Porcentaje final.

De acuerdo con una investigación realizada por Kogan et al. (2007) sobre la medición de la viscosidad en una ME de carbamacepina, concluyen que el aumento de la viscosidad es atribuido al hecho de que cuando la fracción en peso de la fase acuosa es baja (5 %), la ME consiste en glóbulos de agua dispersos en la fase continua de aceite w/o donde las interacciones entre los glóbulos son débiles por lo tanto se reflejan una baja viscosidad (50 cP). Una vez que los glóbulos se hinchan, las interacciones glóbulo-glóbulo aumentan y la viscosidad incrementa bruscamente con la adición de fase acuosa (45 %), entonces las estructuras bicontinuas se forman progresivamente. En esta región, el agua y

el aceite se interconectan mediante canales y aumentan progresivamente las interacciones estructurales hasta una viscosidad máxima, la interacción entre las colas de tensoactivos es grande y se espera un enredo fuerte, que lleve a un gran aumento de la viscosidad (265 cP). Cuando el sistema está totalmente invertido en los dominios bicontinuos, la viscosidad es máxima, sin embargo, con una mayor dilución con agua (50 %–85 %), la estructura bicontinua gradualmente se colapsa y se produce la transición a la ME o/w, que se refleja en una fuerte disminución de la viscosidad (250 cP–6 cP) (Kogan, Aserin, & Garti, 2007).

Lo anterior indica una transición estructural, un comportamiento que tienden a presentar las MEs estudiadas, siendo la ME1 del tipo w/o mientras que la ME2 y ME3 se transforman en una estructura bicontinua. Esta transición se ve plasmada en la Figura 30, donde las barras rojas reflejan el aumento de la viscosidad para cada ME observándose que ninguna tiende a disminuir; por lo tanto se infiere la presencia de un cambio de estructura w/o (ME1) a una bicontinua (ME2 y ME3).

Por otra parte, se realizó la medición de la viscosidad de las MEs sin CLOT (columnas azules) y las MEs cargadas con CLOT (columnas rojas) como se muestra en la Figura 31, donde se observa una disminución cuando el CLOT es adicionado en la ME.

Mediante un análisis estadístico presentado en el anexo 2 ($\alpha=0.05$) se determinó que si existe una diferencia estadísticamente significativa para la ME2 y ME3 en la disminución de la viscosidad cuando estas contienen CLOT.

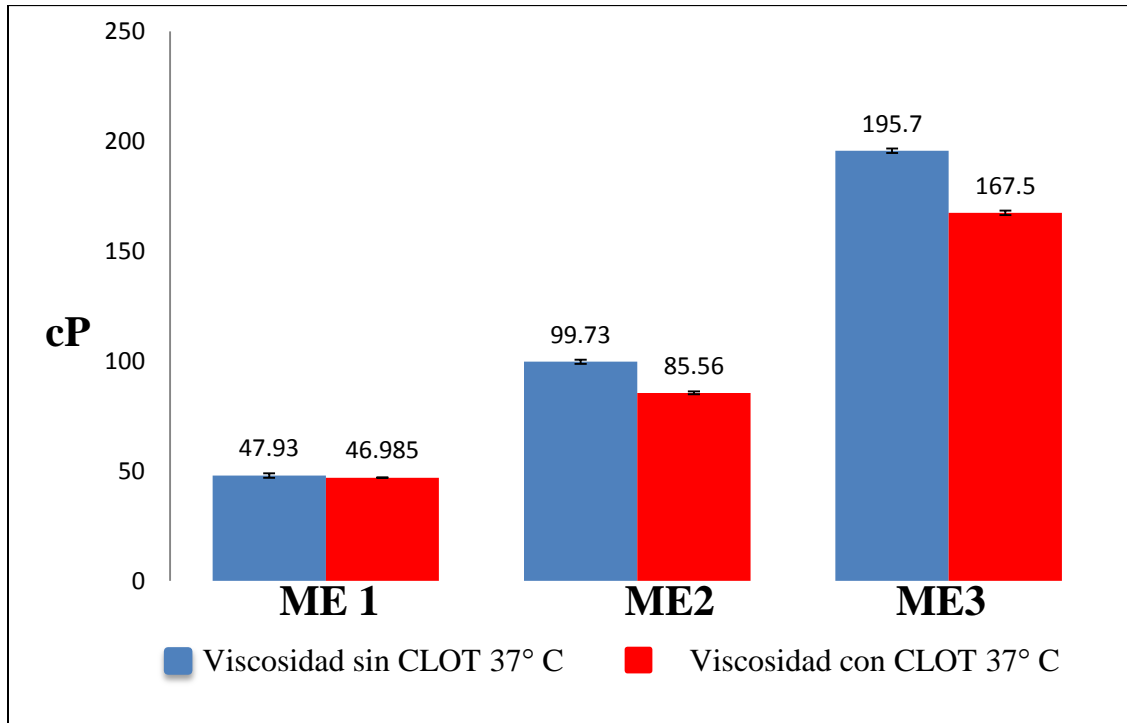


Figura 31. Comparación de la viscosidad entre MEs sin CLOT y MEs con CLOT

Una de las causas probables de esta disminución puede ser el carácter hidrofóbico que presenta el CLOT, el cual como ya se mencionó, se va encontrar interaccionando con el MIP, Tween[®] 80 y el etanol en la interfase agua–aceite, mediante fuerzas de atracción dipolo-dipolo, relajando la cadena hidrocarbonada de estos compuestos orgánicos, ya que se sabe, que los líquidos compuestos por moléculas que no pueden formar puentes de hidrógeno son, en general, menos viscosos que aquellos que pueden formarlos (Atkins J., 2005); por consecuencia, esta interacción va contribuir a disminuir la viscosidad en las MEs cargadas con CLOT.

5.6. Estudios de liberación *in vitro*

La prueba de liberación *in vitro* se realizó por sextuplicado para todas las MEs en tiempos de muestreo de 0.25, 0.50, 1, 2, 3, 4, 6, 8 y 24 horas, pero solo la ME3 se mantuvo transparente durante toda la prueba. La ME1 y ME2 se tornaron opacas después de la primera media hora.

