



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS

*FACULTAD DE FARMACIA*



**“DESARROLLO Y OPTIMIZACIÓN DE PELÍCULAS  
MUCOADHESIVAS CON METRONIDAZOL PARA EL  
TRATAMIENTO DE LA VAGINITIS”**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRO EN FARMACIA**

**PRESENTA:**

**Q.F.B. WILLIAM CARTAS CABRERA**

**DIRECTOR DE TESIS:**

**DR. EFRÉN HERNÁNDEZ BALTAZAR**

**CUERNAVACA, MORELOS, 2020.**

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Investigación de Tecnología Farmacéutica de la Facultad de Farmacia de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos bajo la dirección de Dr. Efrén Hernández Baltazar.



**FACULTAD DE FARMACIA**  
Consejo Interno de Posgrado

MAESTRÍA EN FARMACIA

Cuernavaca, Morelos a 11 de diciembre de 2019  
Folio: FF/D/SAC/ CIP /MF/063/2019

**Q.F.B WILLIAM CARTAS CABRERA**  
**ESTUDIANTE DEL PROGRAMA DE MAESTRÍA EN FARMACIA**  
**P R E S E N T E**

Por este medio le informo que, con base en la propuesta hecha en su solicitud, el Consejo Interno de Posgrado le asigno el siguiente jurado para evaluar la tesis "Desarrollo y optimización de películas mucoadhesivas con metronidazol para el tratamiento de la vaginitis"

Quedando integrado su comité de la siguiente manera:

**PRESIDENTE: Dr. Julio Cesar Rivera**  
**SECRETARIO: Dr. Jesús Rivera Islas**  
**V.1. Dra. Luz María Melgoza Contreras**  
**V.2. Dra. Dea Herrera Ruiz**  
**V.3. M en C. Enrique Amador González**

Se le solicita entregar las tesis al jurado designado y dar fluidez a los trámites como se indica en el manual de procedimientos.

Esperando que esta resolución sea en beneficio de su desempeño académico, y sin otro particular por el momento reciba un cordial saludo.

Atentamente  
**Por una humanidad culta**  
*Una universidad de excelencia*

**Dr. Julio César Rivera Leyva.**  
**Jefatura de Posgrado**



ccp: archivo, jurado

mitv

**UA  
EM**



**VOTO APROBATORIO  
PROGRAMA DE POSGRADO DE FARMACIA  
FACULTAD DE FARMACIA UAEM**

**Nombre del alumno:** William Cartas Cabrera

**Título de la tesis:** "Desarrollo y optimización de películas mucoadhesivas con Metronidazol para el tratamiento de la vaginitis"

**Grado a obtener:**

- Maestría en Farmacia  
 Doctorado en Farmacia

**Miembro del jurado:** Dr. Jesús Rivera Islas

La tesis fue leída y se le hicieron las observaciones pertinentes de tal forma que mi decisión es:

- Si se aprueba la tesis tal como se presenta.  
 Se rechaza.

**Observaciones solo en caso de rechazo:**

---

---

---

Jesús Rivera Islas  
Firma del miembro del jurado

6/mayo/2020  
Fecha



**VOTO APROBATORIO  
PROGRAMA DE POSGRADO DE FARMACIA  
FACULTAD DE FARMACIA UAEM**

**Nombre del alumno:** William Cartas Cabrera

**Título de la tesis:** "Desarrollo y optimización de películas mucoadhesivas con Metronidazol para el tratamiento de la vaginitis"

**Grado a obtener:**

- Maestría en Farmacia  
 Doctorado en Farmacia

**Miembro del jurado:** Dra. Luz María Melgoza Contreras

La tesis fue leída y se le hicieron las observaciones pertinentes de tal forma que mi decisión es:

- Si se aprueba la tesis tal como se presenta.  
 Se rechaza.

**Observaciones solo en caso de rechazo:**

---

---

---

Luz María Melgoza C.  
Firma del miembro del jurado

24/02/20  
Fecha



**VOTO APROBATORIO  
PROGRAMA DE POSGRADO DE FARMACIA  
FACULTAD DE FARMACIA UAEM**

**Nombre del alumno:** William Cartas Cabrera

**Título de la tesis:** "Desarrollo y optimización de películas mucoadhesivas con Metronidazol para el tratamiento de la vaginitis"

**Grado a obtener:**

- Maestría en Farmacia  
 Doctorado en Farmacia

**Miembro del jurado:** M en C. Enrique Amador González

La tesis fue leída y se le hicieron las observaciones pertinentes de tal forma que mi decisión es:

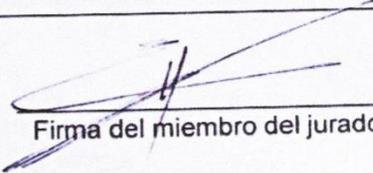
- Si se aprueba la tesis tal como se presenta.  
 Se rechaza.

**Observaciones solo en caso de rechazo:**

---

---

---

  
Firma del miembro del jurado

26-05-2020  
Fecha



**VOTO APROBATORIO  
PROGRAMA DE POSGRADO DE FARMACIA  
FACULTAD DE FARMACIA UAEM**

**Nombre del alumno:** William Cartas Cabrera

**Título de la tesis:** "Desarrollo y optimización de películas mucoadhesivas con Metronidazol para el tratamiento de la vaginitis"

**Grado a obtener:**

- Maestría en Farmacia  
 Doctorado en Farmacia

**Miembro del jurado:** Dr. Julio Cesar Rivera

La tesis fue leída y se le hicieron las observaciones pertinentes de tal forma que mi decisión es:

- Si se aprueba la tesis tal como se presenta.  
 Se rechaza.

**Observaciones solo en caso de rechazo:**

---

---

---

  
Firma del miembro del jurado

02/03/2020  
Fecha



Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

#### Sello electrónico

DEA HERRERA RUIZ | Fecha:2020-05-25 17:36:41 | Firmante

ZMXhmicUcDiH5K66AgUdzllr4yc8bix28FQ+h1aRR3Fn3l6xY5ZDirB9tRKaGwtHjUV7HDsKF2eMz+4hVU0laaVQzylvusvrcpbWXs8RuS7SuWxRJ02Ry98kjOnsvCSM5y4L9Uf9lzl3UqRgKfKhmQ69oFAKzNs55X0hfjYGH6TCR9l6rvvolZ8QFzsiVDbcp5U0wSJIDKNTUs/kzmaA0XstinSZG/yGGtf3OzBSWpEzRNFKzBzhGM1EOnahvcV4R8QUfkoSHbHATqN9HF+w5f/pnLjOZw80WG16l9OJUomwdZvNFf69RqzHZD89yujH76nCMM71rPUXRis9YuA==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



[MQpne7ZEzB{](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/uxTO6MFfjfkX8J3Zst66c7qm5o8DXI>



## AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Efrén Hernández Baltazar por darme la oportunidad de realizar este proyecto en su laboratorio, por su apoyo y consejos en el trayecto de estos dos años.

A mis sinodales por el tiempo que han invertido, observaciones y correcciones que me han realizado para enriquecer el proyecto.

A el Dr. Oscar Torres Ángeles por permitirnos usar el equipo y material de laboratorio 9 de microbiología, así como por habernos obsequiado las cepas con las cuales se trabajaron, a Janeth y Miriam, por la capacitación para la realizar las pruebas correspondientes.

Al Laboratorio nacional de microscopia avanzada del Instituto de biotecnología de la UNAM, por permitirnos ingresar a sus instalaciones y hacer uso del microscopio de contraste de fases para alizar las pruebas correspondientes a nuestras películas.

A mis compañeros de maestría y de laboratorio, que me apoyaron a lo largo de los dos años, dándome consejos y motivándome para continuar siempre hacia adelante y a la Lic. Irais por el apoyo con cada uno de los tramites a lo largo de los 2 años de la maestría.

A CONACYT por proporcionarme la ayuda económica a través de la beca que me proporcionaron a lo largo de la maestría, para continuar con mis estudios y de igual manera culminar de forma satisfactoria la maestría.

## DEDICATORIA

A mis padres Teófila Cabrera Orozco y Cándido Antonio Reyna, que a lo largo de mi vida han confiado en mí en cada momento, siempre motivándome, apoyándome y dándome ánimos. Al leer esto quiero que sepan lo importante que son para mí, hemos pasado juntos por tantas cosas, momentos de alegría, momentos de tristeza, momentos de lujos y momentos de escases, unos más que otros, pero todas esas experiencias me han enseñado todo lo que se, y me han hecho la persona que soy, nunca dejare de agradecerles todo lo que se han esforzado por mí, no pude tener mejores padres que ustedes, sé que muy pocas veces se los digo por mi forma de ser pero son las personas que más amo en mi vida, gracias por todo y créanme que siempre estaré para ustedes, porque esto solo es un pequeño paso para cumplir mis sueños y metas, y una de ellas es regresarle todo lo que ustedes me han brindado y multiplicárselos por mucho y que siempre se sientan orgullosos de mí.

A los dos mounstritos que llegaron a mi vida sin pensarlo Evelin y Haily, sepan que las amo con todo mi corazón, nunca pensé en tener dos hermanas que llegaran a mi vida, y aunque son unos diablitos por que molestan mucho, las amo demasiado, siempre voy a ver por ustedes, porque deseo muchísimo que nunca les falte nada de lo que en alguna ocasión a mí me hizo falta, que en un futuro sean mucho mejores de lo que yo he sido, siempre van a contar conmigo.

“Jamás permitas que mentes pequeñas te hagan creer que tus sueños son demasiado grandes para ti”

## ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE GENERAL .....	I
ÍNDICE DE TABLAS.....	IV
ÍNDICE DE FIGURAS .....	IV
ÍNDICE DE ABREVIATURAS.....	VII
RESUMEN .....	VIII
ABSTRACT .....	IX
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. ANTECEDENTES.....	4
3. MARCO TEÓRICO .....	7
3.1. Vagina.....	7
3.2. Vasculatura de la vagina .....	7
3.3. Ambiente vaginal.....	8
3.4. Mucosa vagina .....	9
3.5. Vaginitis.....	11
3.5.4. Prevalencia de infecciones vaginales .....	15
3.6. Metronidazol.....	16
3.8. Películas mucoadhesivas.....	18
3.9. Sistemas de liberación mucoadhesivos .....	19
3.9.1. Absorción del fármaco a través de la mucosa vaginal .....	19
3.10. Bioadhesión y mucoadhesión .....	19
3.11. Teorías de la mucoadhesión.....	20
3.12. Sistema de liberación de las películas .....	22
3.13. Métodos de fabricación de películas.....	22
3.14. Propiedades de películas mucoadhesivas .....	24
4. JUSTIFICACION.....	30
5. HIPÓTESIS.....	31
6. OBJETIVO GENERAL.....	31
7. OBJETIVOS ESPECIFICOS.....	32
8. MATERIALES .....	33
8.1 Equipos .....	33

8.2. Materias primas.....	33
9. METODOLOGÍA.....	34
9.6. Selección de materiales Poliméricos.....	34
9.7. Selección de disolventes para la fabricación de películas.....	34
9.8. Elaboración de películas mucoadhesivas .....	34
9.9. Diseño exploratorio .....	35
9.10. Caracterización de las películas mucoadhesivas.....	35
9.17. Validación del método analítico por UV para cuantificar Metronidazol..	40
9.18. Seguimiento de las películas mediante microscopia de contraste de fases 42	
9.19. Seguimiento fotográfico y espectrofotometría Raman .....	43
9.20. Estudios de liberación <i>in vitro</i> .....	44
9.21. Modelado matemático para descifrar el mecanismo de liberación.....	44
9.22. Estudios microbiológicos.....	45
10. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	46
10.6. Selección de materiales poliméricos .....	46
10.7. Selección de disolventes empleados .....	49
10.8. Fabricación de películas .....	50
10.9. Diseño exploratorio .....	50
10.10. Cuantificación de fármaco en las películas .....	68
10.11. Fuerza de mucoadhesión.....	69
10.12. Compatibilidad Fármaco-excipientes .....	70
10.13. Validación del método analítico .....	73
10.14. Análisis de las películas mediante microscopia de contraste de fases .	75
10.15. Análisis del seguimiento fotográfico y espectrofotometría Raman .....	78
10.16. Liberación <i>in vitro</i> .....	81
10.17. Estudios microbiológicos.....	82
11. CONCLUSIONES.....	94
12. PERSPECTIVAS .....	95
13. BIBLIOGRAFÍA.....	96
14. ANEXOS.....	105
Curva de validación para la cuantificación de Metronidazol.....	105
Repetibilidad del método analítico .....	105

Exactitud del método analítico .....	106
Compatibilidad fármaco excipiente a la semana 1, 2 y 3. ....	107
Seguimiento espectrofotométrico Raman de las películas de la semana 1, 2 y 3.....	108
Fotografías de microscopía de contraste de fases de las películas con fármaco a la semana 1, 2 y 3. (Aumento en 40x) .....	109
Espesor (Considerando interacciones primarias).....	110
Hinchamiento .....	112
Tiempo de desintegración de la película.....	114
Tiempo de disolución de la película .....	115
Fuerza de adhesión .....	117
Optimización de la respuesta.....	119

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.- Características, diagnóstico y tratamiento de las infecciones vaginales (Perea; 2010). .....	2
Tabla 2.- Ejemplos de principios activos incorporados en películas (Ditix, R.P., and Puthli, S.P.; 2009). .....	5
Tabla 3.- Prevalencia de microorganismos aislados de cultivo cervicovaginal (Gonzalez A, cols; 2004) .....	16
Tabla 4.- Clasificación cualitativa de la capacidad adhesiva de polímeros bioadhesivos (Rodriguez IC, et al; 2000).....	25
Tabla 5.- Películas en el mercado .....	29
Tabla 6.- Fármaco recuperado de los vasos de precipitado de las formulaciones	39
Tabla 7.- Niveles de concentración para establecer la linealidad del método analítico .....	41
Tabla 8.- Modelos matemáticos ((Ríos KO; 2018) .....	45
Tabla 9.- Evaluación de la formación de películas .....	47
Tabla 10.- Diseño experimental.....	51
Tabla 11.- Resultados del diseño .....	52
Tabla 12.- Optimización de la deseabilidad.....	65
Tabla 13.- Comparación de valores óptimos .....	67
Tabla 14.- Fármaco incorporado en las películas.....	69
Tabla 15.- Parámetros de validación del método analítico y resultados obtenidos	74
Tabla 16.- Áreas de inhibición en los cultivos microbiológicos .....	89

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.- Vasculatura vaginal (Castillo A; 2011). .....	8
Figura 2.- Mucosa vaginal (Ross MH and Pawlina W; 2013). Esta imagen representa un corte teñido con H-E de la pared vaginal, muestra con poco aumento dos de las tres capas de la vagina: la capa mucosa y la capa muscular (la capa más externa de todas la adventicia no aparece). La mucosa consiste en un epitelio estratificado plano y en un tejido subyacente. Es característico que el limite conjuntivo-epitelial sea muy irregular, con papilas prominentes que empujan la superficie profunda del epitelio. La capa muscular, que se ve solo en parte, consiste en haces de células musculares lisas de disposición irregular. Además, la región profunda del tejido conjuntivo contiene vasos sanguíneos abundantes que irrigan las diversas capas de la pared vaginal. 40x .....	9
Figura 3.- Diagnóstico de enfermedades vaginales( Gonzalez A, cols; 2004) .....	12
Figura 4.- Neisseria gonorrhoeae .....	13
Figura 5.- Trichomonas vaginalis .....	14
Figura 6.- Candida albicans.....	14
Figura 7.- Estructura del Metronidazol (drugbank.ca/structures/DB00916/image.svg) .....	16

Figura 8.- Teoría de la humectación Diagrama esquemático que muestra la influencia del ángulo de contacto entre el dispositivo y la membrana mucosa en la bioadhesión (Carvalho FC; 2010).....	20
Figura 9.- Teoría de la fractura Regiones donde puede ocurrir la ruptura del enlace mucoadhesivo (Carvalho FC; 2010). ....	21
Figura 10.- Teoría de la difusión Interacciones secundarias resultantes de la interdifusión de cadenas poliméricas de dispositivo bioadhesivo y de moco (Carvalho FC; 2010).....	21
Figura 11.- Proceso de fabricación por fusión-extrusión .....	23
Figura 12.- Proceso de fabricación por moldeo.....	24
Figura 13.- Microscopía de poros de alginato de sodio (i) y carboximetilcelulosa (ii) (Boateng JS, et al; 2010).....	27
Figura 14.- Ejemplos de mucoadhesivo en el mercado.....	29
Figura 15.- Vernier digital .....	36
Figura 16.- Montaje para la medición de la fuerza de adhesión .....	38
Figura 17.- Microscopio de epifluorescencia .....	43
Figura 18.- Prueba de liberación In vitro.....	44
Figura 19.- Materiales poliméricos analizados para la fabricación de la película mucoadhesiva vaginal.....	46
Figura 20.- Películas con diferentes plastificantes .....	48
Figura 21.- Película con Sorbitol como plastificante.....	48
Figura 22.- Selección de disolvente .....	49
Figura 23.- Diagrama de Pareto para el Espesor .....	53
Figura 24.- Grafico de contorno de superficie estimada para el Espesor.....	54
Figura 25.-Diagrama de Pareto para el Hinchamiento .....	55
Figura 26.- Grafico de contorno de superficie estimada para el Hinchamiento ....	57
Figura 27.- Diagrama de Pareto para el Tiempo de desintegración de la Película .....	58
Figura 28.- Grafico de contorno de superficie estimada para el Tiempo de desintegración de la Película.....	59
Figura 29.- Diagrama de Pareto para el Tiempo de disolución de la Película .....	60
Figura 30.- Grafico de contorno de superficie estimada para el Tiempo de disolución de la Película.....	61
Figura 31.- Diagrama de Pareto para la Fuerza de adhesión.....	62
Figura 32.- Grafico de contorno de superficie estimada para la Fuerza de adhesión.....	63
Figura 33.- Grafico de contorno de superficie estimada para la Optimización .....	66
Figura 34.- Gráficos de la comparación de valores óptimos.....	68
Figura 35.- Tejido vaginal.....	70
Figura 36.- Montaje para la medición de mucoadhesión .....	70
Figura 37.- Gráfico de lectura en espectroscopia Raman del Metronidazol. ....	71
Figura 38.- Gráfico de lectura en espectroscopia Raman de cada uno de los excipientes ye el fármaco incorporados en la formulación de la película. ....	71

