



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

**Microemulsión con clotrimazol para uso vaginal: preparación y
evaluación *in vitro* y *ex vivo***

TESIS

PARA OBTENER EL TÍTULO DE
LICENCIADO EN FARMACIA

PRESENTA:

FRANCISCO JAVIER AGUILAR AGUILAR

ASESORA:

Dra. ELIZABETH PIÑÓN SEGUNDO

COASESORA:

Dra. MARÍA GUADALUPE NAVA ARZALUZ

CUAUTITLÁN IZCALLI, EDO. 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.



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

A mis padres, Beatriz y Francisco, por estar siempre conmigo apoyándome en todo lo que se me ocurre en cada una de las etapas de mi vida y por guiarme de la mejor manera para que ser lo que hoy soy. Les agradezco por enseñarme el valor del trabajo y soy afortunado por tenerlos a mi lado, este trabajo se los dedico a ustedes.

A la doctora Elizabeth Piñón, por ser una excelente académica y darme la oportunidad de estar en su equipo de trabajo y apoyarme desde el inicio hasta la fecha. Le agradezco enormemente por sus enseñanzas, su apoyo y por el aprendizaje que obtuve en la realización de este proyecto, así como el apoyo para incursionar en la industria farmacéutica para desarrollarme profesionalmente.

A Maricela, por ser mi compañera de vida, por motivarme y presionarme a concluir este proyecto, por alentarme y apoyarme para ser mejor persona y por estar conmigo siempre. Gracias por tantos momentos que hemos vivido y vivimos juntos.

A mis amigos y hermanos del CCH, en especial a Arturo, Brian y Mou; gracias por tantas vivencias y experiencias que pasamos juntos en aquella época maravillosa de mi vida, a pesar de que la distancia hace muy difícil que nos encontremos de nuevo, nunca olvidare cada momento que pase con ustedes en el famoso edificio "H" .

A mi amigo Rodrigo, con quien he convivido por un largo tiempo, gracias por tus consejos y por tantas cosas que hemos pasado a lo largo de tantos años.

A mis amigos de la universidad, G11, por haber sobrevivido a la universidad, a las fiestas, a las desveladas, a tareas y practicas tediosas y al estrés extremo del día a día en la universidad, por soportar mi sarcasmo y extravagancia. Juan, Kari, Mafer, Efrech, Micky, Chabela, Tania, Andy, Artur, los quiero amigos.



Índice general

Índice de figuras.....	III
Índice de tablas.....	IV
Índice de gráficos.....	V
Abreviaturas.....	VI

I.	Introducción.....	1
II.	Hipótesis	2
III.	Objetivos.....	2
1.	Objetivo general.	2
2.	Objetivos particulares.....	2
IV.	Marco teórico	3
1.	Aparato reproductor femenino.	3
2.	Vagina.	6
3.	Infecciones Vaginales.....	9
4.	Sistemas farmacéuticos de aplicación vaginal.....	11
4.1.	Absorción de fármacos en la vagina.	13
5.	Microemulsión.	14
5.1.	Composición de las microemulsiones.....	15
5.2.	Diferencia entre emulsión, nanoemulsión y microemulsión.....	19
5.3.	Microemulsiones como sistemas novedosos de administración de fármacos.	21
5.4.	Diagramas pseudoternarios de fases para microemulsiones.....	25
5.5.	Liberación de fármaco a partir de microemulsiones.	26
6.	Clotrimazol.....	28
7.	Evaluación de la liberación de un fármaco en formulaciones vaginales.	29
7.1.	Estudios <i>in vitro</i>	29
7.2.	Estudios <i>ex vivo</i>	30
8.	Celdas de Franz.	31
II.	Materiales y métodos.....	33



1.	Reactivos.....	33
2.	Aparatos y equipos	34
3.	Membrana	34
4.	Material biológico.....	34
IV.	Metodología.....	35
V.	Resultados y discusión.....	41
VI.	Conclusiones	78
VII.	Perspectivas.....	79
VIII.	Referencias	80
	Anexo 1. Espectros de absorción y coeficiente de absorptividad.....	84
	Anexo 2. Curvas de calibración.	86
	Anexo 3. Propiedades de los reactivos utilizados.	94
	Anexo 4. Resultados obtenidos del perfil de liberación.....	1



Índice de figuras.

Figura 1. Esquema del aparato reproductivo femenino.....	5
Figura 2. Dibujo esquemático de la mucosa vaginal.	7
Figura 3. Representación de las estructuras de auto-asociación más comúnmente encontrados en sistemas o/w, w/o ó bicontinuas..	19
Figura 4. Representación esquemática de la diferencia entre microemulsión, nanoemulsión y macroemulsión.	20
Figura 5. Diagrama de regiones hipotéticas de sistemas microemulsionados..	26
Figura 6. Representación esquemática de la difusión de las micelas en una microemulsión a través de una membrana.....	27
Figura 7. Representación esquemática de una Celda de Franz.....	33
Figuras 8. Tubos inmersos en el baño de Dubnoff	39
Figuras 9. Baño de Dubnoff.....	39
Figura 10. Celda tipo Franz utilizada.....	40
Figura 11. Estudios de liberación <i>in vitro</i>	41
Figura 12. Apariencia de la microemulsión sin fármaco..	42
Figura 13. Distribución del tamaño de glóbulo de la microemulsión sin fármaco..	43
Figura 14. Distribución del tamaño de glóbulo (lote 1)..	47
Figura 15. Distribución del tamaño de glóbulo (lote 2).	47
Figura 16. Distribución del tamaño de glóbulo (lote 3)..	48
Figura 17. Distribución del tamaño de glóbulo (lote 4).	48
Figura 18. Ejemplo del potencial zeta con un coloide negativo.....	51
Figura 19. Distribución del potencial zeta de la microemulsión del lote 3.	52
Figura 20. Distribución de potencial zeta de la microemulsión sin fármaco.	54
Figura 21. Espectro de absorción de clotrimazol en metanol	56
Figura 22. Modelo de bolsas de diálisis utilizado para la disolución.....	60
Figura 23. Cortes realizados al tejido vaginal de cerda para la extracción de clotrimazol.	74
Figura 24. Mecanismo de acción general del clotrimazol.....	94



Índice de tablas

Tabla 1. Comparación de las características físicas de micelas, emulsiones, liposomas, microemulsiones y nanopartículas..	24
Tabla 2. Composición y proporciones de la microemulsión..	34
Tabla 3. Tamaño de partícula e índice de polidispersión de la microemulsión sin fármaco...	43
Tabla 4. Tamaño de partícula promedio para microemulsiones con diferentes cantidades de clotrimazol..	46
Tabla 5. Resultados de la medición de potencial zeta de la microemulsión del lote 3	52
Tabla 6. Valor de potencial zeta de cada uno de los picos por separado para el lote 3	53
Tabla 7. Resultados de la medición de potencial zeta de la microemulsión sin fármaco... ..	53
Tabla 8. Solubilidad de Clotrimazol en FVS-Gelucire® al 3%	60
Tabla 9. Interpretación de los mecanismos de liberación de difusión	64
Tabla 10. Valores de r^2 y n obtenidos de la ecuación de la recta respectiva de cada sistema para la solución con clotrimazol.	65
Tabla 11. Valores de r^2 y n obtenidos de la ecuación de la recta respectiva de cada sistema para la microemulsión con clotrimazol.	65
Tabla 12. Valores de r^2 y de las constantes de orden cero obtenidos de la ecuación de la recta respectiva de cada sistema para la solución con clotrimazol y la microemulsión... ..	69
Tabla 13. Valores de r^2 y de las constantes de primer orden obtenidos de la ecuación de la recta respectiva de cada sistema para la solución con clotrimazol y la microemulsión.	70
Tabla 14. Resultados obtenidos de la extracción de clotrimazol en tejido vaginal para cada permeación.....	75
Tabla 15. Comparación de los parámetros de permeación obtenidos para la solución y la microemulsión	77



Índice de gráficos

Gráfico 1. Perfil de liberación para la solución de clotrimazol, en fluido vaginal simulado-Gelucire® al 3% pH= 4.51	61
Gráfico 2. Perfil de liberación para la microemulsión con clotrimazol, en fluido vaginal simulado-Gelucire® al 3% pH= 4.51	62
Gráfico 3. Comparación de los valores promedio de los perfiles de liberación de la microemulsión con clotrimazol y la solución de clotrimazol en fluido vaginal simulado-Gelucire® al 3% pH= 4.51	62
Gráfico 4. Modelo de Korsmayer- Peppas aplicado a la solución con clotrimazol.	65
Gráfico 5. Modelo de Korsmayer- Peppas aplicado a la microemulsion con clotrimazol.	66
Gráfico 6. Cinética de orden cero aplicada para resultados obtenidos de los perfiles de liberación de la solución con clotrimazol.....	68
Gráfico 7. Cinética de orden cero aplicada a los resultados obtenidos de los perfiles de liberación de la microemulsión con clotrimazol.	68
Gráfico 8. Cinética de primer orden aplicado para resultados obtenidos de los perfiles de liberación de la solución con clotrimazol.....	69
Gráfico 9. Cinética de primer orden aplicado para resultados obtenidos de los perfiles de liberación de la microemulsión con clotrimazol.	70
Gráfico 10. Perfil de permeación del clotrimazol en solución de FVS-Gelucire® al 3% p/v.	73
Gráfico 11. Perfil de permeación del clotrimazol en una microemulsión como vehículo	73
Gráfico 12. Comparación de los perfiles de permeación del clotrimazol en una microemulsión (rojo) y en solución de FVS-Gelucire® al 3% p/v.	74
Gráfico 13. Comparación de la cantidad promedio de fármaco retenido en el tejido vaginal.....	75



Abreviaturas

CLOT: clotrimazol.

o/w: aceite en agua.

w/o: agua en aceite.

ME: microemulsión.

Sol.: solución.

DLS: dispersión de luz dinámica.

IPD: índice de polidispersión.

Conc.: concentración

PEG: polietilenglicol.

Desv. Est.: desviación estándar.

C.V.: coeficiente de variación.

Min: minutos.

FSV: fluido vaginal simulado.

ETS: enfermedades de transmisión sexual.

FEUM: Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos.

I. Introducción

El desarrollo de nuevos sistemas de liberación de fármacos ha tenido un enorme impacto en la capacidad para tratar numerosas enfermedades. Para alcanzar efectos farmacológicos con menores efectos secundarios, los fármacos deben ser entregados a los sitios de destino sin distribución significativa a otras zonas.

Uno de estos sistemas son las microemulsiones. Las microemulsiones son definidas como un sistema de agua, aceite y por lo menos un tensoactivo que se presentan como una solución líquida transparente, ópticamente isotrópica, de baja viscosidad y termodinámicamente estable, que tiene un tamaño de glóbulo de 10 a 100 nm.

Los sistemas microemulsionados han surgido como nuevos vehículos para la administración de fármacos que permiten liberación sostenida o controlada y pueden ser administrados por vías tales como: vía transdérmica, tópica, oral, nasal, intravenosa, ocular, vaginal y otras vías de administración de medicamentos. Las formulaciones basadas en microemulsiones ofrecen una rápida dispersión y una mejora en los perfiles de absorción del fármaco que pueden ser explotados para el desarrollo de nuevos sistemas de liberación.

Debido a que las infecciones vaginales representan un alto índice de consultas ginecológicas en la mayoría de las instituciones de salud y centros médicos, síntomas como la picazón, el ardor y la secreción de la vagina son algunos de los motivos de consultas ginecológicas más comunes en la mayoría de las instituciones que prestan servicios de salud.

Estas afecciones pueden ser causadas por distintos microorganismos las cuales pueden o no ser transmitidas sexualmente. Debido a esto se debe prestar atención especial a dicha problemática ya que afecta a todas las mujeres de todas las edades, independientemente de los ámbitos económicos y socioculturales.

En este proyecto experimental se propone el desarrollo de un sistema farmacéutico a base de microemulsión que contenga un agente antimicótico eficaz en el tratamiento de infecciones vaginales causadas por hongos.

II. Hipótesis

Si las microemulsiones aumentan la solubilidad de los fármacos poco solubles en agua, entonces se podrá preparar una microemulsión con clotrimazol que pueda ser utilizada y hacer más eficiente el tratamiento de infecciones vaginales micóticas.

III. Objetivos

1. Objetivo general.

- Preparar una microemulsión constituida por clotrimazol, palmitato de isopropilo, Tween[®] 80-etanol (1:1) y agua para obtener una forma farmacéutica que pueda ser usada en el tratamiento de infecciones vaginales.

2. Objetivos particulares.

- Caracterizar las microemulsiones obtenidas evaluando, tamaño de glóbulo y estabilidad física para corroborar la formación de la microemulsión a través de difracción de rayo láser.
- Realizar estudios de liberación *in vitro* de una solución de clotrimazol y una microemulsión con clotrimazol empleando bolsas de diálisis para determinar el mecanismo de liberación del fármaco en una microemulsión.
- Realizar estudios de permeación *ex vivo* de una solución de clotrimazol y una microemulsión con clotrimazol empleando tejido vaginal de cerda para evaluar si el fármaco atraviesa o no el tejido vaginal.
- Desarrollar 2 métodos analíticos espectrofotométricos para cuantificar el clotrimazol en fluido vaginal simulado con Gelucire[®] 44/14 al 3%.

IV. Marco teórico

1. Aparato reproductor femenino.

El aparato genital femenino está conformado por órganos internos y externos. Los órganos internos comprenden a los ovarios, trompas uterinas, útero, vagina y los genitales externos, llamados en conjunto vulva.

El aparato genital femenino se compone de dos glándulas mixtas, los ovarios que generan los óvulos, las trompas que se encargan de dirigir los óvulos del ovario al útero, la vagina la cual es un conducto musculoso membranoso con una longitud aproximada de 8 a 12 cm, la vulva y la glándulas mamarias que están ligadas a este aparato y al sistema tegumentario (Tortora & Derrickson, 2007). El aparato genital femenino consta de órganos externos e internos, que a continuación se enlistan:

- Órganos externos.

Los órganos externos o vulva están compuestos por: clítoris, uretra, labios menores y el monte de venus, mostrados en la figura 1.

- i. Monte de venus o monte del pubis.

El monte del pubis es un sector de tejido graso redondeado que se encuentra por delante de la sínfisis del pubis. Está formada por tejido adiposo recubierto de piel con vello pubiano.

- ii. Labios mayores.

Los labios mayores son dos grandes pliegues de piel que contienen en su interior tejido adiposo subcutáneo y que se dirigen hacia abajo y hacia atrás desde el monte del pubis.

Después de la pubertad, sus superficies externas quedan revestidas de piel pigmentada recubiertas por vello contiene glándulas sebáceas y sudoríparas. El orificio entre los labios mayores se llama hendidura vulvar (Agur & Grant, 2007).

iii. Labios menores.

Los labios menores son dos delicados pliegues de piel que no contienen tejido adiposo subcutáneo ni están cubiertos por vello pero que poseen glándulas sebáceas y sudoríparas. Los labios menores se encuentran entre los labios mayores y rodean el vestíbulo de la vagina. En mujeres jóvenes sin hijos, habitualmente los labios menores están cubiertos por los labios mayores. En mujeres que han tenido hijos, los labios menores pueden protruir a través de los labios mayores (Fox, 2008).

iv. Clítoris.

El clítoris es un pequeño órgano cilíndrico compuesto por tejido eréctil que se agranda al rellenarse con sangre durante la excitación sexual. Tiene entre 2 a 3 cm de longitud y está localizado entre los extremos anteriores de los labios menores (Agur & Grant, 2007).

- Órganos internos.

Los órganos internos que integran el aparato reproductor femenino son el ovario, trompa uterina, útero y vagina, como se muestra en la figura 1.

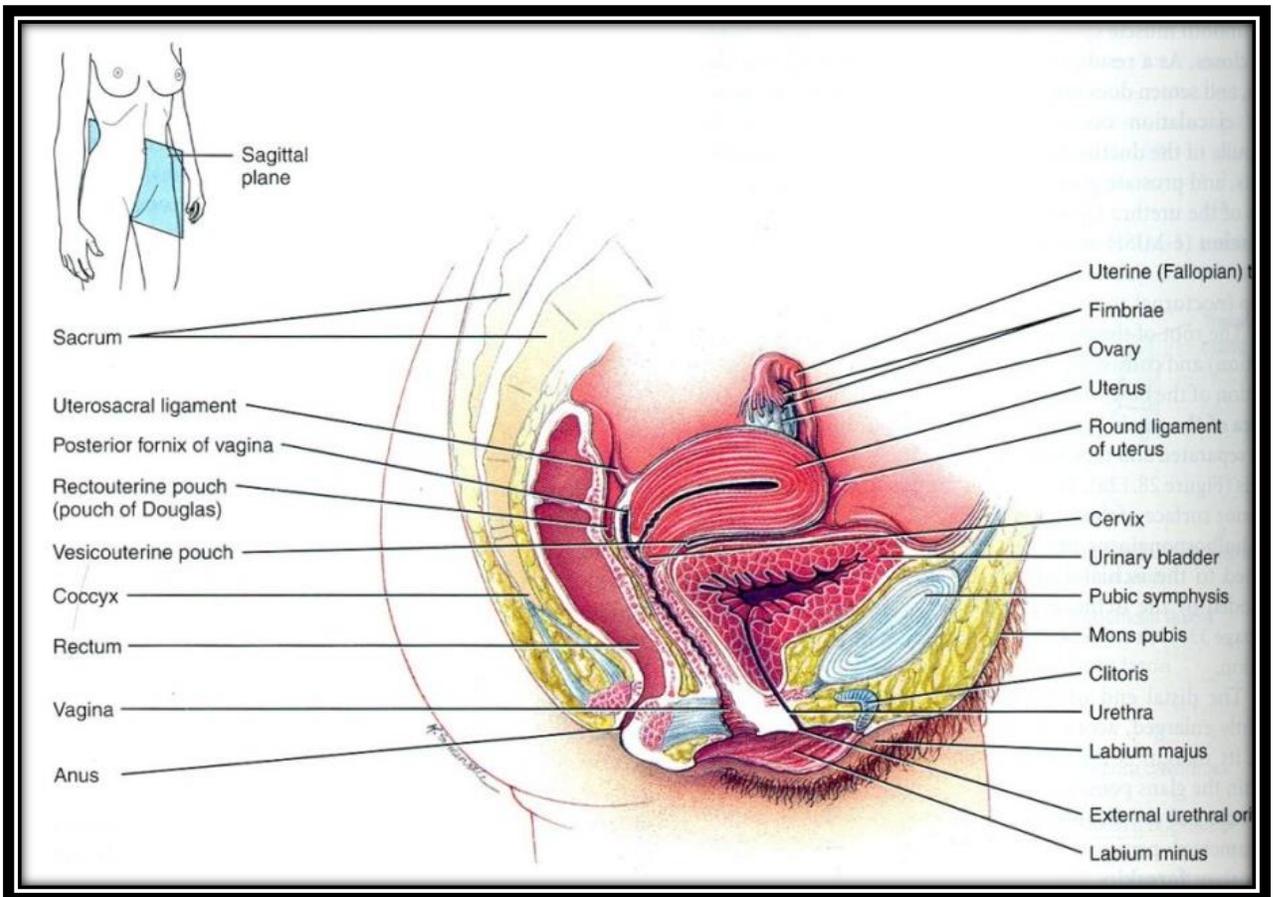


Figura 1. Esquema del aparato reproductivo femenino. Tomado de (Tortora & Derrickson, 2007).

i. Ovarios.

Los ovarios son 2 cuerpos ovalados en forma de almendra, de aproximadamente 3 cm, longitud, 1 cm, de ancho y 1 cm de espesor. Se localiza uno a cada lado del útero y se mantienen en posición por varios ligamentos. En los ovarios se encuentran los folículos ováricos que contienen los ovocitos en sus distintas fases de desarrollo y las células que nutren a los mismos ovocitos secundarios además de producir hormonas incluyendo progesterona y estrógenos (Tortora & Derrickson, 2007).

ii. Trompas de Falopio.

Las trompas de Falopio son 2 conductos de 10 - 12 cm. de longitud y 1 cm. de diámetro que se unen a los cuernos del útero por cada lado. Están diseñadas para recibir los ovocitos que salen de los ovarios y en su interior se produce la fecundación, el encuentro de los espermatozoides con el óvulo (Agur & Grant, 2007).

iii. Útero.

El útero o matriz es el sitio de implantación del óvulo fecundado, de desarrollo para el feto durante el embarazo y el parto. Durante los ciclos reproductores en los que la implantación no se produce, el útero es el sitio de origen del flujo menstrual.

La porción superior redondeada del cuerpo se llama fondo del útero y a los extremos del mismo o cuernos del útero se unen las trompas de Falopio, cuyas cavidades quedan así comunicadas con el interior del útero. Las células secretoras de la mucosa del cuello uterino producen una secreción llamada moco cervical, mezcla de agua, glucoproteínas, lípidos, enzimas y sales inorgánicas. En los años reproductores, las mujeres secretan de 20 a 60 ml de este líquido cada día (Fox, 2008).

iv. Vagina.

Este órgano se mencionara con más detalle ya que es el sitio al que va dirigido el sistema de liberación diseñado.

2. Vagina.

- Anatomía.

La vagina es un conducto fibromuscular tubular de 10 cm de largo recubierto por una membrana mucosa que se extiende desde el exterior del cuerpo al cuello uterino. Es el lugar de la salida para el flujo menstrual y el canal de parto. Situada entre la vejiga urinaria y el recto, la vagina se orienta en dirección superior y posterior, en donde se une con el útero (Tortora & Derrickson, 2007).

Histológicamente la vagina está compuesta por cuatro capas distintas: epitelio escamoso estratificado, lámina propia, capa muscular y adventicia.

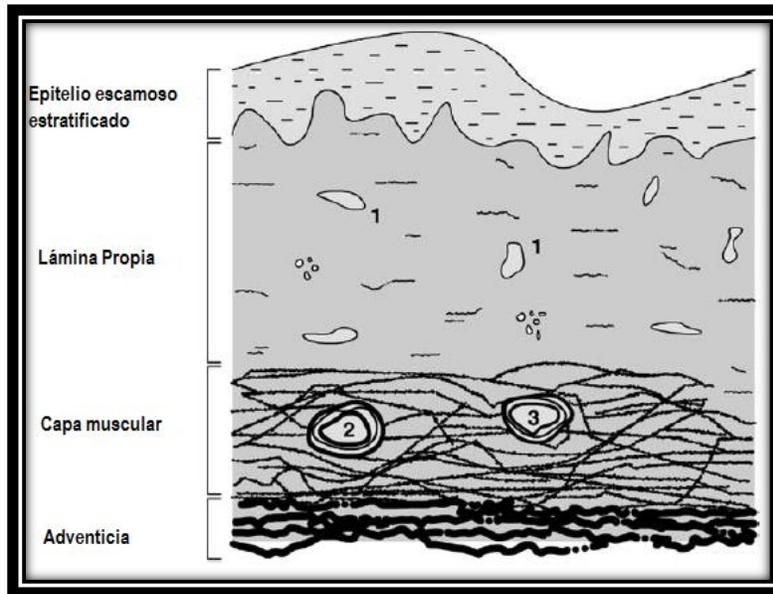


Figura 2. Dibujo esquemático de la mucosa vaginal. Modificado de (das-Neves & Bahia, 2006).

La mucosa de la vagina es la capa superficial, está en continuidad con la del útero. Desde el punto de vista histológico, está formada por un epitelio pavimentoso (plano) estratificado no queratinizado y tejido conectivo que se dispone formando pliegues transversales. La mucosa vaginal contiene grandes reservas de glucógeno, que produce ácidos orgánicos al descomponerse; el ambiente ácido resultante retarda el crecimiento microbiano (Tortora & Derrickson, 2007)

Aunque se considera un tejido mucoso, la vagina normal no tiene glándulas, la secreción vaginal es una mezcla de fluidos a partir de un número de fuentes diversas. Este revestimiento de moco tiene varias funciones fisiológicas importantes que juegan un papel significativo en la absorción o acción del fármaco (das-Neves & Bahia, 2006).

La lamina propia, o túnica, hecha de colágeno y elastina, contiene un rico suministro vascular y canales linfáticos.

La capa muscular es la tercera, está formada por una capa circular externa y una capa longitudinal interna de músculo lisa que puede elongarse considerablemente.

La capa final o adventicia, se compone de tejido conectivo areolar y un gran plexo de vasos sanguíneos, está formada por tejido conectivo laxo. Esta fija la vagina a los órganos adyacentes como la uretra y la vejiga urinaria hacia adelante y al recto hacia atrás.

- Fisiología

El pH del tracto genital femenino sano es ácido (pH=3.5-4.5) el cual sirve para protegerla de infecciones. Este ambiente ácido se mantiene por la producción de ácido láctico, que se crea gracias a las bacterias lácticas denominadas *Lactobacillus ssp.* Los lactobacilos son benéficos para la salud vaginal ya que ellos compiten con microbios exógenos por los nutrientes (Alexander, et al., 2004).

Estas bacterias (lactobacilos) producen ácido láctico a partir del glucógeno de las células mucosas exfoliadas de la vagina y peróxido de hidrógeno, que es tóxico para otros microorganismos que carecen de enzimas catalasas (Dobaria, et al., 2007).

Si la flora vaginal fisiológica se destruye, el entorno de la vagina se alcaliniza. Esto puede producir un desequilibrio bacteriano y provocar infecciones que, de manera normal, no aparecen en la flora vaginal.

Los tampones o cualquier otro material absorbente se convierten en un medio para la colonización y crecimiento de microorganismos. La sangre absorbida por el tampón alcaliniza el pH del medio vaginal, en el cual los lactobacilos no pueden sobrevivir (Valenta, 2005).

Los cambios en los niveles hormonales (especialmente estrógeno) durante el ciclo menstrual conducen a alteraciones en el espesor de la mucosa, en el ancho de los canales intercelulares, el pH y las secreciones.

También hay variaciones en la actividad enzimática (endopeptidasas y aminopeptidasas) con los cambios hormonales todos estos cambios hacen difícil lograr la liberación consistente del fármaco, por lo que es necesario desarrollar nuevos sistemas de liberación (Fox, 2008; Ciudad-Reynaud, 2007).

3. Infecciones Vaginales.

Las infecciones vaginales, tanto en México, como en el mundo, representan un alto índice de consultas ginecológicas en la mayoría de las instituciones que prestan servicios de salud. Las infecciones vaginales pueden ser provocadas por diversas entidades infecciosas, tanto bacterias aerobias como anaerobias, hongos, virus y parásitos, estos pueden ser transmitidos sexualmente o no (Perea, 2010).

Síntomas como la picazón, el ardor y la secreción de la vagina son algunos de los motivos de consulta más comunes entre las mujeres. Muchas veces, el problema es una vaginitis o inflamación de la vagina. Entre las mujeres en edad fértil, la causa más común es una infección bacteriana. El síntoma principal es una secreción vaginal fétida, pero algunas mujeres no tienen síntomas (Martín-Aragon & Benedí, 2009; Perea, 2010).

- Vaginitis.

La vaginitis bacteriana, la tricomoniasis y la candidiasis son posiblemente los padecimientos ginecológicos más frecuentes, estas afecciones pueden ser provocadas de manera exógena o endógena.

- Vaginitis bacteriana.

La vaginitis bacteriana se caracteriza por la sustitución de los lactobacilos por *Gardnerella vaginalis*, asociación que se debe con frecuencia a anaerobios, como *Bacteroides spp* y *Mobiluncus spp*. Este padecimiento se manifiesta por flujo,

comezón, mal olor (aminas) y pH elevado. La frecuencia de vaginitis bacteriana en la población mundial varía entre 16 y 26% (Flores-Paz., et al., 2003).

La causa de esta disbacteriosis es desconocida, y se asocia con la existencia de múltiples parejas sexuales, duchas vaginales y pérdida de *Lactobacillus ssp*, lo que provoca una elevación del pH vaginal (Perea, 2010).