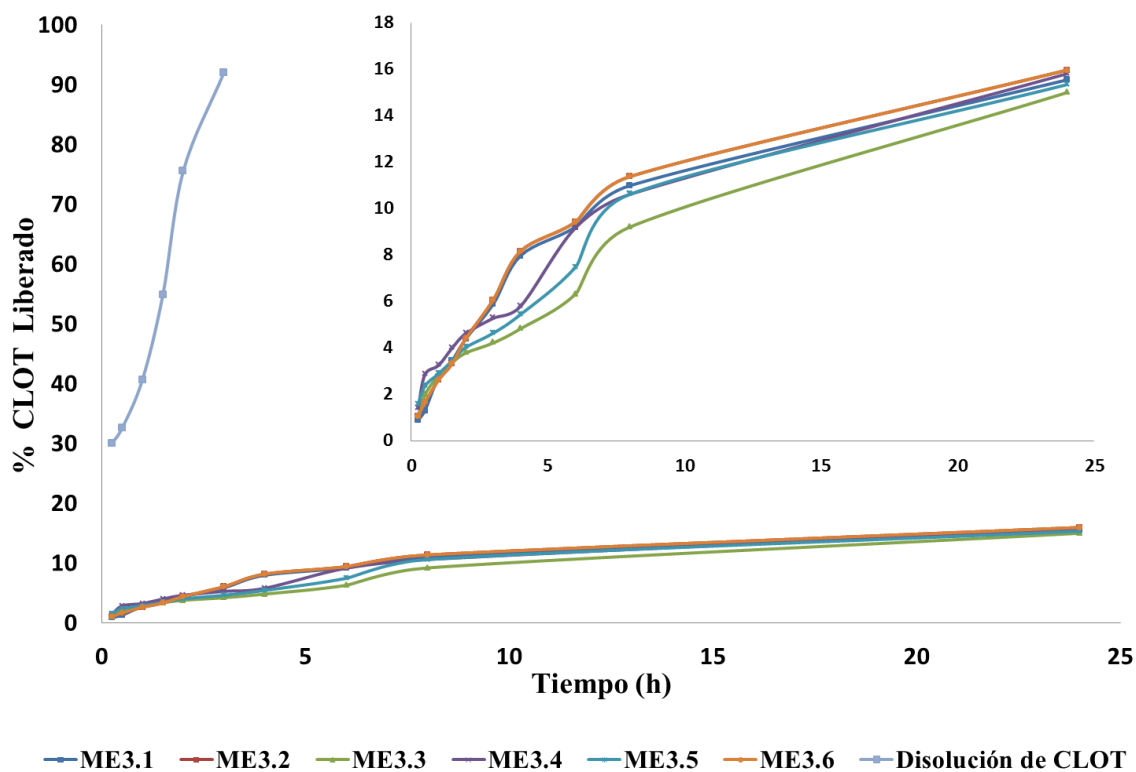


Figura 32. Perfiles de liberación de ME3 1% CLOT y disolución de CLOT.

La cantidad promedio liberada de CLOT desde la ME3 fue del 15.70 % hasta las 24 horas, como se muestra en la Figura 32, en esta figura también se presenta el perfil de una disolución de CLOT, donde se puede observar que al pasar las 3 primeras horas casi el

100 % de CLOT difundió a través de la membrana de celulosa, por tal motivo se puede comprobar que la liberación del CLOT desde la ME3 fue retardada.

Se analizaron los datos de la liberación del CLOT, utilizando dos modelos matemáticos semi-empíricos, el de Peppas (Figura 33) y Higuchi (Figura 34) para determinar el mecanismo de liberación del CLOT presente en la ME3 (mostrado en el anexo 4).

En el modelo de Peppas, la dependencia de la velocidad de liberación con el tiempo es igual a:

$$M_t / M_{\infty} = k t^n$$

Donde k es una constante que incorpora características estructurales y geométricas del mecanismo y “ n ”, es el exponente de liberación, indicando de acuerdo al valor numérico que tome, será el mecanismo de liberación que ocurra (Tabla 5). Esta ecuación puede verse como el resultado de la combinación de dos procesos aparentemente independientes, uno el debido al transporte del fármaco que obedece a las leyes de Fick o fickiano y el otro al hinchamiento del sistema (expansión dinámica), que involucra a la transición de un estado semirígido a otro más flexible, llamado “transporte-caso II”. Es decir en esta ecuación se tiene en cuenta no sólo la difusión del fármaco, sino también la relajación del sistema, como determinantes de la liberación de la misma (Andreetta, 2003).

Tabla 5. Valor del exponencial “n” modelo de Peppas.

Valor de n	Mecanismo de transporte	Tipo de liberación
0.5	Difusión fickiana	Dependiente del tiempo $f(t^{1/2})$
$0.5 < n < 1$	Transporte no fickiano (anómalo)	Dependiente del tiempo $f(t^{n-1})$
1	Transporte caso II	Independiente del tiempo (orden cero)
$n > 1$	Transporte súper caso II	Dependiente del tiempo $f(t^{n-1})$

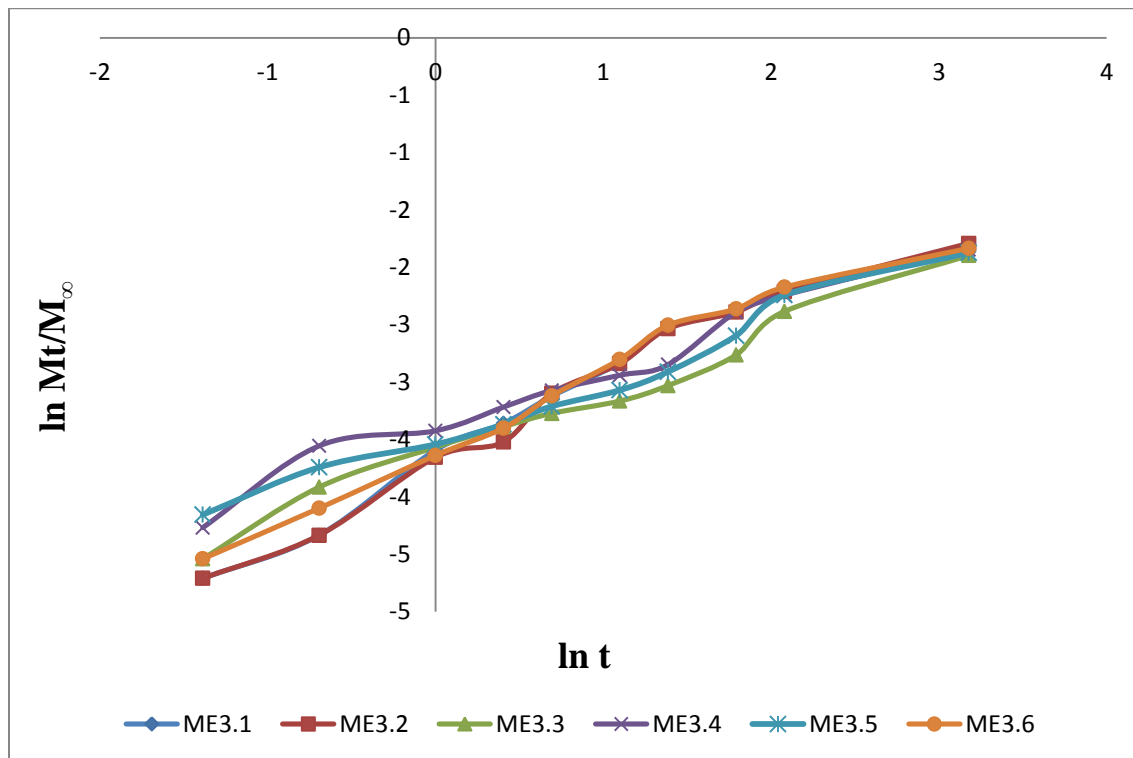


Figura 33. Gráfica de la ME3 por el modelo de Peppas.

El modelo de Higuchi es utilizado para describir la velocidad de liberación de un fármaco a partir de un sistema matricial. Si bien luego fue modificada y extendida para diferentes geometrías y características de las matrices, la ecuación básica del modelo propuesto es la siguiente:

$$Mt/M_{\infty} = k t^{1/2}$$

Siendo k la constante de velocidad, donde M_t es la cantidad absoluta de fármaco liberada al tiempo t , M_∞ es la cantidad total de fármaco liberada a tiempo infinito, la cual teóricamente deberá corresponder a la cantidad total incorporada dentro del sistema a $t = 0$ (Dash, Murthy, Nath, & Prasanta, 2010).