Figura 39.- Gráfico de lectura en espectroscopia Raman del Metronidazol, y las mezclas físicas 1:1, que se realizó del fármaco con cada excipiente de la formulación. (TIEMPO 0).....	72
Figura 40.- Gráfico de lectura en espectroscopia Raman del Metronidazol, y las mezclas físicas 1:1, que se realizó del fármaco con cada excipiente de la formulación. (CUARTA SEMANA).....	72
Figura 41.- Fotografía de película mucoadhesiva sin fármaco al tiempo 0 (Microscopia de contraste de fases) (Aumento en 40x) .....	75
Figura 42.- Fotografía de película mucoadhesiva con fármaco al tiempo 0 (Microscopia de contraste de fases) (Aumento en 40x) .....	76
Figura 43.- Fotografía de película mucoadhesiva sin fármaco a la semana 4 (Microscopia de contraste de fases) (Aumento en 40x) .....	77
Figura 44.- Fotografía de película mucoadhesiva con fármaco a la semana 4 (Microscopia de contraste de fases) (Aumento en 40x) .....	77
Figura 45.- Películas con fármaco y sin fármaco al tiempo 0 .....	79
Figura 46.- Lectura de espectroscopia Raman al tiempo 0 .....	79
Figura 47.- Películas con fármaco y sin fármaco a la semana 4 .....	80
Figura 48.- Lectura de espectroscopia Raman la semana 4 .....	80
Figura 49.- Liberación in vitro .....	81
Figura 50.- Resultados de las pruebas de susceptibilidad ante Metronidazol y Fluconazol.....	82
Figura 51.- Prueba control de DMSO .....	83
Figura 52.- Prueba control con Fluconazol.....	84
Figura 53.- Prueba control con Metronidazol.....	85
Figura 54.- Prueba de películas sin fármaco .....	86
Figura 55.- Prueba de película con fármaco.....	87
Figura 56.- Prueba de películas con fármaco en forma circular al tiempo 0.....	91
Figura 57.- Prueba de películas con fármaco en forma circular a la semana 4 ....	92

## ÍNDICE DE ABREVIATURAS

- VB.....Vaginosis bacteriana
- CLSI..... Clinical & Laboratory Standards Institute
- ITS.....Infecciones de transmisión sexual
- DIU.....Dispositivo intra uterino
- HCl 1M.....Ácido clorhídrico 1 Molar
- HPMC.....Hidroxipropil metil celulosa
- Lustreclear.....Nombre comercial de la combinación de carragenina y celulosa micronizada
- DE.....Desviación estándar
- CV.....Coeficiente de variación
- IC.....Intervalos de confianza
- USP.....United States Pharmacopeial
- AB..... Interacción entre el HPMC K15M y el lustreclear
- AC..... Interacción entre el HPMC K15M y el sorbitol
- BC..... Interacción entre el lustreclear y el sorbitol

## RESUMEN

El objetivo del presente trabajo ha sido desarrollar y optimizar la formulación de películas mucoadhesivas con Metronidazol, combinando excipientes y propiedades tecnológicas de éstos, para obtener propiedades físicas de la formulación idóneas en base a las características de desempeño preestablecidas.

Se realizó una búsqueda bibliográfica recabando información acerca de los mejores polímeros para cumplir con los objetivos establecidos, de igual manera se hicieron algunas pruebas con los polímeros para seleccionar los adecuados junto con los disolventes idóneos para mantener las propiedades requeridas para la formulación.

Se realizó un diseño experimental con el programa estadístico Statgraphics, mediante el cual se fabricaron formulaciones en orden aleatorio y fueron evaluados en espesor, resistencia al plegado, porcentaje de hinchamiento, tiempo de desintegración de la película, tiempo de disolución de la película, fuerza de adhesión, para posteriormente realizar una optimización en base a las variables de respuesta estudiadas.

La película mucoadhesiva optimizada fue evaluada para conocer el contenido de fármaco por  $\text{cm}^2$ , la fuerza de mucoadhesión, de igual manera a estas películas se les evaluó la estabilidad durante un lapso de un mes a una temperatura de  $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ , obteniendo que éstas se mantenían estables sin crear ningún tipo de interacción fármaco-excipiente.

Las películas obtenidas tuvieron una liberación inmediata, en una prueba de liberación *in vitro*, debido a que a los primeros 5 minutos liberaron el 100% del fármaco. También las películas fueron sometidas a pruebas microbiológicas para observar su efectividad de inhibición frente a cepas de *Candidas*, las cuales han sido reportadas en una alta prevalencia en infecciones vaginales obteniendo que las películas mucoadhesivas tienen una mayor eficacia que el fármaco en solución, su efectividad es comparable al Fluconazol, fármaco que es reportado como control por el CLSI (Clinical & Laboratory Standards Institute).

## ABSTRACT

The objective of this work has been developed and improved the formulation of mucoadhesive films with metronidazole, combining excipients and technological analysis properties, to obtain suitable physical properties of the formulation based on the pre-established performance characteristics.

A bibliographic search was carried out, gathering information about the best protocols to meet the stated objectives. Similarly, some tests were carried out with the polymers to select the requirements together with the suitable solvents to maintain the properties required for the formulation.

An experimental design was made with the statistical program, by which formulations were manufactured in random order and evaluated in thickness, resistance to folding, percentage of swelling, time of disintegration of the film, concentration time of the film, strength of adhesion, to subsequently perform an optimization based on the response results studied.

The optimized mucoadhesive film was controlled to know the content of the drug per  $\text{cm}^2$ , the strength of mucoadhesion, in the same way, these films were evaluated for stability over a period of one month at a temperature of 40 °C, obtaining that they remain stable without create any kind of excipient drug interaction.

The films obtained had an immediate release, in an “*in vitro*” release test, because the first 5 minutes released 100% of the drug. The films also sometimes went to microbiological tests to observe their inhibition treatment against *Candida* strains, which have been reported in a high prevalence in vaginal infections, obtaining the mucoadhesive films have a greater efficacy than the medicine in solution, their problem. It is comparable to Fluconazole, a drug that is reported as a control by the CLSI (Clinical & Laboratory Standards Institute).

## 1. INTRODUCCIÓN

Las infecciones vaginales representan una de las primeras causas de consulta en unidades de atención médica, se reporta que en la consulta representa el 20 % del total de las consultas en atención medica primaria; en la población americana negra es del 45 a 55%, en la mujer asiática se reporta entre un 20 a 30% (Donders, 2010), para la población mexicana se reporta que alrededor del 60% de pacientes femeninos con diagnóstico de candidiasis, son debido a *Candida albicans*, de igual manera la frecuencia de infección por *Trichomonas vaginalis*, puede varias dependiendo de la población en estudio, en el 2003 se reportó alrededor del 1.7%, en Cuernavaca, México, 2.5% en la Unión Soviética hasta 35% en Haití (Flores-Paz R, cols; 2003).

Entre las enfermedades genitales se encuentra la candidiasis vulvovaginal, que se considera la segunda causa más frecuente de vaginitis después de vaginosis bacteriana, ya que cuenta con una prevalencia en mujeres de 20-30 años, que afecta de 70-75% de las mujeres al menos una vez en el transcurso de su vida (Bassi P and Kaur G; 2015).

Todas las infecciones del aparato genital femenino presentan una sintomatología que puede ser común (Tabla 1), como disuria, polaquiuria, prurito vulvar, y leucorrea (Perea; 2010).

Tabla 1.- Características, diagnóstico y tratamiento de las infecciones vaginales (Perea; 2010).

Diagnostico	Vagina normal	Vulvovaginitis por Candida	Tricomoniasis	Vaginosis
Flora microbiana	<i>Lactobacilus spp.</i>	<i>C. albicans</i> y otras levaduras	<i>T. vaginalis</i>	<i>Garnerella vaginalis</i> Mycoplasmas y anaerobios
Síntomas	Ninguno	Irritación y prurito vulvar. Leucorrea	Leucorrea profusa y maloliente	Leucorrea maloliente y abundante
Exudado vaginal	Claro o blanco flocular, no homogéneo	Blanco. En agregados adherentes	Amarillentos. Homogéneo, poco viscoso, a menudo espumoso.	Blanco o grisáceo. Homogéneo
Inflamación del introit vulvar o vaginal	No	Eritema del epitelio vaginal, frecuente dermatitis	Eritema del epitelio vaginal, petequias en cérvix.	No
pH del exudado	<4.5	<4.5	>4.5	>4.5
Olor o anomalías (pescado) cuando se añade KOH (10%) al exudado vaginal	No	No	Con frecuencia	Siempre
Examen al microscopio	Células epiteliales. Predominio de Lactobacillus	Leucocitos, células epiteliales, levaduras, pseudomicelios en el 80%	Leucocitos, trichomonas en el 80-90% de las sintomáticas	Células "clave". Escasos PMN Lactobacillus Flora mixta
Tratamiento	No	Clotrimazol o miconazol intravaginal una semana.	Metronidazol 2 g por vía oral, una sola dosis	Metronidazol 500 mg/12 horas, 5-7 días
Actitud con parejas sexuales	Ninguna	Ninguna: si hay dermatitis del pene, tratamiento tópico	Búsqueda de otras ETS. Metronidazol	Búsqueda de otras ETS.

Los sistemas bioadhesivos han sido empleados especialmente en aplicaciones odontológicas, ortopédicas, oftálmicas y quirúrgicas y, también son empleados en el estudio de la liberación controlada y localizada de principios activos sobre mucosas. Las aplicaciones de estos sistemas exigen un estudio debido a los retos que nos impone la vía de administración debido al comportamiento de los materiales poliméricos utilizados para el desarrollo. Los polisacáridos representan una clase importante de biomateriales naturales, que incluyen el almidón, la celulosa, la agarosa, el alginato, el dextrano y la quitina, entre otros (Castro J, et al; 2016).

La forma de administración por mucoadhesivos puede ser por diferentes rutas, incluyendo ocular, nasal, rectal, y vaginal, para la entrega local o sistémica.

La mucoadhesión es un estado en el que dos materiales, uno de los cuales es moco o una membrana mucosa, se mantienen juntos durante un periodo prolongado de tiempo (Muzib Y, et al; 2012).

La vagina es un órgano del tracto reproductor femenino, potencial vía de administración de fármacos para conseguir efectos tanto locales como sistémicos puesto que el epitelio vaginal se considera una mucosa (Cazorla R; 2015).

Un inconveniente de la ruta está representado por mecanismos de eliminación fisiológicos, como el ciclo menstrual, además de las secreciones vaginales constantes, los cuales son responsables directos del escaso tiempo de residencia de las formulaciones convencionales (cremas, óvulos) en el sitio de acción/absorción, causando una mala distribución y acción del fármaco.

Existen enfoques propuestos en la literatura para resistir los problemas mencionados anteriormente: uno está representado por formulaciones mucoadhesivas capaces de prolongar la permanencia del medicamento en la cavidad vaginal gracias a la formación de enlaces físicos con la mucosa, el otro está constituido por un líquido termogelificante, sistemas que están sujetos a una transición sol-gel en la administración vaginal (Caramella CM, et al; 2015).

Los sistemas de administración vaginal de medicamentos incluyen soluciones, semisólidos (cremas y geles) y formulaciones sólidas (tampones, cápsulas, óvulos, películas, esponjas, polvos y dispositivos especiales de liberación controlada como el anillo intravaginal), así como otros tipos de formulaciones tales como aerosoles y sistemas de partículas integrados en sistemas adecuados de administración de fármacos (Allen LV, et al; 2011).

## 2. ANTECEDENTES

Se han estudiado nuevas formas de dosificaciones farmacéuticas las cuales puedan servir tanto para una administración local, como para una administración sistémica; las mucosas actúan como una vía, la cual puede ser aprovechada como una gran ruta de administración farmacéutica.

Los polímeros han sido estudiados por poseer diversas aplicaciones en productos farmacéuticos. Sus capacidades en base a su estructura son muchas, lo cual lo datan de una gran capacidad bioadhesiva (Bassi P and Kaur G; 2017).

Las películas como forma de dosificación han adquirido gran relevancia en el ámbito farmacéutico, como productos convenientes y amigables para el paciente (Morales J and McConville J; 2011).

En el 2012 se realizó la preparación de películas de liberación rápida de levocetirizina. Las películas se realizaron mediante el uso de polímeros tales como HPMC y el alcohol polivinílico, ya sea como polímero único o en combinación con un método de moldeo por disolvente, se evaluaron las características físicas las cuales dieron resultados satisfactorios (Prabhu P, et al; 2012).

En el año 2016, se desarrollaron sistemas poliméricos bioadhesivos del tipo película polimérica y comprimido empleando el biopolímero Pululan, para el transporte de digluconato de clorhexidina, el cual es un principio activo utilizado como tratamiento de la gingivitis y de la enfermedad periodontal (Castro J, et al; 2016).

Se desarrolló películas de quitosán proveniente de desechos del calamar gigante “*Dosidicus gigas*”, a las cuales se le evaluaron propiedades físicas, mecánicas, compatibilidad y de mucoadhesión para su uso como apósitos en el tratamiento de heridas generadas por quemaduras (Fuentes I and Pastor A; 2009).

Tabla 2.- Ejemplos de principios activos incorporados en películas (Ditix, R.P., and Puthli, S.P.; 2009).

Acción	Ingrediente
<b>Energizantes</b>	Cafeína
<b>Mucoadhesivos de desintoxicación</b>	Extracto de té verde y antioxidantes
<b>Vitalidad masculina</b>	Extracto de ginseng y otros ingredientes que incrementan el libido
<b>Inhibidor del apetito</b>	Vitaminas, minerales y suplementos
<b>Mucoadhesivo antibacterial</b>	Cloruro de cetilpiridino
<b>Promotor de saliva</b>	Extracto de frutas acidas
<b>Ondansetron Rapidfilm</b>	Ondansetron 4 mg y 8 mg
<b>Donezepila Rapidfilm</b>	Hidroclorhidrato de Donepezilo 5 mg y 10 mg
<b>Dejar de fumar</b>	Nicotina
<b>Vitaminas</b>	B6, B12, C, D3
<b>Vitalidad femenina</b>	Benzocaína, cafeína, melatonina, proteínas.

Un estudio más, a base de polímeros naturales, utilizando el TSP (Polímero de semilla de tamarindo), el cual se utilizó como formador de matriz polimérica, y también incorporaba a la película propiedades mucoadhesivas. Se sabe bien que la *Candida vaginitis* es una de las causantes de infecciones vaginales que tiene gran prevalencia, por lo cual se buscó fabricar una formulación, con Nistatina como principio activo, que posea un mayor tiempo de residencia en el sitio de acción además de tener una liberación controlada, en comparación con productos que ya se encuentran de forma comercial, como cremas que tienen la dificultad de liberar únicamente el 30% del principio activo, además de sufrir el arrastre por el lavado vaginal (Bassi P and Kaur G; 2017).

Las propiedades mucoadhesivas permiten un mejor contacto de la formulación con la superficie vaginal y tiempos de residencia más largos. En la mayoría de los casos, la mucoadhesión se imparte a una formulación mediante el empleo de excipientes poliméricos. Los mecanismos de mucoadhesión implican, en primer lugar, una etapa

de contacto, en la que la hidratación, la humectación y la diseminación son los pasos más importantes y, posteriormente, una etapa de consolidación, que implica el fortalecimiento de la unión polímero-mucina, gracias a la interpenetración de las cadenas de polímero en el moco y la aparición de enlaces polímero-mucina (principalmente van der Waals y enlaces de hidrógeno o interacciones electrostáticas) (Boddupalli BM, et al; 2010).

### 3. MARCO TEÓRICO

#### 3.1. Vagina

Ross y Pawlina, se refieren a la vagina como un tubo fibromuscular que comunica los órganos genitales internos con el medio externo. Es una vaina que se extiende desde el cuello del útero hasta el vestíbulo vaginal, el cual corresponde a la región situada entre los labios menores (Ross MH and Pawlina W; 2013).

Está situada entre la vejiga y el recto. Mide de 7 a 10 cm y sus paredes son muy elásticas y plegadas (Córdova A, cols; 2003).

Castillo se refiere a la vagina como un tubo musculomembranoso que se extiende desde el cuello del útero hasta el vestíbulo de la vagina (Castillo A; 2011).

#### 3.2. Vasculatura de la vagina

Para referirnos a la vasculatura vaginal, se divide está en dos porciones:

- \* Porción superior: a través de las arterias uterinas.
- \* Porción media e inferior: a través de las arterias vaginales que derivan de la arteria rectal media y de la arteria pudenda interna.

Las venas forman los plexos venosos vaginales a lo largo de las caras laterales de la vagina y dentro de la mucosa vaginal, estas comunican con los plexos venosos vesicales, uterino y rectal y drenan en las venas ilíacas internas (Figura 1) (Castillo, A; 2011).

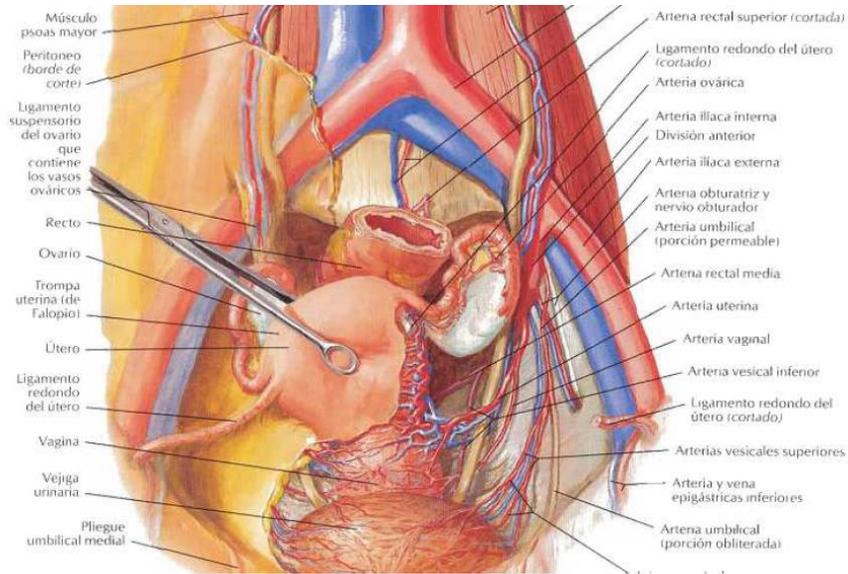


Figura 1.- Vasculatura vaginal (Castillo A; 2011).