- Vaginitis candidiásica.

La vaginitis por *Candida spp*, caracterizada por ardor, comezón, flujo, inflamación de la vagina, es frecuente en la mujer. El principal agente etiológico de la candidiasis vaginal y de otras infecciones ginecológicas como la peritonitis pélvica es *C. albicans* (Flores-Paz., et al., 2003). Aproximadamente el 75% de las mujeres experimentan por lo menos un episodio de candidiasis vulvovaginal durante su vida y aproximadamente 40% a 50% de ellos sufren de múltiples episodios (Bachhav & Patravale, 2009).

En la vaginitis candidiásica el pH vaginal se mantiene a 4.5 o inferior y no siempre tiene la candidiasis el carácter de ETS, pudiendo ser una infección endógena, las infecciones por hongos pueden ocurrir la semana previa a la menstruación, debido a las fluctuaciones de los niveles estrogénicos (Ciudad-Reynaud, 2007).

- Trichomoniasis.

Otro agente etiológico causante de vaginitis es el parásito *Trichomona vaginalis*, que causa lesiones muy severas en el cérvix como friabilidad, zonas hemorrágicas y secreción vaginal abundante.

Su frecuencia es muy variada; dependiendo de la población estudiada. Produce leucorrea profusa, espumosa, amarillo-verdosa y maloliente, con abundantes polimorfonucleares, pH alcalino, y prurito vaginal. En la exploración, la vagina está inflamada y el cérvix enrojecido y edematoso con aspecto de frambuesa (Perea, 2010). La infección por *T. vaginalis* constituye una de las ETS mas frecuentes en el mundo.

- Vaginitis por clamidia

La infección por *Chlamydia trachomatis* es una enfermedad muy común transmitida sexualmente. A la clamidia se le conoce como la enfermedad silenciosa, porque entre el 70-80% de las mujeres infectadas y cerca del 50% de los hombres infectados no presentan síntomas. Si hay síntomas, éstos aparecen generalmente entre 1 y 3 semanas después del contagio. Esta es la forma de vaginitis más diagnosticada en el mundo (Flores-Paz., et al., 2003).

4. Sistemas farmacéuticos de aplicación vaginal.

La vagina se ha utilizado como una vía de administración de fármacos durante mucho tiempo, tradicionalmente con el fin de obtener un efecto farmacológico local. Varios tipos de fármacos se han administrado a través de la mucosa vaginal, tales como antimicrobianos, inductores de parto, espermicidas y hormonas sexuales (Alexander, et al., 2004).

La ruta vaginal ha sido considerada de gran interés para la administración de fármacos, ya que permite tanto la administración local como sistémica, permitiendo la absorción de péptidos y otras macromoléculas, e incluso nanopartículas. La ruta vaginal ofrece diferentes ventajas sobre la oral, pero no se priva de inconvenientes.

Preparaciones ginecológicas modernas con frecuencia incorporan moléculas poliméricas con el fin de mejorar la eficiencia y prolongar la adsorción y retención por las células de la mucosa vaginal (Braga., et al., 2009).

La administración local (vaginal) no sólo da tratamiento específico, sino también evita los efectos secundarios tóxicos de los fármacos que pueden encontrarse cuando se administran por vía oral (Bachhav & Patravale, 2009).

Los sistemas ideales de administración de fármacos vaginales deben ser fáciles de usar, discretos, sin dolor para el paciente, rentable, ampliamente disponible y seguros para la administración continúa. También debe permitir la autoadministración, con una mínima interferencia con el funcionamiento del cuerpo y de la vida diaria.

Hasta la década de 1920 se consideraba que la vagina era un órgano incapaz de absorber fármacos de forma sistemática. Aunque la mayoría de estos medicamentos que se administran vaginalmente están indicados para el tratamiento de las condiciones locales, un número significativo de ellos puede alcanzar niveles séricos suficientes para tener efectos sistémicos (das-Neves & Bahia, 2006).

La Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos (11ªed, 2014) muestra algunas de las formas farmacéuticas que pueden ser usadas vaginalmente, entre las que se encuentran las siguientes:

- a) Cremas: son formas farmacéuticas constituidas por dos fases, una lipofílica y otra acuosa, pueden ser una preparaciones líquidas o semisólidas que contienen el o los principios activos y aditivos, generalmente o/w, con un contenido de agua superior al 20%.
- b) Geles: son sistemas semisólidos que comprenden pequeñas cantidades de sólido, dispersos en cantidades relativamente grandes de líquido. Estos sistemas forman una matriz tridimensional, polimérica con un alto grado de reticulación física que contiene el o los principios activos y aditivos sólidos dispersos en la matriz.
- c) Ungüento o pomada: preparación de consistencia blanda que contiene el o los principios activos y aditivos incorporados a una base apropiada que le da consistencia. Se adhiere y aplica en la piel y mucosas. Esta base puede ser liposoluble o hidrosoluble, generalmente es anhidra o con un contenido de agua menor al 20%. También se denomina ungüento hidrofílico cuando contiene una base lavable o removible con agua.

- d) Jaleas: coloide semisólido que contiene el o los principios activos y aditivos, cuya base es hidrosoluble y por lo general está constituido por gomas.
- e) Cápsulas blandas: son formulaciones en las que el fármaco está incluido en un contenedor o cubierta soluble de gelatina. Los contenidos pueden ser sólidos, líquidos o de consistencia pastosa.
- f) Óvulos: preparaciones que contienen uno o más fármacos disueltos o dispersos en una masa, la cual puede ser soluble o dispersable en agua; de forma cónica, cilíndrica o de bala, al ser introducido en la vagina esta se funde o disuelve a la temperatura corporal.
- g) Tabletas: formas farmacéuticas sólidas de dosificación unitaria, preparadas por compresión, que contienen principios activos y excipientes.

4.1. Absorción de fármacos en la vagina.

La absorción vaginal de fármacos depende de distintos factores. Las propiedades más relevantes de la molécula (fármaco) que determinan si pueden permear y ser absorbidos a través de la mucosa vaginal son la lipofilicidad, el grado de ionización, el peso molecular, la superficie, la carga y la naturaleza química de moléculas.

También se encuentran los factores propios de la anatomía de la vagina. Las rugosidades vaginales y microcrestas sobre la superficie de las células epiteliales permiten la expansión de la vagina, aumentando el área interfacial donde colocar la formulación, mejorando así la absorción del fármaco; otros factores que afectan la vagina tiene notables características en términos de secreción vaginal, pH, actividad enzimática y microflora.

Estos factores afectan la extensión y retención así como la absorción y la liberación del fármaco en la vagina (Dobaria, et al., 2007).

El área de interfacial de la vagina es grande, rico suministro sanguíneo, esta vía de administración se evita el efecto primer paso hepático, además evita los efectos secundarios gastrointestinales y permeabilidades relativamente altas de fármacos

de pesos moleculares diversos son algunas de las características fisiológicas de la vagina que contribuyen a tener ventajas farmacocinéticas con respecto a la vía oral (Machado, et al., 2015).

Los pasos clave para que un fármaco se absorba en la vagina son la disolución del fármaco en el fluido vaginal y su penetración epitelial. La absorción de fármacos puede ser pasiva o activa.

Los mecanismos de transporte pasivos incluyen las rutas transcelular y paracelular, lo que representa un proceso de difusión. Los transportadores activos generan gradientes a través de las barreras, la mayoría de los fármacos permean la vagina a través de mecanismos de difusión (Palmeira, et al., 2015).

El mecanismo de permeación de la mayoría de los principios activos es por difusión simple, donde los principios activos lipófilos son absorbidos por vía intercelular, mientras que los hidrofílicos se absorben a través de los poros presentes en la mucosa vaginal (das-Neves & Bahia, 2006).

5. Microemulsión.

Las microemulsiones son sistemas que podrían ser útiles para la administración vaginal de fármacos, tanto para tener un efecto local como sistémico.

- Definición.

El concepto microemulsión se introdujo en la década de 1940 por Hoar y Schulman, que generaron una solución clara de fase única valorando una emulsión convencional con hexanol (Lawrence & Rees, 2012).

Las microemulsiones se definen como sistemas coloidales transparentes de dos líquidos inmiscibles, estabilizados por una película interfacial de tensoactivo o una mezcla de tensoactivos, frecuentemente en combinación con un co-tensoactivo (Fanun, 2012), ópticamente isotrópica, de baja viscosidad y termodinámicamente estable.

Las microemulsiones son comúnmente conocidas como emulsiones agua en aceite (w/o, por sus siglas en ingles), aceite en agua (o/w) o pueden encontrarse en forma de una estructura bicontinua, produciendo un producto transparente que tiene un tamaño de glóbulo de 10 a 100 nm y no tienen tendencia a coalescer (Carlucci, et al., 2004) (Bagwe, et al., 2001).

5.1. Composición de las microemulsiones.

Como ya se mencionó las microemulsiones están constituidas por:

- Fase oleosa.

La selección de la fase oleosa se basa en la naturaleza del fármaco, así como la vía de administración. El *screening* del aceite puede tener un potencial de solubilización del fármaco.

Los ácidos grasos saturados e insaturados tienen actividad potenciadora de la penetración. Se ha reportado que los ácidos grasos aumentan la permeabilidad del estrato corneo, mediante la alteración de los lípidos densamente empaquetados. (Saini, et al., 2014).

- Tensoactivo.

Son sustancias que presentan actividad en la interface liquido-liquido, reduciendo la tensión interfacial del líquido en el que está disperso o bien la tensión interfacial en una solución heterogénea. (Saini, et al., 2014). Todos los agentes activos de superficie activa o tensoactivos contienen en su molécula, uno o varios grupos hidrofílicos, de tipo iónico o no iónico, generalmente una estructura hidrocarbonada lipofílica no polar. (Ramos Olmos, et al., 2003)

Los tensoactivos se pueden clasificar de acuerdo a su comportamiento en un medio acuoso como:

- Tensoactivos aniónicos: Están constituidos por una cadena alquílica lineal o ramificada que va de 10 a 14 átomos de carbono, y en su extremo polar de la molécula se encuentra un anión. Representantes de este grupo son

derivados del ión sulfato o de sulfonatos como es el dodecil sulfato de sodio o dodecil bencensulfonato de sodio (Wilkinson & Moore, 1990).

- Tensoactivos catiónicos: Son aquellos que en solución forman iones cargados positivamente. Como representante de este grupo se encuentra el bromuro de cetil amonio; en general, son compuestos cuaternarios de amonio o una amina grasa en medio ácido (Ramos Olmos, et al., 2003).

- Tensoactivos anfóteros ó anfotéricos: Como su nombre lo indica, actúan dependiendo el pH del medio en que se encuentren, en medio básico son aniónicos y en medio ácido son catiónicos, por ejemplo la alquil dimetil betaína (Ramos Olmos, et al., 2003).

- Tensoactivos no-iónicos: El término tensoactivo no-iónico se refiere principalmente a los derivados polioxietilenados y polioxipropilenados, también se incluyen en esta categoría los derivados de anhídridos del sorbitán, alcanolamidas, grasas, etc. Al no ionizarse en agua, no forman sales con los iones metálicos. Su naturaleza química los hace compatibles con otros tensoactivos aniónicos, catiónicos y con coloides cargados positiva y negativamente.
En los agentes no-iónicos el grupo hidrofóbico está formado por una cadena larga que contienen una serie de grupos débilmente solubilizantes (hidrofílicos) tales como enlaces etéreos o grupos hidroxilos en sus moléculas. La repetición de estas unidades débiles tiene el mismo efecto que un hidófilo fuerte, pero no hay ninguna ionización. (SEMARNAT, s.f.)

Los diferentes grupos de agentes tensoactivos (iónico, no iónico o zwitteriónico) se pueden utilizar para formular microemulsiones. Las características del tensoactivo dependerán de los grupos funcionales de la cabeza y de la cola (Rousseau, et al., 2011).

El papel de un tensoactivo es disminuir la energía interfacial. Esta característica es favorable para la formación de microemulsiones, para formar una microemulsión se necesita disminuir la “ γ ” de manera importante y así obtener glóbulos de diámetro del orden de nanómetros. Para lograr esto es necesario utilizar una sustancia más, denominada cotensoactivo, cuya función es disminuir aún más la energía de interfacial. (Robledo & Ruiz, s.f.).

Las formulaciones de microemulsiones a base de tensoactivos no iónicos (por ejemplo, Tween[®] y Span[®]) han demostrado ser apropiadas para aplicaciones farmacéuticas tópicas. Por otro lado, los perfiles de seguridad superiores de fosfolípidos (por ejemplo, lecitinas) prestan microemulsiones apropiadas para vías parenterales y orales. Por otra parte, las lecitinas son generalmente no irritantes y no sensibilizantes en animales y la piel humana (Mutasem O., et al., 2005).

- Co-tensoactivo.

En la mayoría de los casos, los tensoactivos de cadena única por sí solos son incapaces de reducir la tensión interfacial o/w suficientemente para formar microemulsión. Por lo que es necesario la adición de un cotensoactivo debido a su naturaleza anfifílica, un co-tensoactivo se acumula sustancialmente en la capa interfacial, aumentando la fluidez de la película interfacial penetrando en la capa de tensoactivo. (Saini, et al., 2014). Los cotensoactivos comúnmente más utilizados son alcoholes de cadena de mediana longitud (octanol, heptanol, etanol, etc.) ácidos alcanóicos, alcanodíoles y alquil aminas. (Lawrence & Rees, 2012).

Las propiedades inherentes de los alcoholes como cotensoactivos tendrán un impacto sobre su uso. En particular, la longitud de la cadena de alcohol puede tener un efecto significativo en la alteración del tensoactivo en la interfase aceite-agua, con alcoholes de cadena más cortas se incrementa la flexibilidad interfacial más ampliamente (Tagavifar, et al., 2018). Sin embargo, las preocupaciones de toxicidad limitan el uso de cotensoactivos eficaces. El cotensoactivo más utilizado es el etanol dado su disponibilidad y menor toxicidad a comparación de otros alcoholes (Rousseau, et al., 2011).

- Fase acuosa.

El agua es el vehículo más utilizado. El pH de la fase acuosa siempre necesita ser ajustado debido a su considerable impacto en el comportamiento de fase de microemulsiones.

- Estructura.

Las microemulsiones son sistemas dinámicos en el que la interfaz está fluctuando de manera continua y de forma espontánea. Estructuralmente, se dividen en o/w, w/o y microemulsiones bicontinuas.

Hay pocas teorías tratan de explicar la formación de microemulsiones. Sin embargo, la más famosa es la teoría geométrica de embalaje, que describe a las microemulsiones como pequeños glóbulos de fase interna (aproximadamente 200 nm) dispersa en la fase continua y estabilizado por el embalaje eficiente de moléculas de tensoactivo en la interfaz. (Rousseau, et al., 2011).

La mezcla de fase oleosa, agua y tensoactivos es capaz de formar una amplia variedad de estructuras y fases. Exámenes estructurales pueden revelar la existencia de emulsiones regulares, fases hexagonales cristalinas anisotrópicas o cúbicas y estructuras lamelares dependiendo de la relación de los componentes (Bardhan, et al., 2013) (Carlucci, et al., 2004).

La mayoría de estas fases y estructuras diferentes son fácilmente reconocibles por simple inspección visual de las composiciones debido a su apariencia física; las estructuras lamelares y las fases cúbicas son altamente viscosas, y pueden ser reveladas por inspección con luz polarizada (fases cristalinas), como se muestra en la figura 3, y por lo tanto ser diferenciadas de las microemulsiones regulares (Bagwe, et al., 2001).

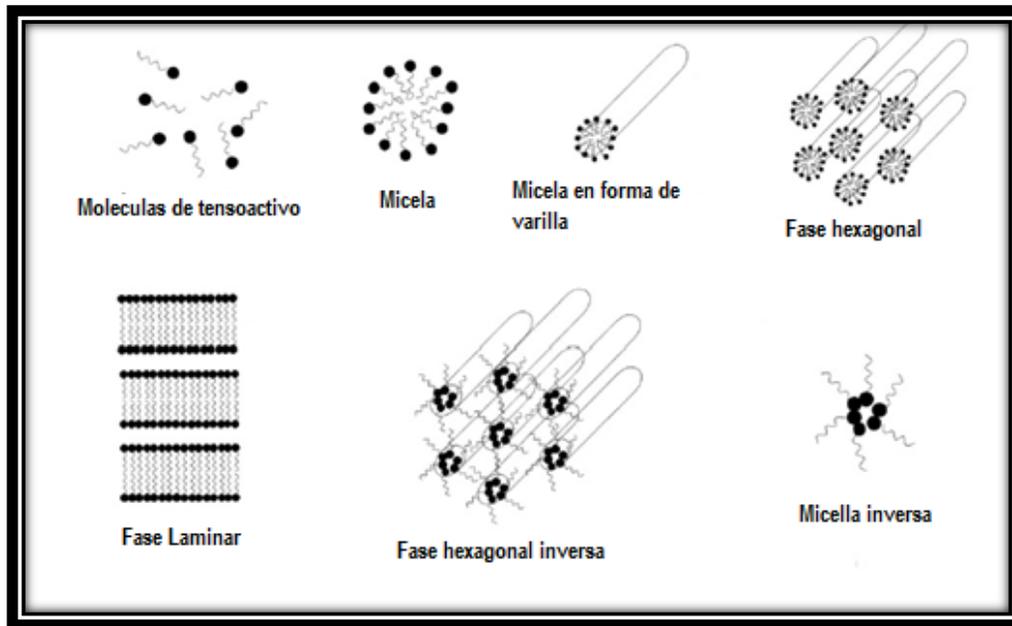


Figura 3. Representación esquemática de las estructuras de auto-asociación más comúnmente encontrados en sistemas o/w, w/o ó bicontinua. Modificado de Lawrence & Rees, 2012.

5.2. Diferencia entre emulsión, nanoemulsión y microemulsión.

La diferencia clave entre emulsiones y microemulsiones es la formación instantánea de estas últimas. Mientras que las emulsiones pueden exhibir una excelente estabilidad cinética, son, fundamentalmente, termodinámicamente inestables y eventualmente las fases se separan mientras que las ME son termodinámicamente estables las emulsiones son turbias mientras las microemulsiones son claras o translúcidas. Además, hay diferencias distintivas en su método de preparación, ya que las emulsiones requieren un gran aporte de energía, mientras que las microemulsiones no (Lawrence. & Rees, 2012).

Recientemente se ha propuesto el uso de un tipo nuevo de emulsiones, a las que han denominado nanoemulsiones se conocen comúnmente como miniemulsiones o emulsiones ultra finas. En comparación con las emulsiones convencionales y las microemulsiones, las nanoemulsiones son más similares a las macroemulsiones, con la excepción de tamaños de glóbulo más pequeños. Las nanoemulsiones

generalmente son por naturaleza de un color azul-blanco a semi-opaco. Se clasifican según los mismos tipos que las macroemulsiones; ya sea como o/w y w/o, en la figura 4 se puede observar la comparación entre una emulsión convencional, una nanoemulsión y una microemulsión. (Callendera, et al., 2017).

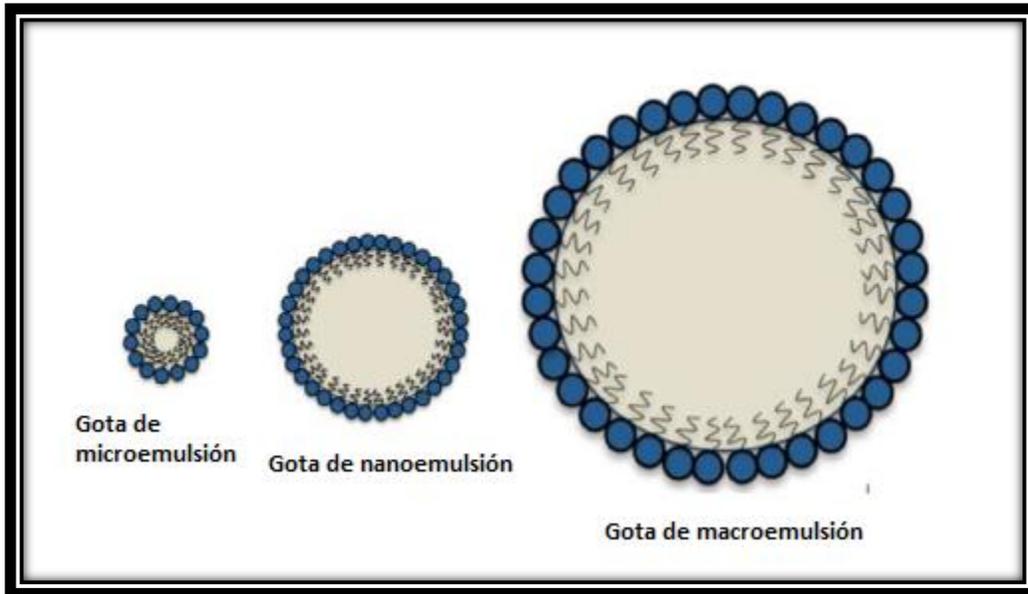


Figura 4. Representación esquemática de la diferencia entre microemulsión, nanoemulsión y macroemulsión. Modificado de (Callendera, et al., 2017)

Las emulsiones pueden ser aceite en agua (o/w) si los glóbulos de aceite se dispersan en agua o agua en aceite (w/o) si los glóbulos de agua se dispersan en aceite. El tamaño de glóbulo está en el rango de 0.5 y 50 μm . En consecuencia, las emulsiones tienen una apariencia turbia; las fases interfieren en la dispersión de la luz que pasa a través de la emulsión por lo tanto su color básico es el blanco. Como sistemas termodinámicamente inestables, las emulsiones no se forman espontáneamente; es necesaria la agitación manual o mecánica de los ingredientes usando centrifugación o agitación (Burguera & Burguera, 2012).

En una microemulsión las fases no se separan por centrifugación y el sistema se forma espontáneamente, la formación espontánea de una microemulsión se debe principalmente a una disminución sustancial de la tensión interfacial γ , en la interfase aceite-agua, de acuerdo con el equilibrio termodinámico típico. Si $\Delta G > 0$,

la emulsificación necesita trabajo adicional. En consecuencia, pueden obtenerse macroemulsiones termodinámicamente inestables (Fanun, 2012).

Se puede considerar que la energía libre de la formación de microemulsiones depende de la medida en que el tensoactivo reduce la tensión interfacial de la interfaz aceite-agua y el cambio en la entropía del sistema de manera que:

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

Donde ΔG_f es la energía libre de formación, γ es la tensión interfacial del sistema, ΔA es el cambio en el área interfacial de la microemulsificación, ΔS es el cambio en la entropía del sistema y T es la temperatura. Cuando una microemulsión se forma el cambio en ΔA es muy grande por el gran número formado de glóbulos muy pequeños. Considerándose entonces que para formar una microemulsión es necesario un valor de γ muy pequeño y esta compensado por el componente entrópico (Lawrence & Rees, 2012).

La transparencia y la dispersión de la luz se controlan en gran medida mediante el tamaño de partícula de la fase dispersada, por lo tanto, cuando se observan a simple vista, las composiciones transparentes parecen consistir en una única fase sin gotículas o partículas (Bardhan, et al., 2014).

5.3. Microemulsiones como sistemas novedosos de administración de fármacos.

El uso de las microemulsiones en tecnología farmacéutica es un desarrollo relativamente reciente. En la última década se han dedicado una gran cantidad de investigaciones a la exploración de las microemulsiones, en relación con el almacenamiento, la estabilidad, el bajo nivel de dosificación, la viabilidad, los efectos secundarios, la liberación controlada, la respuesta biológica y la distribución homogénea para su posible uso como sistemas de administración de fármacos (Vanic & Škalko-Basnet, 2013).

El desarrollo de nuevos sistemas de liberación ha tenido un enorme impacto en nuestra capacidad para tratar numerosas enfermedades. Para alcanzar efectos

farmacológicos con menores reacciones secundarias, los fármacos deben ser entregados a los sitios de destino sin distribución significativa a las zonas no diana (Fanun, 2012).

Las microemulsiones pueden ser formuladas para ser utilizadas como acarreadores de fármacos (Callendera, et al., 2017). Los sistemas a base de microemulsión han surgido como nuevos vehículos para la administración de fármacos que permiten liberación sostenida o controlada por diferentes vías como: transdérmica, tópica, oral, nasal, intravenosa, ocular, vaginal entre otras vías (Bachhav & Patravale, 2009).

La administración de fármacos por medio de microemulsiones es una plataforma de entrega práctica para mejorar la especificidad, la actividad terapéutica, y la reducción de toxicidad de los fármacos. Debido a la existencia de diferentes dominios de polaridad en los sistemas microemulsionados, muestran un enorme potencial para ser utilizado como vehículos de administración para una diversidad de fármacos (Lawrence & Rees, 2012).

Las microemulsiones son particularmente atractivas para fármacos que sean sensibles al calor, ya que para la elaboración de estas no requieren altas temperaturas. Los glóbulos pequeños proporcionan una mejor adherencia a las membranas y transporte de moléculas de fármaco de una manera controlada. (Bardhan, et al., 2014).

Otra razón que justifica el uso de microemulsiones w/o, es que estos protegen a las moléculas de fármaco soluble en agua, en particular proteínas y péptidos del metabolismo, por el contrario las microemulsiones o/w son investigadas para facilitar la disolución de moléculas insolubles en agua para su administración.

Las microemulsiones se caracterizan por tener una ultra baja tensión interfacial entre las fases no miscibles y ofrecen la ventaja de formación espontánea, estabilidad termodinámica, simplicidad de fabricación, capacidad de solubilización de solutos lipófilos, hidrófilos y anfifílicos, mejorar la solubilización y biodisponibilidad de los fármacos hidrofóbicos, gran superficie y el potencial de

mejora de la permeación a través de diferentes membranas y/o mucosas, como la piel o la mucosa vaginal. (Fanun, 2012).

El grado y la velocidad de liberación del fármaco dependen del método de preparación del sistema generado en las microemulsiones. El sistema generado podría influir en la selección de una ruta de entrega. En todas las rutas de entrega, el tipo de microemulsión y microestructura afecta la magnitud y velocidad de liberación del fármaco (Burguera & Burguera, 2012).

La producción de microemulsiones requiere grandes cantidades de tensoactivo para disminuir la tensión interfacial de manera importante. Por lo tanto se necesita una cantidad de tensoactivo aproximadamente 100 veces mayor que la que se utiliza para formar una emulsión convencional. Este es uno de los principales problemas que impiden una amplia utilización de las microemulsiones debido a costo de las grandes cantidades de tensoactivo (Rousseau, et al., 2011).

Los trabajos publicados hasta el momento se centran en dos aspectos: en primer lugar, el efecto de las diferentes estructuras de la microemulsión en la capacidad de solubilización fármacos y la eficiencia de disolución; en segundo lugar, la caracterización fisicoquímica de microemulsiones cargadas con el fármaco en comparación con los sistemas libres de fármaco (Fanun, 2012).

En la tabla 1 se mencionan la comparación tipos de distintos tipos de sistemas emulsionados.

Tabla 1. Comparación de las características físicas de micelas, emulsiones, liposomas, microemulsiones y nanopartículas. Modificado de (Bagwe, et al., 2001).

Sistema de liberación	Ventajas	Desventajas
Micelas	Baja viscosidad. Tamaño de glóbulo pequeño. Fácil preparación. Vida de anaquel larga.	Baja solubilización de fármacos. Toxicidad potencial del surfactante.
Microemulsión	Alta solubilización del fármaco. Tamaño de glóbulo pequeño. Fácil preparación. Vida de anaquel larga.	Grandes cantidades de tensoactivo. Toxicidad potencial del tensoactivo y cotensoactivo.
Emulsión	Pequeñas cantidades de tensoactivo. Alta solubilidad del fármaco en el acarreador.	Alta viscosidad para la administración paraenteral Inestable. Vida de anaquel corta. Glóbulos grandes.
Liposomas y vesículas	Preparadas a partir de lectina y colesterol sustancias presentes en el cuerpo.	Difícil preparación A menudo se desintegran una vez administradas.
Nanopartículas	Larga vida de anaquel. Algunas pueden ser biodegradarse lentamente.	Solubilidad limitada del fármaco. Difícil preparación. Dificultad para controlar el tamaño de partícula. Los polímeros usados usualmente no son biocompatibles.