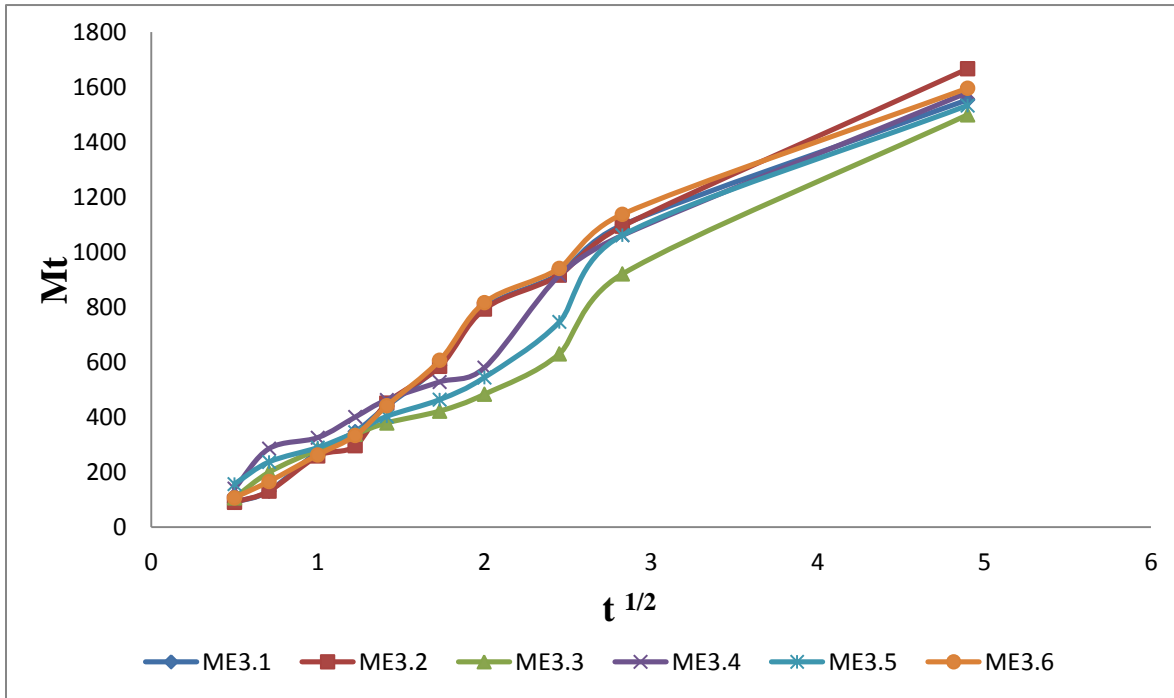


Figura 34. Gráfica de la ME3 por el modelo de Higuchi.

Tabla 6. Valor de “n”, “ K_H ” y “ r^2 ” de la ME3.

Sistema	Peppas		Higuchi	
	n	r^2	K_H	r^2
ME3.1	0.6712	0.9692	354.42	0.9610
ME3.2	0.6876	0.9753	379.38	0.9759
ME3.3	0.5490	0.9812	315.19	0.9812
ME3.4	0.5126	0.9729	333.46	0.9767
ME3.5	0.5066	0.9779	326.56	0.9730
ME3.6	0.6383	0.9776	363.14	0.9601
Promedio	0.5942	0.9756	345.35	0.9713

Con el análisis de la liberación y de acuerdo a los promedios del coeficiente de correlación presentados en la Tabla 6, los datos experimentales obtenidos para la liberación del CLOT de la ME3, se ajustan satisfactoriamente al modelo de Peppas ($r^2=0.9756$). El valor obtenido para la constante difusional ($n>0.5$) indica que la liberación del CLOT sigue un mecanismo no Fickiano, o bien, una difusión anómala dependiente del tiempo.

De acuerdo a lo mencionado por Andretta et al. (2003) cuando $n>0.5$, ocurren dos mecanismos al mismo tiempo, la difusión del fármaco y la relajación de la matriz que sucede cuando el agua se embebe en un polímero, por ejemplo hidroximetilpropilcelulosa, siendo ésta la controladora de la velocidad de liberación, en sistemas formados por matrices poliméricas.

Ahora bien, al hacer la evaluación de los datos siguiendo el modelo de Higuchi, también se encontró un ajuste adecuado ($r^2=0.9713$).

El modelo de Higuchi, describe una relación lineal entre la raíz cuadrada del tiempo y el porcentaje acumulado de la liberación del fármaco, lo que sugiere que el mecanismo principal de liberación es la difusión (Dash, Murthy, Nath, & Prasanta, 2010).

Por lo tanto, de acuerdo a los dos modelos, la liberación del CLOT se llevó a cabo por difusión, pero la velocidad de liberación del CLOT también fue influenciada por el

aumento de la viscosidad de la ME3 a causa de la captación de agua del FVS/Tw[®] 20 3 % pH 4.2.

Como ya se comentó, la ME3 puede estar presentando una estructura bicontinua y de acuerdo con Kamranfar & Jamialahmadi (2014) a altas concentraciones de tensoactivo y de moderadas a elevadas concentraciones de agua, la viscosidad de las MEs podría incrementarse, tal aumento se atribuye a la transición de una forma geométrica de micelas esféricas a micelas cilíndricas o en forma de varilla. Siendo esta una de las causas probables del aumento de la viscosidad y la velocidad de liberación del CLOT desde la ME3.

Se han reportado liberaciones de CLOT desde sistemas de ME, por ejemplo las MEs estudiadas por Hashem et al. (2011), quienes utilizaron una membrana de celulosa como matriz para depositar la formulación y ser puesta en contacto directo con un medio de disolución de pH 7.4 y lauril sulfato de sodio al 1 % como agente promotor de la solubilidad del CLOT. La formulación estuvo constituida por agua, MIP, Tween[®] 80 y *n*-butanol, obteniendo una liberación del 50% hasta las 8 horas.

Es evidente que esta liberación supera el porcentaje liberado de CLOT desde la ME3, pero es importante recordar, que la viscosidad inicial de la ME3 es de 95.7 cP y puede llegar hasta los 904.9 cP por efecto de la captación de agua, mientras que la ME citada reporta una viscosidad de 86.70 cP, pudiendo inferir que es este el factor que influye en el bajo porcentaje de liberación del CLOT desde la ME3 a comparación de la ME reportada.

5.7. Pruebas de bioadhesión

Se sabe que la adhesión en la mucosa vaginal es crucial para la supervivencia de las esporas de *C. albicans* y su posterior germinación a hifas y micelios, capaces de penetrar e invadir el epitelio vaginal causando así la vulvovaginitis (Barrenetxea, 2002).

Por lo tanto, fue de suma importancia evaluar la bioadhesión de la ME3, midiendo el tiempo de residencia de la formulación en tejido vaginal porcino, mediante la modificación de dos métodos, uno desarrollado por Nakamura, Ohta, Machida, & Nagai (1996) método 1 y el método 2, desarrollado y modificado por Bachhav & Patravale (2009).

Los resultados obtenidos por el método 1 para la evaluación de la bioadhesión en la ME3, fue de 9 minutos y 3 segundos, siendo el tiempo que tardo en recorrer 5 cm del tejido vaginal porcino a una inclinación de 45°, ya que para el desarrollo de formas farmacéuticas vaginales se debe de tener en consideración la anatomía vaginal, por lo que en una mujer de pie, el tercio inferior de la vagina está dirigido oblicuamente hacia arriba y hacia atrás en un ángulo de aproximadamente de 45 ° con respecto a un eje horizontal (Barnhart & Shalaby, 1998),

Este tiempo es menor al obtenido por Patel et al. (2012), quienes elaboraron un gel a base de ME para administración vaginal de sertaconazol, donde obtuvieron un tiempo de retención de 88 minutos sobre tejido vaginal, pero es importante considerar, que este gel contiene como agente gelificante, Carbopol[®] 940 y tiene una viscosidad de 2020 cP,

mientras que la ME3 por la captación de agua durante el contacto directo con FVS pH 4.2, aumento su viscosidad hasta 904.7 cP, como se observa en la Figura 35 manteniéndose adherida al tejido vaginal porcino.

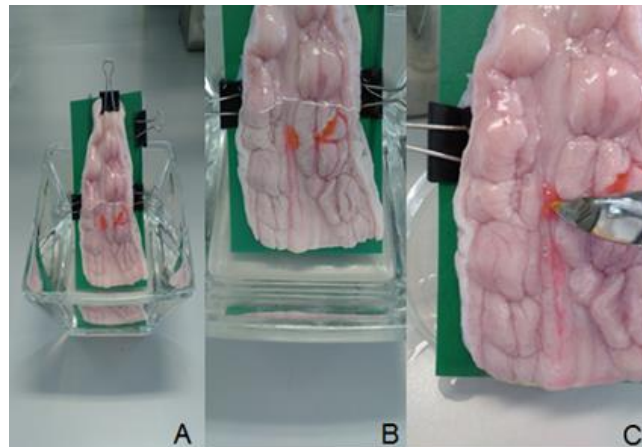


Figura 35. Prueba de bioadhesión, método 1.