### 3.3. Ambiente vaginal

La producción de líquido vaginal de aproximadamente 6 g/día y un volumen presente en la vagina de aproximadamente 0.5 a 0.75 mL. Compuestos tales como ácido láctico, ácido acético, glicerol, urea y glucosa están presentes en concentraciones significativas en los fluidos vaginales. El glucógeno, que está presente en gran cantidad, es un sustrato de los procesos microbianos y enzimáticos que producen ácido láctico, cuya concentración se estima entre 3 y 5 g/L, y que contribuye a mantener el pH vaginal hasta valores ligeramente ácidos, generalmente en el intervalo de 4–4.5 (Owen DH and Katz DF; 1999).

El entorno al que enfrentan los sistemas de administración puede variar dependiendo de diversos factores, los cambios en los niveles hormonales que normalmente son los responsables de la disminución de fluidos vaginales, además de que son responsables del aumento de pH vaginal (Caramella CM, et al; 2015).

Los principales componentes de la mucosidad secretada son las mucinas solubles. Estas son glucoproteínas altamente glicosiladas que consisten en subunidades de aproximadamente 500 kDa unidas por puentes disulfuro para proporcionar grandes

estructuras que atrapan una gran cantidad de agua para dar una capa protectora visco-elástica sobre la superficie de la mucosa (Dhanisha SS, et al; 2018).

### 3.4. Mucosa vagina

La vagina se compone de una capa mucosa interna, que tiene pliegues transversales abundantes y esta revestida por un epitelio estratificado plano. En los seres humanos y en otros primates, las células epiteliales pueden contener gránulos de queratohialina, pero en condiciones normales no ocurre queratinización. Por consiguiente, en todo el espesor de epitelio es posible ver núcleos dentro de las células (Ross MH and Pawlina W; 2013).

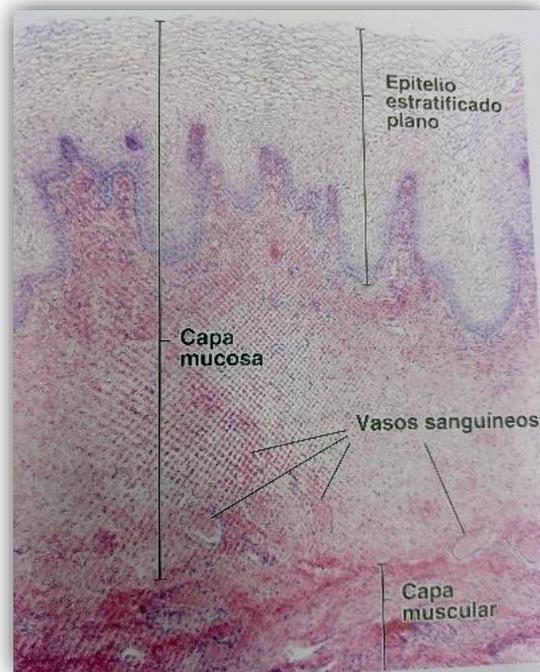


Figura 2.- Mucosa vaginal (Ross MH and Pawlina W; 2013).

Esta imagen representa un corte teñido con H-E de la pared vaginal, muestra con poco aumento dos de las tres capas de la vagina: la capa mucosa y la capa muscular (la capa más externa de todas la adventicia no aparece). La mucosa consiste en un epitelio estratificado plano y en un tejido subyacente. Es característico que el límite conjuntivo-epitelial sea muy irregular, con papilas prominentes que empujan la superficie profunda del epitelio. La capa muscular, que se ve solo en parte, consiste en haces de células musculares lisas de disposición irregular. Además, la región profunda del tejido conjuntivo contiene vasos sanguíneos abundantes que irrigan las diversas capas de la pared vaginal. 40x

La mucosa vaginal contiene grandes reservas de glucógeno. El ambiente ácido retarda el crecimiento microbiano, pero también es nocivo para los espermatozoides (Tortora GJ and Derrickson B; 2012).

#### 3.4.1 Lamina propia

La lamina propia posee dos regiones bien definidas. La región más cercana a la luz del órgano está compuesta por un tejido conjuntivo laxo muy celular. La otra región, contigua a la capa muscular, es más densa y puede considerarse una submucosa. También puede haber nódulos linfáticos solitarios (Ross MH and Pawlina W; 2013).

#### 3.4.2. Capa Muscular Vaginal

La vagina posee una capa muscular intermedia, que está organizada en dos estratos de músculo liso entremezclados (uno circular interno y longitudinal externo) que a veces no son fáciles de discernir (Ross MH and Pawlina W; 2013).

#### 3.4.3. Capa Adventicia de la Mucosa

La vagina posee una capa adventicia externa, que está organizada en un estrato interno de tejido conjuntivo denso contiguo a la capa muscular y un estrato externo de tejido conjuntivo laxo que se confunde con la adventicia de las estructuras vecinas. El estrato interno contiene fibras elásticas en abundancia que contribuyen a la elasticidad y a la resistencia de la pared vaginal. El estrato externo posee una gran cantidad de vasos sanguíneos y linfáticos, así como nervios (Fawcett DW; 1995).

#### 3.4.4. Mucus

La mucosidad normal y el aclaramiento mucociliar son componentes críticos de función inmune innata. El moco tiene actividades antioxidantes, antiproteasas y antimicrobianas. Las mucinas formadoras de gel son los principales componentes poliméricos del moco normal. Los principales componentes macromoleculares de la

mucosidad son las glucoproteínas de la mucina. Las mucinas son glicoproteínas grandes. Las mucinas secretadas forman grandes estructuras oligoméricas que imparten propiedades viscoelásticas al moco (Voynow JA and Rubin BK; 2009).

#### 3.4.5. Desprendimiento vaginal

Las células superficiales del epitelio vaginal se están desprendiendo constantemente durante el ciclo, pero esta descamación es más fuerte en la fase luteínica tardía y durante la menstruación (Fawcett DW; 1995).

#### 3.4.6. Secreciones vaginales

La vagina carece de glándulas y la mayor parte de su líquido lubricante procede de la secreción de las glándulas del cuello uterino. Se cree que se origina como un trasudado de los capilares de la lámina propia y que se mueve a través de canales intercelulares del epitelio hacia la luz (Fawcett DW; 1995).

### 3.5. Vaginitis

La vaginitis es un proceso inflamatorio de la mucosa vaginal que afecta a millones de mujeres en todo el mundo. La manifestación primaria es flujo vaginal y es la causa de consulta ginecológica más común a cualquier edad (Valdeiglesias N and Medrano AO; 2001).

En una mujer sana, el ecosistema vaginal se encuentra en equilibrio gracias a la actividad de la bacteria dominante *Lactobacillus acidophylus*. Este produce ácido láctico y peróxido de hidrógeno, sustancias que regulan el crecimiento de otras bacterias de la microflora vaginal normal. El ácido láctico mantiene el pH vaginal por debajo de 4.5 (Eschenbaach DA, et al; 1989).

#### 3.5.1. Vaginosis bacteriana

Existen diversos factores que predisponen la infección bacteriana, además se han referido que componentes sociales como la raza negra, el bajo nivel educativo y

estrato socioeconómico, tiene un efecto predisponente para la vaginosis bacteriana debido a las condiciones de higiene, vivienda y dificultades de acceso a la atención médica (Rojas J, cols; 2012).

### 3.5.2. Diagnostico

Para su diagnóstico en el laboratorio, el Test de Amsel que incluye el presentar  $pH > 4.5$ , secreción blanca y homogénea, y prueba de aminas positiva y en el frotis se observan células guía. Otro es el método de Nugent, que consiste en la cuantificación de los morfotipos bacterianos en un frotis vaginal, teñido con Gram (Nugent RP, et al; 1991).

De igual manera se han evaluado técnicas de aglutinación en látex para la detección de *Gardnerella vaginalis*, útil para el diagnóstico de la infección, presentando una sensibilidad del 98% y especificidad del 89% (López, A; et al, 2005).

A continuación, se muestran un esquema el cual es utilizado para el diagnóstico de infecciones vaginales, en los centros de atención medica privadas y de atención pública.

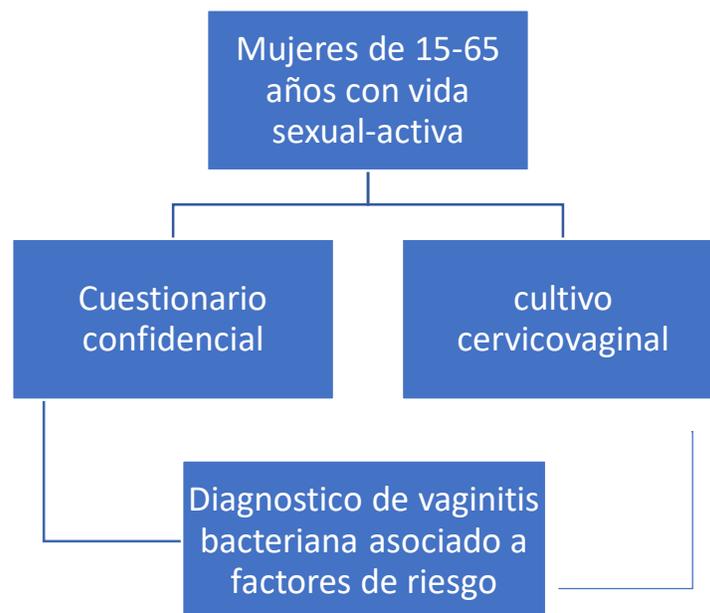


Figura 3.- Diagnóstico de enfermedades vaginales( Gonzalez A, cols; 2004)

### 3.5.3. Microorganismos

Las bacterias anaerobias producen aminopeptidasas que degradan proteínas y descarboxilasas que convierten los aminoácidos en diaminas. Estas últimas contribuyen a la aparición de los signos y síntomas asociados con el síndrome (Thomason JL, et al; 1989).

#### 3.5.3.1. *Neisseria gonorrhoeae*

*Neisseria gonorrhoeae* es un coco Gram negativo, inmóvil, no esporulado, no encapsulado. El microorganismo tiene tendencia a presentarse en pares (diplococos) (Mavroidi A, et al; 2000).

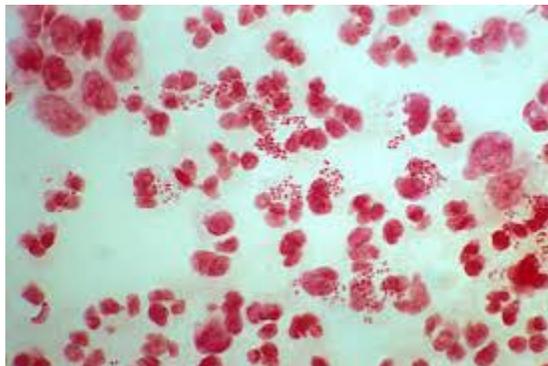


Figura 4.- *Neisseria gonorrhoeae*

Las infecciones urogenitales asintomáticas, se encuentran con mayor frecuencia en mujeres. Si la gonorrea no se trata adecuadamente, puede provocar complicaciones en la reproducción (Unemo M and Shafer W; 2014).

#### 3.5.3.2. *Trichomonas vaginalis*

En 1836 Alfred Donné describió el parásito que hoy se conoce como *Trichomonas vaginalis* como “animalículos” presentes en secreciones genitourinarias humanas. En 1938 se le designó como *T. vaginalis*, debido a la demostración de que la vagina humana es su hábitat normal (Costamagna S and Visciarellin E; 2008).

*Trichomonas vaginalis*, el agente etiológico de la trichomoniasis humana, es un protozoo parásito que infecta el tracto urogenital produciendo la más común de las enfermedades de transmisión sexual (Hernández HM, et al; 2009).



Figura 5.- *Trichomonas vaginalis*

### 3.5.3.3. *Candida albicans*

Hongo dimorfo que forma largas pseudohifas, hifas y blastoconidios (células gemantes subesféricas de 3-8 x 2-7  $\mu\text{m}$ ). Asimilan y fermentan azúcares (Berkhout R; 2002).

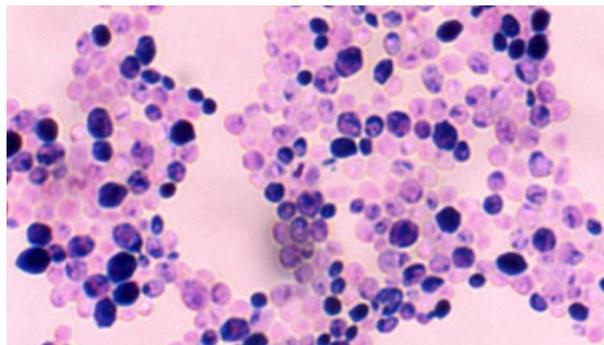


Figura 6.- *Candida albicans*

De los casos de flujo vaginal, la vaginosis bacteriana (VB) suele representar el 50% de los casos y la candidiasis vulvovaginal el 30 a 35% de los casos. Se considera, como la segunda causa de flujo vaginal más frecuente (Ciudad A; 2007).

#### 3.5.4. Prevalencia de infecciones vaginales

La VB es la infección vaginal más prevalente en el mundo, reportándose en frecuencias entre 11% y 48%, siendo la presentación asintomática la forma más común (Tolosa JE, et al; 2006).

Sobel reporta que la prevalencia de VB varía según la población de estudio y la situación geográfica, con rangos que van del 4% en estudiantes universitarios al 33% en las clínicas de transmisión sexual (Sobel JD; 2000).

Se reporta una prevalencia que oscila entre 40% y 50%, seguida por la candidiasis con un 20-25% y trichomoniasis entre 15-20%, el porcentaje restante incluye vaginitis (Domingo A; 2005).

Las mujeres que presentan mayor riesgo para la vaginosis son las adolescentes y las mujeres en edad fértil, sumando al tener múltiples parejas sexuales, uso de duchas vaginales, ausencia de lactobacilos vaginales y el no uso del preservativo (Díez, M. and Díaz, A.; 2011).

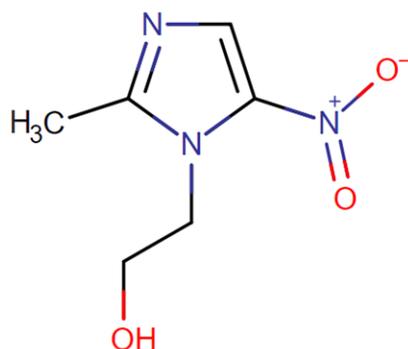
En un estudio realizado en el centro de salud en atención primaria Dr. Jose Castro Villagrana, se realizó un estudio para determinar la prevalencia de casos incidentes en infecciones vaginales, siendo la VB la condición más común, con 318 casos (32.9%), seguida de la candidiasis con 146 (15.08%) (Tabla 3) (Gonzalez A, cols; 2004).

Tabla 3.- Prevalencia de microorganismos aislados de cultivo cervicovaginal (Gonzalez A, cols; 2004)

Prevalencia de microorganismos aislados de cultivo cervicovaginal		
Microorganismo o condición	Número de casos	Porcentaje
Vaginosis bacteriana	318	32.9
<i>Candida albicans</i>	76	7.9
Otras Candida	70	7.2
<i>Ureaplasma urealyticum</i>	33	3.4
<i>Mycoplasma hominis</i>	5	0.5
<i>Streptococcus agalactiae</i>	34	3.5
<i>Escherichia coli</i>	98	10.1
Otras enterobacterias*	14	1.4
<i>Trichomonas vaginalis</i>	4	0.4
* <i>Klebsiella sp.</i> ; <i>Proteus sp.</i>		

### 3.6. Metronidazol

Un nitroimidazol utilizado para tratar la amebiasis; vaginitis; infecciones por tricomonas; giardiasis; bacterias anaerobicas; e infecciones treponémicas. También se ha propuesto como un sensibilizador de radiación para células hipóxicas (Shennan A et al; 2006).



<b>logP</b>	<b>0.7526</b>
<b>pKa</b>	2.57
<b>Solubilidad en agua</b>	10 mg/mL
<b>BSC</b>	Clase I
<b>Unión a proteínas plasmáticas</b>	20%
<b>Vida media</b>	6 – 14 h

Figura 7.- Estructura del Metronidazol ([drugbank.ca/structures/DB00916/image.svg](http://drugbank.ca/structures/DB00916/image.svg))

### 3.6.1. Farmacocinética

El Metronidazol es selectivo para bacterias. El Metronidazol reducido se une covalentemente al ADN, altera su estructura helicoidal, inhibe la síntesis de ácidos nucleicos bacterianos y da como resultado la muerte celular bacteriana.

Se absorbe bien (al menos 80%) con las concentraciones plasmáticas máximas alcanzadas en 1-3 horas después de la administración de dosis terapéuticas de formulación de liberación inmediata. Menos del 20% se une a proteínas plasmáticas. Sufre un metabolismo hepático por hidroxilación, oxidación y glucuronidación (Shennan A, et al; 2006).

### 3.6.2. Dosis e indicaciones terapéuticas

Las indicaciones aprobadas incluyen el tratamiento de tricomoniasis, vaginitis y uretritis causada por *Gardnerella vaginalis*, giardiasis, amebiasis e infecciones causadas por bacterias anaeróbicas, que comprenden las infecciones ginecológicas. Según la indicación, el régimen de dosificación puede variar de 250 mg tres veces al día durante 7 días a 750 mg tres veces al día durante 10 días. También se pueden utilizar dosis únicas de 2 g. Las dosis diarias pueden ser tan altas como 2,5 g (Rediguieri CF, et al; 2011).

## 3.7. Propiedades químicas

### 3.7.1. Solubilidad

La solubilidad del Metronidazol en agua es de 10 mg/mL a 20 °C y 10.5 mg/mL a 25 °C. La solubilidad a temperatura ambiente es de 64.8 mg/mL y pH 1.2, disminuyendo a alrededor de 10 mg/mL a valores de pH entre 2.5 y 8.0 (Rediguieri CF, et al; 2011).

A 25 °C, el valor de log P es de 0.7526 en n-octanol/agua. El Metronidazol es un compuesto básico débil con un valor de pKa de 2.62 (Rediguieri CF, et al; 2011).

### 3.7.2. Absorción y Permeabilidad

El Metronidazol se absorbe rápidamente con una biodisponibilidad (BA) superior al 90%. Este se transporta de forma pasiva a través de las células de los mamíferos (Simms-Cendan JS; 1996).

### 3.7.3. Distribución, metabolismo y eliminación

Menos del 20% del Metronidazol circulante está unido a las proteínas plasmáticas. El volumen de distribución oscila entre 0.51 y 1.1 L/kg. El Metronidazol se metaboliza en el hígado por la cadena lateral, produciendo 1-( $\beta$ -hidroxietil)-2-hidroximetil-5-nitroimidazol (aproximadamente 30%-65% de la actividad del Metronidazol). La principal vía de eliminación del Metronidazol y sus metabolitos es a través de la orina. La vida media de eliminación del compuesto original varía de 6 a 14 h (Rediduieri CF, et al; 2011).