5.4. Diagramas pseudoternarios de fases para microemulsiones.

Dado que la existencia de microemulsiones es enteramente debida al delicado equilibrio de los componentes bien mezclados, los diagramas de fases pseudoternarios se utilizan para identificar y caracterizar regiones en las que se forma una microemulsión. Los tres elementos que componen el sistema están situados en los vértices del triángulo, donde su fracción de volumen correspondiente es 100%. Alejándose del ápice se reduce su fracción de volumen y aumenta la de uno o ambos componentes restantes (Rousseau, et al., 2011).

La variación de la composición lleva a la determinación de los límites de fase, y por lo tanto el comportamiento de fase del sistema se puede generar. La región de formación de microemulsión se caracteriza generalmente por la construcción de diagramas de fase pseudoternario. Tres componentes son el requisito básico para formar una microemulsión: una fase oleosa, una fase acuosa y un agente tensoactivo o mezcla de tensoactivos y/o cotensoactivos.

El tamaño y la región de existencia de un dominio de microemulsión monofásico dentro del diagrama de fase están fuertemente influenciados por la presencia de sales en la fase acuosa, la naturaleza del grupo polar y el grupo hidrocarbonado del tensoactivo, el de solvente y la temperatura (Bawgue, et. Al, 2001).

Si se utiliza un cotensoactivo, que a veces puede ser representado en una relación fija con el agente tensoactivo como un solo componente, se trata como un solo "pseudocomponente". Las cantidades relativas de estos tres componentes se pueden representar en un diagrama de fases ternario. Los diagramas de fase se pueden utilizar para mostrar la influencia de los cambios en las fracciones de volumen de las diferentes fases en el comportamiento de fase del sistema (Fanun, 2012).

En función de su formulación, los sistemas agua - aceite - tensoactivo presentan, al equilibrio, una o varias fases: sea una microemulsión sola (Winsor IV), una microemulsión en equilibrio con una fase oleosa (Winsor I) o con una fase acuosa (Winsor II) sea una microemulsión en equilibrio a la vez con una fase oleosa y una fase acuosa (Winsor III). (Talegaonkar, et al., 2008). En la figura 5 se muestran las

regiones hipotéticas de sistemas microemulsionados en un diagrama pseudoternario.

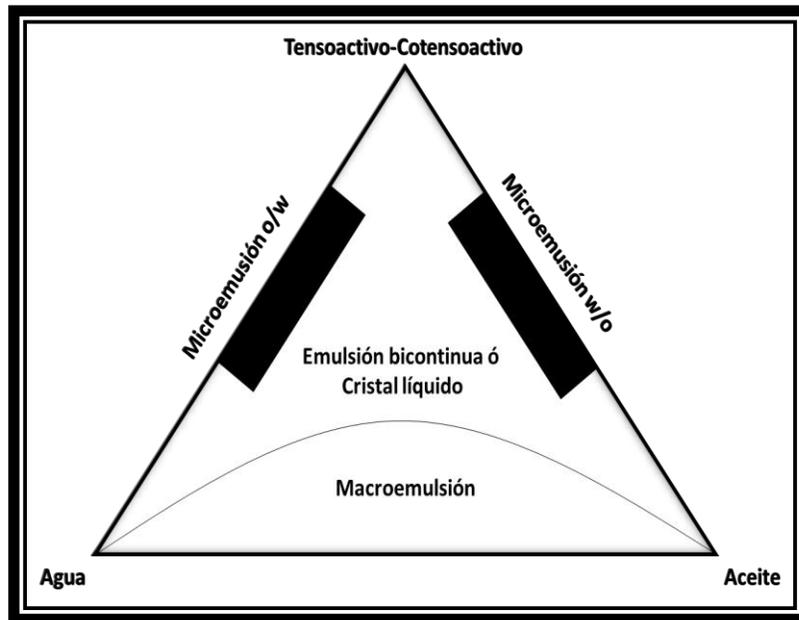


Figura 5. Diagrama de regiones hipotéticas de sistemas microemulsionados

La teoría de embalaje geométrico implica que la estabilidad de la microemulsión está en función de las interacciones de afinidad interfaciales (electrostáticas y fuerzas de van der Waals) que promuevan la integridad y la continuidad de la película interfacial. Por consiguiente, se puede suponer que la estabilidad de un sistema de microemulsión particular, está relacionada con las características fisicoquímicas y moleculares de sus componentes interfaciales (Tahaa, et al., 2005).

5.5. Liberación de fármaco a partir de microemulsiones.

La difusión del fármaco a partir de las gotitas de aceite a los tejidos vivos puede tener lugar cruzando el medio acuoso circundante que esencialmente actúa como una barrera para el transporte de fármacos debido a la baja solubilidad del

fármaco en agua. En este caso, la microemulsión se utiliza para retardar la administración de fármacos y la fase oleosa funciona como un depósito, pero también puede suceder que la microemulsión acelera la absorción del fármaco por los tejidos vivos como en el caso de gotitas de aceite fagocitosis dirigida por estructuras biológicas particulares (Lawrence & Rees, 2012).

En el estado de equilibrio, el fármaco puede ser distribuido entre tres fases diferentes: la fase dispersa, la fase continua, y las micelas de tensoactivo. El estudio de la liberación del fármaco desde partículas esféricas homogéneas puede ser discutido utilizando dos modelos limitantes:

- La difusión del fármaco a lo largo del glóbulo es determinante de la velocidad de todo el fenómeno, se considera que la barrera interfacial existente entre cada glóbulo y su entorno es el paso determinante de la velocidad, al ser uniforme la concentración del fármaco dentro del glóbulo.
- El fármaco se mueve desde las fases de aceite y micelares a la fase hidrófila circundante del compartimento donador y luego cruza la membrana interpuesta para alcanzar el compartimento receptor (Sirotti, et al., 2002) (Callendera, et al., 2017). Como se ejemplifica en la figura 6.

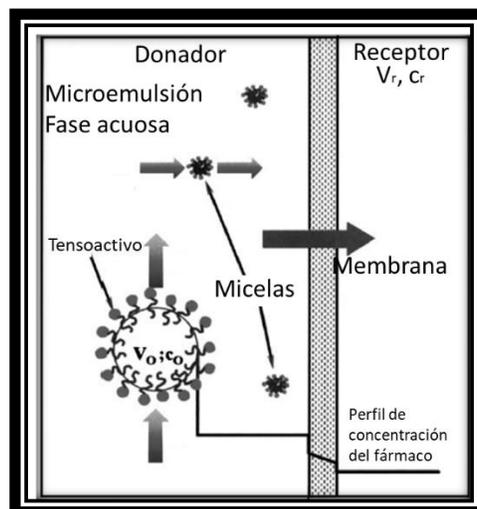


Figura 6. Representación esquemática de la difusión de las micelas en una microemulsión a través de una membrana. Modificado de Sirotti, et al., 2002.

Como ya se mencionó, un factor muy importante al formular microemulsiones, es su caracterización fisicoquímica. La caracterización comprende la medida del tamaño del glóbulo por dispersión de luz dinámica (DLS), la conductancia, la viscosidad, la conductividad térmica, la espectroscopia infrarroja, calorimetría, pH, conductividad eléctrica y viscosidad se usan frecuentemente para comprender los estados fisicoquímicos de las microemulsiones (Bagwe, et al., 2001).

6. Clotrimazol.

El clotrimazol (CLOT) es un antifúngico de amplio espectro perteneciente al grupo de los imidazoles. Su toxicidad es baja y es utilizado frecuentemente para tratar infecciones del tracto vaginal.

Una concentración de 3 µg/mL es efectiva para inhibir diferentes especies de hongos (Moffat, et al., 2011), en particular especies de *Candida*, el cual es responsable de la vulvovaginitis, además es efectivo contra patógenos como *Dermatophytes ssp*, levaduras, *Trichophyton ssp*, *Microsporum ssp*, *Epidermophyton ssp* y *Malassezla ssp*. Dicha enfermedad puede transmitida sexualmente y causa problemas ginecológicos recurrentes que dañan el epitelio vaginal dejándolo potencialmente susceptible a infecciones virales.

El clotrimazol es estable en estado sólido bajo condiciones normales de almacenamiento. Se mantiene sin cambios por calor (70°C) y exposición a la luz del día por dos semanas. En solución, la estabilidad del clotrimazol es pH dependiente. En medio alcalino es estable, pero se hidroliza en medio ácido (Florey, 1982).

El clotrimazol es altamente soluble en diclorometano, soluble en N, N-dimetil formamida, en metanol y etanol, poco soluble en dietiléter y prácticamente insoluble en agua (Moffat, et al., 2011). Como derivado imidazólico inhibe la enzima necesaria para la biosíntesis del ergosterol, componente fundamental de la membrana celular fúngica, con esta inhibición se produce una deficiencia que

provoca la alteración de la permeabilidad de la pared celular del hongo finalmente causando la lisis celular (Martín-Aragon & Benedí, 2009). En el anexo 4 se representa el mecanismo de acción del clotrimazol.

7. Evaluación de la liberación de un fármaco en formulaciones vaginales.

Una formulación vaginal debe ser evaluada realizando tanto los estudios *in vitro* e *in vivo*. Dependiendo de la forma de dosificación, pruebas adicionales para productos vaginales pueden incluir apariencia, viscosidad, pH, análisis de tamaños de partícula, velocidad de disolución, uniformidad de contenido y límites microbianos (Ansari, et al., 2006).

El control de la liberación del fármaco tiene considerable importancia en el diseño de sistemas novedosos de administración de fármacos. Los métodos para la evaluación de la liberación del fármaco están en el centro de atención. La piedra angular de cualquier sistema novedoso de administración de fármacos se basa en las propiedades farmacocinéticas y la permeabilidad del fármaco a través de membranas. La liberación del fármaco puede ser controlada o evaluado por el monitoreo de su permeación a través membranas naturales o sintéticas (Dobaria, et al., 2007).

7.1. Estudios *in vitro*.

Los ensayos de disolución *in vitro* se utilizan en la industria farmacéutica para dos fines fundamentales:

- Como parte integral del proceso de control de calidad de la forma farmacéutica.
- Como indicativo del comportamiento de la forma farmacéutica *in vivo*, es decir del proceso de disolución en los fluidos corporales.

Las condiciones experimentales de los ensayos de disolución son diferentes en función del objetivo deseado. Entre los factores a considerar en el diseño de un ensayo de disolución son:

- Composición del medio
- Temperatura
- Agitación
- Duración,
- Toma de muestras.

La velocidad de liberación se puede definir como la cantidad de fármaco que se disuelve en cada unidad de tiempo, a partir de una forma sólida de dosificación. El ensayo debe realizarse en condiciones de mínima concentración, condiciones de gradiente máximo (sink), de modo que la concentración de fármaco en el fluido de disolución no rebase nunca el 15% de su concentración a saturación (Guzmán, et al., 2013).

Aunque, la extrapolación de los resultados *in vitro* a los seres humanos debe hacerse con mucho cuidado, la correlación *in vitro* - *in vivo* representa una herramienta importante para la predicción de la farmacocinética *in vivo*.

Estos estudios incluyen la determinación de la liberación del fármaco y características bioadhesivas en adición a varias propiedades físicas y químicas de las formulaciones. Las características de liberación de un fármaco desde una formulación vaginal pueden ser determinada simulando el fluido vaginal (pH 4.2) y en varios medios de disolución (rango de pH de 2-12) a través de diferentes tipos de células de difusión con ciertas modificaciones y una prueba de disolución vaginal. La fuerza bioadhesiva de la formulación vaginal puede ser medida por varias técnicas (Dobarra, et al., 2007).

7.2. Estudios *ex vivo*.

Los modelos *ex vivo* se han usado para predecir la penetración de fármaco a través de la barrera vaginal mediante el uso de tejido vaginal, ya sea humano o

animal. Los tejidos *ex vivo* se usan no sólo para los ensayos de permeabilidad de fármacos, sino que también permiten el análisis histológico para evaluar las diferencias antes y después de la aplicación del fármaco / permeación, como cambios histológicos o alteraciones en la integridad del tejido (Machado, et al., 2015).

Mientras que algunos autores pueden clasificar estos experimentos *ex vivo* como experimentos *in vitro*, los dos conceptos son diferentes. Mientras los ensayos *ex vivo* requieren excisión de tejido de animales o seres humanos, y su uso en condiciones que conservan sus características biológicas y físicas originales durante un determinado período, la principal limitación de los modelos *in vitro*, es resultado de la imposibilidad de integrar factores externos celulares (Palmeira, et al., 2015).

El tejido vaginal obtenido a partir de diferentes especies animales tales como roedores, conejos, cerdos, monos, vacas y ovejas se han utilizado para estudios de permeabilidad. La absorción vaginal puede ser significativamente diferente al comparar el los modelos animales y humanos (Ansari, et al., 2006).

En general, el tejido vaginal porcino parece ser un buen modelo *ex vivo* para evaluar la permeabilidad de fármacos a través de ella. Para la extrapolación en tejido vaginal humano es de gran importancia para validar un estudio de la permeabilidad relativa en tejidos. Además, una ventaja de la vagina porcina es que se puede acceder fácilmente a través de los mataderos locales (Machado, et al., 2015).

8. Celdas de Franz.

Para realizar los estudios de permeación, se pueden emplear diversas celdas de difusión, las más utilizadas son las celdas tipo Franz usando membranas sintéticas.

Las celdas de Franz representan, desde su desarrollo en 1975, uno de los principales métodos utilizados para evaluar la penetración transepitelial y a partir de los últimos años, la liberación de fármacos (Chattaraj, et al., 2005).

Constituyen un sistema compuesto por dos cámaras, una donora y otra receptora, separadas por una membrana de origen animal, humana o sintética que permite evaluar la difusión de moléculas biológicamente activas de una cámara a otra (figura 7). En el compartimento superior se adiciona una solución o dispersión que contiene el compuesto activo y en el inferior se toman las muestras correspondientes, que posteriormente son cuantificadas mediante técnicas analíticas como ultravioleta y cromatografía de líquidos de alta presión. (Ansari, et al., 2006).

La circulación del agua caliente se mantiene alrededor de la cámara del receptor todo el proceso, por lo general a 37 ° C para imitar la temperatura del cuerpo humano. La barra de agitación garantiza la homogeneidad de la solución receptora. Las muestras pueden ser tomadas a través del tiempo mediante alícuotas por el puerto de muestreo (Dezani, et al., 2013).

Varios estudios *in vitro* han sido ya llevados a cabo para caracterizar la barrera vaginal en términos de penetración de fármaco utilizando un sistema de celda de Franz. Además este modelo constituye la metodología de referencia en la USP para los productos farmacéuticos de uso tópico (Machado, et al., 2015).

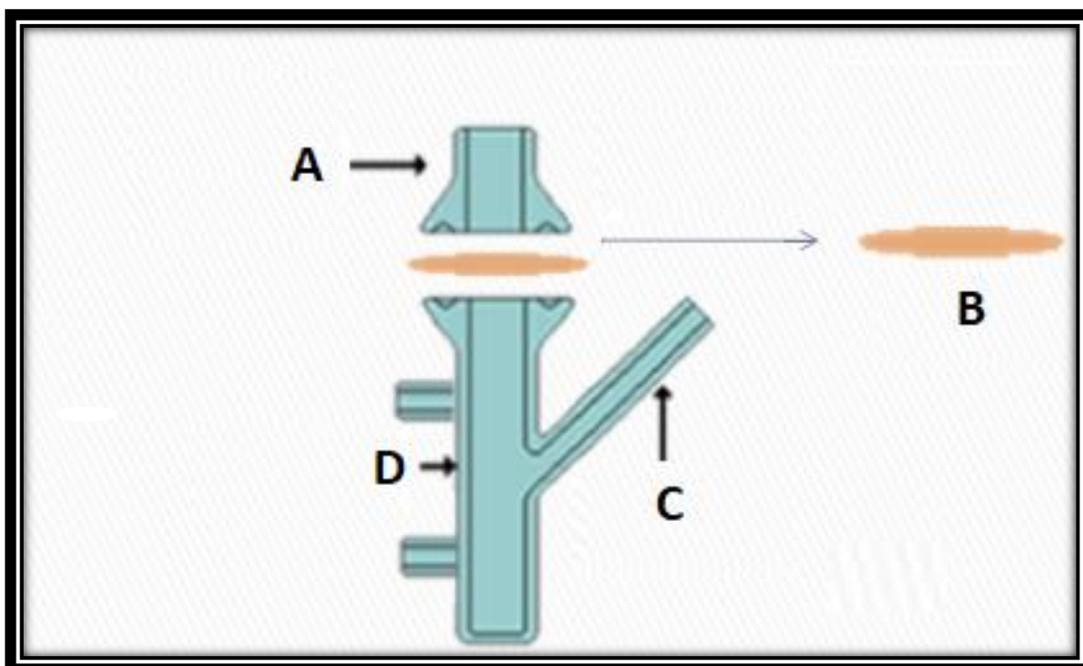


Figura 7. Representación esquemática de una Celda de Franz: A) compartimento donador, B) Tejido vaginal, C) Puerto de muestreo, D) Receptor.

V. Materiales y métodos

3. Reactivos

- Clotrimazol (Sigma-Aldrich, USA).
- Tween® 80 (Droguería Cosmopolita, México).
- Etanol (REASOL, México).
- Palmitato de isopropilo (Droguería Cosmopolita, México).
- Gelucire® 44/14 (Gattefossé Saint-Priest, Francia).
- Hidroxido de sodio (grado reactivo Fermont, México).
- Ácido clorhídrico (grado reactivo, J.T. Baker, México).
- Agua destilada y desionizada (obtenida del equipo Milli Q).
- Glucosa (grado reactivo Fermont, México).
- Urea (grado reactivo Fermont, México).
- Hidróxido de calcio (grado reactivo, J.T. Baker, México).

- Ácido láctico (Droguería Cosmopolita, México).
- Cloruro de sodio (grado reactivo Fermont, México).
- Glicerol (Droguería Cosmopolita, México).

4. Aparatos y equipos

- Balanza analítica Velab[®] (Mexico).
- Balanza electronica Ohaus Traveler[®] TM.
- Agitador magnético (WiseStir MSH-20).
- Agitadores magnéticos uniplaza y multiplazas.
- Zetasizer[®] ZS90 (USA).
- Espectrofotómetro Genesys 10s UV/Vis (USA).
- Potenciómetro Hanna Instruments[®] 2211 (Rumania).
- Centrifuga Hettich[®] Universal 320.
- Material de vidrio.
- Recirculador de líquidos con termostato (IKA EH4 basic).
- Celdas de permeación tipo Franz.
- Cronometro.

5. Membrana

- Tubos de membrana de celulosa, 10 mm de ancho y un diámetro de 6 mm y un peso molecular de 14000 Da (Sigma-Aldrich, USA).

6. Material biológico.

- Vaginas de cerda sin tratamiento térmico.

VI. Metodología

- Selección de la fase oleosa.

Se evaluaron dos aceites para la elaboración de la microemulsión, miristato de isopropilo y palmitato de isopropilo, se adicionaron 5 mg de clotrimazol en 2 mL de cada aceite respectivamente en tubos Eppendorf. Después se sonicó ambas muestras por 10 min a 25°C, y observó la presencia de residuos o sedimento.

- Preparación de las microemulsiones.

Se prepararon microemulsiones aceite en agua con agua, palmitato de isopropilo y una mezcla de Tween® 80-etanol (1:1), la proporciones de la microemulsión se muestran en la tabla 2. Estas proporciones fueron determinadas previamente.

Tabla 2. Composición y proporciones de la microemulsión.

Material	(%p/p)	Volumen (mL)	Cantidad (g)
Palmitato de isopropilo	5	0.5	0.42
Tween® 80	25	2.5	2.65
Etanol	25	2.5	1.97
Agua	45	4.5	4.5

Se pesaron cada uno de los componentes por separado. En el vaso con la cantidad pesada de Tween® 80, se adicionó la cantidad pesada de etanol para disolverlo, se mantuvo en agitación constante con un agitador magnético (WiseStir MSH-20).

Una vez disuelto en etanol el Tween® 80, se adicionó al vaso con palmitato de isopropilo hasta formar una solución homogénea. Se adicionó lentamente la proporción de agua, se mantuvo en agitación constante, hasta la formación una solución translúcida.

Se midió el tamaño de glóbulo de la microemulsión usando el Zetasizer® ZS90 y se hizo un análisis visual de la homogeneidad del sistema.

- Preparación de la microemulsión y adición del fármaco.

La microemulsión se preparó de la misma forma que en el punto anterior. El principio activo se disolvió en el vaso con la mezcla de palmitato de isopropilo y Tween® 80-etanol (1:1). Se adicionó y disolvió diferentes cantidades de fármaco, 5, 8, 10 y 12 mg de CLOT a un volumen de 10 mL de ME para determinar la carga máxima de clotrimazol a incluir. Estos lotes se denominaron lote 1 (5 mg), lote 2 (8 mg), lote 3 (10 mg) y lote 4 (12 mg).

- Caracterización de la microemulsión con fármaco.
 - Determinación del tamaño de glóbulo. Se determinó en un Zetasizer® nano-ZS90 utilizando como medio de dispersión agua destilada en una celda de vidrio. Cada lote se leyó por triplicado.
 - Estabilidad física. Se colocaron dos mililitros de ME de cada lote en un tubo de Eppendorf® respectivamente y se centrifugó a 5000 rpm por 20 minutos y se dejó en refrigeración por tres días, se observó si se presentaba algún cambio o sedimentación.

Se seleccionó como mejor sistema al que tuviera la mayor carga de clotrimazol y se mantuviera estable físicamente.

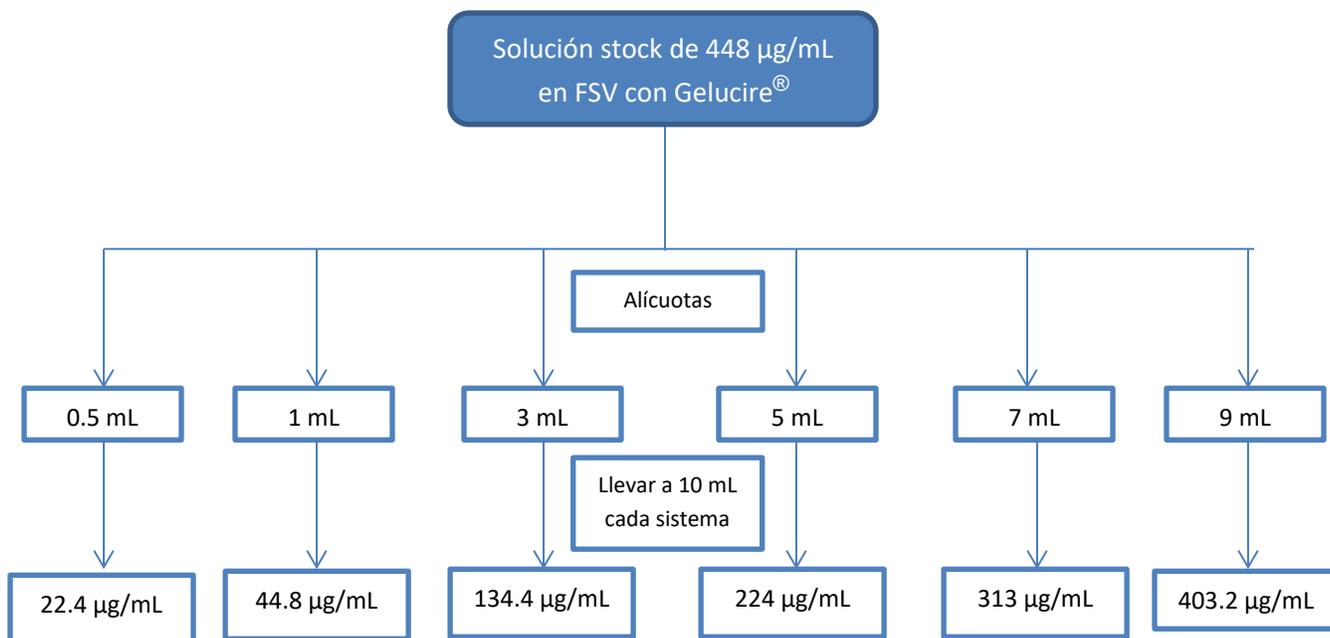
- Potencial zeta. Una vez seleccionado el sistema que contiene la mayor carga de fármaco, se determinó en un Zetasizer® nano-ZS90 el potencial zeta de la microemulsión en una celda transparente desechable. Se leyó por triplicado.
- Desarrollo de métodos analíticos.

Se desarrollaron dos métodos analíticos espectrofotométricos para cuantificar el clotrimazol liberado desde las bolsas de diálisis y el clotrimazol permeado a través de tejido vaginal de cerda sin tratamiento térmico. Los medios de disolución a utilizados son los siguientes:

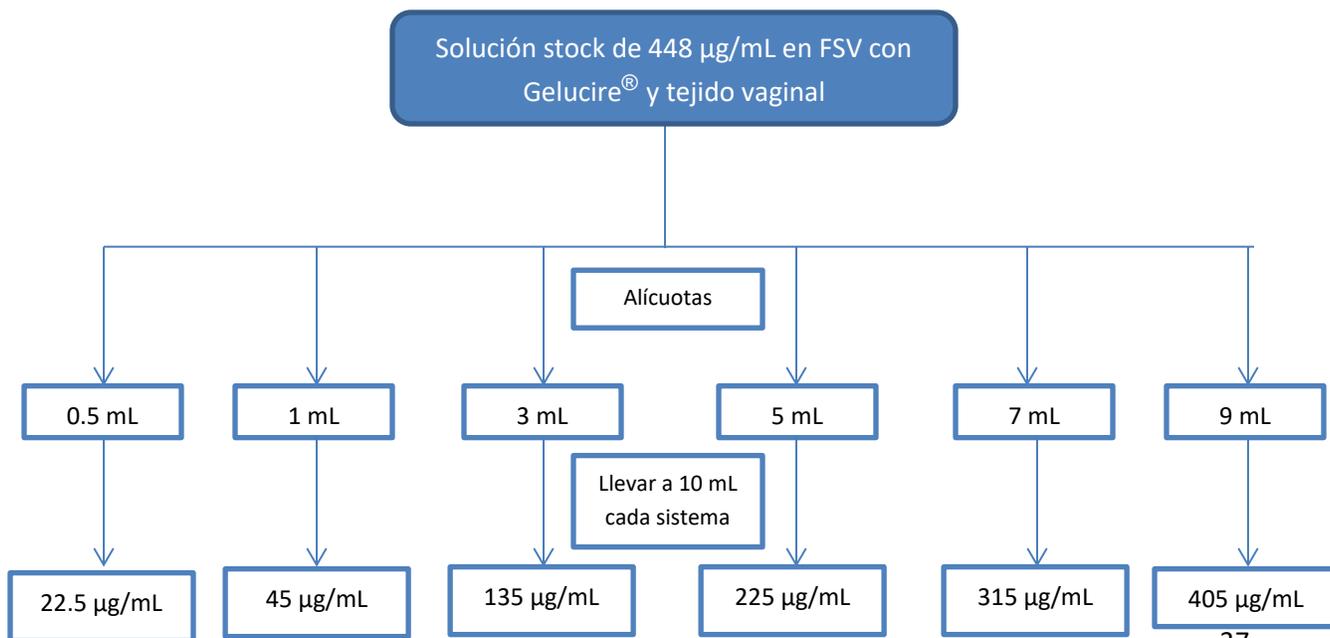
- Método 1: fluido vaginal simulado (FVS) con Gelucire® 44/14 al 3% (p/v).
- Método 2: FVS con Gelucire® 44/14 al 3% (p/v) en contacto con la cara interna del tejido vaginal. El tejido se mantuvo en contacto con la solución de FVS con Gelucire® durante 12 h con agitación magnética constante, posteriormente se filtró por gravedad y se centrifugó a 7000 rpm por 20 min.