A) ME3 al inicio de la prueba; B) ME3 recorriendo el tejido vaginal porcino; C) ME3 gelificada al finalizar la prueba.

Por otra parte, el tiempo de residencia obtenido por el método 2, fue de 6 minutos y 58 segundos, menor al obtenido por el método 1, debido a que la ME3 estuvo sometida a un movimiento constante de arriba hacia abajo en contacto directo con FVS pH 4.2 (Figura 36).

El resultado de esta prueba se comparó con los tiempos obtenidos en un estudio realizado por Bachhav & Patravale (2009), quienes elaboraron un gel a base de ME de CLOT obteniendo un tiempo de residencia de 48 minutos por el mismo método, superando a los obtenidos en este estudio, cabe mencionar que en ese mismo estudio realizo la medición de un gel comercial Candid-V[®], el cual obtuvo 24 minutos de tiempo de retención, por lo

tanto, los tiempos de retención de la ME3, pueden ser considerados como alentadores, tomando en cuenta que no se está haciendo uso de algún agente gelificante, sino que se está obteniendo una ME que por sí misma puede volverse más viscosa. Estos sistemas están siendo estudiados recientemente mediante diagramas pseudoternarios donde se identifican zonas de formación de sistemas transparentes de alta y baja viscosidad con relación a las proporciones de agua y tensoactivos como lo reporta Beningi et al. (2018).

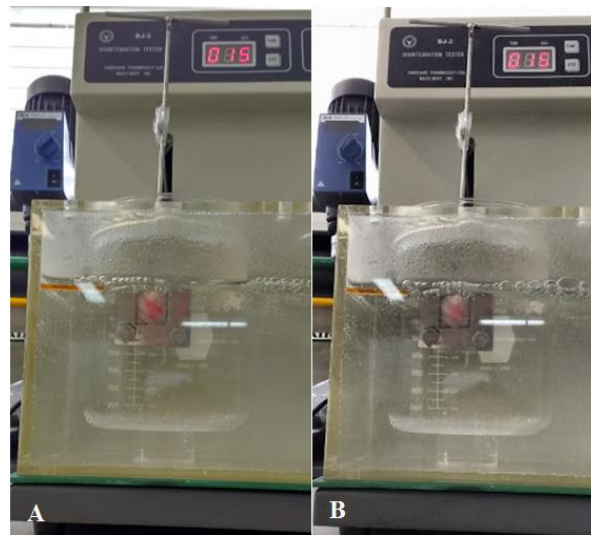


Figura 36. Prueba de bioadhesión, método 2.
A) ME3 sobre el tejido vaginal porcino; B) ME3 desprendiéndose del tejido vaginal porcino.

VI. CONCLUSIONES

Se prepararon y caracterizaron tres MEs como formas farmacéuticas que pueden ser usadas para el tratamiento de micosis vaginal causada por *C.albicans*.

Las MEs fueron obtenidas con la construcción de un diagrama pseudoternario constituido por MIP, agua y la mezcla de Tw[®] 80/Et (2:1) y de acuerdo a las pruebas realizadas de tamaño de glóbulo, conductividad eléctrica y viscosidad. Se logró inferir que la ME1 es del tipo w/o, la ME2 y ME3 son del tipo bicontinuo. Cabe mencionar que para determinar por completo la estructura de las MEs es necesario realizar pruebas como dispersión de rayos X de ángulo pequeño, dispersión de neutrones de ángulo pequeño, microscopía electrónica de transmisión o resonancia magnética nuclear.

La capacidad de carga del CLOT en las MEs es dependiente de la proporción de MIP contenido en cada ME. El contenido de CLOT en la ME1 y en la ME2 fue del 2 % p/v y del 1% p/v para la ME3.

Por otra parte, en los estudios de liberación *in vitro* la ME3 se mantuvo transparente durante todo el estudio, liberando la cantidad promedio del 15.70 % de CLOT en 24 horas, ajustándose a los mecanismos de liberación propuestos por Peppas y Higuchi, donde la velocidad de liberación depende del aumento de la viscosidad del sistema por la captación de agua (Peppas) y el mecanismo de liberación es mediante difusión (Higuchi).

Por último, los tiempos de residencia de la ME3 obtenidos por los métodos 1 y 2, evaluaron la capacidad de bioadhesión de la ME, a pesar de que fueron menores a los reportados para MEs gelificadas con polímeros bioadhesivos, en este estudio se tuvo la ventaja de que no se utilizaron agentes gelificantes y que la ME3 por si misma pudo volverse más viscosa, aumentando su tiempo de residencia en el tejido vaginal.

VII PERSPECTIVAS

Caracterizar las MEs obtenidas, aplicando otras técnicas, como las microscopia de transmisión electrónica, para elucidar el tipo de ME formada y/o la formación de sistemas multifasicos o bicontinuos.

Evaluar con un analizador de textura la capacidad mucoadhesiva de la ME3 de forma cuantitativa, sobre tejido vaginal de cerda o placas de mucina.

Evaluar la efectividad de la ME3 frente a *Candida Albicans* mediante pruebas microbiológicas en placa.

VIII. REFERENCIAS

- Alexander, N. J., Baker, E., Kaptein, M., Karck, U., Miller, L., & Zampaglione, E. (2004). Why consider vaginal drug administration? *Fertility and Sterility*, 82(1), 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2004>
- Álvarez, H. (2008). *Microemulsiones como formas farmacéuticas y su caracterización por teoría de percolación*. (Tesis de licenciatura), Universidad Nacional Autónoma de México.
- Andreetta, H. A. (2003). Fármacos de Acción Prolongada: Mecanismos de Liberación. Usos de distintos modelos. *Acta Farmaceutica Bonaerense*, 22(4), 355–363.
- Atkins J. (2005), “Principios de química”, editorial Medica Panamericana, Buenos Aires Argentina.
- Bachhav, Y. G., & Patravale, V. B. (2009). Microemulsion-Based Vaginal Gel of Clotrimazole: Formulation, In Vitro Evaluation, and Stability Studies. *AAPS PharmSciTech*, 10(2), 476–481. <https://doi.org/10.1208/s12249-009-9233-2>
- Barnhart, K., & Shalaby, W. (1998). Vaginal Microbicide Formulations Workshop. In R. William (Ed.), *Vaginal Microbicide Formulations Workshop* (Lippincott, pp. 1–16). Philadelphia, USA.
- Barrenetxea, G. (2002). Vulvovaginitis candidiásica. *Revista Iberoamericana de Micología*, 19, 22–24.

- Benigni M.,Pescina S.,Grimaudo M. A.,Padula C.,Santi P.& Nicoli S.,(2018).
Development of microemulsions of suitable viscosity for cyclosporine skin delivery.
International Journal of Pharmaceutics, 545, 197-205.
- Bonacucina, G., Cespi, M., Misici-Falzi, M., & Palmieri, G. F. (2009). Colloidal soft matter as drug delivery system. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 98(1), 1–42.
<https://doi.org/10.1002/jps.21423>
- Borhade, V., Pathak, S., Sharma, S., & Patravale, V. (2012). Clotrimazole nanoemulsion for malaria chemotherapy. Part I: Preformulation studies, formulation design and physicochemical evaluation. *International Journal of Pharmaceutics*, 431, 138–148.
<https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2011.12.040>
- Callender, S. P., Mathews, J. A., Kobernyk, K., & Wettig, S. D. (2017). Microemulsion utility in pharmaceuticals: Implications for multi-drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, 526(1–2), 425–442.
<https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2017.05.005>
- Cassone, A. (2015). Vulvovaginal *Candida albicans* infections: Pathogenesis, immunity and vaccine prospects. *BJOG: An International Journal of Obstetrics and Gynaecology*, 122, 785–794. <https://doi.org/10.1111/1471-0528.12994>
- Crowley, P. D., & Gallagher, H. C. (2014). Clotrimazole as a pharmaceutical: past, present and future. *Journal of Applied Microbiology*, 117, 611–617.