## 3.8. Películas mucoadhesivas

Entre las rutas de administración de fármaco las membranas del organismo como mucosa oral, nasal, vaginal, se han identificado como un sitio potencial para la absorción de fármacos. Las películas tienen un enfoque prometedor y exitoso para la entrega eficaz del fármaco, además de poseer una buena ventaja para el cumplimiento del tratamiento (Salamat N, et al; 2005).

Normalmente, las películas mucoadhesivas son de tamaño pequeño, fabricadas usando polímeros con propiedades mucoadhesivas, cargado con el principio farmacéutico activo (Dixit R and Puthli S; 2009).

La mayor ventaja que puede ofrecer este tipo de formulaciones es que puede aplicarse a pacientes que no posea movimientos propios. Por otra parte, proporcionan largo tiempo de residencia (Salamat N, et al; 2005).

### 3.9. Sistemas de liberación mucoadhesivos

Según los diversos mecanismos, los polímeros con propiedades de mucoadhesión prometedoras son aquellos que tienen un alto número de grupos funcionales, por ejemplo, grupos hidroxilo o grupos carboxilatos. El peso molecular no debe ser tan alto para perjudicar la hidratación y el entrelazamiento de la cadena con las mucinas, pero no debe ser tan bajo como para dar una mala cohesión. La flexibilidad es importante para mejorar la interpenetración con el moco. Los grupos ionizables pueden ayudar a la mucoadhesión si son capaces de determinar las interacciones electrostáticas en el entorno vaginal con los restos aniónicos de las mucinas (Smart JD; 2005).

#### 3.9.1. Absorción del fármaco a través de la mucosa vaginal

La absorción del fármaco a través de la vagina puede verse afectada por variaciones en el grosor epitelial y por cambios en la composición del medio vaginal que se producen como consecuencia de condiciones fisiológicas. Además, las fugas y la acción de autolimpieza del tracto vaginal pueden reducir la biodisponibilidad del fármaco (Hussain A and Ahsan F; 2005). Las desventajas generales de la administración vaginal de medicamentos incluyen su evidente especificidad de género, sus limitaciones culturales y su interferencia en la higiene personal (Vermani K and Garg S; 2000).

### 3.10. Bioadhesión y mucoadhesión

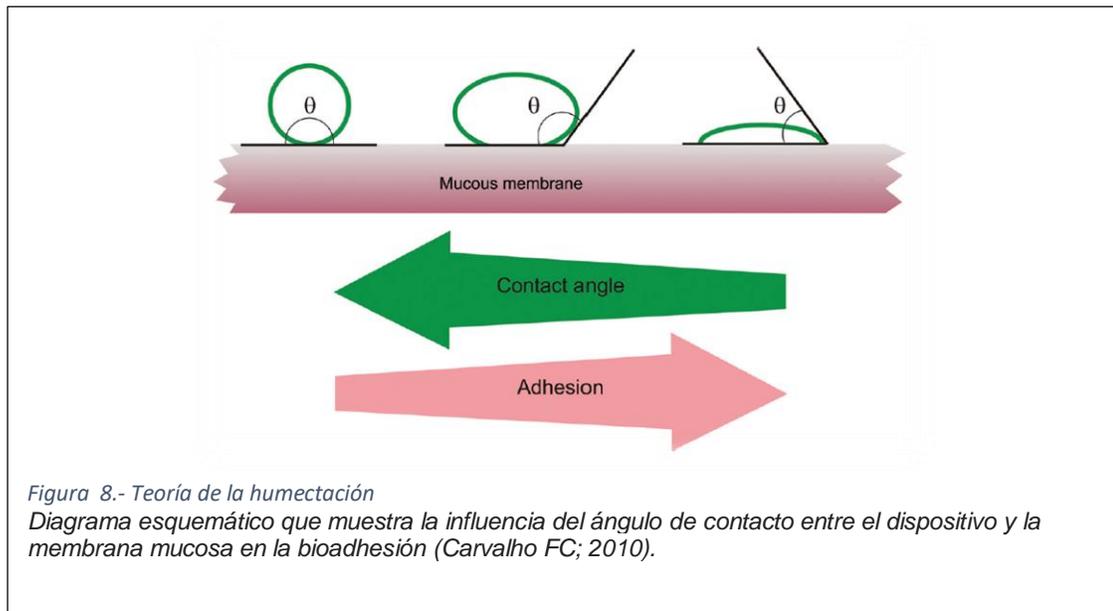
La bioadhesión se puede definir como el estado en el que dos materiales, al menos uno de los cuales es de naturaleza biológica, se mantiene unido por fuerzas interfaciales. La superficie biológica puede ser tejido epitelial o capa mucosa en la superficie de un tejido. Si la unión del adhesivo es a una capa mucosa, el fenómeno se denomina mucoadhesión (Roy SK and Prabhakar B; 2010).

### 3.11. Teorías de la mucoadhesión

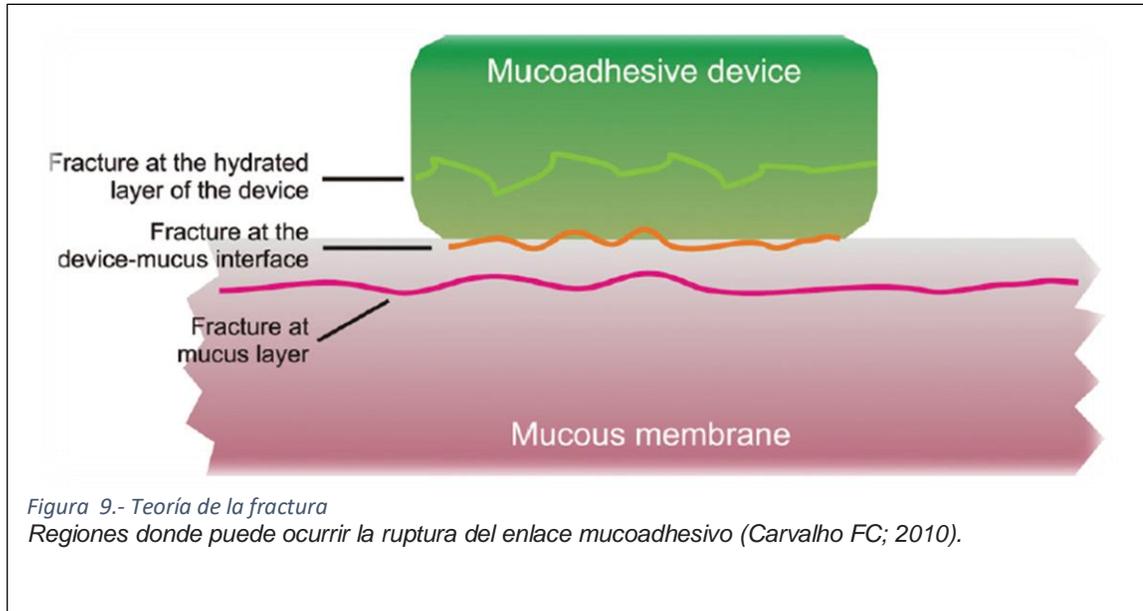
**Teoría electrónica:** según esta teoría, la transferencia de electrones ocurre al contacto de un polímero adhesivo con una glicoproteína mucosa debido a la diferencia en su estructura electrónica. Esto resulta en la formación de doble capa eléctrica en la interfaz (Vallejo-Díaz BM and Perilla JE; 2008).

**Teoría de adsorción:** Después de un contacto inicial entre dos superficies, el material se adhiere debido a las fuerzas de superficie que actúan entre los átomos en las dos superficies, fuerzas débiles como puentes de hidrogeno y del tipo Van der Waals (Vallejo-Díaz BM and Perilla JE; 2008).

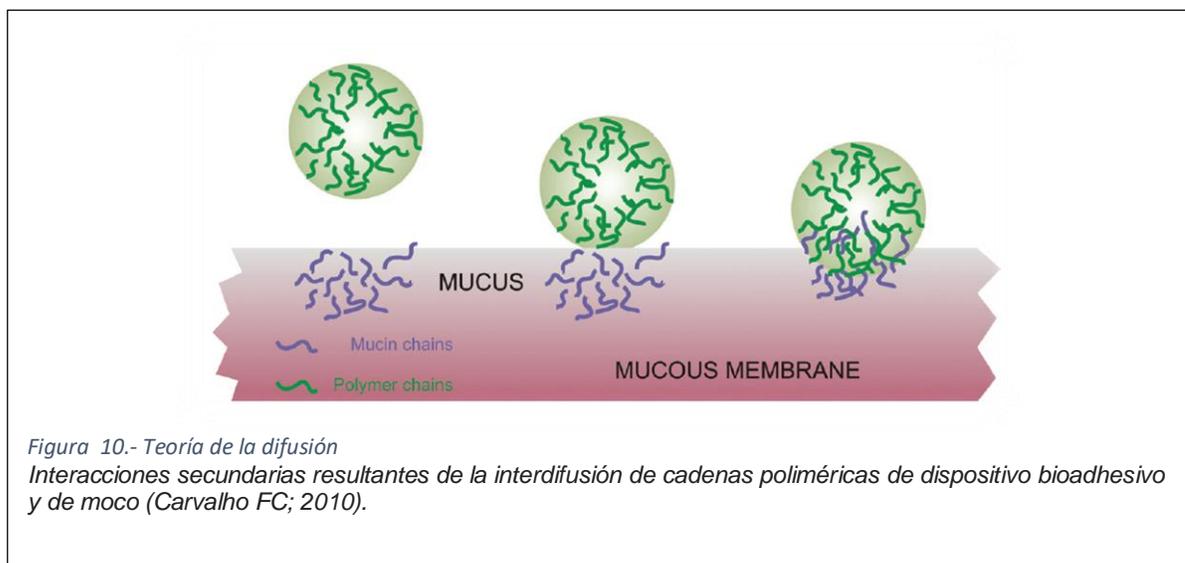
**Teoría de humectación:** Predominantemente aplicable a sistemas bioadhesivos líquidos. El trabajo termodinámico de la adhesión es una función de la tensión superficial de la superficie en contacto, así como tensión interfacial. La energía interfacial es responsable del contacto entre las dos superficies y la fuerza del adhesivo (Vallejo-Díaz BM and Perilla JE; 2008).



**Teoría de la fractura:** Intenta relacionar la dificultad de separación de dos superficies después de la adhesión, es la fuerza que se requiere para separar ambas superficies (Vallejo-Díaz BM and Perilla JE; 2008).



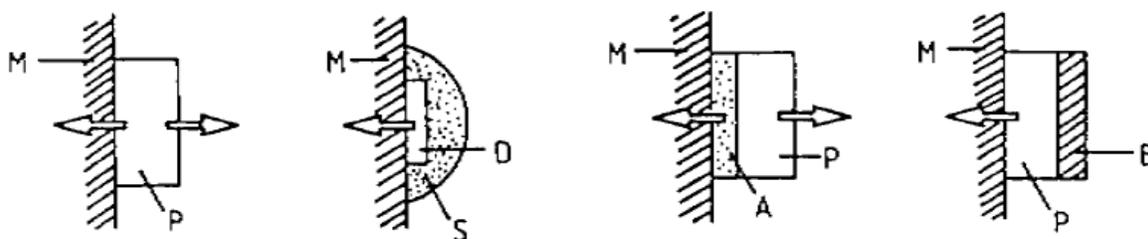
**Teoría de difusión:** Las cadenas de polímero y la mezcla de moco a una profundidad suficiente para crear una unión adhesiva semipermanente (Roy SK and Prabhakar B; 2010).



**Teoría mecánica:** Es una de las primeras teorías planteadas para explicar el comportamiento adhesivo de materiales. En ella se establece que el fenómeno se debe al anclaje del adhesivo en los poros y oquedades superficiales del sustrato, que proveen un aumento de área superficial y al endurecerse se fijan a múltiples sitios de anclaje (Vallejo-Díaz BM and Perilla JE; 2008).

### 3.12. Sistema de liberación de las películas

La tecnología de las películas y su diseño está vinculado a la tecnología de los polímeros. El sistema puede estar concebido de modo que el fármaco que se va liberando sea simultáneamente absorbido a través de la mucosa. Este tipo, denominado sistema de liberación unidireccional o bidireccional, libera el producto activo ya sea hacia la zona de mucosa a la que este adherida consiguiendo así una actividad sistémica o bien permiten la liberación del fármaco en dos sentidos, es decir, hacia la zona mucosa ocupada por el bioadhesivo y en dirección opuesta, permitiendo una acción localizada (Rodríguez IC, et al; 2000).



Esquema de cuatro tipos de parches adhesivos para liberación. M, mucosa. P, polímero con péptido. D, depósito de fármaco. S, protector adhesivo. A, capa adhesiva. B, capa impermeable de refuerzo (Rodríguez IC, et al; 2000)

### 3.13. Métodos de fabricación de películas

En la literatura se distinguen dos formas de fabricación de películas mucoadhesivas, fusión-extrusión y moldeo, cada una con diferentes herramientas utilizadas, así como también el uso de técnicas y aparatos diferentes, con el objetivo de fabricar una película apta para el mercado.

### 3.9.1 Fusión-extrusión

En la extrusión por fusión en caliente, una mezcla de ingredientes farmacéuticos se funde y luego se fuerza a través de un orificio (la matriz) para producir un material más homogéneo (Mollan M, et al; 2003).

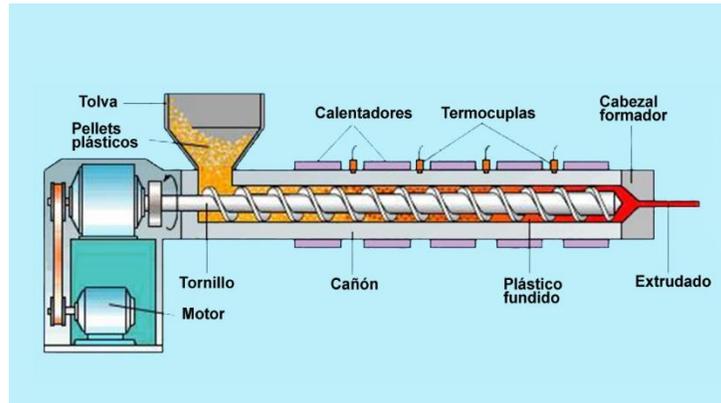


Figura 11.- Proceso de fabricación por fusión-extrusión

La extrusión por fusión en caliente se ha utilizado para la fabricación de matrices de liberación (Repka MA, et al; 2007), así como para películas que se disgregan por vía oral (Cilurzo F, et al; 2008).

### 3.9.2. Moldeado

El proceso consiste en varios pasos: preparación de la solución de moldeo, transferencia del volumen apropiado de solución a un molde, secado de la solución de moldeo, corte de la forma de dosificación para contener la cantidad deseada de fármaco y finalmente el envasado. Durante la preparación de las películas, se le da principal importancia a las propiedades reológicas de la solución o suspensión, las burbujas de aire atrapado, uniformidad de contenido y los disolventes residuales en la forma de dosificación (Morales JO and McConville JT; 2011).

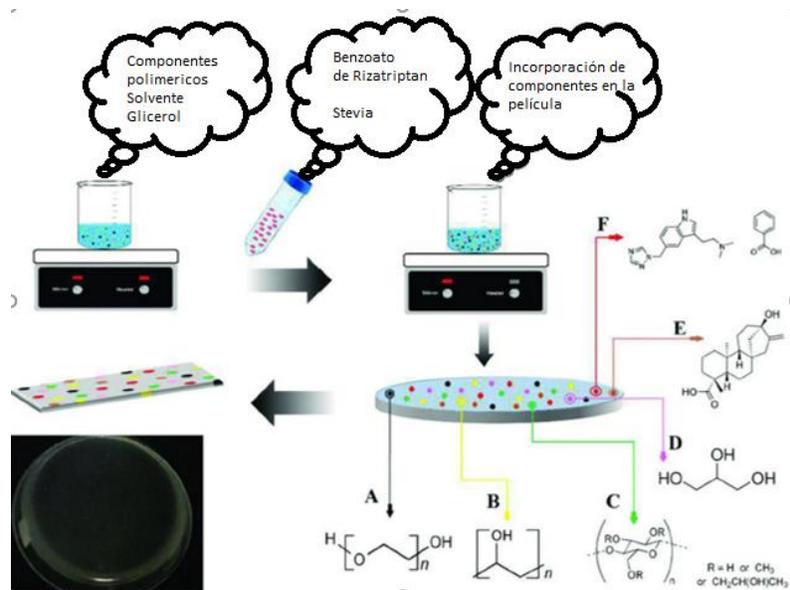


Figura 12.- Proceso de fabricación por moldeo

### 3.9.2.1. Ventajas

El método de moldeo, es sin duda, el proceso de fabricación más ampliamente utilizado para la fabricación de películas que se encuentra en la literatura. Esto se debe principalmente a la facilidad del proceso y el bajo costo que se incurre en la configuración del sistema a escala en un laboratorio de investigación (Morales JO and McConville JT; 2011).

### 3.14. Propiedades de películas mucoadhesivas

Los protocolos de evaluación para la administración de películas son muy similares a otras formas farmacéuticas tales como las películas transdermicas, espesor, variación de peso, resistencia, flexibilidad, absorción de agua, morfología de la superficie, contenido de humedad, entre otras deben ser evaluados para la preparación de películas (ASTM, 2001).

#### 3.14.1. Espesor y peso

El espesor de las películas es una propiedad que normalmente se mide usando un micrómetro digital bien calibrado o por imágenes SEM. De hecho, la medición del

espesor en la película es esencial para determinar la uniformidad de la película, ya que está directamente relacionado con la precisión de la dosis en la película. Por otra parte, el espesor es una característica necesaria para proporcionar bioadhesión adecuada. Además, la elección del polímero en la fabricación de las películas es un punto crítico, ya que ciertos polímeros que aumentan el espesor de las películas y por lo tanto poseen mejor adhesión (Prabhushanka GL, et al; 2010).

Tabla 4.- Clasificación cualitativa de la capacidad adhesiva de polímeros bioadhesivos (Rodríguez IC, et al; 2000).