Se determinaron las longitudes de onda de máxima absorción para el clotrimazol en ambos medios. Se construyeron las curvas de calibración correspondientes siguiendo los criterios de la FEUM 11° edición.

En los esquemas 1 y 2 se muestra con detalle cómo se prepararon las curvas de calibración para los dos métodos analíticos:



Esquema 1: curva de calibración de clotrimazol en fluido vaginal simulado (FVS) con Gelucire® 44/14 al 3%



Esquema 2: curva de calibración para clotrimazol en FVS con Gelucire® 44/14 al 3% (p/v) en contacto con tejido vaginal.

- Validación de los métodos analíticos.

Para demostrar que los métodos analíticos satisfacen los requisitos para la cuantificación confiable del fármaco se realizaron las siguientes pruebas:

- Selectividad del sistema: Se estableció que ninguna sustancia interfiera en la respuesta del analito, se adicionó cantidades conocidas de estas, solas o combinadas a la muestra y se evaluó su respuesta bajo las mismas condiciones de análisis.
- Linealidad del sistema: Se preparó por lo menos por triplicado 5 niveles de concentración de la solución de referencia. Se midió la respuesta analítica bajo las mismas condiciones de medición, se reportó la relación concentración vs respuesta analítica, se calculó la prueba de intercepto, intervalos de confianza ($IC_{\beta 1}$), r^2 y coeficiente de variación (CV). Criterios de aceptación: IC no debe incluir el cero, $r^2 \leq 0.98$, $CV \geq 2\%$.
- Precisión del sistema: Se preparó por lo menos 3 niveles de concentración por sextuplicado. Se midió la respuesta analítica bajo las mismas condiciones. Calcular Desv. Est. y CV de la respuesta analítica. Criterios de aceptación: $CV \geq 1.5\%$ para métodos físico-químicos, $CV \geq 3\%$ para métodos biológicos.
- Exactitud: Conociendo los componentes de la muestra se preparó el placebo analítico. Se seleccionaron dos niveles, superior e inferior, de la cantidad por sextuplicado. Se calculó el porcentaje de recobro de cada placebo analítico, al obtener el cociente de la cantidad recuperada respecto de la cantidad adicionada expresada en porcentaje. Calcular Desv. Est., CV e IC (μ) del porcentaje de recobro. Criterios de aceptación: IC(μ) debe incluir el 100% o que el promedio aritmético del % de recobro se incluya en el intervalo; CV del porcentaje de recobro no mayor de 3% para métodos espectrofotométricos.

- Límite de detección y Límite de cuantificación: Se preparó por lo menos 3 concentraciones de la sustancia de interés, se calculó el límite de detección teórico con la siguiente fórmula: $LD = \frac{3.3 \times s_{b0}}{b_1}$ y para el límite de cuantificación: $LC = \frac{10 \times s_{y/x}}{b_1}$, criterio de aceptación $r^2 \geq 0.98$, ($IC_{\beta 1}$) no debe incluir el cero (Secretaría-de-Salud, 2014).
- Cinética de liberación *in vitro*.

Se realizaron por triplicado pruebas de liberación *in vitro* para el lote microemulsión que fue seleccionado.

Se usó una bolsa de diálisis con tamaño de corte de de P.M. de 14000 Da, 10 mm de ancho y un diámetro de 6 mm selladas con hilo Nylon®. Se adiciono en cada bolsa 2 mL de la ME o de la solución con clotrimazol y las bolsas se depositaron en tubos de vidrio con tapa de baquelita que contenían 30 mL de FVS con Gelucire® al 3%, a temperatura de 37°C y se mantuvieron en agitación horizontal en un baño de Dubnoff como se muestra en las figuras 8 y 9.

a)



b)



Figuras 8 y 9. Se muestra los tubos inmersos en el baño de Dubnoff (a) y el baño de Dubnoff (b) respectivamente

El estudio se siguió durante 8 horas, tomando muestra del medio a diferentes tiempos (10, 20, 30, 40, 60, 90, 120, 180, 240, 300, 360, 420, 480 min) reponiendo con medio fresco el volumen retirado. Las muestras obtenidas se analizaron por UV a la longitud de onda de máxima absorción del clotrimazol.

- Estudio de permeación *ex vivo*.

La permeación *ex vivo* de clotrimazol se evaluó en celdas verticales tipo Franz para la ME con la cantidad máxima de clotrimazol disuelto y una solución de clotrimazol de concentración similar, utilizando como membrana tejido vaginal de cerda. Colocando el tejido entre el compartimiento donador y el receptor, llenando el compartimento receptor con FVS con Gelucire® al 3% y se mantuvieron las celdas a 37°C con agitación constante en una parrilla magnética multiplazas (figuras 10 y 11).

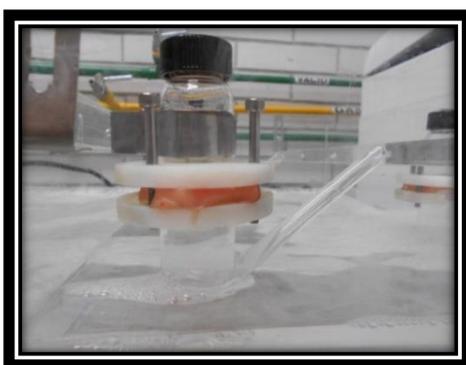


Figura 10. Se muestra la celda tipo Franz utilizada.

Adicionalmente, se evaluaron sistemas blanco que contenían 5 mL de FVS con Gelucire® al 3% o microemulsión sin fármaco. Seguir las permeaciones durante 8 h manteniendo las mismas condiciones y tomando muestra del medio a diferentes tiempos (30, 60, 120, 180, 240, 300, 360, 420, 480 min). Se analizaron las muestras por espectrofotometría UV-visible a la longitud de onda de máxima absorción del clotrimazol.

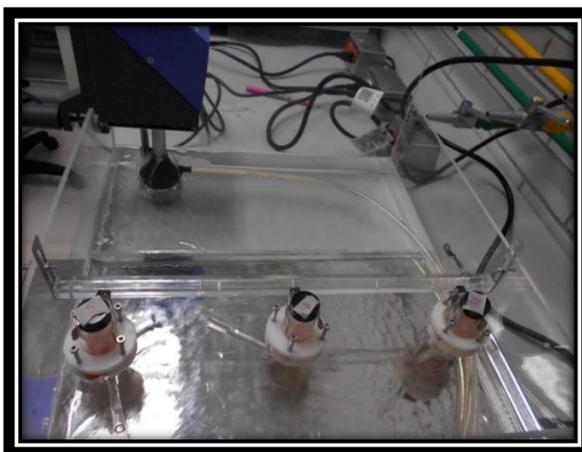


Figura 11. Celdas colocadas y en agitación en la parrilla multiplazas.

- Extracción de Clotrimazol remanente en el tejido vaginal.

Después de terminar los estudios de permeación, se lavó el tejido vaginal con agua destilada para eliminar el exceso de microemulsión, se cortó la mucosa vaginal en segmentos o trozos pequeños y mantener en agitación en una solución de FVS con Gelucire® al 3% (20 mL) a temperatura ambiente por 12 hrs.

Después se filtró por gravedad para eliminar residuos de gran tamaño, posteriormente se centrifugó a 10,000 rpm durante 20 min para eliminar sedimentos y otros residuos, se analizó el sobrenadante por UV-VIS a la longitud de onda de máxima de absorción (261 nm) y se interpoló el resultado en la curva de calibración correspondiente.

VII. Resultados y discusión.

En las pruebas de solubilidad cualitativa del clotrimazol, se apreció que los 5 mg de clotrimazol se solubilizaron mejor en palmitato de isopropilo en comparación con miristato de isopropilo, debido a que después de la sonicación el fármaco se encontraba suspendido en miristato de isopropilo mientras que en palmitato de isopropilo se encontró totalmente disuelto. Debido a que el palmitato de isopropilo posee una cadena alquílica más larga tiene mayor capacidad de disolver solutos

lipofílicos como el clotrimazol. Por tanto el palmitato de isopropilo se seleccionó como fase oleosa para la formulación de la microemulsión (Moffat, et al., 2011).

La obtención y caracterización de las microemulsiones se caracterizan por baja tensión interfacial entre las fases no miscibles y ofrecen la ventaja de formación espontánea, estabilidad termodinámica y simplicidad de fabricación, tal es el caso de la microemulsión preparada, la cual se forma espontáneamente (Fanun, 2012) pero se agitó brevemente para homogenizar por completo la microemulsión. Se obtuvo un sistema claro con una ligera coloración ámbar a causa del Tween® 80 como se muestra en la figura 12.

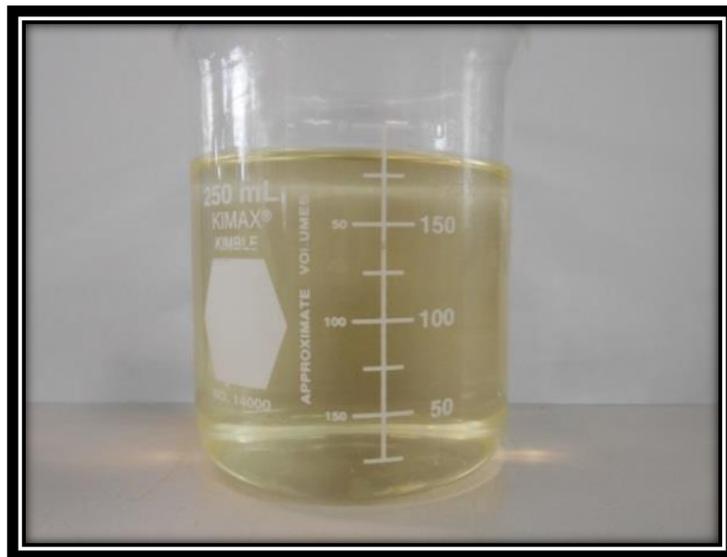


Figura 12. Apariencia de la microemulsión sin fármaco.

Una vez obtenida la microemulsión se determinó el tamaño de partícula e índice de polidispersión usando un equipo de DLS. Los resultados se resumen en la tabla 3.

Tabla 3. Tamaño de partícula e índice de polidispersión de la microemulsión sin fármaco.

Muestra	Tamaño (nm)	Índice de polidispersión
ME	14.29	0.095
	14.29	0.080
	14.43	0.102
Promedio	14.34	0.092

En la figura 13 se muestra la distribución en la población de glóbulos en la microemulsión obtenida.

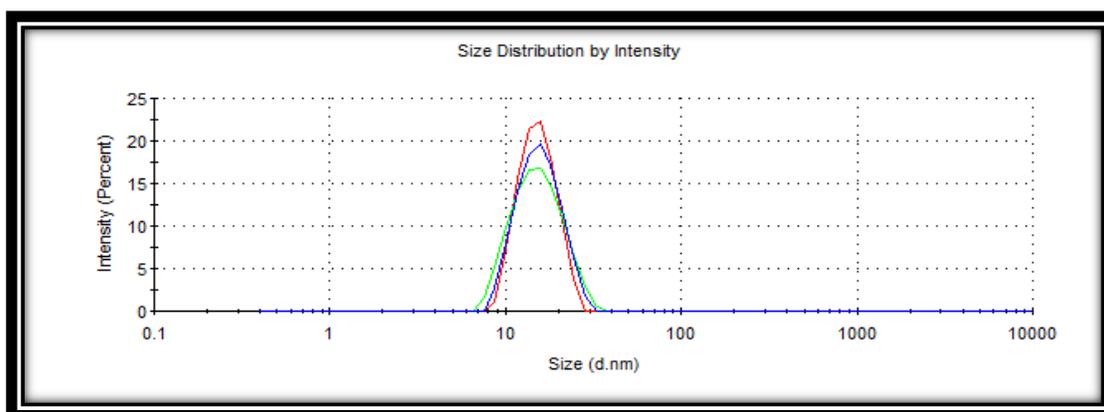


Figura 13. Distribución del tamaño de glóbulo de la microemulsión sin fármaco.

El tamaño de glóbulo es un parámetro importante ya que con este se puede diferenciar y denotar la existencia de glóbulos submicrónicos, específicamente un tamaño de glóbulo de 10 a 100 nm y que no exista coalescencia (Bagwe, et al., 2001).

La determinación del tamaño de glóbulo por el contador electrónico Zetasizer Nano S® ZS90 Malvern, el cual realiza mediciones de tamaño usando un proceso llamado dispersión de luz dinámica (DLS), mide el movimiento browniano y relaciona esto con el tamaño de las partículas y/o glóbulos. Lo hace mediante la iluminación de las partículas con un láser, si una pequeña partícula es iluminada por una fuente de luz tal como un láser, la partícula dispersará la luz en todas las

direcciones, y el análisis de las fluctuaciones de intensidad de la luz dispersada. La velocidad de medición de las partículas en un medio líquido depende de la temperatura, viscosidad del líquido y del tamaño de las partículas (Malvern-Instruments, 2004).

Como se puede observar en la tabla 3 así como en la figura 13, el tamaño promedio de los glóbulos de la microemulsión presentaron un tamaño submicrónico (14.34 nm). Se sabe que una microemulsión es un sistema coloidal con tamaños de 10 a 100 nm, tomando en cuenta esto se puede corroborar que el sistema analizado entra en la categoría de microemulsión.

Existen diversos tipos de dispersión que pueden presentarse en los sistemas coloidales, en este caso se busca tener un sistema monodisperso, para que exista una homogeneidad entre el tamaño de los glóbulos formados, un sistema polidisperso significaría que el tamaño de los glóbulos varía mucho entre sí. El índice de polidispersión establece que mientras más cercano a cero se encuentre el resultado obtenido, será indicativo de que el sistema presenta una monodispersión en el tamaño de glóbulo (Arias, et al., 2008).

Por lo que también se analizó el índice de polidispersión de la microemulsión formada, el índice de polidispersión es un parámetro que define la distribución del tamaño de partícula de una muestra cuyo valor es obtenido por análisis de espectroscopía fotónica de correlación. Puede tomar valores en el rango de 0 a 1; un valor más alto indica una distribución de nanopartículas menos homogénea.

De acuerdo con Kharia, et al., 2012, consideran un rango desde 0.01 a valores de 0.7 para partículas monodispersas. Muestras con una amplia distribución de tamaño de partícula tienen un índice de polidispersión mayor a 0.7. En el caso de la microemulsión se obtuvo un valor promedio de 0.092, por lo tanto la distribución de glóbulo de la microemulsión de trabajo se considera como monodispersa. Estos datos coinciden con la distribución poblacional que se incluye en la tabla 13.

Estos resultados coinciden con los datos que obtuvieron (Bachhav & Patravale, 2009), para una formulación con clotrimazol en la que utilizaron Cremophor® EL,

Capryol® 90 y agua: tamaño de glóbulo de 48.4 nm y un índice de polidispersión de 0.75, la formulación utilizada en este trabajo tuvo un tamaño de glóbulo menor y una dispersión menor entre el tamaño de cada glóbulo.

Una vez corroborada la formación de la microemulsión con los reactivos mostrados en la tabla 2, se procedió a adicionar el fármaco a utilizar (clotrimazol) preparando cuatro lotes los cuales contenían distintas cantidades del fármaco (5, 8, 10 y 12 mg) para evaluar la cantidad máxima de este que el sistema puede disolver.

Ya elaborados los lotes se determinó el tamaño de partícula de cada una para observar si la cantidad de fármaco añadida afectaría en el tamaño de glóbulo obtenido.

A continuación se muestran los resultados obtenidos de tamaño de glóbulo de los lotes de ME (tabla 4, figuras de la 14 a la 17). Todas las mediciones se realizaron por triplicado

En general, todos los lotes preparados presentan un tamaño submicrónico y todas las partículas se encuentran en el rango de entre 10-100 nanómetros, como se muestra en la tabla 4 y en las figuras 14 a la 17. Se puede apreciar la distribución del tamaño de glóbulo es similar, aunque el lote 3, que contiene 10 mg de CLOT, tiene un tamaño ligeramente menor a comparación de los demás lotes.

A pesar de esto mientras aumenta la concentración de fármaco el tamaño de glóbulo no se ve significativamente afectado, ya que en el lote 4 que contiene la mayor cantidad de CLOT, presenta tamaños de glóbulo similar a los otros lotes.

Tabla 4. Tamaño de partícula promedio para microemulsiones con diferentes cantidades de clotrimazol.

Lote	Cantidad de CLOT (mg)	Tamaño (nm)	IPD
1	5	12.19	0.155
		12.79	0.087
		12.80	0.123
		$\bar{x}= 12.56$	$\bar{x}= 0.121$
2	8	12.12	0.112
		12.21	0.104
		12.27	0.132
		$\bar{x}= 12.20$	$\bar{x}= 0.116$
3	10	11.17	0.095
		11.2	0.084
		11.17	0.097
		$\bar{x}= 11.18$	$\bar{x}= 0.092$
4	12	12.62	0.133
		12.78	0.130
		12.48	0.135
		$\bar{x}= 12.62$	$\bar{x}= 0.132$

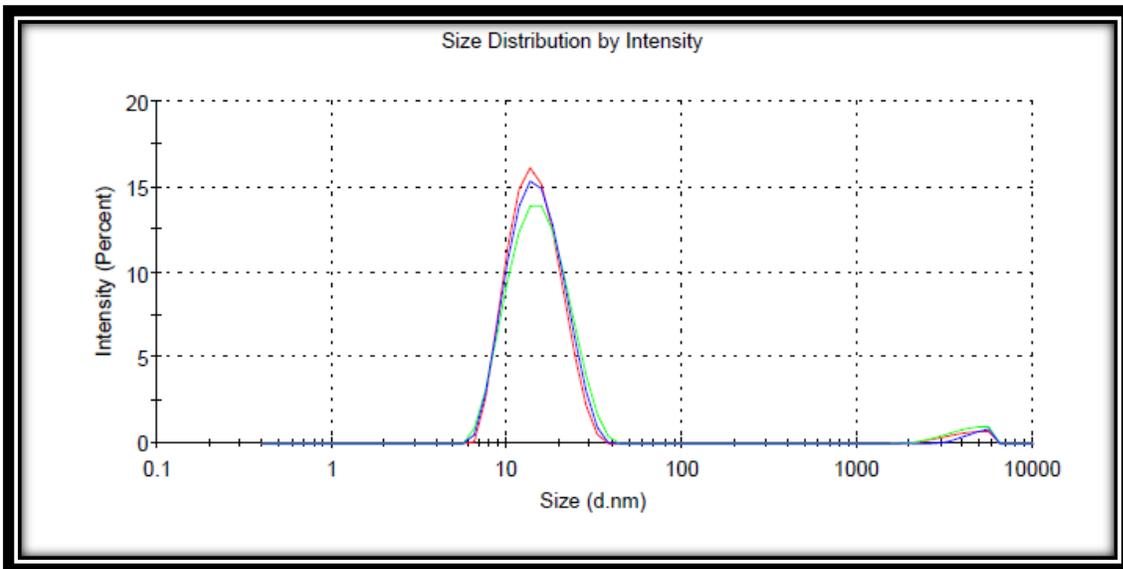


Figura 14. Distribución del tamaño de glóbulo (lote 1).

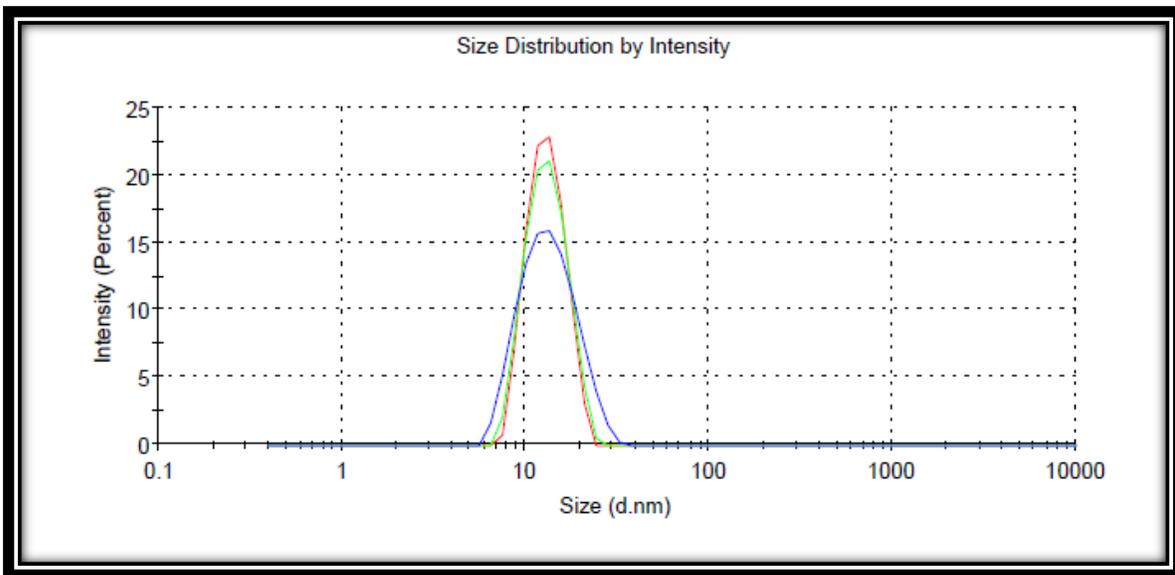


Figura 15. Distribución del tamaño de glóbulo (lote 2).

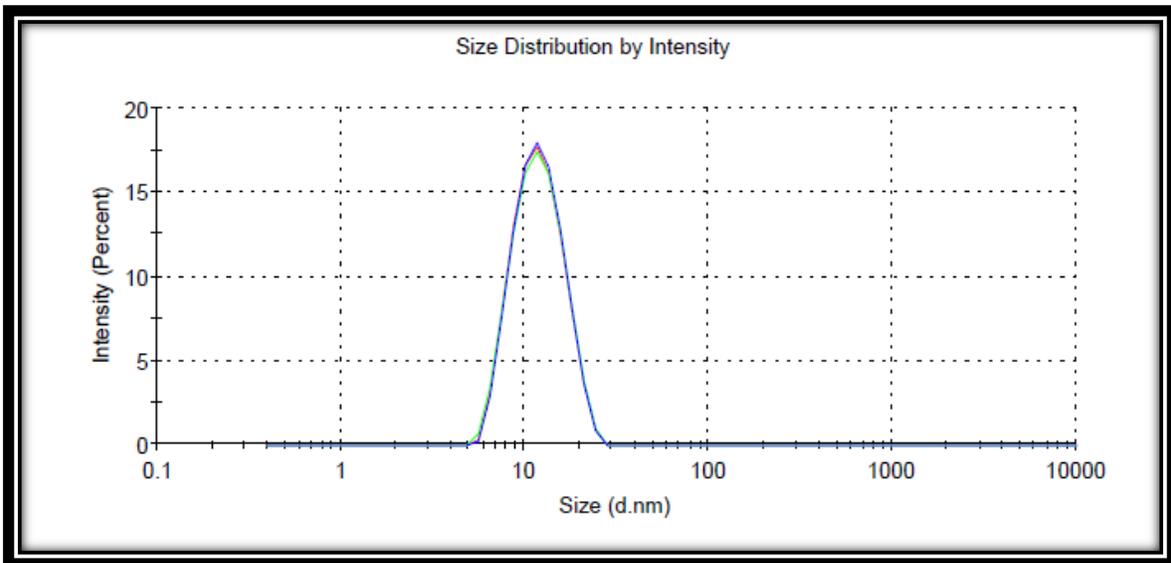


Figura 16. Distribución del tamaño de glóbulo (lote 3).

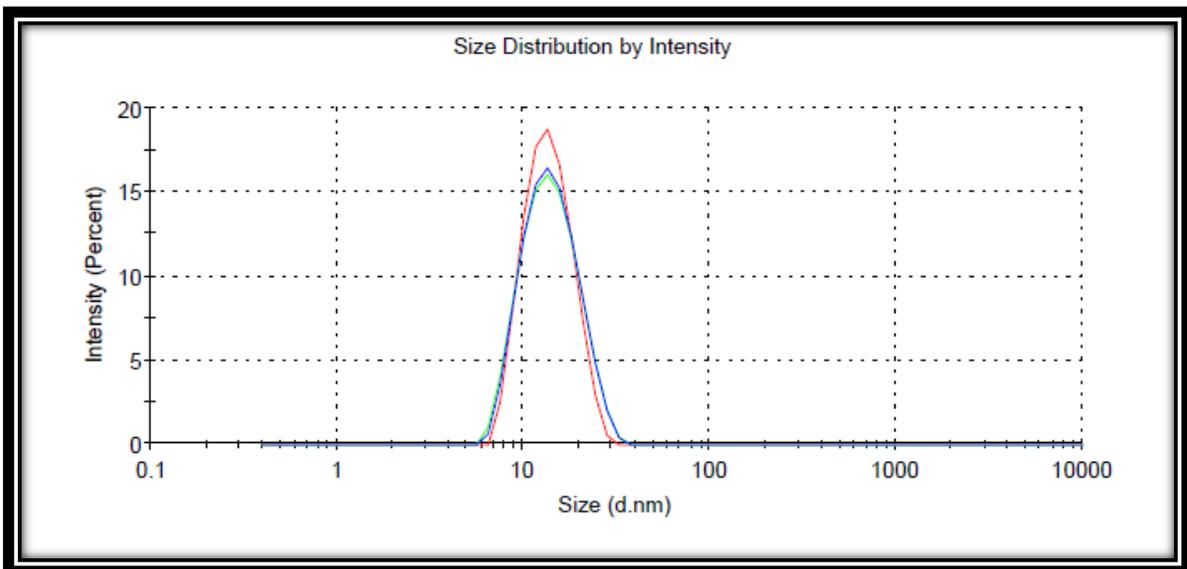


Figura 17. Distribución del tamaño de glóbulo (lote 4).

Posteriormente se llevó a cabo también una prueba de estabilidad física a todos los lotes, centrifugando las diferentes microemulsiones a 5,000 rpm durante 20 minutos y dejándolas en refrigeración por 3 días, se observaron cada una de las

muestras en busca de separación de fases o sedimentación de fármaco según sea el caso (Bachhav & Patravale, 2009).

La microemulsión del lote 4 que contenía 12 mg de fármaco, presentó una separación de fases y sedimentación de fármaco, en este caso lo que se buscaba era el lote que pudiera disolver la mayor cantidad de clotrimazol, por lo tanto se estableció que la cantidad máxima de fármaco que puede contenerse en la microemulsión desarrollada es de 10 mg, la cual corresponde al lote 3, ya que este no presentó separación de fases, ni sedimento de fármaco.

Una vez seleccionada la microemulsión con mayor cantidad de fármaco, se determinó el potencial zeta de ésta. La carga interfacial que pueda estar presente en los glóbulos de la microemulsión se determina por la medición de este parámetro.

La medición de la electrocinética, como la movilidad electroforética o potencial zeta, se puede considerar una técnica *in situ* para determinar la disolución de la superficie y la adsorción de especies cargadas en un sistema coloidal (Arias, et al., 2008).

El potencial zeta se define como el promedio del potencial electrostático existente en el plano hidrodinámico de la partícula, en medio del plano Stern y el extremo de la capa difusa. Aunque el potencial zeta no es igual al potencial de Stern o potencial de la superficie eléctrica en la doble capa, es a menudo la única ruta disponible para la caracterización de las propiedades de la doble capa eléctrica de los coloides.

El desarrollo de una carga neta en la superficie de la partícula afecta a la distribución de los iones en la región interfacial que rodea, lo que resulta en un aumento de la concentración de iones contrarios (iones de carga opuesta a la de la partícula) cerca de la superficie. Por lo tanto existe una doble capa eléctrica alrededor de cada partícula (Malvern-Instruments, 2004).