<https://doi.org/10.1111/jam.12554>

Dash, S., Murthy, P., Nath, L., & Prasanta, C. (2010). Review Kinetic Modeling on Drug Release from Controlled Drug Delivery Systems. *Acta Poloniae Pharmaceutica-Drug Research*, 67(3), 217–223.

García G. N., (2017), Desarrollo y caracterización de una microemulsión bioadhesiva para administración vaginal, (Tesis de Maestría en Ciencias Farmacéuticas), Universidad Autónoma Metropolitana, México.

Hashem F. S., Shaker D., S.,Ghorab M.,K.,Nasr M. & Ismail A.(2011). Formulation, Characterization, and Clinical Evaluation of Microemulsion Containing Clotrimazole for Topical Delivery *American Association of Pharmaceutical Scientists*, 12, 879-886.

Katz, D. F., Yuan, A., & Gao, Y. (2015). Vaginal drug distribution modeling. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 92, 2–13. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2015.04.017>

Kogan, A., Aserin, A., & Garti, N. (2007). Improved solubilization of carbamazepine and structural transitions in nonionic microemulsions upon aqueous phase dilution. *Journal of Colloid and Interface Science*, 315, 637–647. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2007.06.087>

Lawrence, M. J., & Rees, G. D. (2012). Microemulsion-based media as novel drug delivery systems. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 64, 175–193.

<https://doi.org/10.1016/j.addr.2012.09.018>

Machado, R. M., Palmeira-de-Oliveira, A., Gaspar, C., Martinez-de-Oliveira, J., & Palmeira-de-Oliveira, R. (2015). Studies and methodologies on vaginal drug permeation. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 92, 14–26.

<https://doi.org/10.1016/j.addr.2015.02.003>

Mehta, D., Rathod, H., Mehta, D. P., Rathod, H. J., & Shah, D. P. (2015). Microemulsions: A Potential Novel Drug Delivery System. *International Journal of Pharmaceutical Sciences*, 11(1), 48–60.

Moulik, S. P., & Paul, B. K. (1998). Structure, dynamics and transport properties of microemulsions. *Advances in Colloid and Interface Science*, 78, 99–195.

[https://doi.org/10.1016/S0001-8686\(98\)00063-3](https://doi.org/10.1016/S0001-8686(98)00063-3)

Nakamura, F., Ohta, R., Machida, Y., & Nagai, T. (1996). In vitro and in vivo nasal mucoadhesion of some water-soluble polymers. *International Journal of Pharmaceutics*, 134, 173–181.

Neves, J. Das, Amaral, M. H., & Bahia, M. F. (2007). Vaginal Drug Delivery. In C. Shayne (Ed.), *Pharmaceutical Manufacturing Handbook: Production and Processes* (John Wiley, pp. 809–878). New Jersey, USA.

<https://doi.org/10.1002/9780470259818.ch22>

Palmeira-de-Oliveira, R., Palmeira-de-Oliveira, A., & Martinez-de-Oliveira, J. (2015).

- New strategies for local treatment of vaginal infections. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 92, 105–122. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2015.06.008>
- Patel, M. R., Patel, R. B., Parikh, J. R., & Patel, B. G. (2016). Novel isotretinoin microemulsion-based gel for targeted topical therapy of acne: formulation consideration, skin retention and skin irritation studies. *Applied Nanoscience*, 6(4), 539–553. <https://doi.org/10.1007/s13204-015-0457-z>
- Patel A. & Patel J., (2012). Mucoadhesive Microemulsion Based Prolonged Release Vaginal Gel for Anti-Fungal Drug. *American Journal of Pharmtech Research*, 2, 650-661.
- Pineda, J., Cortés, A. Á., Uribarrem, T. del N. Jesus, & Castañón, L. R. (2017). Artículo de Revisión Candidosis vaginal. Revisión de la literatura y situación de México y otros países latinoamericanos. *Revista Médica Risaralda*, 23(1), 38–44.
- Podlogar, F., Gašperlin, M., Tomšič, M., Jamnik, A., & Rogač, M. B. (2004). Structural characterisation of water-Tween 40®/Imwitor 308®-isopropyl myristate microemulsions using different experimental methods. *International Journal of Pharmaceutics*, 276, 115–128. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2004.02.018>
- Rahman, H. M. A. U., Afzal, S., Nazar, M. F., Alvi, D. A., Khan, A. M., & Asghar, M. N. (2017). Phase behavior of a TX-100/oleic acid/water based ternary system: A microstructure study. *Journal of Molecular Liquids*, 230, 15–19. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2017.01.011>

Rowe R.C., Sheskey P. y Quinn M. (ED), (2009), Handbook of Pharmaceutical Excipients, USA: Editorial Pharmaceutical Press.

Saini, J. K., Nautiyal, U., Kumar, S., Singh, D., & Anwar, F. (2014). Microemulsions: A potential novel drug delivery system. *International Journal of Pharmaceutical and Medicinal Research Journal*, 2(1), 15–20.

Singh, P. K., Kashif Iqbal, M., Shukla, V. K., & Shuaib, M. (2014). Microemulsions: Current Trends in Novel Drug Delivery Systems. *Journal of Pharmaceutical, Chemical and Biological Sciences*, 1(11), 39–51.

Tortora G. y Derickson B., (2006), Principios de anatomía y fisiología, Buenos Aires Argentina, Medica Panamericana.

IX. ANEXOS

9.1. Anexo 1

Análisis estadístico de la conductividad eléctrica de las MEs.

Hipótesis de trabajo

El aumento en el contenido de agua en cada sistema de ME no representa una diferencia estadísticamente significativa con el cambio de los valores de conductividad eléctrica.

Hipótesis estadísticas

H0: $\mu_d = 0$ H1: $\mu \neq \mu$

Análisis de varianza

Tabla ANOVA para conductividad por sistema

Fuente	Suma de Cuadrados	de Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	8315.17	5	1663.03	348.08	0.0000
Intra grupos	57.3333	12	4.77778		
Total (Corr.)	8372.5	17			

La tabla ANOVA descompone la varianza de los datos en dos componentes: un componente entre-grupos y un componente dentro-de-grupos. La razón-F, que en este caso es igual a 348.077, es el cociente entre el estimado entre-grupos y el estimado dentro-de-grupos. Puesto que el valor-P de la prueba-F es menor que 0.05, existe una diferencia estadísticamente significativa entre las medias de las 6 variables con un nivel del 95.0% de confianza.

Pruebas de Múltiple Rangos para conductividad por sistema

Método: 95.0 porcentaje LSD

sistema	Casos	Media	Grupos Homogéneos
ME1 inicial	3	10.3333	X
ME1 final	3	15.6667	X
ME2 inicial	3	25.3333	X
ME2 final	3	43.3333	X
ME3 inicial	3	44.0	X
ME3 final	3	74.3333	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
ME1 final - ME1 inicial	*	5.33333	3.88855
ME1 final - ME2 final	*	-27.6667	3.88855
ME1 final - ME2 inicial	*	-9.66667	3.88855

ME1 final - ME3 final	*	-58.6667	3.88855
ME1 final - ME3 inicial	*	-28.3333	3.88855
ME1 inicial - ME2 final	*	-33.0	3.88855
ME1 inicial - ME2 inicial	*	-15.0	3.88855
ME1 inicial - ME3 final	*	-64.0	3.88855
ME1 inicial - ME3 inicial	*	-33.6667	3.88855
ME2 final - ME2 inicial	*	18.0	3.88855
ME2 final - ME3 final	*	-31.0	3.88855
ME2 final - ME3 inicial		-0.666667	3.88855
ME2 inicial - ME3 final	*	-49.0	3.88855
ME2 inicial - ME3 inicial	*	-18.6667	3.88855
ME3 final - ME3 inicial	*	30.3333	3.88855

* indica una diferencia significativa.