<b>BUENO O EXCELNTE</b>	<b>Ácido poliacrílico</b> <b>Alginato sódico</b> <b>Carbopol e Hidroxipropilmetilcelulosa</b> <b>Carbopol 934 y EX 55</b> <b>Carboximetilcelulosa sódica</b> <b>Carragenato</b> <b>Goma guar</b> <b>Hidroxietilcelulosa</b> <b>Homopolímeros y copolímeros de butilacrilato</b> <b>Metilcelulosa 10 cPs</b> <b>Poliacrilamida</b> <b>Policarbofil</b> <b>Tragacanto</b>
<b>MEDIANO</b>	<b>Ácido poliacrílico reticulado con sacarosa</b> <b>Ácido polimetacrílico</b> <b>Carbopol base con vaselina/parafina hidrofílica</b> <b>Goma de karaya</b> <b>Hidroxipropilcelulosa</b> <b>Gelatina</b>
<b>POBRE</b>	<b>Acacia</b> <b>Ácido algínico</b> <b>Agar-agar</b> <b>Amilopectina</b> <b>Carboximetilcelulosa cálcica</b> <b>Polihidroxietilmetacrilato (PHEMA)</b> <b>Metilcelulosa, mayor de 100 cPs</b> <b>Pectina</b> <b>Polietilenglicol</b> <b>Polivinilpirrolidona</b> <b>Carragenato degradado</b> <b>Dextranos</b>

Algo que puede interferir en el espesor de la película, de igual manera puede ser la incorporación del plastificante en la formulación. En general una película debe exhibir un espesor de entre 50 y 1000 micrómetros (Cilurzo F, et al; 2008).

Al momento de la fabricación la variación de peso se mide de forma individual en cada una de las películas y se calculan los pesos promedios. Una gran variación indica una diferencia en el método de fabricación empleado de las películas y es probable que tenga un contenido no uniforme de fármaco (Cao N, et al; 2009).

### 3.14.2. Resistencia a la tracción y a la porosidad

Las propiedades tecnológicas de los materiales son importantes en la integridad física de la forma de dosificación. La tracción se determina como la medición de la fuerza de la película o fuerza de desgarre. La película se estira hasta que se rasga y la tensión necesaria representa la resistencia a la tracción (Felton L, et al; 2008).

Se ha observado que la resistencia a la tracción de las películas varía con el plastificante, lo que sugiere que la elección del plastificante es importante para obtener la resistencia a la tracción requerida (Hyppola R, et al; 1996).

Estas propiedades, resistencia al desgarre y la porosidad depende de la naturaleza del polímero, el tipo, contenido y composición de la película. Boateng et al; prepararon películas de alginato de sodio y carboximetilcelulosa de sodio y se evaluó la resistencia al desgarre y la porosidad utilizando analizador de textura y SEM, respectivamente. Se observó que la resistencia al desgarre aumenta con el aumento de la concentración del polímero. Además, la forma de los poros en la película varía con los polímeros, como se observó en el caso de la película con alginato de sodio (poros alargados) y carboximetilcelulosa de sodio (poros esféricos) (figura 13) (Boateng JS, et al; 2010).

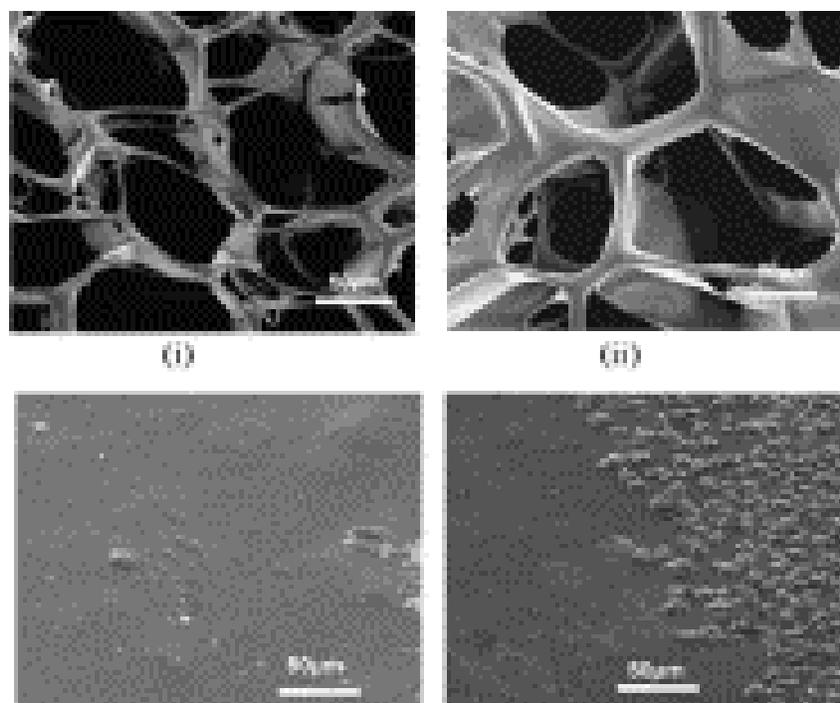


Figura 13.- Microscopía de poros de alginato de sodio (i) y carboximetilcelulosa (ii) (Boateng JS, et al; 2010)

### 3.14.3. Módulo de Young

El módulo elástico o módulo de Young es la medida de la rigidez de las películas. Los métodos utilizados para la medición de la resistencia a la tracción se podrían utilizar para medir este valor. Este mide la resistencia a la deformación y se puede observar mediante el trazado de la curva tensión-deformación en el que la pendiente mide el módulo (Yan W, et al; 2009).

### 3.14.4. Porcentaje de alargamiento

La elongación es una especie de deformación. Se trata de un simple cambio en la forma que sufre cuando está bajo estrés. Que puede ser medido usando un analizador de textura. En otras palabras, cuando una película se pone bajo tensión de tracción, la película se deforma (Dixit R and Puthli S; 2009).

Cuando el estrés se aplica a una película, esta se desarrolla y la longitud de la película aumenta, con el aumento de la cantidad de tensión aplicada. El punto en el que la película se rompe después de sufrir un aumento en la longitud se denomina como porcentaje de rotura de alargamiento (Fulzele S, et al; 2002).

### 3.14.5. Capacidad de absorción de agua

Tras la aplicación de la película en la mucosa, una secuencia de procesos tales como la difusión de moléculas de agua en el polímero, la hidratación, el hinchamiento y la erosión de los polímeros se produce. La difusión de agua en la matriz produce una capa delgada de disolución en la superficie de la matriz. Como se produce la hidratación de la matriz, el fármaco difunde hacia afuera de la matriz. Cuanto mayor es la penetración de medios acuosos en la matriz, más será el fármaco que se mueva hacia afuera de la matriz (Viridén, A; et al, 2009). Sin embargo, el comportamiento de hinchamiento de una película es dependiente altamente de su estructura y de la composición (Senel S, et al; 2000).

### 3.14.6. Grado de hidratación

El grado de hidratación de la película polimérica es importante ya que esta aliada a la fuerza del mucoadhesivo. La hidratación del polímero es esencial para la relajación y la interpenetración de cadenas de polímeros, pero, el exceso de hidratación conduce generalmente a una disminución de mucoadhesión (Mortazavi SA and Smart J; 1993).

Las propiedades de hinchamiento de las películas se determinan generalmente mediante la evaluación del porcentaje de hidratación. Piezas de películas se pesan inicialmente ( $W_1$ ) y se sumergen en solución simulada durante un tiempo determinado, se sacan y se limpian para eliminar el exceso de agua superficial y se pesan ( $W_2$ ), y se calculan como (Peh KK and Wong CF; 1999):

$$\text{Porcentaje de hinchamiento} = (W_2 - W_1) * 100 / W_1$$

### 3.14.7. Cristalinidad de las películas

La forma física (cristalino o amorfo) de la molécula de fármaco dentro de la película se puede determinar fácilmente por análisis cristalográfico con rayos X utilizando un

difractómetro de rayos X, la forma cristalina puede afectar la formación de la matriz además del sistema de liberación de la película (Llabot JM, et al; 2007).

### 3.14.8. Mucoadhesivos en el mercado

Tabla 5.- Películas en el mercado

Nombre comercial	Fármaco	Vía de administración	Enfermedad tratada
<b>VCF</b>	Nonoxynol-9	Vaginal	Anticonceptivo
<b>Ondalenz</b>	Ondansetron	Oral	Antiemético
<b>Nerhasilda</b>	Sildenafil	oral	Disfunción eréctil
<b>Tusheel</b>	Extracto de hojas de hiedra	Oral	Tos productiva



Figura 14.- Ejemplos de mucoadhesivo en el mercado

#### 4. JUSTIFICACION

A pesar de los avances constantes, tanto en la tecnología farmacéutica como en los diversos tratamientos dirigidos a las infecciones vaginales, éstas enfermedades poseen una gran prevalencia de incidencia a nivel mundial y nacional (Flores-Paz R, cols; 2003), al año son reportados millones de casos en todo el mundo de mujeres que acuden a atención médica por infecciones vaginales, esto se debe a diversos factores, principalmente el económico, social y educativo, se sabe que la principal herramienta para evitar estos casos, básicamente se enfocan en dar la información pertinente a los diferentes sectores de la población, para que estas posean el conocimiento necesario para evitar la enfermedad de forma recurrente.

En los últimos años, se han realizado innovaciones basadas en la fabricación de nuevas formas farmacéuticas las cuales posean una mejor actividad contra enfermedades.

Para que el efecto terapéutico sea el deseado en el sitio de acción, es vital que la formulación tenga un tiempo de residencia prolongado, además de controlar el régimen de dosificación. Existen una gran variedad de formas de dosificaciones vaginales en el mercado, que van desde cremas, óvulos, pomadas, espumas, aerosoles, comprimidos, capsulas, etc., estas formulaciones tienden a ser desordenadas en la liberación además de poseer un tiempo pobre de residencia en el sitio de acción, lo que lleva a un mal cumplimiento y pérdida de la terapia. Por lo cual en los últimos años se ha buscado una terapia a base de formulaciones con propiedades mucoadhesivas (Bassi and Kaur G; 2015). Se han realizado estudios, los cuales están dirigidos al estudio de polímeros, los cuales, pueden ser de gran ayuda en la terapia que se ofrece diariamente en el tratamiento de las infecciones vaginales. Se ha estudiado la capacidad de estos polímeros de formar matrices poliméricas, los cuales son capaces de envolver o encapsular el fármaco, y a través de su capacidad de mucoadhesión, liberar el fármaco de forma controlada y eficiente, a través de sus características físicas y mecánicas propias del polímero.

## 5. HIPÓTESIS

Es posible fabricar una película mucoadhesiva vaginal con el fármaco Metronidazol como principio activo, mediante la combinación de polímeros como HPMC K15M y lustreclear (carragenina y celulosa micronizada), mediante la optimización del mucoadhesivo en base a las características físicas y mecánicas idóneas, los cuales proveerán una combinación de propiedades tecnológicas individuales, que en conjunto serán ideales para esta forma de dosificación, utilizando al Metronidazol como fármaco eficaz para el tratamiento de infecciones vaginales.

## 6. OBJETIVO GENERAL

- Desarrollar una película mucoadhesiva vaginal con un alto contenido de fármaco (Metronidazol) utilizando una combinación de polímeros (HPMC K15M y lustreclear).

## 7. OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Diseñar una película mucoadhesiva vaginal con un fármaco antimicrobiano (METRONIDAZOL).
- Determinar la interacción fármaco-polímero en la película mucoadhesiva, mediante la espectroscopia Raman.
- Validar un método analítico para la cuantificación de fármaco en las películas mucoadhesivas.
- Evaluar las características físicas de las películas mucoadhesivas vaginales (espesor, resistencia al plegado, % de hinchamiento, tiempo de desintegración de la película, tiempo de disolución de la película, fuerza de adhesión, contenido de fármaco).
- Realizar la optimización de la película mucoadhesiva a través del programa estadístico Statgraphics, en base a las propiedades idóneas que sean seleccionadas de acuerdo a los criterios físicos que se han decidido analizar.
- Evaluar las características de la película formulada a partir de la optimización (espesor, %hinchamiento, tiempo de desintegración de la película, tiempo de disolución de la película, contenido de fármaco, fuerza de adhesión, fuerza de mucoadhesión).
- Realizar pruebas de liberación *in vitro* de las películas optimizadas.
- Utilizar la microscopia de contraste de fases para observar los cambios que ocurren en la película durante un mes.
- Monitorear mediante un estudio fotográfico y mediciones en espectroscopia Raman el cambio de las películas durante un mes.
- Evaluar las películas mediante pruebas microbiológicas en cepas de *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida tropicalis*.

## 8. MATERIALES

### 8.1 Equipos

- Balanza analítica Ohaus Modelo: E21140
- Espectrofotómetro UV-Vis AGILENT TECHNOLOGIES Modelo: CARY 60/G6860 A
- Termoagitador magnético (parrilla) IKA Modelo: C-MAG HS 7
- Potenciómetro Jenco Modelo: pH6175
- Parrilla de agitación múltiple H+P Labortechnik GmbH Modelo: Variomag Multipoint HP 15
- Estufa de temperatura, Marca: Precisión, Modelo: Oven model 130M
- Espectrómetro Raman Ahura Scientific Modelo: Tru Scan
- Microscopio de Epifluorescencia Zeiss Axioskop

### 8.2. Materias primas

- HPMC K15M: HERCULES, LOTE VK-08156
- Metronidazol
- Sorbitol: Mexicana S.A. DE C.V.
- Glicerina: TREZA
- Lustreclear
- Etanol
- Ácido clorhídrico: REASOL-37%
- Agua destilada

## 9. METODOLOGÍA

### 9.6. Selección de materiales Poliméricos

A través de la búsqueda bibliográfica que se han realizado a lo largo de los años, se ha determinado los polímeros ideales para la elaboración de las películas mucoadhesivas.

Se investigaron sus propiedades fisicoquímicas, la forma de fabricación y las condiciones a mantener para su utilización, HPMC K15M, lustreclear, carbopol, alcohol polivinílico, quitosán, fueron algunos polímeros probados, la selección final se realizó con base a las pruebas de solubilidad y las ventajas que se indicaban en la bibliografía acerca de la utilización de estos materiales.

Las concentraciones que se decidieron utilizar, fueron seleccionadas en base a las películas ya reportadas en la literatura, además de pruebas realizadas para observar la formación de las películas.

### 9.7. Selección de disolventes para la fabricación de películas

Se probaron una variedad de disolventes para de esta manera determinar cuál es la mejor opción en la fabricación de las películas. Se probó HCl 1M, ácido acético, etanol, metanol, dimetil sulfoxido, estas disolventes fueron utilizados para observar la solubilidad del fármaco (Metronidazol) y los polímeros seleccionados (HPMC K15M y lustreclear).

### 9.8. Elaboración de películas mucoadhesivas

Para la fabricación de las películas mucoadhesivas se utilizó HPMC K15M el cual funciona como polímero formador de la matriz polimérica, lustreclear como polímero mucoadhesivo, además se incorporó sorbitol en polvo como plastificante y glicerina como co-plastificante, además este añade propiedades para poder solubilizar el Metronidazol.

Se utilizó el método de moldeo para fabricar las películas, donde se pesó HPMC K15M según lo indico el diseño de experimentos, se colocó en un vaso de

precipitado, adicionando 20 mL de agua destilada, en agitación constante, al paso de 1 h se observó la solubilidad del polímero (formación de solución transparente), a continuación se procede a la adición de Lustreclear y se deja en agitación constante durante 1 h más, hasta conseguir una homogeneización de los polímeros, después de las dos horas en homogeneización de los polímeros, en un vaso de precipitado diferente, se colocó la cantidad de Sorbitol y glicerina adecuado, además de la incorporación del fármaco, que durante todo el proceso se mantuvo en 300 mg, adicionando 12.5 mL de etanol y 2.5 mL de HCl 0.1 M para solubilizar el fármaco y evitar la cristalización de este al momento del proceso de secado. Esta solución fue incorporada a la mezcla de polímeros que se encontraba homogénea, y se dejó en agitación constante durante 30 minutos, una vez transcurrido el tiempo se llevó a una sonicación constante durante 30 minutos y al término de este tiempo, la solución polimérica obtenida se virtió sobre una caja Petri de 9 cm de diámetro y se dejó secar a una temperatura controlada de  $40 \pm 2$  °C en la estufa durante 20 h.

### 9.9. Diseño exploratorio

En base a los conocimientos teóricos respecto al diseño de experimentos y respecto a cada uno de los materiales a utilizar, se decidió utilizar un diseño exploratorio  $2^3 + 1$  punto central, donde los factores a evaluar son el HPMC K15 M, el Lustreclear y el Sorbitol, utilizando el programa estadístico Statgraphics.

### 9.10. Caracterización de las películas mucoadhesivas

Cabe destacar que cada una de las evaluaciones realizadas se llevaron a cabo a temperatura ambiente, utilizando un buffer de fosfatos pH 4.5.

### 9.11. Espesor y la resistencia al plegado

Para determinar el espesor de cada una de las películas elaboradas, se utilizó un vernier digital. La película fue cortada en segmentos de 2 x 2 cm, y se midieron aleatoriamente 3 segmentos, obteniendo como valor final el promedio de estos tres. De la misma manera se eligió de forma aleatoria un segmento de 2 x 2 cm, para la evaluación de la resistencia al plegado, la película se dobló a la mitad de forma

sucesiva en la misma zona, se decidió considerar un mínimo de 300 dobleces como una buena resistencia como lo indican estudios ya realizados de la misma índole (Bassi P and Kaur G; 2015).



Figura 15.- Vernier digital

## 9.12. Porcentaje de hinchamiento

El % de hinchamiento se determinó utilizando un segmento de 2 x 2 cm de la película elaborada, obteniendo un peso inicial del segmento de película y posteriormente sumergiendo este en 10 mL de buffer de fosfatos pH 4.5 durante 10 s, al paso de este tiempo la película se retiró de la solución y se pesó nuevamente. El % de hinchamiento se determinó mediante la siguiente ecuación:

$$\text{Porcentaje Hinchamiento} = \left( \frac{W_f - W_o}{W_o} \right) * 100$$

\* $W_f$ : Peso final

\* $W_o$ : Peso inicial

## 9.13. Tiempo de desintegración y tiempo de disolución de la película

Para medir estas dos variables se eligió un segmento de 2 x 2 cm de la película elaborada, de forma aleatoria, colocándose en 20 mL de solución de buffer de fosfatos pH 4.5 a 100 RPM. La película fue colocada y se tomó el tiempo con el

cronometro, considerándose como tiempo de desintegración el tiempo en el cual la película se empieza a deformar (romper), y se tomó como tiempo de disolución el tiempo en el cual la película ya no se observa en la solución debido a que se disolvió por completo en la solución (Salehi S and Boddohi S; 2017).