La magnitud del potencial zeta da una indicación de la estabilidad potencial del sistema coloidal. Un sistema coloidal es aquel en el que uno de los tres estados de la materia: gaseoso, líquido y sólido, están finamente dispersa en uno de los otros.

Para esta técnica estamos interesados en los dos estados de: un sólido disperso en un líquido, y un líquido dispersado en un líquido, ejemplo, una emulsión. Si todas las partículas en suspensión tienen un gran potencial zeta negativo o positivo, entonces tenderán a repelerse entre sí y no hay tendencia a flocular. Sin embargo, si las partículas tienen valores de potencial zeta baja, entonces no hay fuerza para impedir que las partículas se unan y floculen (Malvern-Instruments, 2004) (Honary & Zahir, 2013).

El potencial zeta puede ser una manera efectiva de controlar el comportamiento del coloide puesto que indica cambios en el potencial de la superficie y en las fuerzas de repulsión entre los coloides.

La teoría DLVO (llamada así por Derjaguin, Landau, Verwey y Overbeek) es la clásica explicación de los coloides en suspensión. Esta se basa en el equilibrio entre las fuerzas opuestas de repulsión electrostática y atracción tipo van der Waals y explica por qué algunos coloides se aglomeran mientras que otros no lo hacen. Cuanto mayor es, en valor absoluto, mayor es la carga de la partícula, por lo que a medida que disminuye el potencial Z las partículas pueden aproximarse aumentando la posibilidad de una colisión y viceversa, en la figura 18 se muestra una representación esquemática del potencial z de un coloide con carga negativa (Swarbrick, 2007).

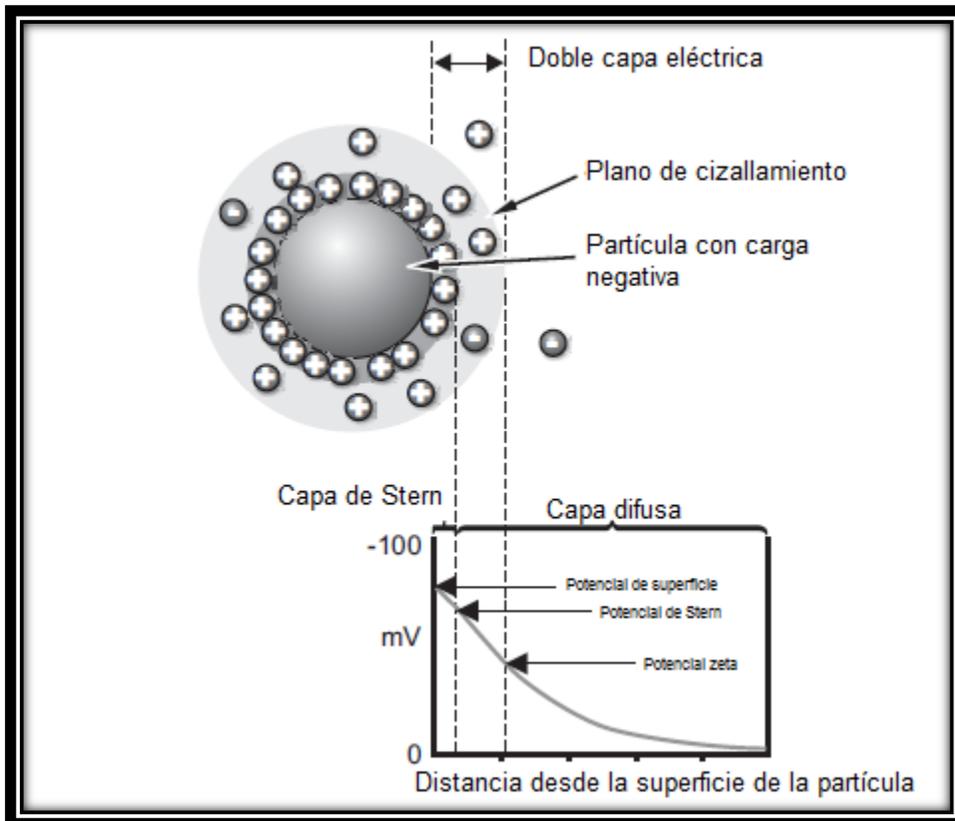


Figura 18. Ejemplo del potencial zeta con un coloide con carga negativa (Malvern-Instruments, 2004).

El potencial zeta de una dispersión puede ser medido gracias a la aplicación de un campo eléctrico a través de ella. El equipo utilizado emplea la dispersión de luz dinámica basada en la dispersión electroforética de las partículas dentro de la celda. El cambio de frecuencia en la incidencia de un rayo láser causado por el movimiento de estas partículas se mide como la movilidad de las mismas y ésta movilidad es transformada a potencial zeta usando la teoría de Smoluchowski, que es la ecuación de evolución temporal de la densidad de probabilidad en el espacio de fases del movimiento browniano de una partícula inmersa en un potencial (Honary & Zahir, 2013).

La determinación del potencial zeta se llevó a cabo en un Zetasizer Nano S® ZS90 Malvern, el equipo hace 3 mediciones de 12 ciclos cada una. El potencial zeta se mide utilizando una combinación de las técnicas de medición: Electroforesis y

Velocimetría por Láser Doppler, a veces llamado Electroforesis Doppler con Láser. Este método mide la rapidez con que una partícula se mueve en un líquido cuando se aplica un campo eléctrico, es decir, su velocidad (Malvern-Instruments, 2004).

Tabla 5. Resultados de la medición de potencial zeta de la microemulsión del lote 3.

Lote	Potencial zeta (mV)
3	-0.0197
	0.0092
	-0.0778
	$\bar{x} = -0.0294$

Una vez que conocemos la velocidad de la partícula y el campo eléctrico aplicado podemos, utilizando otras dos constantes conocidas de la muestra (viscosidad y constante dieléctrica) calcular el potencial zeta. Los resultados de la determinación del potencial zeta se muestran en la tabla 5 y en la figura 19.

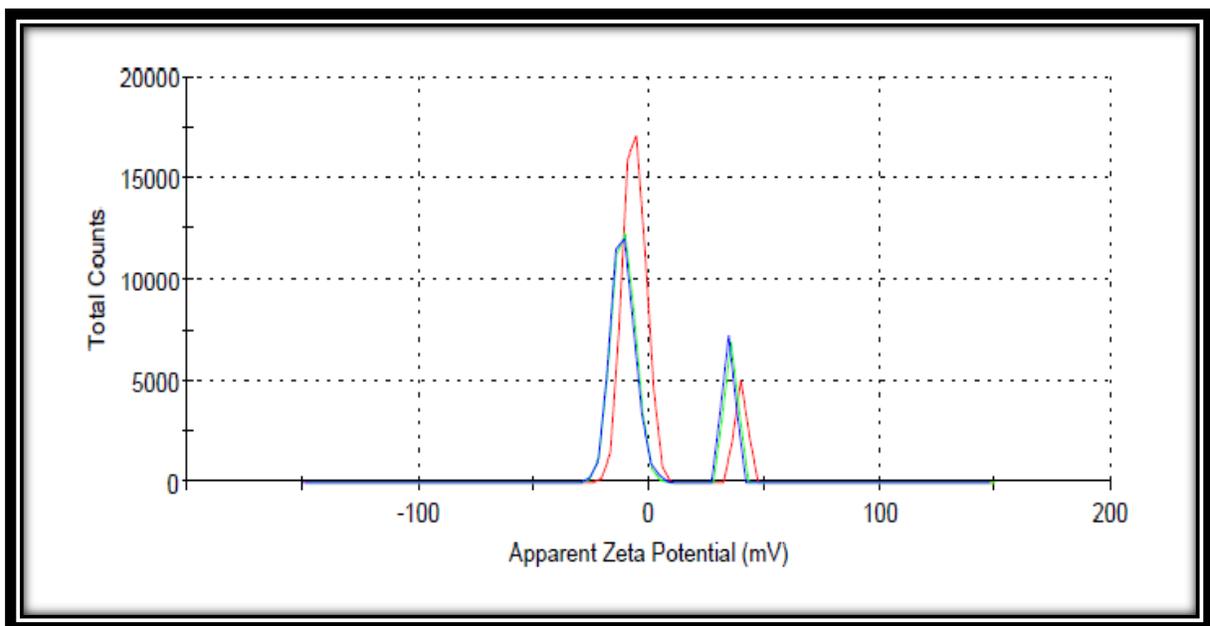


Figura 19. Distribución del potencial zeta de la microemulsión del lote 3.

Tabla 6. Valor de potencial zeta de cada uno de los picos por separado para el lote 3.

Pico	Promedio (mV)	Área (%)
1	-6.38	86.2
2	39.8	13.8

El promedio de la determinación de potencial zeta estimada por el equipo es de -0.0294 mV, pero como se puede observar en la figura 19 se muestran dos picos, en otras palabras dos potenciales zeta que se registraron durante la prueba, por lo tanto se determinó el potencial zeta de la microemulsión sin fármaco para observar si los componentes de esta presentaban algún pico y poder descartarlo de la medición del potencial zeta de la microemulsión del lote 3. En la tabla 7 y la figura 20 se muestran los resultados de la determinación del potencial zeta de la microemulsión sin fármaco.

Tabla 7. Resultados de la medición de potencial zeta de la microemulsión sin fármaco.

Potencial zeta (mV)
-0.097
0.114
-0.500
$\bar{x} = -0.161$

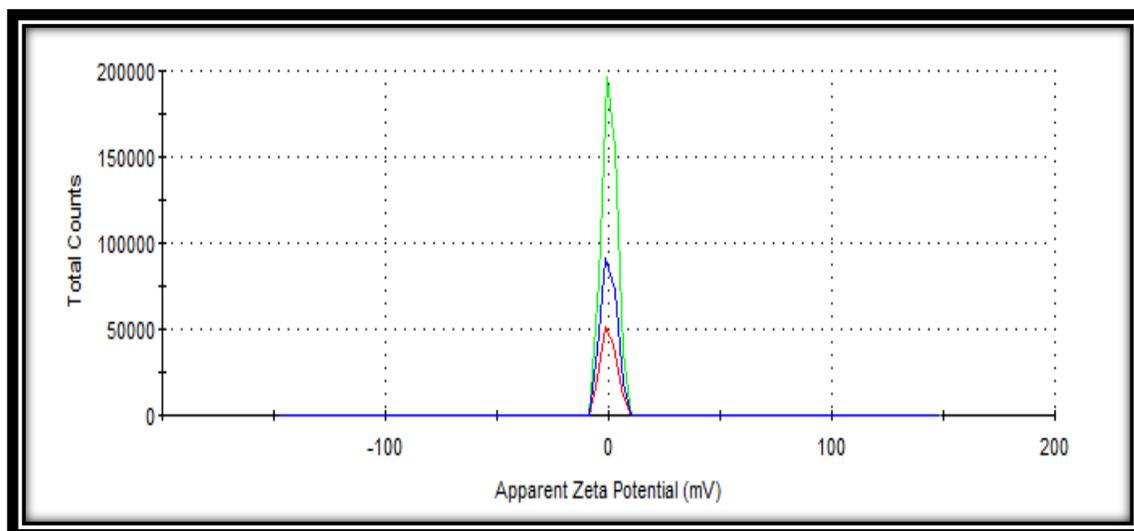


Figura 20. Distribución de potencial zeta de la microemulsión sin fármaco.

Como se puede observar en la figura 20 y en la tabla 7, la microemulsión sin fármaco presenta un valor promedio de potencial zeta de -0.161 mV, debido a que la microemulsión está formada por un tensoactivo no iónico, esto quiere decir que el coloide es neutro ya que no tiene una carga eléctrica formal en la superficie del glóbulo.

Por el contrario en el caso de la microemulsión con fármaco, presenta dos picos como se muestra en la tabla 6 esto debido a que la microemulsión tiene un pH de 5.14, el clotrimazol tiene dos pka 4.70 y 6.02, por lo tanto al ser el clotrimazol una base débil se encuentra protonado adquiriendo carga positiva, pero a pesar de esto se encuentra disuelto dentro del glóbulo que es prácticamente neutro. Los dos picos de respuesta pertenecen respectivamente a los componentes de la microemulsión, en la tabla 6 se muestran los valores de cada pico por separado, con un potencial zeta de -6.38 mV y otro con menor área del fármaco disuelto en la fase acuosa que fue afectado por el campo eléctrico aplicado con un valor de potencial zeta de 39.8 mV.

Pese a esto no se presentaron agregados, coalescencia o separación de fases, debido a que las microemulsiones son sistemas termodinámicamente estables, es decir está en su estado de menor energía o equilibrio químico con su entorno, por

eso se mantiene inalterada por un periodo prologado de tiempo independientemente del potencial zeta que posea el sistema, en este caso se determinó el potencial zeta únicamente como un parámetro de referencia para verificar que el los materiales usados en la formulación no presentan cargas eléctricas, ni hay presencia de iones libres en la microemulsión. Cabe recordar que el tensoactivo usado es de naturaleza no iónica.

Esto es debido a que la dinámica en una microemulsión no está determinada por las cargas eléctricas presente en ella, ya que estas se organizan a si mismas en un proceso de agregación y desintegración que opera simultáneamente. En este proceso existe un intercambio dinámico de materia entre la fase dispersa que ocurre continuamente resultando en un equilibrio en general (Bardhan, et al., 2014). Es por esto que se dice que las microemulsiones son termodinámicamente estables.

En el trabajo realizado por (Sindhu, et al., 2018) para una microemulsión con Duloxetina, obtuvieron un potencial zeta de -25.8 mV, este valor es diferente al obtendio en este trabajo debido a que la formulación y el principio activo son de naturaleza diferente, sin embargo en ambos se demuestra que la estabilidad termodinámica propia de la microemulsión no se afecta por el potencial zeta presente en el sistema.

Se eligió la espectrofotometría UV-VIS como el método de cuantificación para clotrimazol. Considerando que el clotrimazol es un fármaco hidrófobo, se necesita una gran cantidad de medio acuoso para disolver una pequeña cantidad de fármaco por lo tanto se busco un tensoactivo que facilitara que el clotrimazol se disolviera para poder ser cuantificado, ya que utilizar un de solvente se descartó ya que al ser volátiles la concentración variaría dando resultados poco confiables.

Se utilizó Gelucire® como tensoactivo para mejorar la solubilidad del fármaco en un medio acuoso. Los Gelucires® son glicéridos de polietilenglicol (PEG) compuestos de mono, di y triglicéridos y mono y di esterres de PEG.

De acuerdo a Antunes et al. 2012, son excipientes anfífilos cerosos semisólidos con propiedades tensoactivas que espontáneamente forman una fina dispersión o emulsión al contacto con el agua. Las diferentes variedades de Gelucire® son caracterizadas por un rango de punto de fusión y balance hifrofílico-lipofílico (HLB). En este caso se utilizó Gelucire® 44/14 al 3%, al encontrarse en una fina dispersión mejora la solubilidad en agua del fármaco evitando utilizar solventes orgánicos como medio de disolución y forma una solución suficientemente translúcida para utilizar un método espectrofotométrico de cuantificación (Antunes, et al., 2012).

En primer lugar se obtuvieron los espectros de absorción de los medios utilizados con y sin fármaco, los cuales se incluyen en el anexo 1 junto con los valores de los coeficientes de absorción respectivos que se obtuvieron para realizar las curvas de calibración para ambos métodos. El espectro de absorción es único para cada sustancia y permite identificarla. En la literatura se encontró reportado el espectro de absorción para clotrimazol en metanol, figura 21.

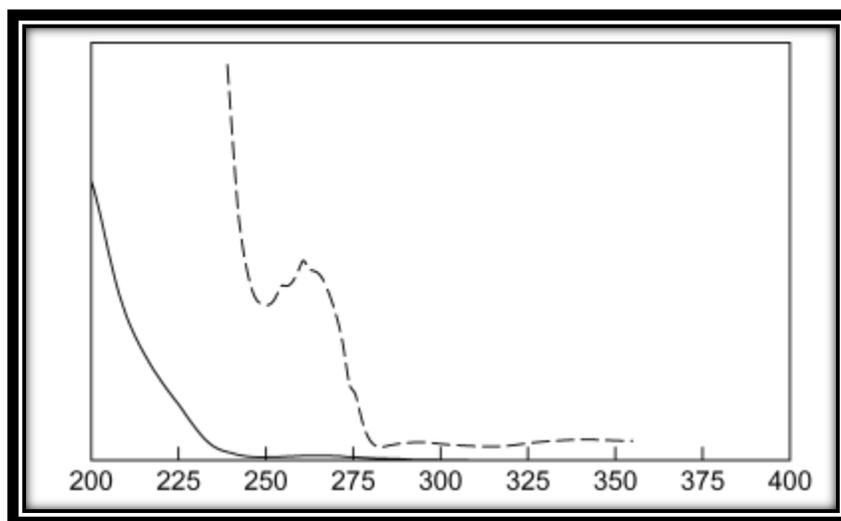


Figura 21. Espectro de absorción de clotrimazol en metanol, (Moffat, et al., 2011)

A pesar de que el medio es diferente al utilizado en la literatura, el espectro de absorción es parecido y para ambos métodos analíticos, presenta su máximo de absorción a 261 nm, como se muestra en el anexo 1, con respecto al máximo

reportado en la literatura que es de 260 nm. El espectro muestra dos picos máximos para ambos medios, pero debido a que el primer máximo muestra un pico angosto, se eligió el máximo a 261 nm ya que el pico de este máximo es más ancho por lo tanto puede presentar menos variación entre lecturas y por tanto menor error a diferencia del primer pico, los barridos espectrofotométricos se muestran en el anexo 1.

La curva de clotrimazol en solución de FVS-Gelucire® 44/14 al 3% y la curva de clotrimazol en solución de FVS-Gelucire® 44/14 al 3% p/v y muestra de tejido vaginal se leyeron a una longitud de onda de 261 nm, debido a que este fue el máximo de absorbancia registrado en ambos casos aunque el coeficiente de absorptividad, para el segundo método, el cual estuvo en contacto con tejido vaginal, presenta un valor de 15.335 g/mL*cm mientras que el coeficiente de absorptividad para el método uno es de 20.337 g/mL*cm, esta disminución es debida a que el medio al entrar en contacto con el tejido disuelve las sustancias presentes en la superficie interna de la vagina (sales, azúcares, proteínas, etc.) saturando la solución y disminuyendo la absorptividad del clotrimazol. En el anexo 3 se muestra detalladamente las propiedades fisicoquímicas de cada reactivo utilizado.

Se prepararon curvas de calibración para estimar la concentración de las muestras analíticas con una variación aceptable ($\leq 2\%$ para métodos espectrofotométricos y 5% para fluidos biológicos de acuerdo a la FEUM 11° edición).

En el anexo 2 se muestran las concentraciones y sus absorbancias correspondientes, así como sus parámetros estadísticos para ambos métodos: desviación estándar (Desv. Est.), coeficiente de determinación (r^2), coeficiente de variación (C.V.), ordenada al origen (b) y la pendiente (m).

Con respecto al análisis estadístico podemos observar que en ambas curvas de calibración se obtuvo una r^2 mayor a 0.98 lo cual indica que los valores experimentales se ajustan a una línea recta ya que el valor de r^2 es cercano a 1

(0.999 para ambos métodos). De igual forma el porcentaje de C.V. es aceptable ya que los valores obtenidos utilizando un método espectrofotométrico son menores a 2 y 5% respectivamente, lo cual indica que la dispersión de datos en la curva de calibración no es significativa.

También se incluyen los resultados de las pruebas de análisis de varianza y prueba de intercepto para evaluar la linealidad de los sistemas y demostrar que la respuesta analítica es directamente proporcional a la cantidad o concentración del analito presente en las soluciones analizadas. Para ambos métodos se puede observar que existe una relación lineal entre la concentración del clotrimazol y su absorbancia; la prueba de intercepto determina si el ruido o error producido por el equipo es mínimo o aceptable para que este no produzca una interferencia en las lecturas y por lo tanto en el resultado analítico, para ambos casos estadísticamente el intercepto es igual a cero.

En el anexo 2 también se muestran los resultados de la validación parcial de ambos métodos en donde se analizaron los siguientes aspectos:

Especificidad, establece que ninguna sustancia interfiera en la respuesta del analito, conocidas estas, solas o combinadas a la muestra para evaluar su respuesta bajo las mismas condiciones de análisis.

Linealidad del sistema, asegura que los resultados obtenidos directamente o por medio de una transformación matemática definida, son proporcionales a la concentración del analito, dentro de un intervalo determinado.

Precisión, es el grado de concordancia entre los resultados analíticos individuales, cuando el procedimiento se aplica repetidamente a diferentes porciones de una muestra homogénea del producto o de una referencia.

Exactitud, concordancia entre un valor obtenido empleando el método y el valor de referencia.

Límite de detección, concentración mínima del analito en una muestra que puede ser detectada, pero no necesariamente cuantificada, bajo las condiciones de operación establecidas.

Límite de cuantificación, concentración mínima del analito, que puede ser determinada con precisión y exactitud aceptables, bajo las condiciones de operación establecidas (Secretaría-de-Salud, 2014).

Como se puede observar en el anexo 2 para ambos métodos cumplen los criterios de aceptación descritos para cada una de las pruebas mencionadas anteriormente, con lo cual se puede decir que los métodos analíticos desarrollados para la cuantificación de clotrimazol arrojarán datos confiables.

Una vez que se obtuvieron métodos analíticos confiables, se llevaron a cabo estudios de liberación *in vitro* y *ex vivo*. En primer lugar se realizó un perfil de liberación *in vitro* para determinar el tipo de liberación de fármaco que se lleva a cabo desde la microemulsión y determinar en base a los resultados el modelo matemático que se ajuste y explique este fenómeno, en este caso se compararon la microemulsión del lote 3 que contiene 10 mg de CLOT y una solución de CLOT de concentración similar a la microemulsión.

Se realizaron estos estudios empleando un sistema de membranas de difusión o bolsas de diálisis, utilizando tubos de membrana de celulosa en donde se añadió un volumen de 2 mL tanto de solución de CLOT como de la microemulsión, ambas se mantuvieron en condiciones “sink” durante el estudio.

Se consideran condiciones “sink” cuando se mantiene la concentración del fármaco en el medio de disolución por debajo del 15% del valor de solubilidad de este. Si el fármaco de estudio es poco soluble en agua es aceptado el uso de solventes orgánicos o de agentes solubilizantes en el medio de disolución para mantener las condiciones “sink”.

Para corroborar que el estudio se llevó a cabo bajo condiciones “sink”, se determinó el valor de solubilidad del CLOT en el medio de disolución (FVS-

Gelucire® al 3%). En la tabla se puede observar el valor de solubilidad del clotrimazol en el medio a diferentes temperaturas.

Las bolsas de diálisis se colocaron en frascos de vidrio con tapa de baquelita cada una, a los cuales se agregaron 30 mL del medio como se muestra en la figura 22, para mantener condiciones “sink” (solubilidad <15%), estos frascos se mantuvieron a 37°C durante toda la prueba y en agitación perpendicular, teniendo como medio de liberación fluido vaginal simulado con Gelucire® 44/14 al 3% con pH de 4.5.

Tabla 8. Solubilidad de Clotrimazol en FVS-Gelucire® al 3%.

Temperatura	Solubilidad (mg/mL)	Promedio (mg/mL)
20 °C	0.815	0.804
	0.792	
	0.805	
37 °C	1.025	1.012
	1.018	
	0.994	



Figura 22. Modelo de bolsas de diálisis utilizado para la disolución.

Para mantener las mismas condiciones en la disolución se adicionó un agente tensoactivo al medio de disolución (Gelucire® 44/14 al 3%). Como se observa en la tabla 8 la determinación de la solubilidad se llevó a cabo a dos temperaturas a 20°C (temperatura ambiente) y 37 °C (temperatura corporal), como es bien sabido al calentar una solución, en la mayoría de los casos, la solubilidad aumenta con un aumento de la temperatura, por lo que el exceso de soluto se disuelve en la solución, como se puede ver en la tabla 8 se pudo obtener una solución más concentrada al calentar la solución.

Los gráficos 1, 2 y 3 muestran los resultados obtenidos en los perfiles de liberación, sólo se muestran las primeras 8 horas de liberación ya que después de estas el Gelucire® utilizado en el medio se enturbia impidiendo obtener una respuesta espectrofométrica confiable después de dicho tiempo, dentro y fuera de la membrana utilizada para la disolución.

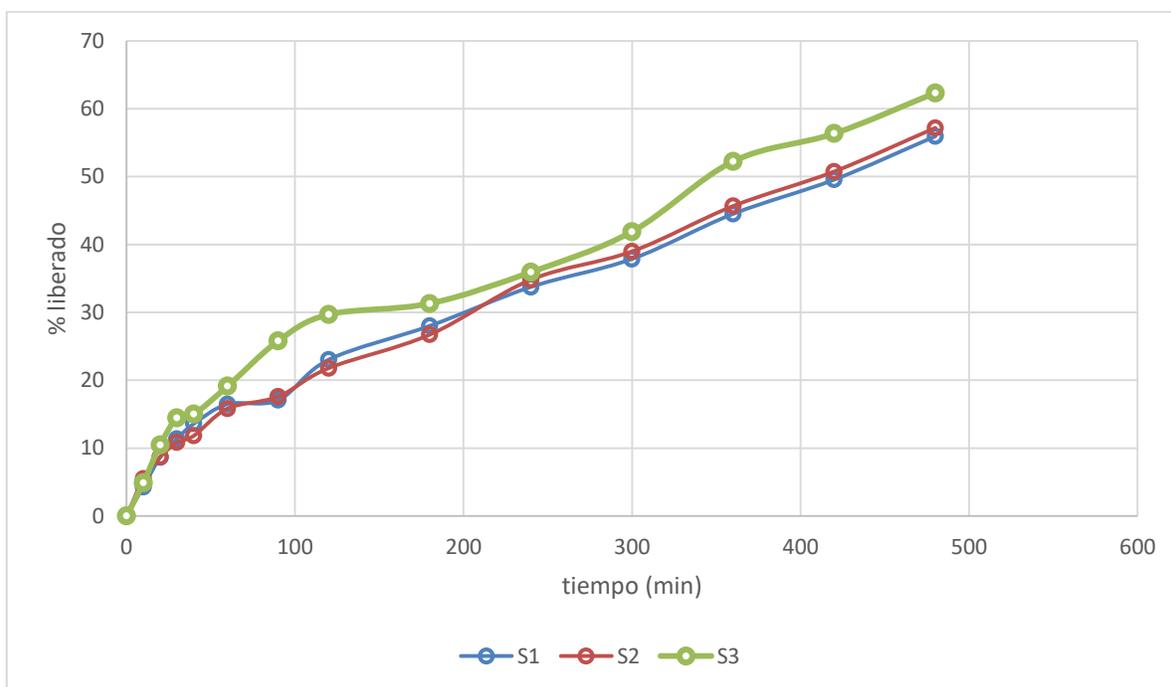


Gráfico 1. Perfil de difusión para la solución de clotrimazol, en fluido vaginal simulado-Gelucire® al 3% pH= 4.51.