Esta tabla aplica un procedimiento de comparación múltiple para determinar cuáles medias son significativamente diferentes de otras. La mitad inferior de la salida muestra las diferencias estimadas entre cada par de medias. El asterisco que se encuentra al lado de los 14 pares indica que estos pares muestran diferencias estadísticamente significativas con un nivel del 95.0% de confianza. En la parte superior de la página, se han identificado 5 grupos homogéneos según la alineación de las X's en columnas. No existen diferencias estadísticamente significativas entre aquellos niveles que compartan una misma columna de X's. El método empleado actualmente para discriminar entre las medias es el procedimiento de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher. Con este método hay un riesgo del 5.0% al decir que cada par de medias es significativamente diferente, cuando la diferencia real es igual a 0.

Hipótesis de trabajo para la comparación de conductividad eléctrica de las MEs cargadas con CLOT.

El contenido de CLOT en cada sistema de ME no representa una diferencia estadísticamente significativa con el cambio de los valores de conductividad eléctrica.

Hipótesis estadísticas

$H_0: \mu_d = 0$ $H_1: \mu \neq \mu$

Prueba de Hipótesis para ME1-ME1 CLOT

Media Muestral = 2.33333

Mediana Muestral = 2.0

Desviación Estándar de la Muestra = 1.52753

Prueba t

Hipótesis Nula: media = 0.0

Alternativa: no igual

Estadístico t = 2.64575

Valor-P = 0.118083

No se rechaza la hipótesis nula para alfa = 0.05.

El StatAdvisor

La prueba-t evalúa la hipótesis de que la media de ME1-ME1 CLOT es igual a 0.0 versus la hipótesis alterna de que la media de ME1-ME1 CLOT es no igual a 0.0. Debido a que el valor-P para esta prueba es mayor o igual a 0.05, no se puede rechazar la hipótesis nula, con un nivel de confianza del 95.0% de confianza.

Prueba de Hipótesis para ME2-ME2 CLOT

Media Muestral = 1.33333

Mediana Muestral = 1.0

Desviación Estándar de la Muestra = 0.57735

Prueba t

Hipótesis Nula: media = 0.0

Alternativa: no igual

Estadístico t = 4.0

Valor-P = 0.057191

No se rechaza la hipótesis nula para alfa = 0.05.

El StatAdvisor

Esta ventana muestra los resultados de las pruebas relativas a la población de la cual procede la muestra de ME2-ME2 CLOT. La prueba-t evalúa la hipótesis de que la media de ME2-ME2 CLOT es igual a 0.0 versus la hipótesis alterna de que la media de ME2-ME2 CLOT es no igual a 0.0. Debido a que el valor-P para esta prueba es mayor o igual a 0.05, no se puede rechazar la hipótesis nula, con un nivel de confianza del 95.0% de confianza.

Prueba de Hipótesis para ME3-ME3 CLOT

Media Muestral = -1.33333

Mediana Muestral = -4.0

Desviación Estándar de la Muestra = 4.6188

Prueba t

Hipótesis Nula: media = 0.0

Alternativa: no igual

Estadístico t = -0.5

Valor-P = 0.666667

No se rechaza la hipótesis nula para alfa = 0.05.

El StatAdvisor

La prueba-t evalúa la hipótesis de que la media de ME3-ME3 CLOT es igual a 0.0 versus la hipótesis alterna de que la media de ME3-ME3 CLOT es no igual a 0.0. Debido a que el valor-P para esta prueba es mayor o igual a 0.05, no se puede rechazar la hipótesis nula, con un nivel de confianza del 95.0% de confianza.

9.2. Anexo 2

Análisis estadístico de la viscosidad en las MEs sin CLOT y cargadas con CLOT.

Hipótesis de trabajo

El contenido de CLOT en cada sistema de ME no representa una diferencia estadísticamente significativa con el valor de la viscosidad con respecto a los sistemas que no lo contienen.

$H_0: \mu_d = 0$ $H_1: \mu \neq \mu$

Prueba de Hipótesis para ME1-ME1F

Media Muestral = 0.945

Mediana Muestral = 0.945

Desviación Estándar de la Muestra = 1.16673

Prueba t

Hipótesis Nula: media = 0.0

Alternativa: no igual

Estadístico t = 1.14545

Valor-P = 0.456905

No se rechaza la hipótesis nula para alfa = 0.05.

El StatAdvisor

Esta ventana muestra los resultados de las pruebas relativas a la población de la cual procede la muestra de ME1-ME1F. La prueba-t evalúa la hipótesis de que la media de ME1-ME1F es igual a 0.0 versus la hipótesis alterna de que la media de ME1-ME1F es no igual a 0.0. Debido a que el valor-P para esta prueba es mayor o igual a 0.05, no se puede rechazar la hipótesis nula, con un nivel de confianza del 95.0%.

Prueba de Hipótesis para ME2-ME2F

Media Muestral = 14.17

Mediana Muestral = 14.17

Desviación Estándar de la Muestra = 0.480833

Prueba t

Hipótesis Nula: media = 0.0

Alternativa: no igual

Estadístico $t = 41.6765$

Valor-P = 0.0152723

Se rechaza la hipótesis nula para $\alpha = 0.05$.

El StatAdvisor

Esta ventana muestra los resultados de las pruebas relativas a la población de la cual procede la muestra de ME2-ME2F. La prueba-t evalúa la hipótesis de que la media de ME2-ME2F es igual a 0.0 versus la hipótesis alterna de que la media de ME2-ME2F es no igual a 0.0. Debido a que el valor-P para esta prueba es menor que 0.05, se puede rechazar la hipótesis nula con un 95.0% de confianza.

Prueba de Hipótesis para ME3-ME3F

Media Muestral = 28.2

Mediana Muestral = 28.2

Desviación Estándar de la Muestra = 0.282843

Prueba t

Hipótesis Nula: media = 0.0

Alternativa: no igual

Estadístico $t = 141.0$

Valor-P = 0.00451496

Se rechaza la hipótesis nula para $\alpha = 0.05$.

El StatAdvisor

Esta ventana muestra los resultados de las pruebas relativas a la población de la cual procede la muestra de ME3-ME3F. La prueba-t evalúa la hipótesis de que la media de ME3-ME3F es igual a 0.0 versus la hipótesis alterna de que la media de ME3-ME3F es no igual a 0.0. Debido a que el valor-P para esta prueba es menor que 0.05, se puede rechazar la hipótesis nula con un 95.0% de confianza.

9.3. Anexo 3

Desarrollo del método analítico para la cuantificación de CLOT.

-Preparación de FVS pH 4.2/Tween[®] 20 al 3%

Se preparó 1 L de FVS de acuerdo al método desarrollado por (Owen y Katz 1999) pesando los siguientes reactivos de acuerdo a la siguiente tabla:

Tabla 7. Reactivos para preparar FVS pH4.2.

Reactivos	Gramos
NaCl	3.51
KOH	1.40
Ca(OH) ₂	0.22
Ácido láctico	2
Ácido acético	1
Glicerol	0.16
Urea	0.40
Glucosa	5
HCl 0.1M	Adicionar para ajustar pH 4.2

*Posteriormente se disolvieron 30g de Tween[®] 20 en 1L de fluido vaginal simulado pH 4.2.