#### 9.14. Fuerza de adhesión

Para determinar la fuerza de adhesión de las películas elaboradas, se cortaron segmentos de 2 x 2 cm de las diferentes películas, y se seleccionaron de forma aleatoria para la prueba.

Para esta prueba se adaptó un equipo en el laboratorio, utilizando un sensor de fuerza (Dual-Range Force Sensor) enlazado a un taladro de baja velocidad (Black+Decker 9.6V) que a su vez se encontraba conectado a un equipo encargado de registrar la fuerza (VernierLabPro) y en conjunto con un programa computacional (Logger Pro 3.5.0), arrojan la lectura de fuerza de la película. Se colocó el segmento de 2 x 2 cm de la película, sujetándose de una pinza, que estaba conectada mediante una cuerda al taladro y posteriormente al sensor de fuerza. La película se mojó ligeramente con buffer de fosfatos pH 4.5, y se adhirió a un portaobjetos, presionando la unión por 10 s, posteriormente se hizo rotar el taladro de forma muy lenta, hasta conseguir desprender la película del vidrio, observando que el programa computacional había detectado la lectura de fuerza requerida para desprender la película.

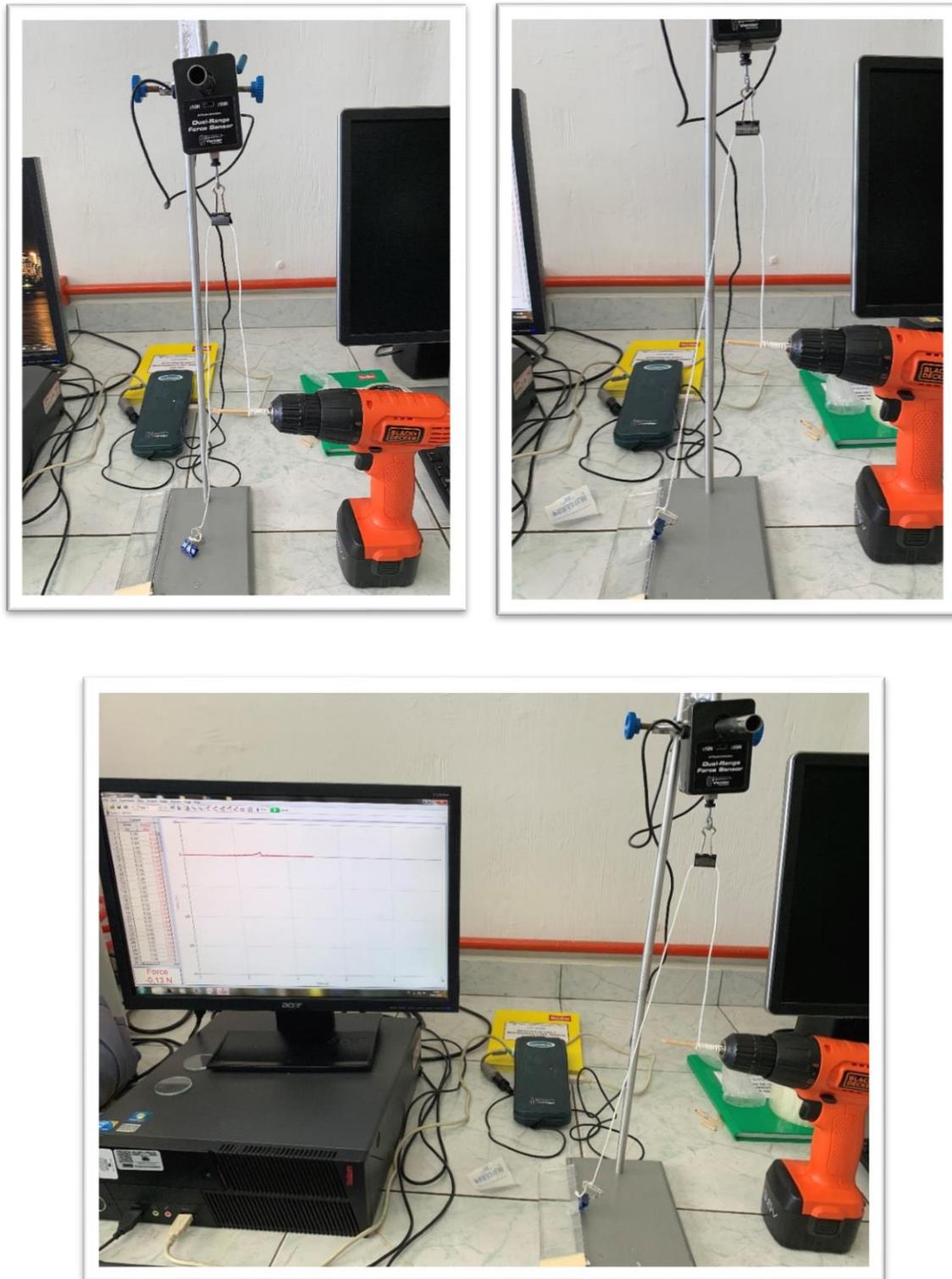


Figura 16.- Montaje para la medición de la fuerza de adhesión

### 9.15. Contenido de fármaco en la película

Para determinar el contenido de fármaco en las películas elaboradas, se procedió a cortar segmentos de películas de 2 x 2 cm, posteriormente se colocó la película seleccionada de forma aleatoria, en un vaso de precipitado con 50 mL de buffer de fosfatos pH 4.5, se agito de forma constante hasta disolver por completa la película, una vez logrado esto se procedió a tomar una alícuota de la solución del vaso de precipitado y colocarlo en un matraz volumétrico de 10 mL aforando este con el mismo buffer de fosfatos. Una vez en el matraz se midió en el UV, para obtener la absorbancia que posteriormente ayudaría a determinar el contenido de fármaco en el segmento de 2 x 2 cm de la película, y también en el área total de la película formada en la caja Petri. También se hizo una cuantificación del fármaco que se retenía en las paredes del vaso de precipitado donde se elaboraban las películas mucoadhesivas.

Tabla 6.- Fármaco recuperado de los vasos de precipitado de las formulaciones

	<b>Abs</b>	<b>Concentración mg/mL</b>	<b>Contenido total</b>
<b>x1</b>	0.4558	0.834814815	41.74
<b>x2</b>	0.3744	0.684074074	34.20
<b>x3</b>	0.298	0.542592593	27.12
<b>Media:</b>			<b>34.35</b>
<b>Des Est:</b>			<b>7.30</b>

### 9.16. Compatibilidad Fármaco-Excipiente

En el momento en que se fabrica una nueva formulación farmacéutica se tienen que valorar diferentes aspectos para comprobar la seguridad y eficacia de la forma farmacéutica. Uno de los aspectos a considerar es la interacción que pueda sufrir el fármaco al momento de interrelacionarse con los diferentes excipientes que se puedan utilizar en la formulación. Más adelante en los resultados se muestra las lecturas realizadas mediante el equipo Raman a la combinación 1:1 de fármaco y

excipientes, manteniendo un estrés de temperatura de  $40 \pm 2$  °C, durante el lapso de 1 mes.

## 9.17. Validación del método analítico por UV para cuantificar Metronidazol

### 9.17.1. Preparación de la solución stock

Se pesaron 10 mg de Metronidazol y se colocaron en un matraz volumétrico de 10 mL aforando con solución amortiguadora de fosfatos pH 4.5 para tener un stock de 10 mg/mL. De la solución anterior se tomaron 250  $\mu$ L y se colocó a un matraz volumétrico de 10 mL, aforando con solución amortiguadora de fosfatos pH 4.5, para obtener una concentración de 25  $\mu$ g/mL. Esta solución fue leída con un barrido en el espectrofotómetro UV-Vis Cary 60, entre 200 a 400 nm de longitud de onda, utilizando solución amortiguadora de fosfatos como blanco (García MA, et al; 2002).

### 9.17.2. Linealidad

Para esta prueba se prepararon 5 niveles de concentraciones diferentes a partir de un stock de fármaco de 10 mg/mL; las concentraciones evaluadas fueron 5, 10, 15, 20 y 25  $\mu$ g/mL como se observa en la siguiente tabla. La siguiente tabla describe las diluciones realizadas para obtener la curva de cuantificación. Las curvas se prepararon por triplicado. Se obtuvo la absorbancia de las diferentes soluciones a 321 nm en el espectrofotómetro UV y los datos obtenidos se analizaron por regresión lineal. Se calculó el coeficiente de determinación ( $r^2$ ), la pendiente, el intercepto, la desviación estándar (DE) y el coeficiente de variación (CV) y los intervalos de confianza para los parámetros.

Tabla 7.- Niveles de concentración para establecer la linealidad del método analítico

Niveles	Concentración de la solución stock (µg/mL)	Solución amortiguadora de fosfatos pH 4.5	Concentración final en µg/mL
1	10 mg/mL	Aforo a 10 mL	5
2			10
3			15
4			20
5			25

### 9.17.3. Exactitud

La exactitud se determinó por medio del porcentaje de recobro del analito (Metronidazol), como la relación entre el valor obtenido y el valor real. Tres concentraciones, alta de 25 µg/mL, baja de 5 µg/mL e intermedia de 15 µg/mL, se prepararon por triplicado midiendo la absorbancia, determinando el recobro mediante la utilización de la fórmula para su cálculo. Se obtuvo el CV de los recobros y el IC para los mismos.

$$\text{Porcentaje recobro} = (\text{concentración real} / \text{concentración})$$

### 9.17.4. Repetibilidad

Se conoce a la repetibilidad como el grado de similitud que existe en los resultados de las muestras individuales de una muestra homogénea, esta incluye todas las variaciones del método y se puede calcular como la desviación estándar.

La repetibilidad se puede usar para medir la precisión ya que es la coincidencia de resultados en un tiempo corto usando los mismos instrumentos y analistas. Se

prepararon tres concentraciones conocidas (25, 15 y 5 µg/mL) por triplicado a las cuales se les determino su absorbancia, determinando la DE y el CV de estas.

#### 9.17.5. Límite de cuantificación

Esta prueba se hizo para medir la sensibilidad del método, es decir, la concentración a partir de la cual las muestras pueden ser cuantificadas. Para calcularla hicimos uso de la pendiente de la recta obtenida de la curva de linealidad usando la siguiente ecuación.

$$LC = (10 \times DE) / \text{Pendiente}$$

#### 9.17.6. Límite de detección

Es empleado para saber cuál es la concentración mínima de analito que proporciona una respuesta medible por el método UV. Se determinó con la pendiente de la recta de la curva de calibración de albumina con la siguiente ecuación.

$$LD = (3.3 \times DE) / \text{Pendiente}$$

#### 9.18. Seguimiento de las películas mediante microscopia de contraste de fases

Las películas optimizadas fueron observadas al microscopio ya que estas se van modificando al paso del tiempo. Se decidió usar microscopia de contraste de fases, utilizando un microscopio de Epifluorescencia Zeiss Axioskop, modificado con filtros para poder visualizar la película en un contraste de fases.



Figura 17.- Microscopio de epifluorescencia

Se elaboró la película optimizada, una película se fabricó sin la inclusión del fármaco (Metronidazol), a la segunda película elaborada se le incorpora el fármaco; estas fueron observadas al microscopio al tiempo 0, una vez que las películas fueron retiradas de la estufa, observadas con un objetivo 20x. Posteriormente la misma muestra de película observada en el tiempo 0 fue conservada y resguardada en parafilm que posteriormente fue introducida en papel aluminio para mantener en mayor medida las condiciones de la película. La película fue observada al microscopio durante cuatro semanas consecutivas.

#### 9.19. Seguimiento fotográfico y espectrofotometría Raman

De la misma manera que para realizar el monitoreo microscópico, para el monitoreo fotográfico de las películas y la lectura con espectrofotometría Raman, se elaboró una película optimizada sin la incorporación del fármaco (Metronidazol), la segunda película elaborada se le incorporo el fármaco. La primera lectura de Raman se llevó a cabo en el tiempo 0, al igual que las fotografías tomadas como evidencia fotográfica. Las siguientes lecturas se llevaron a cabo a lo largo de las 4 semanas siguientes.

### 9.20. Estudios de liberación *in vitro*

La prueba de liberación se realizó utilizando buffer pH 4.5 como medio de disolución. Para llevar a cabo el estudio se montó el equipo de disolución de paletas, introduciendo al fondo del vaso el cual contenía el medio de disolución, un vidrio de reloj en el cual se adhiere la película mucoadhesiva con la ayuda de cinta adhesiva doble cara (Aparato 5 USP). El aparato se colocó a 50 rpm, disponiéndose a tomar muestras a los 5, 10, 15, 30, 60, 120, 150, 180, 210 min y leyendo las muestras en el espectrofotómetro UV a una longitud de 321 nm,

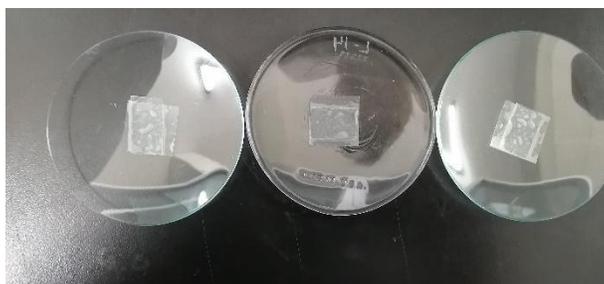


Figura 18.- Prueba de liberación *In vitro*

### 9.21. Modelado matemático para descifrar el mecanismo de liberación

Los estudios de liberación son la mejor manera de dilucidar y evaluar la liberación del fármaco a partir un sistema. Los resultados obtenidos de liberación a partir de los cálculos correspondientes se ajustaron a diversos modelos matemático-

cinéticos. Para cada ajuste se determinó el coeficiente de determinación ( $r^2$ ) al graficar los modelos.

Tabla 8.- Modelos matemáticos ((Ríos KO; 2018)

Modelo matemático	Ecuación
Orden cero	$C = C_0 - K_0 t$
Primer orden	$\text{Log } C = \text{Log } C_0 - K_t / 2.303$
Korsmeyer-Peppas	$C_t / C^\infty = Kt^n$
Higuchi	$C_0^{1/3} - Ct^{1/3} = K_{HCT}$

## 9.22. Estudios microbiológicos

Para la realización de estudios microbiológicos, se utilizaron cepas de *Candidas* que han sido reportadas con una alta prevalencia a infecciones vaginales. Para esto las cepas donadas por el Laboratorio 9 de Microbiología de la Facultad de Farmacia de la UAEM a cargo de Dr. Oscar Torres Ángeles, se descongelaron y posteriormente se sembraron en placas de Dextrosa, según la indica el manual de CLSI, las cepas fueron incubadas por 24 h, posteriormente cada una de las cepas con las que se trabajó fueron estandarizadas, las cepas de *Candida albicans*, *Candida glabrata* y *Candida tropicalis* con ayuda de solución salina estéril fueron colocadas en un tubo y bien homogeneizadas, después con ayuda de un espectrofotómetro de UV, con una longitud de onda de 530 nm, se ajustó a una densidad óptica de 0.5 McFarland, la cual tiene una concentración aproximada de  $1 \times 10^6 - 5 \times 10^6$  UFC/mL. Las cepas estandarizadas fueron inoculadas mediante la utilización de agar blando o con el asa bacteriológica en placas de Müller Hinton, donde se aplicaron las pruebas con los blancos como el Dimetil Sulfoxido, el Metronidazol en solución, el Fluconazol en solución (utilizado como fármaco control como lo indica el CLSI), las películas cargadas con el fármaco (Metronidazol) y las películas sin fármaco. Cada una de las pruebas fue incubada por 18 h, y al paso de este tiempo fue analizado el área de inhibición de cada una de las pruebas. Todos los materiales empleados en el proceso, fueron sometidos a procesos de esterilización (Canton E, et al; 2007).

## 10. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 10.6. Selección de materiales poliméricos

A través de una búsqueda bibliográfica, se valoraron diversos polímeros reportados con la finalidad de elegir el polímero o los polímeros adecuados para la fabricación de la película mucoadhesiva vaginal. Se valoró la utilización de alcohol polivinílico, HPMC K15M, Lustre clear y Carbopol (figura 19), ya que son materiales poliméricos muy utilizados en estudios que han sido reportados, además de que son materiales ya muy bien estudiados, por lo cual se conoce las características tecnológicas que cada uno puede proveer en la fabricación de la película.



Figura 19.- Materiales poliméricos analizados para la fabricación de la película mucoadhesiva vaginal

Para cada uno de los polímeros se evaluaron diferentes concentraciones, en búsqueda de aquellas ideales para la formación de una buena película, tomando como parámetro de evaluación, las características que se observen. Fueron marcados con una “x” aquellas concentraciones en las que se observara la formación de películas en la caja Petri y con un “N”, aquellas concentraciones que no mostraran una buena formación de película, presentaran una mala flexibilidad por si solas, se encontraran ásperas, grumosos, gruesas.

Tabla 9.- Evaluación de la formación de películas

Contenido/ Polímero	25 mg	50 mg	100 mg	200 mg	300 mg	400 mg	500 mg
<b>HPMC K15M</b>	<b>N</b>	<b>N</b>	<b>X</b>	<b>X</b>	<b>X</b>	<b>X</b>	<b>N</b>
<b>Lustreclear</b>	<b>N</b>	<b>N</b>	<b>N</b>	<b>N</b>	<b>N</b>	<b>X</b>	<b>X</b>
<b>Alcohol polivinílico</b>	<b>N</b>	<b>N</b>	<b>N</b>	<b>X</b>	<b>X</b>	<b>X</b>	<b>N</b>
<b>Carbopol 940</b>	<b>N</b>	<b>N</b>	<b>X</b>	<b>X</b>	<b>N</b>	<b>N</b>	<b>N</b>

Con base a los análisis realizados de cada uno de los materiales de forma individual, se decidió utilizar el HPMC K15M y Lustreclear, debido a las características individuales en la formación de películas y en base a las características que han sido reportados para estos materiales.

El HPMC K15M funciona como matriz polimérica, es la encargada de controlar la liberación del fármaco, además de que en forma individual da una buena mucoadhesión. Lustreclear se decidió incorporar como polímero mucoadhesivo, ya que de manera individual no mostraba capacidades idóneas para la formación de película por sí sola, hasta concentraciones muy altas, por lo cual se decidió incorporarlo en concentraciones bajas para aumentar la mucoadhesión de la película.