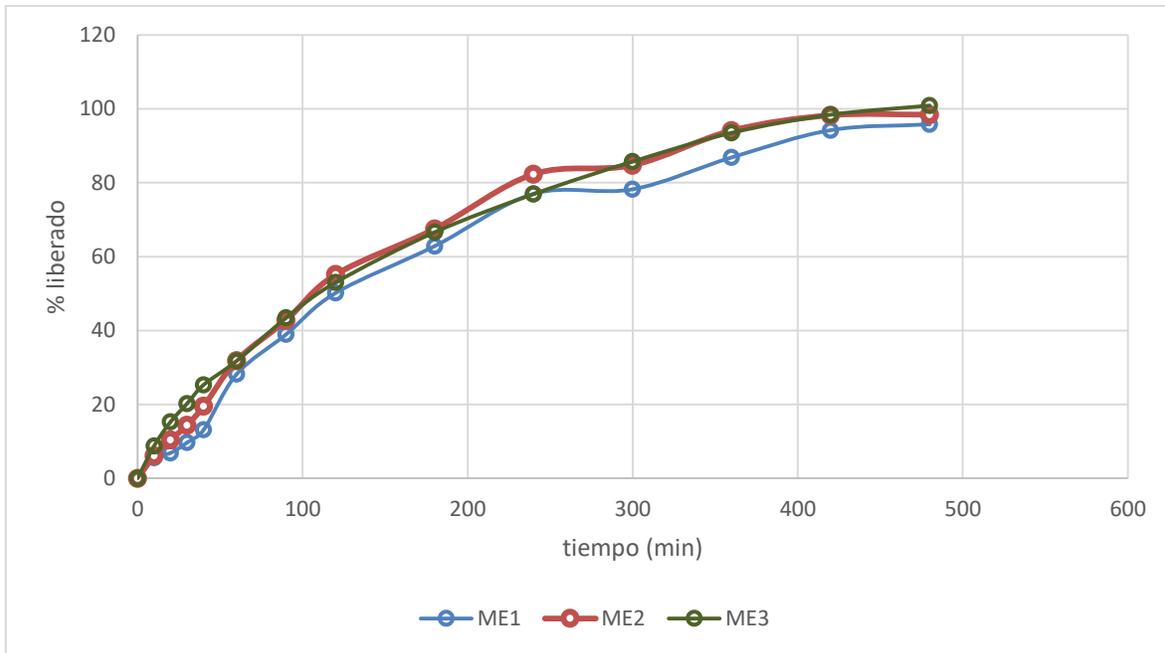


Gráfico 2. Perfil de liberación del clotrimazol a partir de la microemulsión, en fluido vaginal simulado-Gelucire® al 3% pH= 4.51.

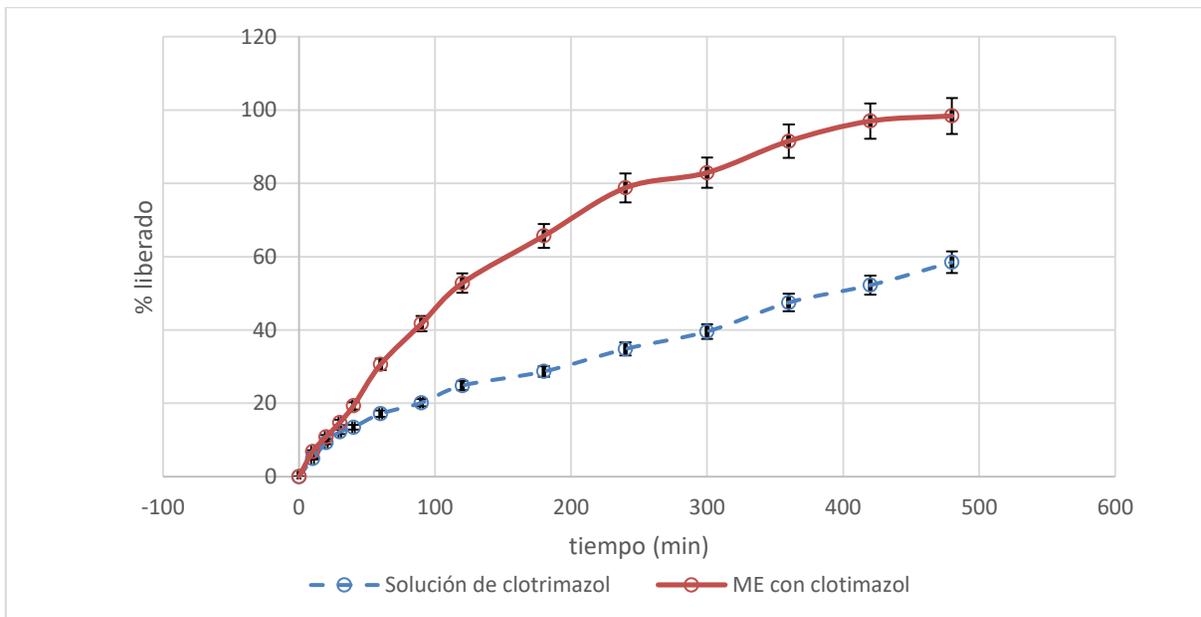


Gráfico 3. Comparación de los valores promedio de los perfiles de liberación del clotrimazol a partir de la microemulsión y la difusión solución de clotrimazol en fluido vaginal simulado-Gelucire® al 3% pH 4.51.

Se puede observar en el gráfico 1 en los primeros minutos de la prueba se lleva a cabo una fase de liberación rápida la cual va disminuyendo su velocidad conforme aumenta el tiempo, en total al final de la prueba se liberó alrededor del 60% de la cantidad total. Debido a que el medio de disolución se enturbia por la naturaleza oleosa del Gelucire® drásticamente después de las 8 horas, no se pudieron tomar muestras después de este tiempo ya que los resultados eran poco confiables.

En el gráfico 3 se muestran los valores promedio para cada perfil de liberación respectivamente, se puede observar que el comportamiento de la liberación de la microemulsión es diferente al de la solución de clotrimazol, además de que al final de la prueba se liberó una cantidad cercana al 100% del fármaco contenido en la microemulsión. En el anexo 4 se muestran detallados los valores obtenidos durante ambos estudios de liberación.

Al comparar los perfiles obtenidos de los gráficos 1 y 2 puede observarse una diferencia entre el porcentaje de fármaco liberado a partir de la bolsa de diálisis al medio de disolución. También se puede observar que alrededor del 50% del fármaco ha sido liberado a las 2 horas mientras que en la solución el 50% del fármaco se libera a las 7 horas del estudio.

De acuerdo a lo anterior se puede deducir que la inclusión de clotrimazol en una microemulsión mejora el perfil de liberación en comparación con una simple solución de concentración semejante ya que esta solo difunde a través de la membrana, esto debido la composición de la formulación, el cual facilita su paso a través de la membrana de celulosa utilizada al medio de disolución. Se contempló utilizar otro tipo de membrana pero se decidió continuar con los estudios de permeación y analizar los resultados obtenidos por esta técnica.

Para poder determinar o predecir el mecanismo de liberación *in vitro* de los datos obtenidos de los perfiles de liberación se trataron de acuerdo al modelo semi-empírico del Korsmayer- Peppas conocido también como ley de la potencia, cuya fórmula matemática es:

$$\frac{Mt}{M_{\infty}} = k * t^n$$

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, cuál es el mecanismo de liberación que ocurre, Mt es la cantidad de fármaco liberada al tiempo t y M_{∞} es la cantidad máxima liberada.

En este modelo se describe la liberación de fármacos desde matrices con diferente formas geométricas, el valor de n caracteriza el mecanismo de liberación del fármaco como se describe en la tabla. Para conocer el valor de n en un estudio de liberación $\frac{Mt}{M_{\infty}}$ debe ser menor o igual al 70% de la cantidad total liberada durante el estudio. Si n = 0.5 el mecanismo de transporte es una difusión Fickiana y el tipo de liberación es dependiente del tiempo (Suvakanta, et al., 2010). El tipo de mecanismo de liberación de acuerdo al valor de n que se obtenga se muestra en la tabla 9.

Tabla 9. Interpretación de los mecanismos de liberación de difusión.

Valor de n	Mecanismo de liberación	Velocidad en función del tiempo
0.5	Difusión Fickiana	$t^{-0.5}$
$0.5 < n \leq 1$	Difusión no Fickiana	t^{-1}
n = 1	Transporte caso II	Liberación de orden cero
< 1	Transporte super caso II	t^{-1}

En los gráficos 4, 5 y la tablas 10, 11 se muestran los datos obtenidos de acuerdo a la ecuación de Korsmayer- Peppas tanto para la solución con clotrimazol como para la microemulsión respectivamente.

Tabla 10. Valores de r^2 y n obtenidos de la ecuación de la recta respectiva de cada sistema para la solución con clotrimazol.

Sistema	r^2	N
Solución 1	0.9967	0.5363
Solución 2	0.9925	0.5598
Solución 3	0.9949	0.5377
Promedio	0.9947	0.5446

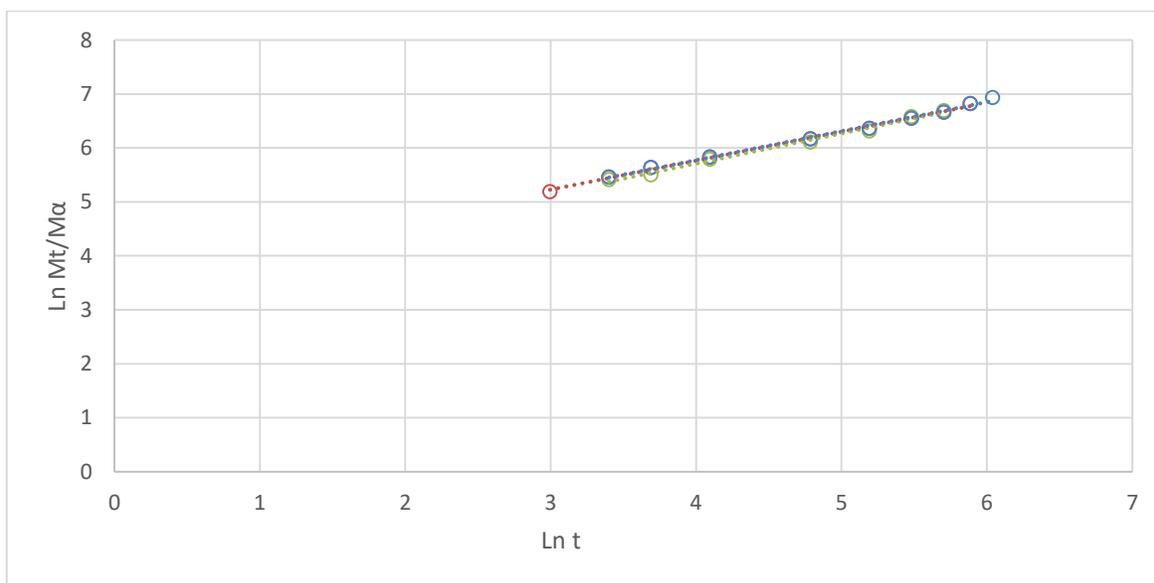


Gráfico 4. Modelo de Korsmayer- Peppas aplicado a las soluciones con clotrimazol

Tabla 11. Valores de r^2 y n obtenidos de la ecuación de la recta respectiva de cada sistema para la microemulsión con clotrimazol.

Sistema	r^2	n
ME 1	0.9942	1.1084
ME 2	0.9946	0.9118
ME 3	0.9982	0.7132
Promedio	0.9956	0.9111

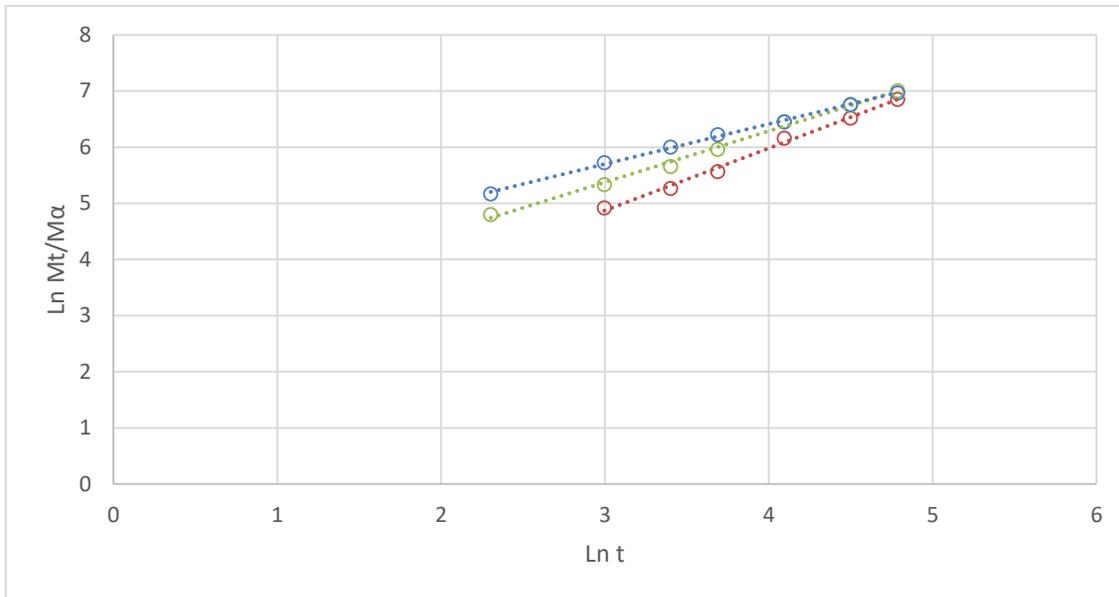


Gráfico 5. Modelo de Korsmayer- Peppas aplicado a las microemulsiones con clotrimazol.

Como se puede observar en las tablas para la solución de clotrimazol se obtuvo un valor promedio de n de 0.5446, el cual es mayor a 0.5 por lo tanto no puede considerarse que en la solución de clotrimazol se lleve a cabo una difusión tipo Fickiana pero si una difusión anómala ya que el valor experimental de n se encuentra entre 0.5 y 1.

Para los valores de n de la microemulsión se obtuvo un valor promedio de 0.9111 queal igual que en la solución con el fármaco se puede decir que se lleva a cabo un mecanismo de transporte anómalo o no Fickiano.

La difusión anómala es un proceso de difusión con una relación no lineal con el tiempo en contraste con un proceso de difusión típico. Como se puede observar en el gráfico 3 la microemulsión presenta este tipo de comportamiento claramente ya que no se observa una relación lineal del porcentaje liberado con respecto del tiempo, mientras que en la solución con clotrimazol al principio de la prueba tiene un comportamiento más lineal después de las dos primeras horas de estudio, por eso el valor de n para la solución es bastante cercano a 0.5 que es el valor que describe un mecanismo de difusión Fickiana.

Con el fin de profundizar en el mecanismo de liberación del principio activo, se ha realizado un ajuste de los datos de liberación a distintos tipos de cinéticas (orden 1, orden 0).

Los mecanismos de liberación de orden cero se consideran como el mecanismo ideal de liberación que los fármacos deberían seguir. Esta entrega ideal es particularmente importante en ciertas clases de medicamentos, como antibióticos, antihipertensivos, medicamentos para el corazón y antidepresivos.

La cinética de liberación de orden cero se refiere al proceso de liberación de fármaco constante desde un medicamento o dispositivo de administración. En su forma más simple, liberación de orden cero puede ser representado como:

$$Q_t = Q_0 + k_0 t$$

Donde Q_t es la cantidad de fármaco disuelto en el tiempo t , Q_0 es la cantidad inicial de fármaco en la solución (la mayoría de veces, $Q_0 = 0$) y K_0 es la constante de liberación de orden cero expresada en unidades de concentración / tiempo (Suvakanta, et al., 2010) (Singhvi & Singh, 2011).

Mientras que para un mecanismo de liberación de primer orden la liberación del fármaco que sigue una cinética de primer orden se puede expresar por la ecuación:

$$\ln Q = \ln Q_0 - k_1 t$$

Donde Q_0 es la concentración inicial del fármaco, k_1 es la constante de liberación de primer orden y t es el tiempo. Los datos obtenidos se representan gráficamente como \ln del porcentaje acumulado de fármaco, que queda en función del tiempo que produciría una línea recta. Este mecanismo de liberación es el que siguen la mayoría de los fármacos al ser entregados desde un medicamento (Singhvi & Singh, 2011).

En los gráficos 6, 7, 8, 9 así como en las tablas 12 y 13 se muestran los valores de r^2 y las constantes de liberación obtenidos para orden 0 y primer orden, los valores utilizados se muestran con detalle en el anexo 4.

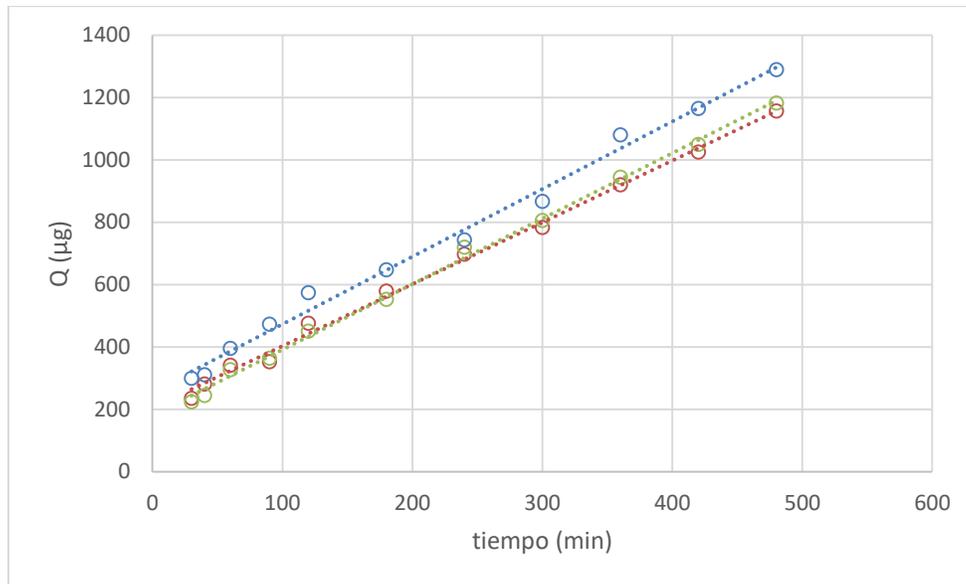


Gráfico 6. Modelo de cinética de orden cero aplicada para resultados obtenidos de los perfiles de liberación de clotrimazol en solución.

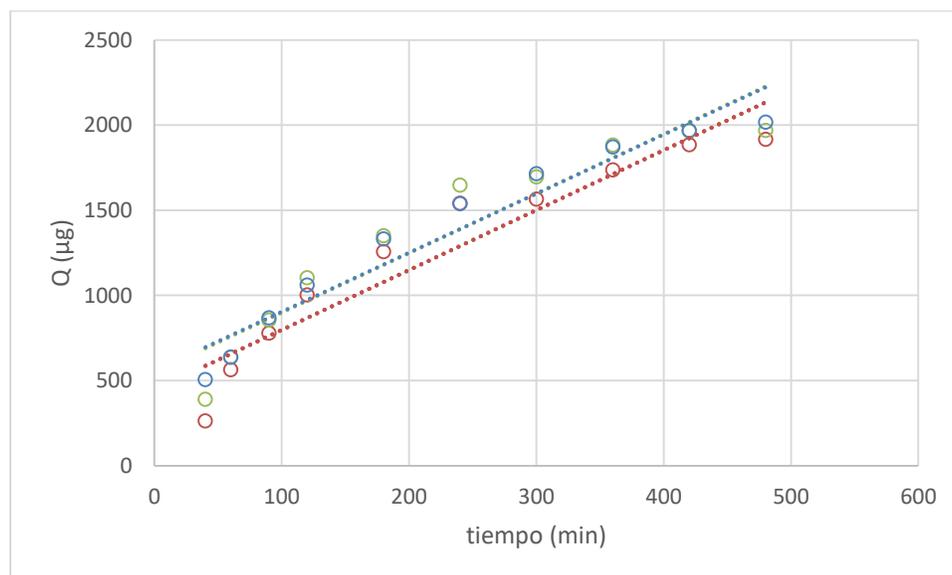


Gráfico 7. Modelo de cinética de orden cero aplicada a los resultados obtenidos de los perfiles de liberación de clotrimazol a partir de la microemulsión.

Tabla 12. Valores de r^2 y de las constantes de orden cero obtenidos de la ecuación de la recta respectiva de cada sistema para la solución con clotrimazol y la microemulsión.

Sistema	r^2	K_0
Sol. con clotrimazol	0.9958	1.9826
	0.9972	2.1019
	0.9916	2.1675
Promedio	0.9948	2.0840
ME con clotrimazol	0.9065	3.5165
	0.8985	3.4948
	0.9405	3.4662
Promedio	0.9151	3.4925

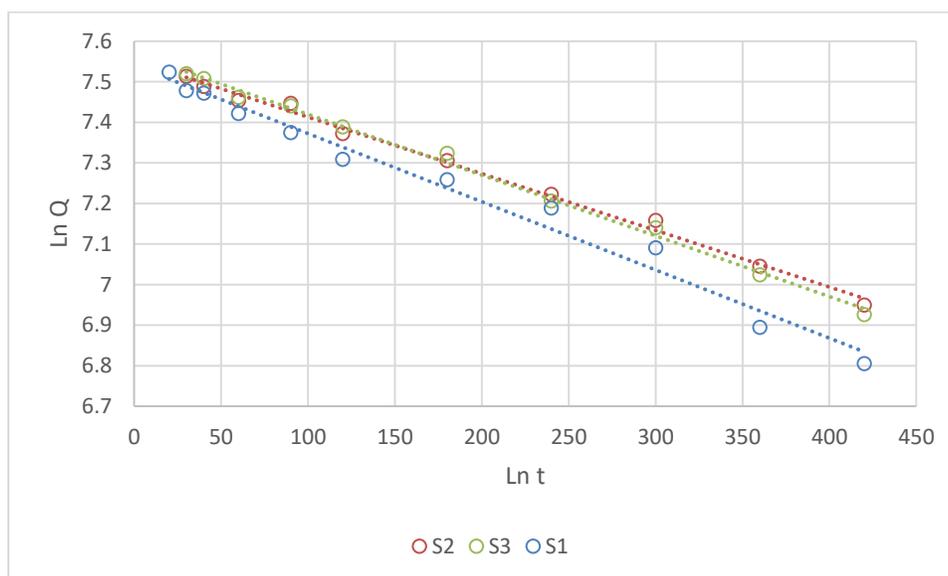


Gráfico 8. Modelo de cinética de primer orden aplicado para resultados obtenidos de los perfiles de liberación de clotrimazol en la solución.

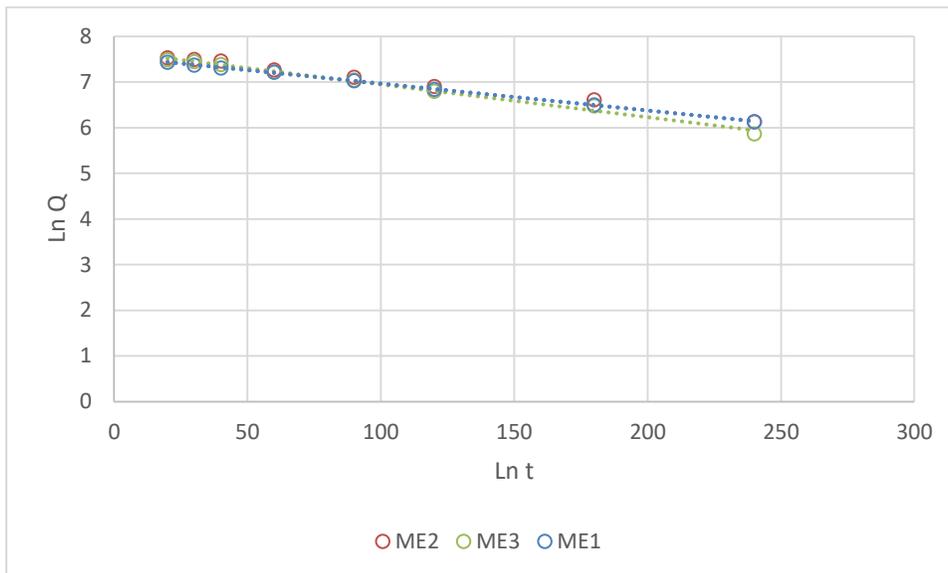


Gráfico 9. Cinética de primer orden aplicado para resultados obtenidos de los perfiles de liberación de clotrimazol a partir de la microemulsión.

Tabla 13. Valores de r^2 y de las constantes de primer orden obtenidos de la ecuación de la recta respectiva de cada sistema para la solución con clotrimazol y la microemulsión.

Sistema	r^2	K_1
Sol. con clotrimazol	0.9948	-0.0014
	0.996	-0.0015
	0.9818	-0.0017
Promedio	0.9908	-0.00153
ME con clotrimazol	0.9949	-0.0063
	0.9918	-0.0072
	0.9996	-0.0059
Promedio	0.9954	-0.0064

Al comparar los datos obtenidos de las tablas de la cinética de orden cero y la cinética de primer orden para la solución de clotrimazol y la microemulsión con

clotrimazol, se puede determinar a que cinética se ajustan al comparar el valor de r^2 , ya que este describe que tanto se ajustan los datos a una línea recta, por lo tanto para la solución de clotrimazol se tiene un valor promedio de r^2 de 0.9948 para orden cero y un valor de r^2 de 0.9908 para la cinética de primer orden.

Aunque para ambas cinéticas se tiene un valor de r^2 aceptable y como se puede observar en los gráficos 6 y 8 los datos se ajustan a una línea recta; por lo tanto para elegir a que modelo se ajustan mejor los datos, el modelo que tenga un valor de r^2 más cercano a 1 es la que se elige, ya que es en la que se ajustan mejor los datos graficados y por lo tanto la que describe mejor el fenómeno que se lleva a cabo experimentalmente.

Por lo tanto la solución de clotrimazol sigue una cinética de liberación de orden cero, es decir, es un proceso de liberación constante desde su lugar de origen, en este caso la solución de clotrimazol dentro de la bolsa de diálisis, la cual difunde de manera constante al medio lo cual se puede apreciar en el gráfico 1, esto es dependiente del tiempo, ya que el fármaco tiene que difundir de una solución concentrada (el interior de la bolsa) a una solución menos concentrada (el medio de disolución) la cual aumentara conforme aumente el tiempo del estudio, en este caso debido a que el medio impedía prolongar el estudio más de 8 hora no se puede observar el comportamiento de la cinética cuando se haya liberado más del 60 % de la cantidad total de clotrimazol.

Para la microemulsión con clotrimazol se obtuvo un valor promedio de r^2 para la cinética de orden cero de 0.9151 y para la cinética de orden uno se tiene un valor de r^2 de 0.9945. En el caso de la microemulsión presenta un mejor ajuste al modelo de primer orden, en este caso se puede notar en el gráfico 7 que los datos no tienen un buen ajuste lineal, mientras que para el modelo de primer orden si se presenta un buen ajuste a una línea recta.

Por lo que la liberación de clotrimazol a partir de la microemulsión sigue una cinética de liberación de primer orden, es decir, que la velocidad con la que difunda el fármaco de la bolsa de diálisis al medio depende de la concentración en

la bolsa de diálisis, mientras mayor sea la concentración mayor será la velocidad con la que difunda al medio. Esto se puede observar en el gráfico 2 ya que se observa que el fármaco es liberado rápidamente al principio y dicha velocidad decrece conforme disminuye la cantidad de fármaco en la bolsa de diálisis.

Al comparar las constantes de liberación para la solución de clotrimazol y la microemulsión, tanto en orden cero como en primer orden, la constante de liberación es más grande para la microemulsión, ya que como se muestra en el gráfico 3 la liberación del fármaco desde la microemulsión al medio de disolución es mayor con respecto a la solución de con el fármaco.

En los gráficos 10 y 11 se muestran los perfiles de permeación en tejido vaginal de cerda obtenidos para la solución de clotrimazol y la microemulsión con clotrimazol para una mejor comparación. Aquí se puede notar que la cantidad de clotrimazol permeada y la velocidad de permeación es mucho menor con la solución que en el caso de la microemulsión y en cuanto a cantidad permeada es menor para la solución en relación a la microemulsión. Los resultados detallados se muestran en el Anexo 5.

Estos resultados son similares con los obtenidos por Bachhav & Patravale, 2009, para una formulación con clotrimazol, en la cual primero se observa una permeación rápida del activo al medio de receptor y después de tres horas la liberación se hace constante hasta el final del tiempo de estudio (12 horas) donde se alcanza a liberar casi en su totalidad el principio activo. La diferencia es que para este trabajo el tiempo del estudio fue de 8 horas.