Pruebas de solubilidad de CLOT en tensoactivos

El desarrollo del método analítico para la cuantificación del CLOT se llevó a cabo con base a pruebas de solubilidad en diversos tensoactivos solubilizados con FVS, ya que de acuerdo a las propiedades fisicoquímicas del CLOT, es prácticamente insoluble en agua 0.49 µg/ml, lo cual hace difícil la cuantificación directa desde el FVS. Por lo tanto, tomando como referencia pruebas de solubilidad de CLOT en tensoactivos estudiadas por (Borhade et al., 2012) donde desarrollan estudios de preformulación de CLOT, para una nanoemulsión. Se eligieron dos tensoactivos; Gelucire[®] 44/14 y Tween[®] 20 obteniendo los siguientes resultados:

Tabla 8. Resultados de prueba de solubilidad de CLOT en tensoactivos.

Solución de tensoactivo en FVS (% p/v)	g de CLOT /concentración		Solubilidad
Gelucire [®] 44/14 10%	0.0075	(0.3mg/ml)	No se solubilizó
Gelucire [®] 44/14 5%	0.0075	(0.3mg/ml)	No se solubilizó
Tween [®] 20 3%	0.0075	(0.3mg/ml)	Si se solubilizó

De acuerdo a los resultados obtenidos en la Tabla 8, el tensoactivo que logró solubilizar la máxima cantidad de CLOT fue Tween[®] 20 3%, siendo una concentración de 0.3 mg/ml.

Determinación de la longitud de onda óptima de CLOT.

Se preparó una disolución de 300 µg/ml de CLOT en FVS/Tw[®] 20 3 % pH 4.2, realizándose un barrido espectrofotométrico de una longitud de onda de 200–380 nm.

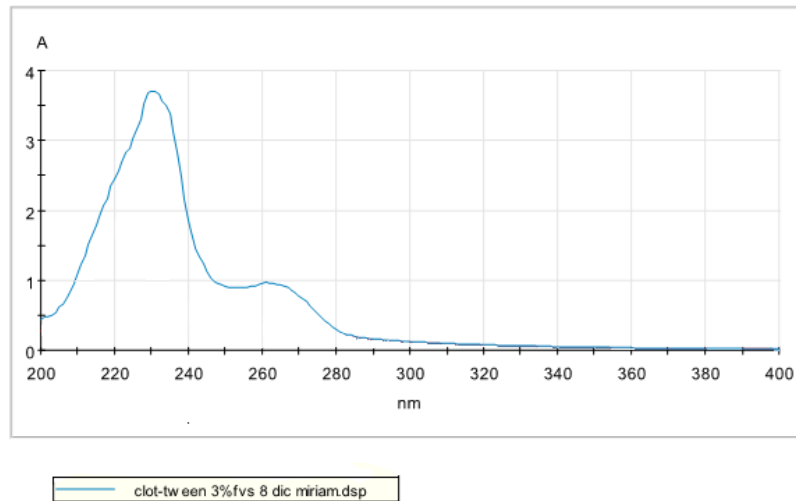


Figura 37. Espectro de absorción de CLOT en FVS/Tween[®] 20 3%.

Del espectro de absorción de CLOT en FVS/Tw[®] 20 3% (Figura 37), se seleccionó la longitud de onda de 260 nm ya que coincide con el espectro característico de CLOT en metanol (Moffat, 2011) además de que se encuentra dentro de los parámetros de ruido del equipo.

Preparación de la curva de calibración

Se preparó una solución de stock de 300 $\mu\text{g/ml}$ de CLOT en FVS/Tw[®] 20 3% pH 4.2, se tomaron alícuotas de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ml, transfiriéndolas a un matraz volumétrico de 10 ml llevando a la marca de aforo con FVS/Tw[®] 20 3%. Cada uno de los sistemas se preparó por triplicado siendo el rango de concentración de 30–270 $\mu\text{g/ml}$.

Cada uno de los sistemas se leyó en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 260 nm, obteniendo el valor de su absorbancia para determinar parámetros y evaluar la curva de calibración Tabla 9.

Tabla 9. Valores de absorbancia de la curva de calibración de CLOT.

Concentración	Absorbancia	Absorbancia/Concentración
	0.069	0.002266
30.44	0.07	0.002299
	0.069	0.002266
	0.135	0.002217
60.88	0.135	0.002217
	0.135	0.002217
	0.198	0.002168
91.32	0.199	0.002179
	0.2	0.002190
	0.262	0.002151
121.76	0.263	0.002159
	0.266	0.002184
	0.331	0.002174
152.2	0.327	0.002148
	0.333	0.002187
	0.395	0.002162
182.64	0.393	0.002151
	0.394	0.002157
	0.453	0.002125
213.08	0.46	0.002158
	0.455	0.002135
	0.523	0.002147
243.52	0.528	0.002168
	0.528	0.002168
	0.588	0.002146
273.96	0.592	0.002160
	0.592	0.002160
	promedio	0.002180
	Desviación estándar	4.21865E-05
	% C.V	1.9347

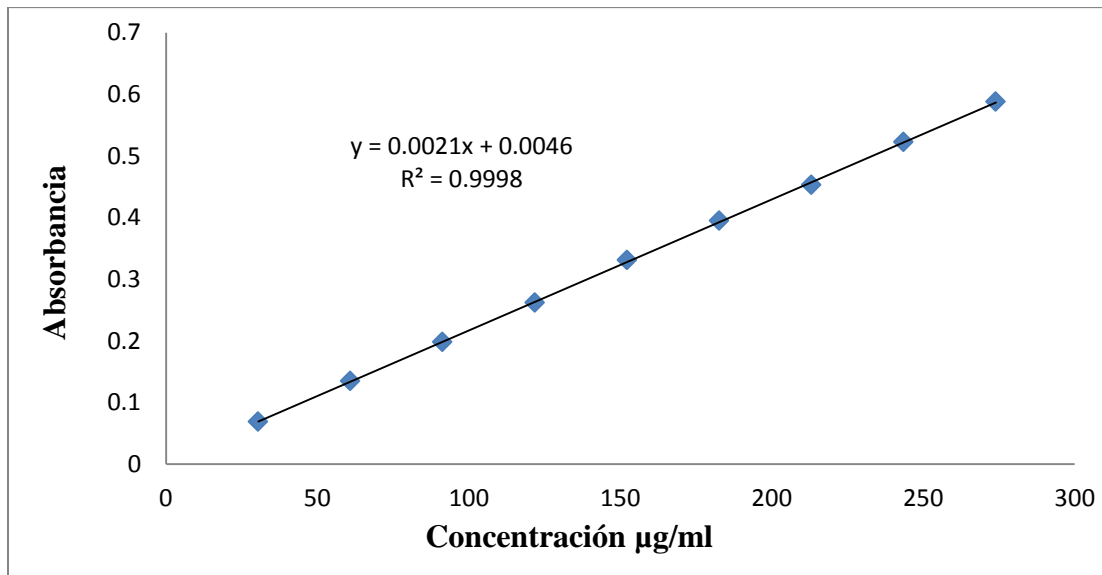


Figura 38. Gráfica de regresión lineal de la curva de calibración.

De acuerdo a los datos de la Tabla 9 se evaluó el método analítico respecto al porcentaje del coeficiente de variación, el cual no debe ser mayor al 2 % para métodos analíticos espectrofotométricos según la guía de validación de métodos analíticos del colegio de QFBs, obteniendo un coeficiente de 1.9347 % quedando dentro de los parámetros establecidos.

Por otra parte el valor de r^2 del análisis de regresión lineal de la curva de calibración es cercano a 1 (Figura 38), por lo tanto el método analítico cumple con los parámetros de especificidad y linealidad para la cuantificación de CLOT.

9.4. Anexo 4

Resultados del modelo de Peppas y Higuchi para la liberación de CLOT.