Se evaluaron diversas concentraciones en combinación de HPMC K15M y Lustreclear, para observar la formación de películas de estos dos polímeros, utilizando diferentes plastificantes (Sorbitol, PG, PEG 4000, Glicerina). Al final se decidió utilizar el sorbitol como plastificante, ya que se observaban buenas propiedades de flexibilidad en la película, además de utilizar también Glicerina como co-plastificante, esto porque se observó que la glicerina por si sola a bajas concentraciones sirvieron como disolvente del fármaco.

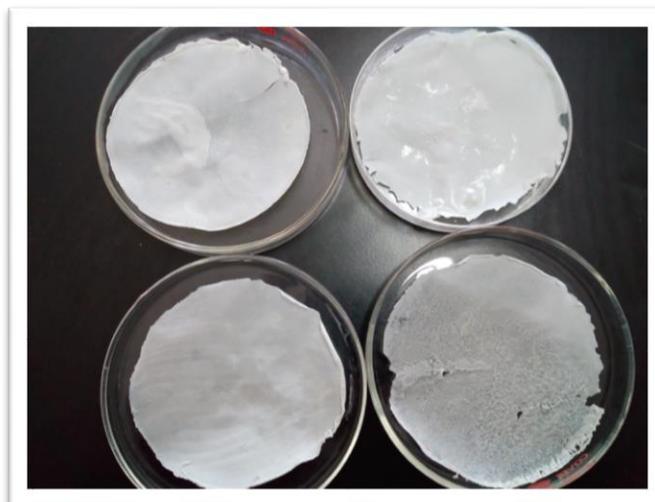


Figura 20.- Películas con diferentes plastificantes

Películas de HPMC K15M y Lustreclear con diferentes plastificantes. (PEG 4000, PG, Sorbitol)



Figura 21.- Película con Sorbitol como plastificante

Película de HPMC K15M y Lustreclear, como plastificante el Sorbitol.

Se decidió utilizar Sorbitol como plastificante debido a que, de forma visual, daba una mejor característica de formación de película (figura21), con base en transparencia, rugosidad, flexibilidad y manipulación de la película, a comparación con los otros dos polímeros utilizados, PEG 4000 y PG.

### 10.7. Selección de disolventes empleados

Una vez realizado la selección de materiales poliméricos a utilizar para la formación de películas, a la par se realizan pruebas de solubilidad utilizando diversos disolventes (HCl 1M, etanol, metanol, ácido acético, dimetil sulfoxido), con la finalidad de elegir los disolventes adecuados para disolver los materiales poliméricos y el fármaco, para formar la película.

El método empleado para la fabricación de películas, moldeo, es un método en el cual se utilizan disolventes para incorporar los diferentes materiales a utilizar y crear una solución homogénea que posteriormente se verterá en la caja Petri. Con el afán de utilizar la menor cantidad de disolvente, se realizaron pruebas de solubilidad.

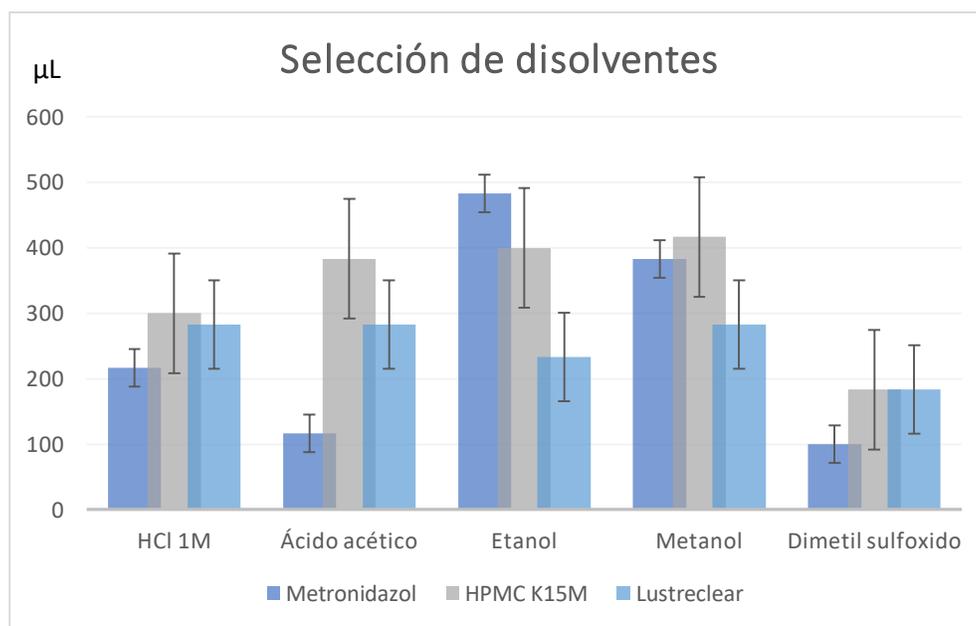


Figura 22.- Selección de disolvente

Los resultados obtenidos de solubilidad de los materiales poliméricos a utilizar y el fármaco arrojan que el mejor disolvente es el dimetil sulfoxido (figura 22), sin embargo, se decide no utilizar este, porque es un reactivo de alto costo, por lo cual se decide utilizar una mezcla de HCl 1M y etanol, en diversos documentos reportan que el HPMC K15M polímero matricial para la película es soluble en agua a temperatura ambiente o fría, por lo cual se llegó a la decisión de utilizar el HCl 1M en baja cantidad para aumentar el grado de solubilidad tanto del HPMC K15M como

del fármaco, y el etanol es un disolvente que nos ayuda a incorporar de buena manera el Lustreclear para formar la solución homogénea, además de ofrecer características buenas en el proceso de secado, ya que este disolvente se evapora de manera rápida por lo cual se acorta el tiempo de secado de la película polimérica.

#### 10.8. Fabricación de películas

Con los materiales poliméricos seleccionados, el plastificante, el co-plastificante y los disolventes empleados, además de la incorporación del fármaco se obtuvieron películas de buena uniformidad a simple vista, transparentes, lisas, de un espesor aceptable, a diversas concentraciones de los diferentes materiales.

#### 10.9. Diseño exploratorio

Con la finalidad de cumplir con el objetivo primordial de incorporar un fármaco en la película, se decidió mantener la concentración de fármaco constante en 300 mg, esto se determinó porque se realizaron estudios en los cuales se intentó incorporar cantidades superiores a esta, en los cuales se observaba la formación de películas con una alta precipitación de fármaco en forma de cristales, por lo cual se determinó la utilización de 300 mg como una constante. Se decidió realizar un diseño exploratorio en el programa Statgraphics utilizando como factores al HPMC K15M, Lustreclear y sorbitol, manteniendo constantes los volúmenes de disolventes empleados y el volumen de glicerina, ya que la actividad principal de este es básicamente la de co-disolvente.

Tabla 10.- Diseño experimental

	HPMC K15M	Lustreclear	Sorbitol
	%	%	%
<b>1</b>	<b>10</b>	<b>20</b>	<b>2</b>
<b>2</b>	<b>40</b>	<b>20</b>	<b>2</b>
<b>3</b>	<b>40</b>	<b>20</b>	<b>10</b>
<b>4</b>	<b>40</b>	<b>5</b>	<b>2</b>
<b>5</b>	<b>10</b>	<b>5</b>	<b>2</b>
<b>6</b>	<b>10</b>	<b>20</b>	<b>10</b>
<b>7</b>	<b>40</b>	<b>5</b>	<b>10</b>
<b>8</b>	<b>25</b>	<b>12.5</b>	<b>6</b>
<b>9</b>	<b>10</b>	<b>5</b>	<b>10</b>

El diseño elaborado a través del programa estadístico, arrojó 9 formulaciones aleatorias las cuales serían fabricadas y evaluadas según las propiedades que han sido elegidas.

#### 10.9.1. Análisis del diseño

Una vez elaboradas cada una de las formulaciones en forma aleatoria, utilizando la misma metodología de elaboración en cada formulación, para evitar la mayor variación que pudiera existir al momento de la fabricación. Se decidieron evaluar 7 variables de respuesta, Espesor (mm), Resistencia al plegado (#), hinchamiento (%), tiempo de desintegración de la película (s), tiempo de disolución de la película (s), fuerza de adhesión (N), contenido de fármaco (mg).

Tabla 11.- Resultados del diseño

HPMC K15M	Lustreclear	Sorbitol	Espesor	Hinchamiento	Tiempo de desintegración de la película	Tiempo de disolución de la película	Fuerza de adhesión	Contenido de fármaco	
%	%	%	mm	%	min	min	N	mg	
1	10	20	2	0.08	181.78	2.25	23.37	1.32	11.5277
2	40	20	2	0.12	94.84	15.09	165.37	1.75	8.9074
3	40	20	10	0.10	203.58	17.05	135.40	2.72	12.074
4	40	5	2	0.10	185.96	3.45	143.40	2.05	11.5185
5	10	5	2	0.06	192.46	0.25	8.15	1.12	14.1481
6	10	20	10	0.06	186.14	1.05	20.30	1.24	14.7314
7	40	5	10	0.18	109.37	1.02	50.44	2.24	9.9259
8	25	12.5	6	0.08	220.62	0.35	97.40	1.54	11.6481
9	10	5	10	0.10	88.46	1.15	15.20	1.21	13.9259

Cada variable fue analizada por el programa estadístico, para observar la influencia de cada uno de los factores sobre las variables de respuesta, se realizó el análisis tomando en consideración las interacciones primarias y secundarias entre los factores, a continuación, se expresan los resultados obtenidos, de igual manera se analizó el diseño únicamente considerando interacciones primarias entre los factores del experimento (véase en el anexo).

#### 10.9.1.1. Espesor

Los resultados del espesor de las diferentes formulaciones fueron analizados con el programa estadístico. El espesor mínimo obtenido fue de 0.063 mm, mientras que el espesor máximo obtenido fue de 0.18 mm.

Se realizó un análisis estadístico de los resultados obtenidos en el diseño para el espesor, con el fin de evaluar el efecto de los factores incluidos en el diseño experimental.

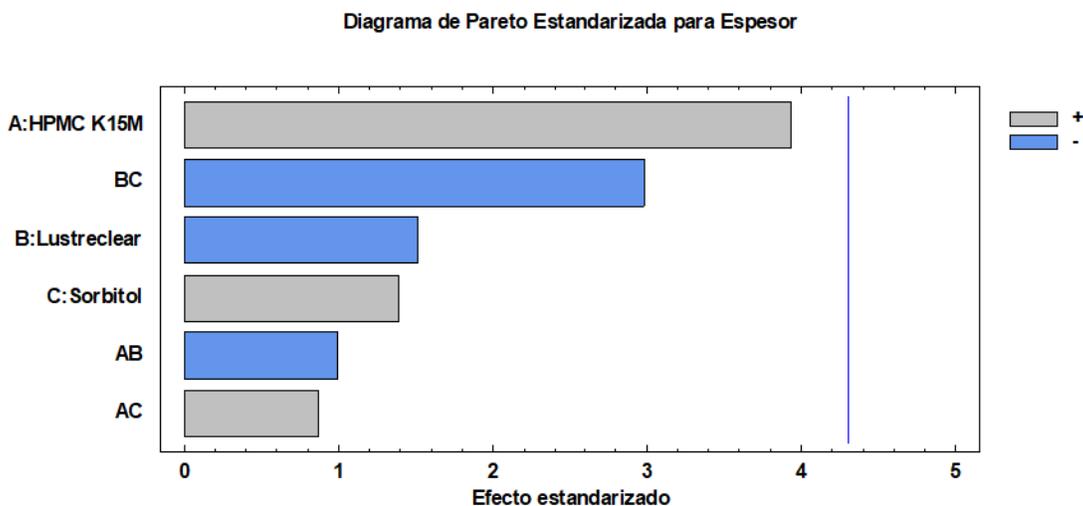


Figura 23.- Diagrama de Pareto para el Espesor

En el diagrama de Pareto (figura 23) se muestra como el factor HPMC K15M es el que actúa en una mayor proporción en el espesor de la película, por lo que se observa, podemos deducir que al aumentar la concentración de HPMC K15M esto influye de manera positiva aumentando el espesor de la película, de igual manera se puede observar que individualmente el factor que afecta en menor medida el espesor es el sorbitol, el cual al aumentar influye de forma positiva el espesor, caso contrario con el Lustreclear el cual al aumentar su concentración afectaría de forma negativa en el espesor, reduciendo el espesor de la película. De igual manera podemos percatarnos que la interacción entre el Lustreclear y el sorbitol afectan de manera negativa en el espesor de la película por lo cual al aumentar de forma proporcional estos dos factores, el espesor de la película se vería reducido, sin embargo, ninguno de estos factores tanto de forma individual como la interacción doble entre estos afecta de forma estadísticamente significativa en el espesor de la película ( $p < 0.05$ ).

Observando que el sorbitol es el factor en estudio que menos afecta en la respuesta del espesor de la película en comparación con los otros factores estudiados, se realizó una optimización de la variable de respuesta de forma individual, dándole un valor óptimo de espesor de 0.1 mm, con la finalidad de obtener valores de factores, para posteriormente fabricar la película y así obtener una película con el espesor óptimo, esto para obtener películas de buen espesor para evitar la incomodidad de

las pacientes al momento de usarlas, de igual manera para no obtener películas delgadas que dificulten su manipulación.

Para obtener valores de espesor de 0.1 mm, se debe mezclar, 25.45% de HPMC K15M, 12.21% de Lustreclar y 6.08% de sorbitol. Con la finalidad de obtener valores cercanos a la optimización, se dispuso a obtener una región de trabajo, mediante un gráfico de contorno de superficie estimada que arroja el programa estadístico.

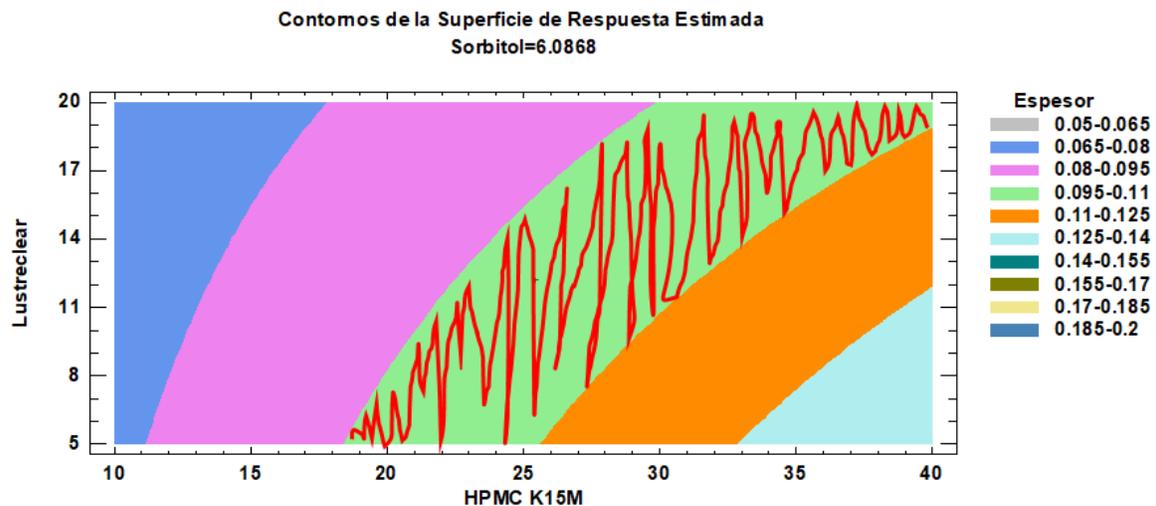


Figura 24.- Grafico de contorno de superficie estimada para el Espesor

El grafico de contorno de superficie estimada nos indica regiones en las cuales podemos desplazar los factores para obtener valores de espesor deseados (figura24), podemos visualizar que si mantenemos constante el Sorbitol en un valor de 6.08% ya que es el factor que influye de manera individual en menor medida sobre el espesor de la película, y al poder desplazar el HPMC K15M y el Lustreclar, se pueden obtener diversos espesores; se observa que si desplazamos el HPMC K15M entre valores de 18% a 26% y al Lustreclar entre valores de 5% a 20%, podremos obtener valores de espesor de entre 0.095 mm a 0.11 mm (Región verde).

El análisis estadístico de esta variable de respuesta a través del programa estadístico, arroja una  $R^2 = 93.80\%$ , lo cual indica que el método es reproducible en ese porcentaje. La ecuación que representa la respuesta espesor, en base a los factores estudiados es:

$$\text{Espesor} = 0.0096 + 0.0017 * \text{HPMC K15M} + 0.0038 * \text{Lustreclear} + 0.0077 * \text{Sorbitol} - 0.00005 * \text{HPMC K15M} * \text{Lustreclear} + 0.00009 * \text{HPMC K15M} * \text{Sorbitol} - 0.0006 * \text{Lustreclear} * \text{Sorbitol}$$

### 10.9.1.2. Resistencia al plegado

Las 9 formulaciones elaboradas según el diseño de experimentos poseían una resistencia que superaba los 300 dobleces sobre su propio eje, por lo cual se considera en base a resultados que ya han sido reportados en trabajos anteriores, que las películas poseen un buen plegado, por lo cual se decidió no analizar estadísticamente el impacto de esta respuesta en la formulación.

### 10.9.1.3. Hinchamiento

Los diversos resultados obtenidos a partir de todas las formulaciones fueron analizados por el programa estadístico, el hinchamiento más alto reflejado en las formulaciones fue de 220.62 % y el hinchamiento mínimo obtenido en las películas fue de 88.46 %.

Se realizó un análisis estadístico con la finalidad de observar el efecto de los factores incluidos sobre el comportamiento del hinchamiento en las diferentes formulaciones del diseño.