De igual manera que en el estudio *in vitro* la prueba de permeación tuvo un tiempo de estudio de 8 horas, ya que el medio presenta una matriz más compleja al haber tenido contacto con la superficie interna de la vagina, presentado problemas de turbidez poco después de las 8 horas, pero mostrándose en ambos casos una mejoría en la permeación con respecto a la solución.

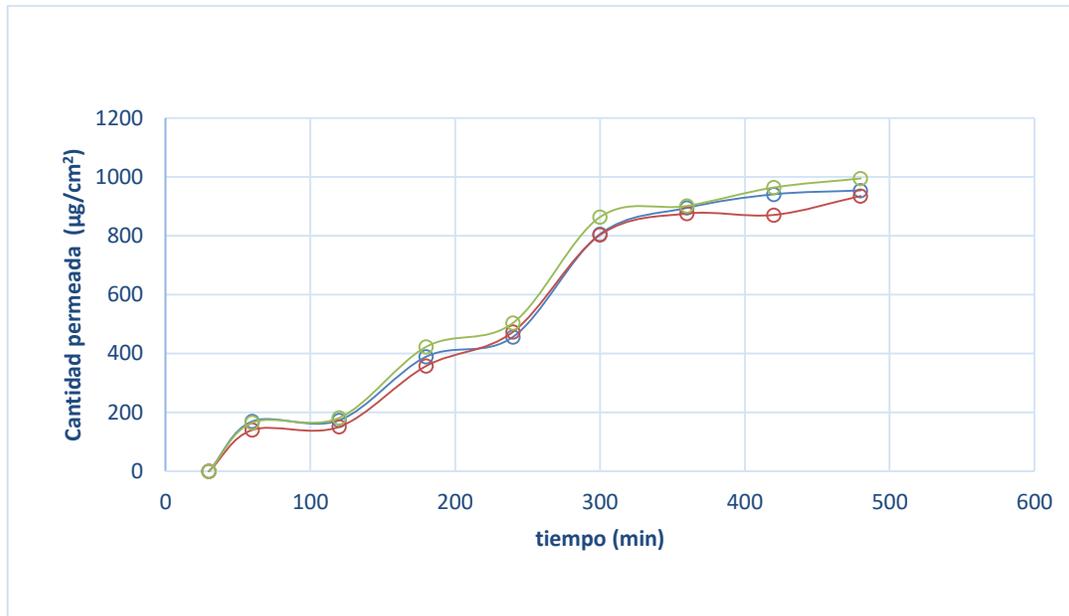


Gráfico 10. Perfil de permeación del clotrimazol en solución de FVS-Gelucire® al 3% p/v.

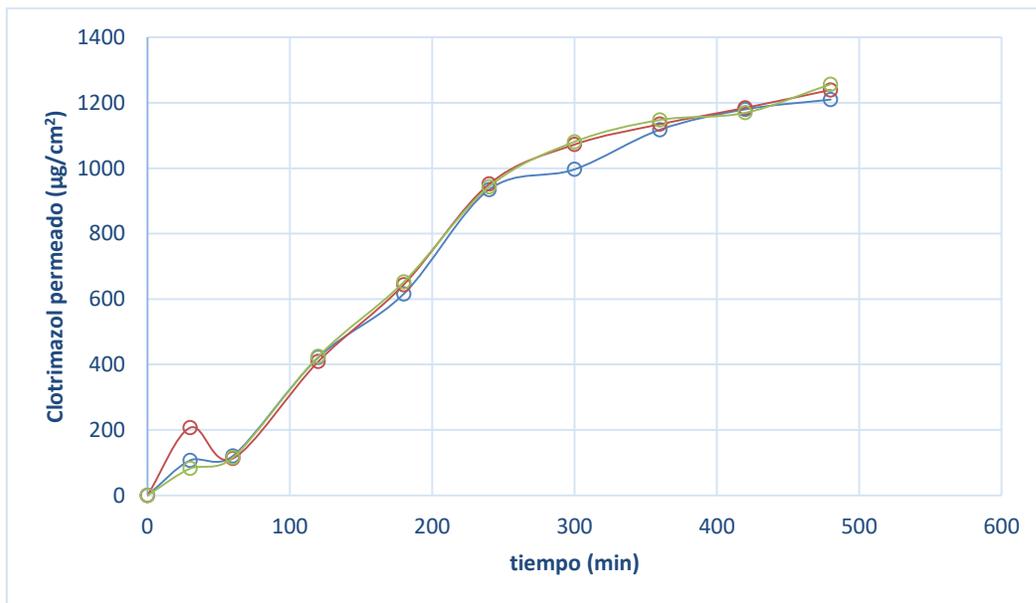


Gráfico 11. Perfil de permeación del clotrimazol en una microemulsión como vehículo

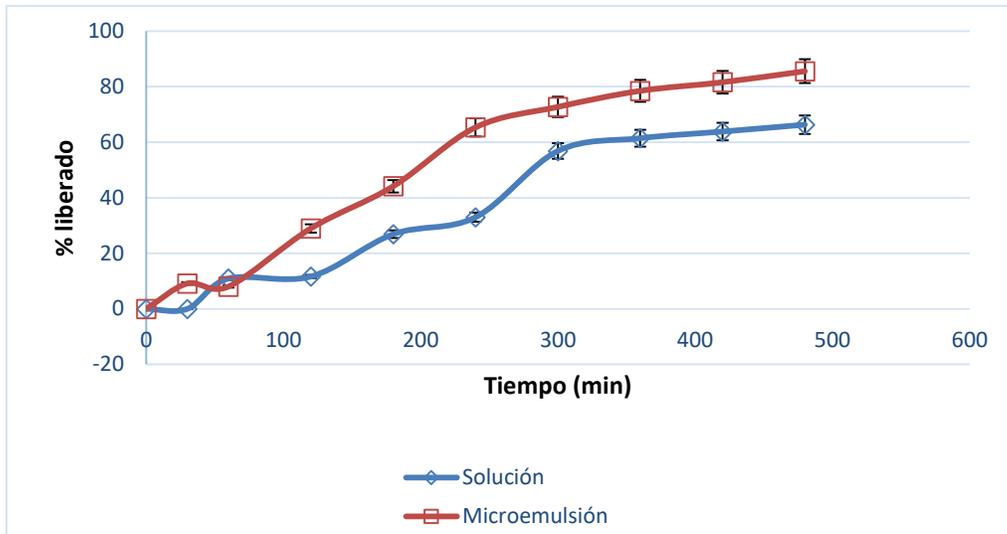


Gráfico 12. Comparación de los perfiles de permeación del clotrimazol en una microemulsión (cuadrado) y en solución de FVS-Gelucire® al 3% p/v (rombo).

Los modelos *ex vivo* se han usado para predecir la penetración de fármaco a través de la barrera vaginal mediante el uso de tejido vaginal, ya sea humano o animal (Machado, et al., 2015). Al final de la prueba se hicieron cortes en el tejido vaginal como se muestra en la figura 23 y se extrajo el clotrimazol retenido. En la tabla se muestra el clotrimazol extraído del tejido vaginal al final de la prueba de permeación.

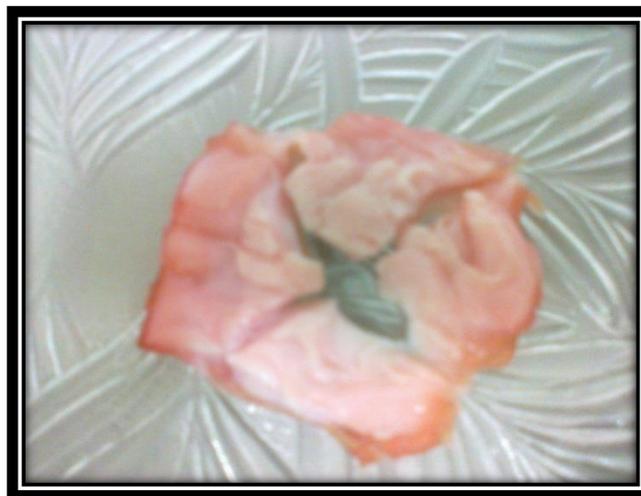


Figura 23. Cortes realizados al tejido vaginal de cerda para la extracción de clotrimazol.

Tabla 14. Resultados obtenidos de la extracción de clotrimazol en tejido vaginal para cada permeación.

CLOT retenido en el tejido	Concentración ($\mu\text{g/mL}$)	Cantidad (μg)
Solución	6.0625	303.125
	4.8125	240.625
	9.1875	459.375
Promedio	6.6875	334.375
Microemulsión	12.9375	646.875
	11.0625	553.125
	9.8125	490.625
Promedio	11.2708	563.541

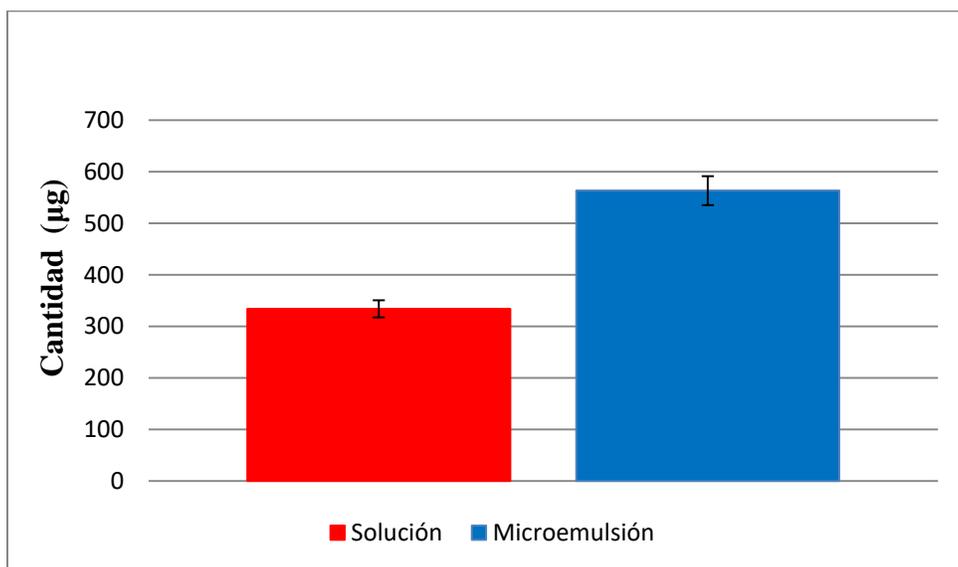


Gráfico 13. Comparación de la cantidad promedio de fármaco retenido en el tejido vaginal.

Para extraer el fármaco retenido en el tejido vaginal se secciono realizando varios cortes en el mismo como se muestra en la figura 23 y se dejó en medio de disolución por 24 horas para posteriormente cuantificarse.

Como puede observarse en el gráfico 13 y en la tabla 14, la cantidad de clotrimazol retenido en el tejido vaginal con la microemulsión es mayor que la cantidad extraída del tejido que estuvo en contacto con la solución, esto debido a

que la microemulsión tuvo mayor facilidad de permear el tejido vaginal que la solución, con lo que se confirma que gracias al tamaño de glóbulo tan pequeño y la formulación de la microemulsión facilita el paso de activos a través de membranas sintéticas o biológicas.

El propósito de verificar la permeación del clotrimazol desde la microemulsión es evaluar la cantidad de fármaco que cruza la membrana y que cantidad queda en el lumen vaginal, así como en el tejido vaginal.

Debido a que se prevé que esta formulación sea incluida en un gel bioadhesivo que provea un efecto antifúngico local que ayude a aliviar las molestias provocadas por una infección vaginal; si permea el fármaco en su totalidad la cantidad biodisponible en el lumen no será la necesaria para tener un efecto terapéutico.

En este caso al solo evaluar la microemulsión, la cantidad permeada es considerable ya que la formulación se encontraba en contacto directo con el tejido vaginal.

Esto indica que la microemulsión facilitó la permeación del clotrimazol a través del tejido vaginal de cerda ya que el tamaño de glóbulo y la composición de los glóbulos en la microemulsión están favorecen la permeación de manera significativa con respecto a la solución, en la que también hay presencia de tensoactivo (Gelucire®) el cual interactúa y altera las membranas celulares facilitando el paso del fármaco. Por lo tanto el factor que potencia la permeación en este caso es el tamaño de glóbulo de la microemulsión.

Se puede observar en la tabla 15 que el flujo del estado estacionario, coeficiente aparente de permeabilidad y la cantidad total permeada son mayores para la microemulsión a comparación de los resultados obtenidos para la solución, reafirmando lo que se ha dicho anteriormente y que la microemulsión mejora la permeación del fármaco en el tejido vaginal de cerda utilizado como se puede ver en el gráfico 12, por lo tanto para que la microemulsión provea un efecto terapéutico satisfactorio es necesario incluirlo en la matriz polimérica de un gel que actúe como reservorio en el lumen vaginal evitando que la microemulsión pueda ser eliminada por el recambio continuo del fluido vaginal y por escurrimientos causados por efecto de la gravedad.

Tabla 15. Comparación de los parámetros de permeación obtenidos para la solución y la microemulsión: Flujo del estado estacionario (Jss), coeficiente aparente de permeabilidad y cantidad total permeada (Q).

	Jss ($\mu\text{g}/\text{cm}^2\cdot\text{h}$)	Papp	Q ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)
Solución	120.1575	0.1197	961.26
Microemulsión	154.4149	0.1544	1235.32

VIII. Conclusiones

- Se preparó y caracterizó una microemulsión O/W conteniendo clotrimazol como principio activo y constituida por palmitato de isopropilo, Tween[®] 80-etanol (1:1) y agua.
- Se confirmó la formación de la microemulsión ya que esta presentó un tamaño de glóbulo de 12 a 14 nm, además de que no presentó una separación de fases al someterla a centrifugación y cambios de temperatura.
- Se desarrollaron dos métodos analíticos para cuantificar clotrimazol que demostraron ser confiables cumpliendo con los parámetros de validación propuestos.
- Se realizaron estudios *in vitro* y *ex vivo* en los cuales se compararon los resultados obtenidos entre la microemulsión del lote 3 (1 mg de clotrimazol/mL de microemulsión) y una solución con clotrimazol de concentración similar, demostrándose que la adición de clotrimazol en la microemulsión favorece de fármaco el paso del a través de una membranas de celulosa y a través de tejido vaginal de cerda.

IX. Perspectivas.

- Incluir la microemulsión con clotrimazol en una matriz semisólida, como un gel, que pueda presentar propiedades mucoadhesivas y permita aumentar su tiempo de residencia en la vagina.
- Llevar a cabo estudios microbiológicos para comprobar la eficacia fungicida de la formulación propuesta.
- Incluir agente promotores que mejoren o faciliten la permeación de los glóbulos de la microemulsión en el tejido vaginal.
- Reducir la cantidad de Gelucire® adicionada para evitar que el medio se enturbie para realizar un estudio de disolución a 12 horas o cambiar el tensoactivo utilizado.
- Realizar la validación completa del método analítico.

X. Referencias

- Agur, M. & Grant, D. F., 2007. *Atlas de Anatomía*. 11° ed. Madrid: Editorial Médica Panamericana.
- Alexander, N. J. y otros, 2004. Why consider vaginal drug administration?. *Fertility and Sterility*, 82(1), 1-12.
- Ansari, M., Kazemipour, M. & Aklamli, M., 2006. The study of drug permeation through natural membranes. *International Journal of Pharmaceutics*, 327(1-2), 6–11.
- Antunes, A. B. d. F., Geest, B. G. D., Vervaet, C. & Remon, J. , 2012. Gelucire 44/14 based immediate release formulations for poorly water-soluble drugs. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 39(5), 1–8.
- Arias, J. L., López-Viota, M., Clares, B. & Ruiz, M. A., 2008. Stability of fenbendazole suspensions for veterinary use, Correlation between zeta potential and sedimentation. *Pharmaceutical Sciences*, 34, 257-262.
- Azeem, A. y otros, 2009. Microemulsions as a Surrogate Carrier for Dermal Drug Delivery. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 35, 525–547.
- Bachhav, Y. G. & Patravale, V. B., 2009. Microemulsion based vaginal gel of fluconazole: Formulation, in vitro and in vivo evaluation. *International Journal of Pharmaceutics*, 365, 175-179.
- Bachhav, Y. G. & Patravale, V. B., 2009. Microemulsion-Based Vaginal Gel of Clotrimazole: Formulation, In Vitro Evaluation, and Stability Studies. *American Association of Pharmaceutical Scientists*, 10(2), 476-481.
- Bagwe, R. y otros, 2001. Improved drug delivery using microemulsions: Progress and new horizons. *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier System*, 18(1), 77-140.
- Bardhan, S., Kaushik, K., Saha, S. K. & Bidyut K., , 2013. Physicochemical studies of mixed surfactant microemulsions with isopropyl myristate as oil. *Journal of Colloid and Interface Science*, 402, 180–189.
- Bardhan, S., Kundu, K., Saha, S. K. & Paul, B. K., 2014. Formation, thermodynamic properties, microstructures and antimicrobial activity of mixed cationic/non-ionic surfactant microemulsions with isopropyl myristate as oil. *Journal of Colloid and Interface Science*, 430, 129–139.
- Bidart, T., 2004. Rol de voriconazol y caspofungina en terapia antifúngica. *Revista Chilena de Infecciones*, 21, 13-19.

- Braga., C. y otros, 2009. Vaginal gel adsorption and retention by human vaginal cells: Visual analysis by means of inorganic and organic markers. *International Journal of Pharmaceutics*, 373, 10-15.
- Burguera, J. L. & Burguera, M., 2012. Analytical applications of emulsions and microemulsions. *Talanta*, 96, 11-20.
- Callendera, S. , Mathews, J. A., Kornyka, K. & Wettiga, S. D., 2017. Microemulsion utility in pharmaceuticals: Implications for multi-drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, 526, 425–442.
- Carlucci, A. M., Cicconi, M. & Bregni, C., 2004. Las Microemulsiones como Vehículos para Administración de Drogas, *Acta Farmaceutica. Bonaerense*, 23(4), 550-557.
- Chattaraj, S., Swarbrick, J. & Kanfer, I., 2005. A simple diffusion cell to monitor drug. *International Journal of Pharmaceutics*, 120, p 119-124.
- Ciudad-Reynaud, A., 2007. Infecciones vaginales por candida. *Revista Peruana de Ginecología y Obstetricia*, 53, 159-166.
- das-Neves, J. & Bahia, M., 2006. Gels as vaginal drug delivery systems. *International Journal of Pharmaceutics*, 318(1-2), 1–14.
- Dezani, A. B. y otros, 2013. Determination of lamivudine and zidovudine permeability using a different ex vivo method in Franz cells. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, 67, 194–202.
- Dobaria, N., Mashru, R. & Vadia , H., 2007. Vaginal drug delivery systems: A Review of Current Status. *East and Central African Journal of Pharmaceutical Sciences*, 10, 5-13.
- Fanun, M., 2012. Microemulsions as delivery systems. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 17(5), 303-313.
- Flores-Paz., R., Rivera-Sánchez., R. & García-Jiménez, E., 2003. Etiología de la infección cérvico vaginal en pacientes del Hospital Juárez de México. *Salud pública de México*, 45.
- Florey, K., 1982. *Analytical profiles of drug substances*. New York: Academic Press.
- Fox, S. I., 2008. *Fisiología Humana*. 7a ed. Madrid: McGraw-Hill.
- Guzmán, M. , Lerma, Y. O. & Aristizábal, Y. B., 2013. Estudio comparativo de la liberación in vitro de metformina, a partir de dos productos multifuente de liberación inmediata, comercializados en Colombia. *Revista Colombiana de Ciencias Químico Farmacéuticas*, 2(42), 169-189.
- Honary, S. & Zahir, F., 2013. Effect of Zeta Potential on the Properties of Nano-Drug Delivery Systems. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 2(12), p 255-264.

Kharia, A., Singhai, A. & Verma, R., 2012. Formulation and evaluation of polymeric nanoparticles of an antiviral drug for gastroretention.. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Nanotechnology*, 4(4), 1557-1562..

Lawrence, M. J. & Rees, G. D., 2012. Microemulsion-based media as novel drug delivery systems. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 23, 175-193.

Machado, R. M. y otros, 2015. Studies and methodologies on vaginal drug permeation. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 92, p 14-26.

Malvern-Instruments, 2004. *Zetasizer Nano user manual*. [En línea] Available at: [http://www.biophysics.bioc.cam.ac.uk/files/Zetasizer Nano user manual Man0317-1.1.pdf](http://www.biophysics.bioc.cam.ac.uk/files/Zetasizer_Nano_user_manual_Man0317-1.1.pdf)

[Último acceso: 7 Enero 2016].

Martín-Aragon, S. & Benedí, J., 2009. Tratamiento de las infecciones ginecológicas. *Farmacia profesional*, 1, 52-57.

Moffat, A. C., Osselton, M. D. & Widdo, B., 2011. *Clarke's Analysis of Drugs and Poisons*. 4° ed. USA: Pharmaceutical press.

Mutasem O., T., Abdel-Halim, H., Al-Ghazawi, M. & Khalil, E., 2005. QSPR modeling of pseudoternary microemulsions formulated employing lecithin surfactants: Application of data mining, molecular and statistical modeling.. *International Journal of Pharmaceutics*, 13(1-2), 135-155.

Palmeira, R., Palmera, A. & Martinez, J., 2015. New strategies for local treatment of vaginal infections. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 92.

Perea, E., 2010. Infecciones del aparato genital femenino: vaginitis, vaginosis y cervicitis. *Medicine*, 10(57), p 3910-3914.

Ramos Olmos, R., Sepúlveda Marqués, R. & Villalobos Moreto, F., 2003. *El agua en el medio ambiente muestreo y análisis*. D.F.: Plaza y Vadez.

Rousseau, D., Rafanan., R. & Yada, R., 2011. Microemulsions as Nanoscale Delivery Systems. En: *Encapsulation technologies and delivery systems for food ingredients and nutraceuticals*. Ontario: Elsevier, 675-681.

Saini, J. K. y otros, 2014. Microemulsions: A potential novel drug delivery system. *International Journal of Pharmaceutical and Medicinal Research*, 2, p 15-20.

Secretaría de Salud, 2014. *Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos*. 11 ed. México: FEUM.

SEMARNAT, s.f. SEMARNAT. [En línea] www.semarnat.gob.mx/archivosanteriores/temas/gestionambiental/MaterialesyActividadesRiesg

osas//gtz/E-clasificaciondetensoactivos.pdf

[Último acceso: 4 Agosto 2015].

Sindhu, y otros, 2018. Duloxetine loaded-microemulsion system to improve behavioral activities by upregulating serotonin and norepinephrine in brain for the treatment of depression. *Journal of Psychiatric Research*, 99, 83-95.

Singhvi, G. & Singh, M., 2011. REVIEW: IN-VITRO DRUG RELEASE CHARACTERIZATION MODELS. *International Journal of Pharmaceutical Studies and Research*, 2(1), 77-84.

Sirotti, C. y otros, 2002. Modeling of drug release from microemulsions: a peculiar case. *Journal of Membrane Science*, 204, 401–412.

Suvakanta, D., Murthy, N., Nath, L. & Chowdhury, , 2010. KINETIC MODELING ON DRUG RELEASE FROM CONTROLLED. *Acta Poloniae Pharmaceutica-Drug Research*, 37(3), 217-223.

Swarbrick, J., 2007. *Encyclopedia of Pharmaceutical Technology*. Tercera ed. USA: Marcel Dekker Inc..

Tagavifar, M. y otros, 2018. Controlling the composition, phase volume, and viscosity of microemulsions with cosolvent. *Fuel*, 211, 214–222.

Talegaonkar, S. y otros, 2008. Microemulsions: A Novel Approach to Enhanced Drug Delivery. *Recent Patents on Drug Delivery & Formulation*, 2, p 238-257.

Tortora, G. J. & Derrickson, B., 2007. *Principios de Anatomía y Fisiología*. 11° ed. Distrito Federal: Panamericana.

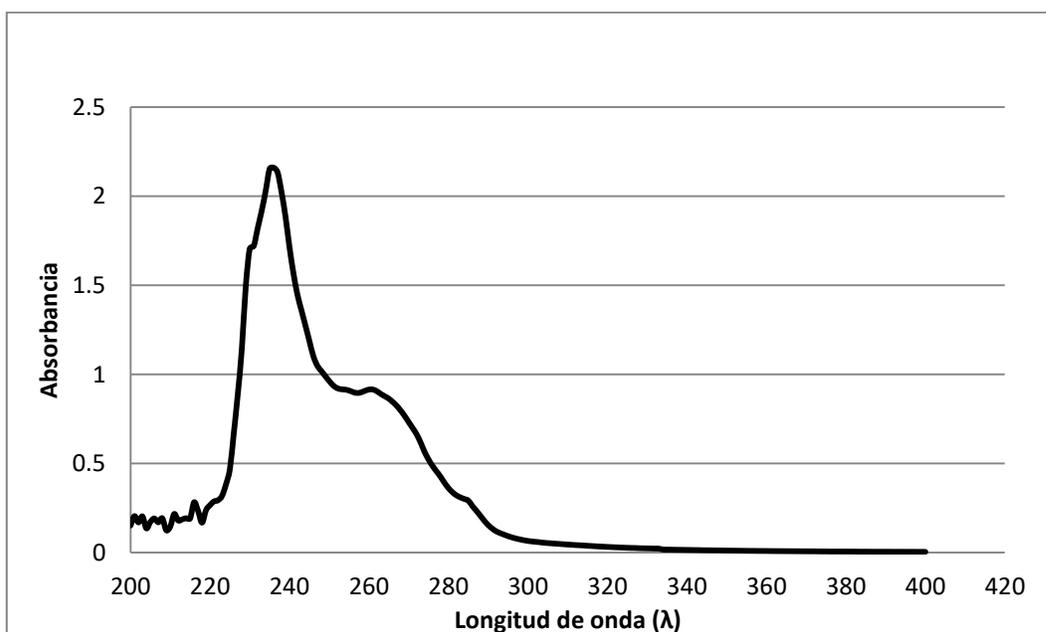
Valenta, C., 2005. The use mucoadhesive polymers in vaginal delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 57(11), p 1692-1712.

Vanic, Z. & Škalko-Basnet, N., 2013. Nanopharmaceuticals for improved topical vaginal therapy: Can they deliver?. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 50, 29–41.

Wilkinson, J. B. & Moore, R. J., 1990. *Cosmetología de Harry*. Madrid: Diaz de Santos.

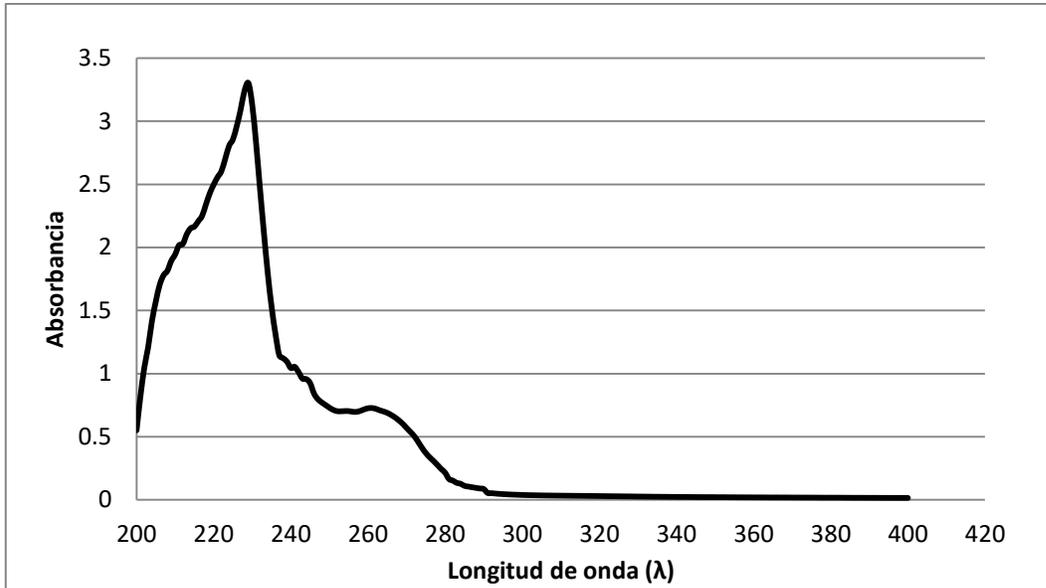
Anexo 1. Espectros de absorción y coeficiente de absorptividad.