ME3.1

Tiempo h	μg clot μg clot	μg clot alícuota	μg clot acumulados	μg corregidos	% liberado	$\ln t$	Mt/M_∞	$\ln Mt/M_\infty$
0.25	90.0000	7.7143	0	90.0000	0.9000	-1.3863	0.0090	-4.7105
0.5	123.3333	10.5714	7.7143	131.0476	1.3105	-0.6931	0.0131	-4.3348
1	256.6667	22.0000	18.2857	274.9524	2.7495	0.0000	0.0275	-3.5937
1.5	306.6667	26.2857	40.2857	346.9524	3.4695	0.4055	0.0347	-3.3612
2	373.3333	32.0000	66.5714	439.9048	4.3990	0.6931	0.0440	-3.1238
3	490.0000	42.0000	98.5714	588.5714	5.8857	1.0986	0.0589	-2.8326
4	656.6667	56.2857	140.5714	797.2381	7.9724	1.3863	0.0797	-2.5292
6	723.3333	62.0000	196.8571	920.1905	9.2019	1.7918	0.0920	-2.3858
8	840.0000	72.0000	258.8571	1098.8571	10.9886	2.0794	0.1099	-2.2083
24	1223.333	104.8571	330.8571	1554.1905	15.5419	3.1781	0.1554	-1.8616

ME3.2

Tiempo h	μg clot μg clot	μg clot alícuota	μg clot acumulados	μg corregidos	% liberado	$\ln t$	Mt/M_∞	$\ln Mt/M_\infty$
0.25	90.0000	7.7143	0	90.0000	0.9000	-1.3863	0.0090	-4.7105
0.5	123.3333	10.5714	7.7143	131.0476	1.3105	-0.6931	0.0131	-4.3348
1	240.0000	20.5714	18.2857	258.2857	2.5829	0.0000	0.0258	-3.6563
1.5	256.6667	22.0000	38.8571	295.5238	2.9552	0.4055	0.0296	-3.5216
2	390.0000	33.4286	60.8571	450.8571	4.5086	0.6931	0.0451	-3.0992
3	490.0000	42.0000	94.2857	584.2857	5.8429	1.0986	0.0584	-2.8400
4	656.6667	56.2857	136.2857	792.9524	7.9295	1.3863	0.0793	-2.5346
6	723.3333	62.0000	192.5714	915.9048	9.1590	1.7918	0.0916	-2.3904
8	840.0000	72.0000	254.5714	1094.5714	10.9457	2.0794	0.1095	-2.2122
24	1340.0000	114.8571	326.5714	1666.5714	16.6657	3.1781	0.1667	-1.7918

ME3.3

Tiempo h	μg clot	μg clot aliquota	μg clot acumulados	μg corregidos	% liberado	$\ln t$	Mt/M_{∞}	$\ln Mt/M_{\infty}$
0.25	106.6667	9.1429	0	106.6667	1.0667	-1.3863	0.0107	-4.5406
0.5	190.0000	16.2857	9.1429	199.1429	1.9914	-0.6931	0.0199	-3.9163
1	256.6667	22.0000	25.4286	282.0952	2.8210	0.0000	0.0282	-3.5681
1.5	290.0000	24.8571	47.4286	337.4286	3.3743	0.4055	0.0337	-3.3890
2	306.6667	26.2857	72.2857	378.9524	3.7895	0.6931	0.0379	-3.2729
3	323.3333	27.7143	98.5714	421.9048	4.2190	1.0986	0.0422	-3.1656
4	356.6667	30.5714	126.2857	482.9524	4.8295	1.3863	0.0483	-3.0304
6	473.3333	40.5714	156.8571	630.1905	6.3019	1.7918	0.0630	-2.7643
8	723.3333	62.0000	197.4286	920.7619	9.2076	2.0794	0.0921	-2.3851
24	1240.0000	106.2857	259.4286	1499.4286	14.9943	3.1781	0.1499	-1.8975

ME3.4

Tiempo h	μg clot	μg clot aliquota	μg clot acumulados	μg corregidos	% liberado	$\ln t$	Mt/M_{∞}	$\ln Mt/M_{\infty}$
0.25	140.0000	12.0000	0	140.0000	1.4000	-1.3863	0.0140	-4.2687
0.5	273.3333	23.4286	12.0000	285.3333	2.8533	-0.6931	0.0285	-3.5567
1	290.0000	24.8571	35.4286	325.4286	3.2543	0.0000	0.0325	-3.4252
1.5	340.0000	29.1429	60.2857	400.2857	4.0029	0.4055	0.0400	-3.2182
2	373.3333	32.0000	89.4286	462.7619	4.6276	0.6931	0.0463	-3.0731
3	406.6667	34.8571	121.4286	528.0952	5.2810	1.0986	0.0528	-2.9411
4	423.3333	36.2857	156.2857	579.6190	5.7962	1.3863	0.0580	-2.8480
6	723.3333	62.0000	192.5714	915.9048	9.1590	1.7918	0.0916	-2.3904
8	806.6667	69.1429	254.5714	1061.2381	10.6124	2.0794	0.1061	-2.2431
24	1256.6667	107.7143	323.7143	1580.3810	15.8038	3.1781	0.1580	-1.8449

ME3.5

Tiempo h	μg clot μg clot	μg clot aliquota	μg clot acumulados	μg corregidos	% liberado	$\ln t$	Mt/M_{∞}	$\ln Mt/M_{\infty}$
0.25	156.6667	13.4286	0	156.6667	1.5667	-1.3863	0.0157	-4.1562
0.5	223.3333	19.1429	13.4286	236.7619	2.3676	-0.6931	0.0237	-3.7433
1	256.6667	22.0000	32.5714	289.2381	2.8924	0.0000	0.0289	-3.5431
1.5	290.0000	24.8571	54.5714	344.5714	3.4457	0.4055	0.0345	-3.3680
2	323.3333	27.7143	79.4286	402.7619	4.0276	0.6931	0.0403	-3.2120
3	356.6667	30.5714	107.1429	463.8095	4.6381	1.0986	0.0464	-3.0709
4	406.6667	34.8571	137.7143	544.3810	5.4438	1.3863	0.0544	-2.9107
6	573.3333	49.1429	172.5714	745.9048	7.4590	1.7918	0.0746	-2.5957
8	840.0000	72.0000	221.7143	1061.7143	10.6171	2.0794	0.1062	-2.2427
24	1240.0000	106.2857	293.7143	1533.7143	15.3371	3.1781	0.1534	-1.8749

ME3.6

Tiempo h	μg clot μg clot	μg clot aliquota	μg clot acumulados	μg corregidos	% liberado	$\ln t$	Mt/M_{∞}	$\ln Mt/M_{\infty}$
0.25	106.6667	9.1429	0	106.6667	1.0667	-1.3863	0.0107	-4.5406
0.5	156.6667	13.4286	9.1429	165.8095	1.6581	-0.6931	0.0166	-4.0995
1	240.0000	20.5714	22.5714	262.5714	2.6257	0.0000	0.0263	-3.6398
1.5	290.0000	24.8571	43.1429	333.1429	3.3314	0.4055	0.0333	-3.4018
2	373.3333	32.0000	68.0000	441.3333	4.4133	0.6931	0.0441	-3.1205
3	506.6667	43.4286	100.0000	606.6667	6.0667	1.0986	0.0607	-2.8024
4	673.3333	57.7143	143.4286	816.7619	8.1676	1.3863	0.0817	-2.5050
6	740.0000	63.4286	201.1429	941.1429	9.4114	1.7918	0.0941	-2.3632
8	873.3333	74.8571	264.5714	1137.9048	11.3790	2.0794	0.1138	-2.1734
24	1256.6667	107.7143	339.4286	1596.0952	15.9610	3.1781	0.1596	-1.8350