- a) Barrido de Clotrimazol en solución de Fluido vaginal simulado-Gelucire® 44/14 al 3% p/v; medio de disolución como blanco.



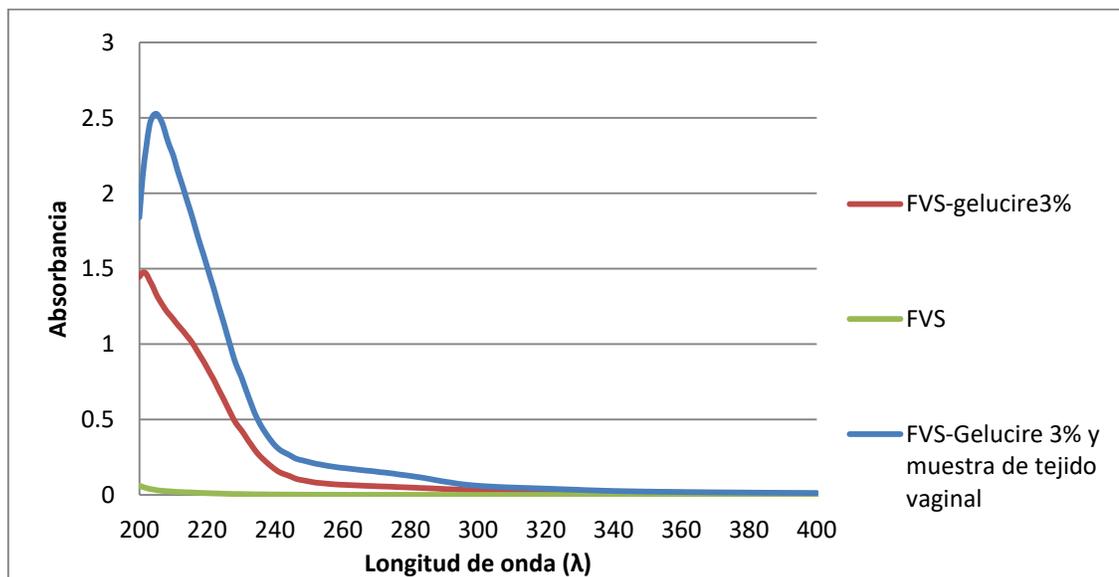
Sistema	$\lambda_{\max}(\text{nm})$	$\lambda_{\max}(\text{nm})$	$\epsilon (\text{g/mL} \cdot \text{cm})$
Clotrimazol en FVS- Gelucire® 44/14 al 3%	235	261	20.337

- b) Barrido de Clotrimazol en solución de Fluido vaginal simulado-Gelucire® 44/14 al 3% p/v y muestra de tejido vaginal; medio de disolución como blanco.



Sistema	$\lambda_{max}(nm)$	$\lambda_{max}(nm)$	ϵ (g/mL*cm) a 261 nm
Clotrimazol en FVS- Gelucire® 44/14 al 3% y muestra de tejido vaginal	229	261	15.335

c) Barrido del Fluido vaginal simulado, Fluido vaginal simulado-Gelucire® 44/14 al 3%, Fluido vaginal simulado y muestra de tejido vaginal y Fluido vaginal simulado-Gelucire® 44/14 al 3% y muestra de tejido vaginal.



Anexo 2. Curvas de calibración.

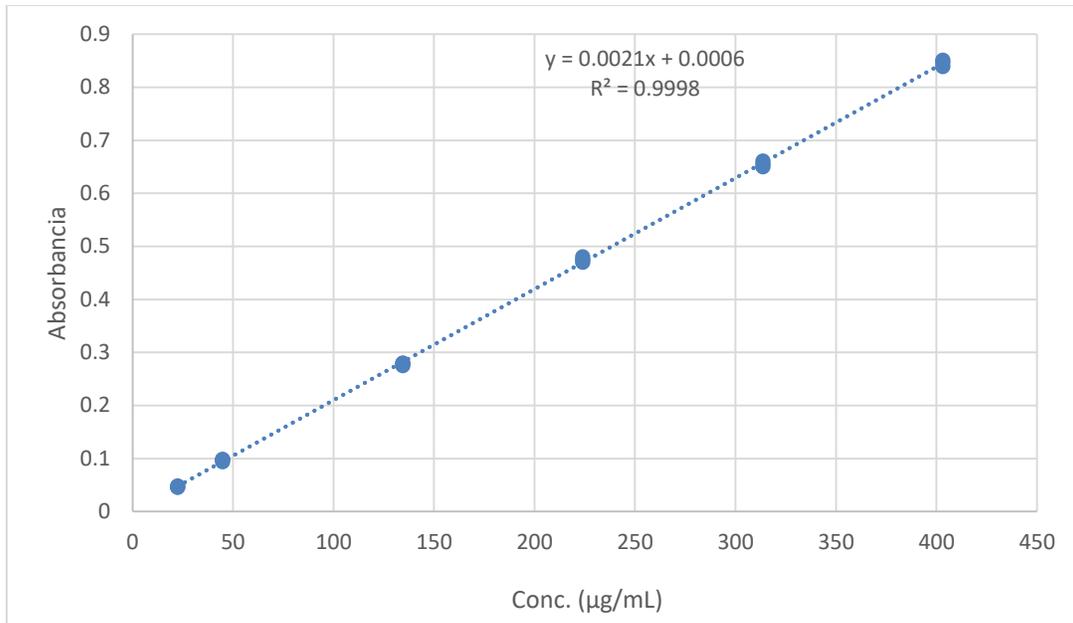
a) Resultados de la curva de calibración de clotrimazol en Fluido vaginal simulado-Gelucire® 44/14 al 3%.

Conc.(µg/mL)	Abs.	A/C	Promedio	Desv Est	%CV
22.4	0.048	0.00214	0.002083	0.000052	2.47
22.4	0.046	0.00205			
22.4	0.046	0.00205			
44.8	0.098	0.00219	0.002158	0.000052	2.39
44.8	0.098	0.00219			
44.8	0.094	0.00210			
134.4	0.275	0.00205	0.002068	0.00002	0.95
134.4	0.279	0.00208			
134.4	0.28	0.00208			
224	0.47	0.00210	0.002119	0.000022	1.06
224	0.48	0.00214			
224	0.474	0.00212			
313.6	0.655	0.00209	0.00209	0.000018	0.84
313.6	0.65	0.00207			
313.6	0.661	0.00211			
403.2	0.846	0.00210	0.002097	0.000015	0.71
403.2	0.839	0.00208			
403.2	0.851	0.00211			
	Prom.	0.00210			
	Desv. Est.	0.00004			
	%CV	1.95187			

b) Resultados de la curva de calibración de clotrimazol en Fluido vaginal simulado-Gelucire® 44/14 al 3% y muestra de tejido vaginal.

Conc	Abs	A/C	Promedio	Desv Est	%CV
22.5	0.031	0.001378	0.001496	0.000112	7.48
22.5	0.034	0.001511			
22.5	0.036	0.0016			
45	0.071	0.001578	0.001578	0.000067	4.23
45	0.074	0.001644			
45	0.068	0.001511			
135	0.216	0.0016	0.001575	0.000027	1.44
135	0.212	0.00157			
135	0.210	0.001556			
225	0.358	0.001591	0.001576	0.000018	1.17
225	0.356	0.001582			
225	0.350	0.001556			
315	0.488	0.001549	0.001558	0.000097	0.62
315	0.494	0.001568			
315	0.490	0.001556			
405	0.640	0.00158	0.00158	0.000099	0.62
405	0.644	0.00159			
405	0.636	0.00157			
	Prom	0.001561			
	Desv Est	5.52E-05			
	%CV	3.539287			

c) Curva de calibración de clotrimazol en fluido vaginal simulado-Gelucire® 44/14 al 3%.



Análisis de la varianza del sistema para evaluar la linealidad del sistema.

ANOVA.

- H_0 : No existe una relación lineal entre la concentración de Clotrimazol y su absorbancia.
- H_a : Existe una relación lineal entre la concentración del Clotrimazol y su absorbancia.

Criterio de aceptación de la hipótesis.

- Si F calculada $>$ F crítica se rechaza la H_0 , por lo tanto, existe una relación lineal entre la concentración del Clotrimazol y sus absorbancia.
- Si F calculada $<$ F crítica se acepta la H_0 , por lo tanto, no existe una relación lineal entre la concentración del Clotrimazol y su absorbancia.

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>F-crítica Valor-P</i>
Modelo	1.99276	1	1.99276	101183.48	0.0000
Residuo	0.000472669	24	0.0000196946		
Total (Corr.)	1.99324	25			

Puesto que el valor P en la tabla ANOVA es menor que 0.05, existe una relación estadísticamente significativa entre Absorbancia y Concentración con un nivel de confianza del 95.0%.

Prueba de intercepto.

- H_0 : La ordenada al origen es igual a cero.
- H_a : La ordenada al origen es diferente a cero.

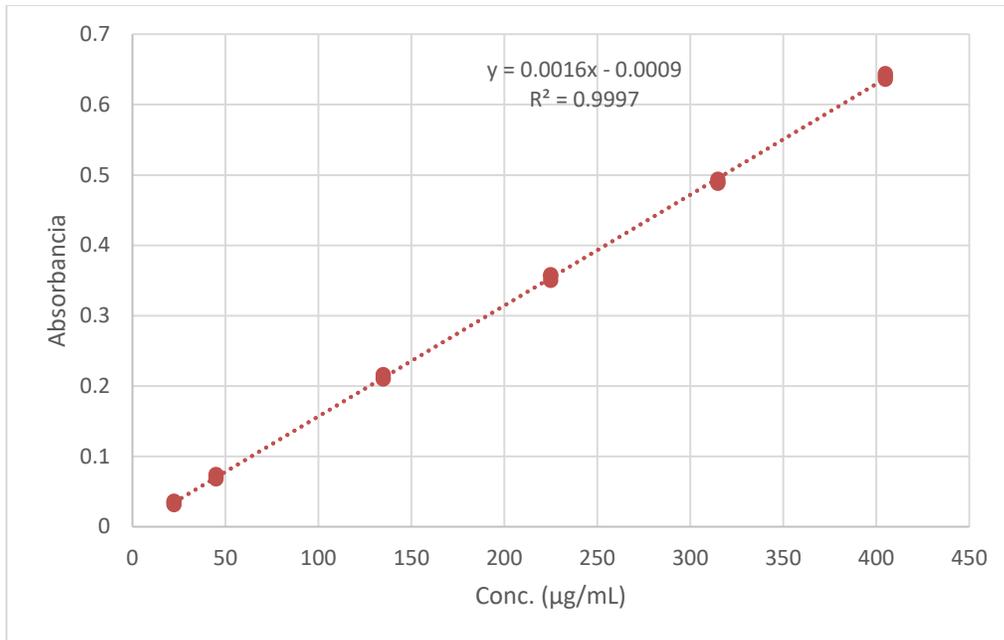
Criterio de aceptación de la hipótesis.

- Si $T < T$ crítica no se rechaza H_0 , por lo tanto, el intercepto es igual a cero.
- Si $T > T$ crítica se rechaza H_0 , por lo tanto, el intercepto es diferente de cero.

	<i>Mínimos Cuadrados</i>	<i>Estándar</i>	<i>Estadístico</i>	<i>T-crítica</i>
<i>Parámetro</i>	<i>Estimado</i>	<i>Error</i>	<i>T</i>	<i>Valor-P</i>
Intercepto	0.000518858	0.00131589	0.394303	0.6968
Pendiente	0.00209424	0.00000658372	318.094	0.0000

Como el valor de $T < T$ crítica, H_0 no se rechaza, es decir el intercepto es igual a cero.

d) Curva de calibración de clotrimazol en fluido vaginal simulado-Gelucire® 44/14 al 3% y muestra de tejido vaginal.



Análisis de la varianza del sistema para evaluar la linealidad del sistema.

ANOVA.

- H_0 : No existe una relación lineal entre la concentración de Clotrimazol y su absorbancia.
- H_a : Existe una relación lineal entre la concentración del Clotrimazol y su absorbancia.

Criterio de aceptación de la hipótesis.

- Si F calculada $>$ F crítica se rechaza la H_0 , por lo tanto, existe una relación lineal entre la concentración del Clotrimazol y sus absorbancia.
- Si F calculada $<$ F crítica se acepta la H_0 , por lo tanto, no existe una relación lineal entre la concentración del Clotrimazol y su absorbancia.

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>F-crítica Valor-P</i>
Modelo	1.78349	1	1.78349	117174.93	0.0000
Residuo	0.000532726	35	0.0000152208		
Total (Corr.)	1.78402	36			

Puesto que el valor P en la tabla ANOVA es menor que 0.05, por lo tanto se rechaza H_0 y existe una relación estadísticamente significativa entre Absorbancia y Concentración con un nivel de confianza del 95.0%.

Prueba de intercepto.

- H_0 : La ordenada al origen es igual a cero.
- H_a : La ordenada al origen es diferente a cero.

Criterio de aceptación de la hipótesis.

- Si $T < T$ crítica no se rechaza H_0 , por lo tanto, el intercepto es igual a cero.
- Si $T > T$ crítica se rechaza H_0 , por lo tanto, el intercepto es diferente de cero.

	<i>Mínimos Cuadrados</i>	<i>Estándar</i>	<i>Estadístico</i>	<i>T-crítica</i>
<i>Parámetro</i>	<i>Estimado</i>	<i>Error</i>	<i>T</i>	<i>Valor-P</i>
Intercepto	-0.000785266	0.00107213	-0.732438	0.4688
Pendiente	0.00157525	0.00000460185	342.308	0.0000

Como el valor de $T < T$ crítica, H_0 no se rechaza, es decir el intercepto es igual a cero.

- Validación del sistema analítico 1.

Parámetro	Especificación	Resultado	Conclusión
Especificidad.	Ninguna sustancia interfiera en la respuesta del analito. La respuesta del método es debida únicamente al analito de estudio.	La respuesta del método es debida únicamente al analito de interés. (Los gráficos se presentan en el anexo 1)	Conforme a la especificación
Linealidad del sistema.	IC (β_1), no debe incluir el cero.	IC (β_1), +4.56047x10 ⁻⁵ -4.56047x10 ⁻⁵	Conforme a la especificación
	$r^2 \geq 0.98$	$r^2 = 0.9997$	
	$CV \leq 2\%$	CV=1.956%	
Precisión del sistema.	S	S=0.00511	Conforme a la especificación
	$CV \leq 1.5\%$	CV= 1.184 %	
Exactitud.	$CV \leq 3\%$	CV= 0.589 %	Conforme a la especificación
	% de recobro: 97-103% para métodos químicos o espectrofotométricos.	99.37 %	
		99.80 %	
		100.42 %	
		99.29 %	
		99.33 %	
100.63 %			
Límite de detección (LD) y límite de cuantificación (LC) teóricos.	$r^2 \geq 0.98$	$r^2 = 0.9997$	Conforme a la especificación
		LD= 0.01095 µg/mL	
		LC= 3.33671 µg/mL	

- Validación del sistema analítico 2.

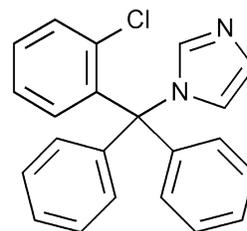
Parámetro	Especificación	Resultado	Conclusión
Especificidad.	Ninguna sustancia interfiera en la respuesta del analito. La respuesta del método es debida únicamente al analito de estudio.	La respuesta del método es debida únicamente al analito de interés. (Los gráficos se presentan en el anexo 1)	Conforme a la especificación
Linealidad del sistema.	IC (β_1), no debe incluir el cero.	IC (β_1), +1.4662x10 ⁻⁵ -1.4662x10 ⁻⁵	Conforme a la especificación
	$r^2 \geq 0.98$	$r^2 = 0.9997$	
	$CV \leq 5\%$	CV=4.459%	
Precisión del sistema.	S	S=0.00458	Conforme a la especificación
	$CV \leq 1.5\%$	CV= 1.428%	
Exactitud.	$CV \leq 3\%$	CV= 1.919%	Conforme a la especificación
	% de recobro: 97-103% para métodos químicos o espectrofotométricos.	102.96 %	
		100.43 %	
		98.17 %	
		99.81 %	
		102.06 %	
98.72 %			
Límite de detección (LD) y límite de cuantificación (LC) teóricos.	$r^2 \geq 0.98$	$r^2 = 0.9997$	Conforme a la especificación
		LD= 2.338 µg/mL	
		LC= 5.2291 µg/mL	

Anexo 3. Propiedades de los reactivos utilizados.

Clotrimazol.

Polvo cristalino de color blanco a pálido amarillo.

1-[(2-Chlorofenil)difenilmetil]-1H-imidazol.



Propiedades

Peso molecular: 344.8 g/mol.

pKa: 4.70 y 6.02

Naturaleza: Base débil.

Solubilidad: Ligeramente soluble en agua (3-8 mg/L a 23°C), benceno y tolueno; totalmente soluble en etanol; soluble en acetona, cloroformo y acetato de etilo; ligeramente soluble en éter.

Punto de fusión: 141-145 °C.

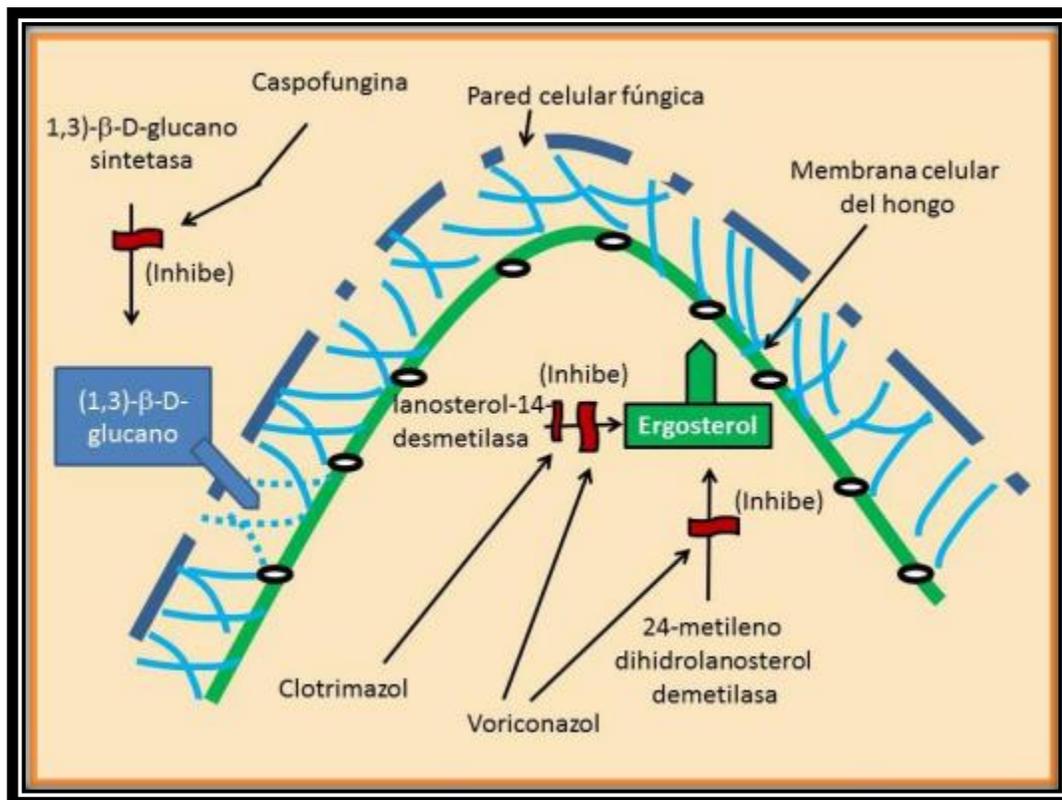


Figura 24. Mecanismo de acción general del clotrimazol (Bidart, 2004).

Tween® 80.

Polioxietilen Sorbitan Monolaurato, polisorbato 80.

Líquido viscoso color ámbar.

Propiedades.

Densidad: 1.060-1.090 g/mL.

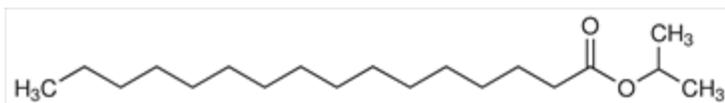
HLB: 15 aprox.

pH en dispersión acuosa 5%: 5.5-7.5

Solubilidad: soluble en agua y etanol.

Palmitato de isopropilo.

Hexadecanoato de isopropilo.



Líquido oleoso, límpido, incoloro o ligeramente amarillento.

Propiedades.

Es un excelente vehículo, ya que es resistente a la oxidación e hidrólisis, y no se enrancia, presentando propiedades emolientes.

Densidad: 0,850 – 0,855 g/ml

Solidifica por debajo de los 16 °C.

P.M.: 298.51 g/mol.

Solubilidad: insoluble en agua, soluble en etanol, cloroformo y éter.

Etanol.

Líquido incoloro, volátil, con un olor característico y sabor picante. También se conoce como alcohol etílico.

Propiedades.

Punto de ebullición: 78.3 °C.

Densidad: 0.7893 g/ml.

Solubilidad: Miscible con agua en todas proporciones, éter, metanol, cloroformo y acetona.

Viscosidad (cP): 1.17 (a 20°C).

Gelucire® 44/14.

Lauril macrogol-32 glyceridos EP

Lauril polioxil-32 glyceridos NF

Bloque semisólido color blanco a amarillo pálido.

Propiedades.

Tensoactivo no iónico, dispersable en agua, compuesto por ésteres de PEG bien caracterizados, una pequeña fracción de glicéridos y PEG libre.

HLB: 14.

Punto de fusión: 44°C.

Anexo 4. Resultados obtenidos del perfil de liberación.

a) Resultados obtenidos para la cinética de liberación del clotrimazol en solución.

Tiempo	Cantidad μg			% liberado			Ln t	Mt			Mt/M α		
	S1	S2	S3	S1	S2	S3							
0	0	0	0	0	0	0							
10	89.14	113.90	101.52	4.31	5.51	4.91	2.30	4.49	4.74	4.62	0.04	0.06	0.05
20	179.24	180.19	216.86	8.67	8.71	10.49	3.00	5.19	5.19	5.38	0.09	0.09	0.11
30	235.52	224.10	299.33	11.39	10.84	14.47	3.40	5.46	5.41	5.70	0.12	0.11	0.15
40	281.33	244.67	310.38	13.60	11.83	15.01	3.69	5.64	5.50	5.74	0.14	0.12	0.16
60	340.95	327.62	395.71	16.49	15.84	19.14	4.09	5.83	5.79	5.98	0.17	0.16	0.20
90	352.95	363.90	533.43	17.07	17.60	25.79	4.50	5.87	5.90	6.28	0.18	0.18	0.27
120	476.38	450.67	614.00	23.04	21.79	29.69	4.79	6.17	6.11	6.42	0.24	0.23	0.31
180	579.33	552.67	647.43	28.01	26.72	31.31	5.19	6.36	6.31	6.47	0.29	0.28	0.32
240	698.00	719.90	743.24	33.75	34.81	35.94	5.48	6.55	6.58	6.61	0.35	0.36	0.37
300	783.33	806.19	866.67	37.88	38.98	41.91	5.70	6.66	6.69	6.76	0.39	0.40	0.43
360	920.57	944.38	1080.57	44.52	45.67	52.25	5.89	6.82	6.85	6.99	0.46	0.47	0.54
420	1024.95	1049.71	1165.43	49.56	50.76	56.36	6.04	6.93	6.96	7.06	0.51	0.52	0.58
480	1156.95	1182.67	1289.33	55.95	57.19	62.35	6.17	7.05	7.08	7.16	0.58	0.59	0.64

Resultados obtenidos para la construcción la cinética de liberación del clotrimazol a partir de la microemulsión.

Tiempo	Cantidad μg			% liberado			Ln t	Mt			Mt/M α		
	ME1	ME2	ME3	ME1	ME2	ME3							
0	0	0	0	0.00	0.00	0.00							
10	10.00	122.00	175.81	5.60	6.10	8.79	2.30	2.30	4.80	5.17	0.00	0.06	0.09
20	137.33	207.81	306.38	6.87	10.39	15.32	3.00	4.92	5.34	5.72	0.07	0.10	0.15
30	193.62	287.43	404.57	9.68	14.37	20.23	3.40	5.27	5.66	6.00	0.09	0.14	0.20
40	262.29	390.38	506.10	13.11	19.52	25.30	3.69	5.57	5.97	6.23	0.13	0.19	0.24
60	475.81	637.62	635.71	28.19	31.88	31.79	4.09	6.17	6.46	6.45	0.23	0.31	0.31
90	679.14	855.81	868.67	38.96	42.79	43.43	4.50	6.52	6.75	6.77	0.33	0.41	0.42
120	950.52	1103.05	1060.19	50.18	55.15	53.01	4.79	6.86	7.01	6.97	0.46	0.53	0.51
180	1256.95	1350.29	1332.19	62.85	67.51	66.61	5.19	7.14	7.21	7.19	0.61	0.65	0.64
240	1540.38	1647.05	1538.95	77.02	82.35	76.95	5.48	7.34	7.41	7.34	0.74	0.80	0.74
300	1564.76	1695.24	1714.76	78.24	84.76	85.74	5.70	7.36	7.44	7.45	0.76	0.82	0.83
360	1737.24	1882.48	1870.57	86.86	94.12	93.53	5.89	7.46	7.54	7.53	0.84	0.91	0.90
420	1884.95	1965.43	1968.29	94.25	98.27	98.41	6.04	7.54	7.58	7.58	0.91	0.95	0.95
480	1916.48	1968.86	2017.90	95.82	98.44	100.90	6.17	7.56	7.59	7.61	0.93	0.95	0.98

Anexo 5. Resultados obtenidos del perfil de permeación de clotrimazol.

a) Resultados obtenidos de la permeación en tejido vaginal de la solución de clotrimazol.

t(min)	Cantidad retirada (μg)			% liberado		
	S1	S2	S3	S1	S2	S3
30	0	0	0	0	0	0
60	169.50	140.35	165.34	11.70	9.68	11.41
120	173.27	151.08	181.41	11.96	10.42	12.52
180	385.08	353.59	418.59	26.57	24.40	28.88
240	448.18	465.30	495.75	30.92	32.10	34.20
300	771.64	768.91	829.68	53.24	53.05	57.24
360	846.94	827.55	853.37	58.44	57.10	58.88
420	861.72	791.58	884.81	59.46	54.62	61.05
480	825.55	806.43	866.08	56.96	55.64	59.76

b) Resultados obtenidos de la permeación en tejido vaginal de la microemulsión con clotrimazol.

t(min)	Cantidad retirada μg			% liberado		
	ME1	ME2	ME3	ME1	ME2	ME3
0	0	0	0	0	0	0
30	370.72	716.92	284.17	7.41	14.34	5.68
60	416.92	389.85	398.45	8.34	7.80	7.97
120	1459.79	1416.27	1469.49	29.20	28.33	29.39
180	2132.27	2230.29	2258.04	42.65	44.61	45.16
240	3236.99	3295.79	3267.86	64.74	65.92	65.36
300	3451.34	3714.11	3743.21	69.03	74.28	74.86
360	3871.01	3928.88	3974.43	77.42	78.58	79.49
420	4087.13	4103.08	4050.36	81.74	82.06	81.01
480	4190.55	4292.38	4353.03	83.81	85.85	87.06