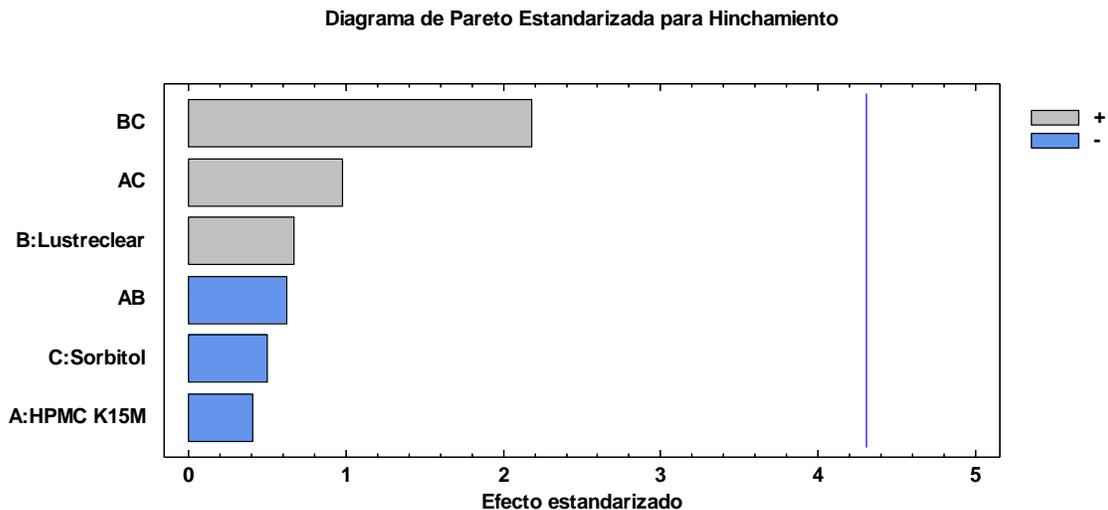


Figura 25.-Diagrama de Pareto para el Hinchamiento

En el diagrama de Pareto (figura 25) estandarizado para el hinchamiento se puede observar que los factores más influyentes son la interacción de Lustreclear con Sorbitol y HPMC K15M con Sorbitol, al aumentar estos factores su interacción influiría de forma positiva el hinchamiento de la película. De forma individual el factor que más influye en el hinchamiento de las formulaciones es el Lustreclear, por lo cual si aumentamos la concentración de Lustreclear aumentara la capacidad de hinchamiento de la película. EL factor que menos influye en la capacidad de hinchamiento de la matriz es el HPMC K15M, este afectaría de forma negativa en el hinchamiento, por lo cual al aumentar las concentraciones de este, el hinchamiento de la formulación se vería reducida, en múltiples trabajos que han sido reportados se indica que HPMC K15M es una buena matriz polimérica, el cual ofrece una mucoadhesión considerable, ofrece buen control en la liberación de fármacos, sin embargo es un polímero no hinchable por lo cual se puede observar que al aumentar su concentración, la variable hinchamiento se vería reducida. Sin embargo, ninguno de estos factores tanto de forma individual como en las interacciones de dos factores, afecta de forma estadísticamente significativa el hinchamiento de la película ( $p < 0.05$ ).

Se decide realizar una optimización del hinchamiento, estableciendo mantener el hinchamiento en un valor de 120%, esto debido a que se requiere que la película tenga un buen hinchamiento para que de esta manera tenga la capacidad de liberar el fármaco de una forma rápida y así este haga su efecto terapéutico.

Para obtener un hinchamiento de película del 120%, se deben mantener los factores HPMC K15M en una concentración de 26.22%, el Lustreclear en 5.13% y el sorbitol en 8.94%. Para obtener un área de trabajo más extensa y así obtener valores de hinchamiento de 120% o cercanos a este, se obtuvo un gráfico de contorno de superficie de respuesta estimada.

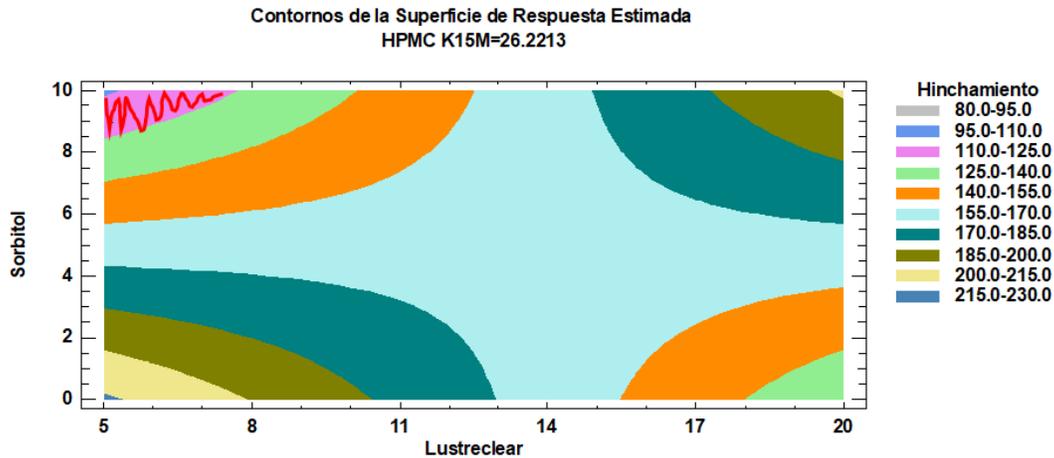


Figura 26.- Grafico de contorno de superficie estimada para el Hinchamiento

El grafico de contorno de superficie estimada es una herramienta la cual no ayuda a visualizar regiones de trabajo cercanas a la optimización (figura 6), el HPMC K15M es el factor que de forma individual afecta en menor proporción el hinchamiento de la matriz, por lo cual se decide mantenerlo constante en 26.22%, por lo cual, si desplazamos el Lustreclear entre 5% y 8%, y el sorbitol entre valores de 8.5% y 10%, podríamos obtener valores de hinchamiento entre 110% y 125% (Región rosa).

El análisis estadístico de esta variable a través del programa estadístico, nos arroja una  $R^2 = 77.71\%$ , lo cual indica que el método seguido es reproducible en ese porcentaje. La ecuación que representa la variable de respuesta hinchazón, en base a los factores que se decidieron manipular es:

$$\begin{aligned} \% \text{ Hinchamiento} = & 271.774 - 0.9410 * \text{HPMC K15M} - 3.5105 * \text{Lustreclear} - 24.2696 \\ & * \text{Sorbitol} - 0.0932 * \text{HPMC K15M} * \text{Lustreclear} + 0.2745 * \text{HPMC K15M} * \text{Sorbitol} + \\ & 1.2237 * \text{Lustreclear} * \text{Sorbitol} \end{aligned}$$

#### 10.9.1.4. Tiempo de desintegración de la película

Los resultados obtenidos de tiempo de desintegración de la película de las 9 formulaciones fueron analizados por el programa estadístico, el tiempo mínimo de

desintegración de película obtenido fue de 0.25 min y el tiempo máximo obtenido fue de 17.05 min.

Se realizó un análisis estadístico de los resultados obtenidos de la variable de respuesta tiempo de desintegración de la película, con la finalidad de observar la influencia de los factores que se han decidido analizar en el estudio.

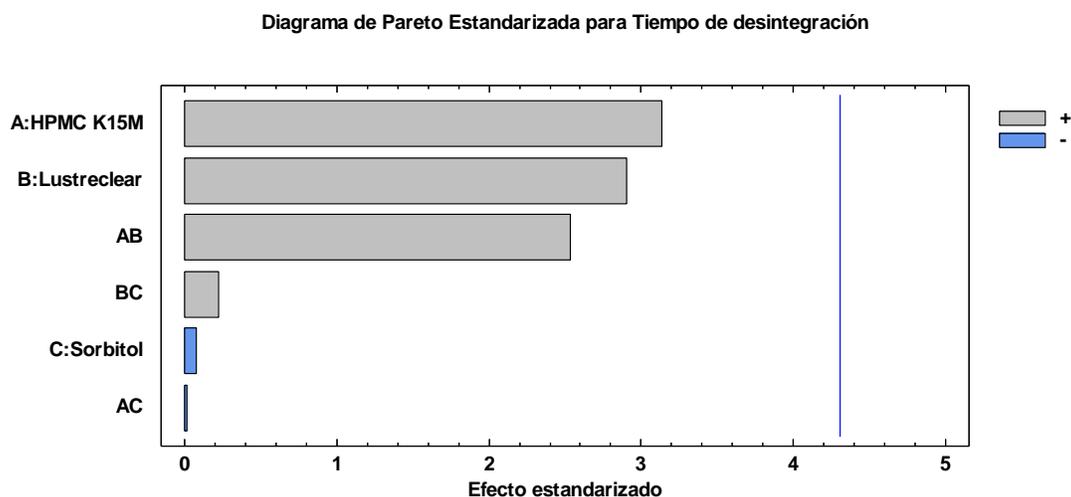


Figura 27.- Diagrama de Pareto para el Tiempo de desintegración de la Película

En el diagrama de Pareto (figura 27) estandarizado para el tiempo de desintegración de la película, se puede observar que de forma individual el factor HPMC K15M es el que influye en mayor medida en la variable de respuesta tiempo de desintegración de película, por lo cual al aumentar la concentración del HPMCK15M influiría de forma positiva en el tiempo de desintegración de película aumentando el tiempo de desintegración, de la misma manera el factor Lustreclear influye casi con la misma magnitud que el HPMC K15M de forma positiva, ya que si se aumenta la concentración de Lustreclear, aumenta el tiempo de desintegración. También se observa que el efecto que menos interfiere en el tiempo de desintegración es el sorbitol, este influye de forma negativa en la variable, por lo cual, al aumentar la concentración del sorbitol, el tiempo de desintegración de película disminuiría. De la misma manera se puede observar que la interacción entre el HPMC K15 M y Lustreclear tiene un gran efecto en esta variable ya que la interacción entre estos dos factores influye de forma positiva aumentando el tiempo de desintegración de

película. Los factores estudiados de forma individual y la interacción doble entre estos no afectan de forma estadísticamente significativa en la variable de respuesta tiempo de desintegración de película ( $p < 0.05$ ).

Se decide realizar una optimización manteniendo el valor óptimo de tiempo de desintegración de película en 5 min, ya que se desea el fármaco se encuentre en el sitio de acción en ese tiempo para llevar el efecto terapéutico casi de forma inmediata.

Para obtener un valor de tiempo de desintegración de película de 5 min, se deben colocar las concentraciones de los factores en valores específicos, el HPMC K15M en 25.74%, el Lustreclear en 12.82% y el sorbitol en 5.75%. Con la finalidad de obtener un área de trabajo más grande, de valores que oscilen entre los 5 min, se decide obtener un gráfico de superficie.

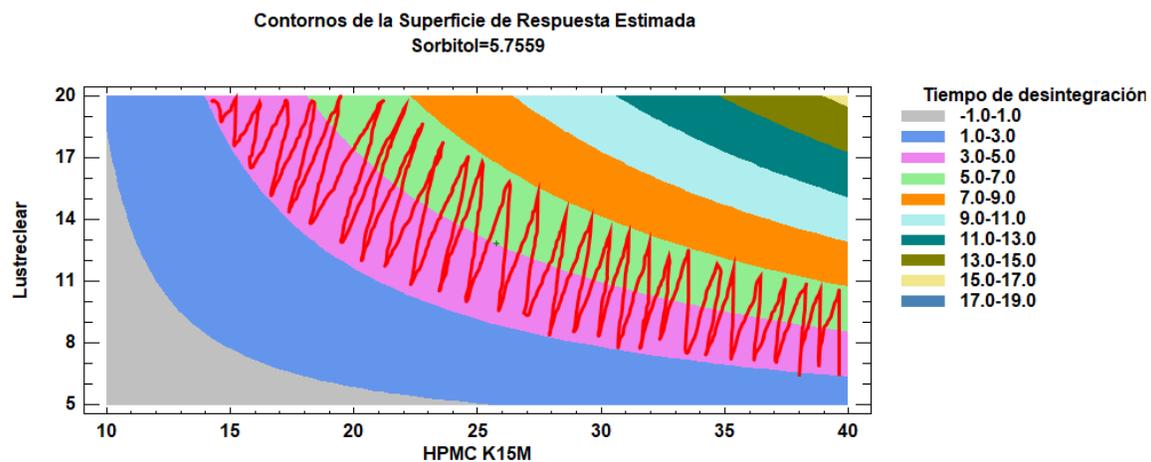


Figura 28.- Gráfico de contorno de superficie estimada para el Tiempo de desintegración de la Película

En el gráfico de contorno de superficie estimada para el tiempo de desintegración de película (figura 28), se puede observar que, si el sorbitol que es el factor que afecta en menor manera la variable, la mantenemos constante con un valor de 5.75%, al HPMC K15M lo desplazamos entre valores de 14% y 40%, y al Lustreclear lo movemos entre valores de 6% y 20%, se podrán obtener valores entre 3 min y 7 min de la variable tiempo de desintegración de película (Región rosa y verde).

El análisis estadístico de esta variable de respuesta, arroja una  $R^2 = 92.52\%$ , lo cual indica que el modelo es reproducible en ese porcentaje, y la ecuación que explica el comportamiento de la variable en base a los factores experimentales es:

$$\text{Tiempo de desintegración} = 1.5753 - 0.0898 * \text{HPMC K15M} - 0.2802 * \text{Lustreclear} - 0.1344 * \text{Sorbitol} + 0.0286 * \text{HPMC K15M} * \text{Lustreclear} - 0.0003 * \text{HPMC K15M} * \text{Sorbitol} + 0.0095 * \text{Lustreclear} * \text{Sorbitol}$$

#### 10.9.1.5. Tiempo de disolución de la película

Los resultados obtenidos de la variable tiempo de disolución de la película de las 9 formulaciones fueron analizados por el programa estadístico, donde el valor máximo obtenido de tiempo de disolución de la película fue de 165.37 min y el valor mínimo fue de 8.15 min.

Se realizó un análisis estadístico de los resultados obtenidos, con la finalidad de observar la influencia de los diversos factores estudiados en la variable de respuesta tiempo de disolución de la película.

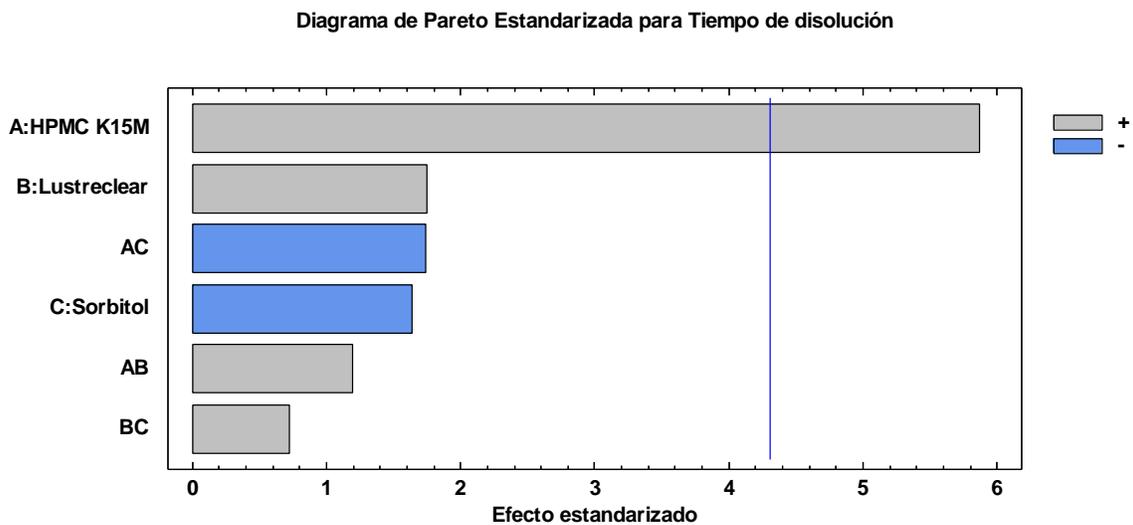


Figura 29.- Diagrama de Pareto para el Tiempo de disolución de la Película

El diagrama de Pareto estandarizado (figura 29) para la variable tiempo de disolución de la película nos muestra que el HPMC K15M como factor individual, es el que afecta en mayor proporción a esta variable, ya que si aumentamos la

concentración del HPMC K15M aumenta de forma considerable el tiempo de disolución de la película, la influencia de este factor en esta variable de respuesta es estadísticamente significativa ( $p < 0.05$ ), por el contrario el sorbitol, afecta en menor proporción esta variable, influyendo de forma negativa en la respuesta, por lo cual si se aumenta la concentración de sorbitol disminuiría el tiempo de disolución de la película, de igual manera la interacción de los factores HPMC K15M y el sorbitol influye de manera negativa en el tiempo de disolución, por lo cual si aumentamos la interacción de estos dos factores, el tiempo de disolución disminuiría. A excepción del HPMC K15M, el Lustrecler, el sorbitol, así como la interacción doble entre los tres factores estudiados, no son estadísticamente significativos ( $p < 0.05$ ).

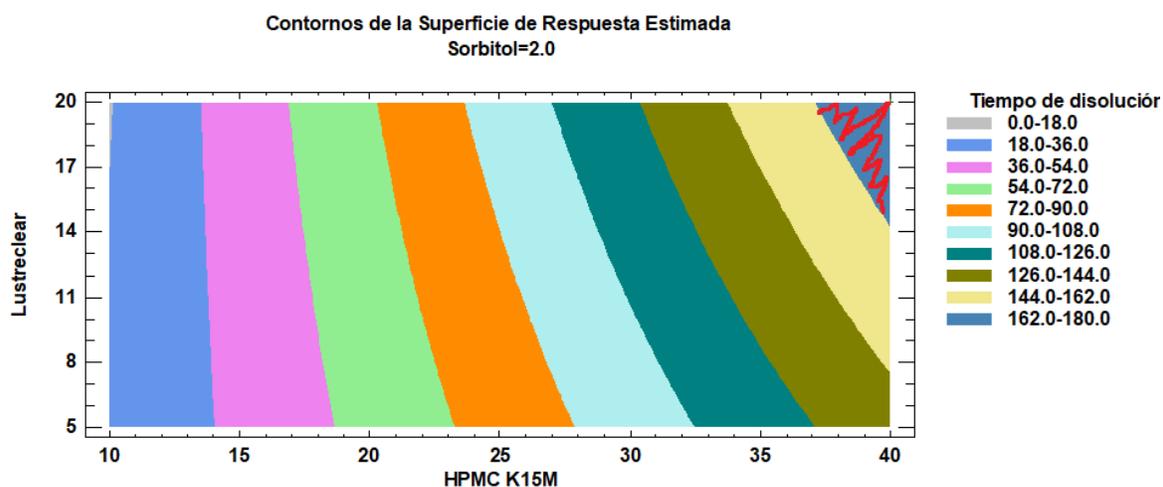


Figura 30.- Grafico de contorno de superficie estimada para el Tiempo de disolución de la Película

En el gráfico de contorno de superficie (figura 30) se puede observar que, si mantenemos constante el sorbitol en un valor de 2%, ya que es el factor que influye menos en la variable de respuesta, el HPMC K15M lo desplazamos entre valores de 37% a 40% y el Lustrecler entre valores de 14% y 20%, podremos obtener una respuesta de entre 162 min a 180 min (Región azul, superior derecha).

El análisis estadístico de esta variable de respuesta, arroja una  $R^2 = 95.76\%$ , lo cual indica que la respuesta de esta variable, tiempo de disolución de la película, se puede explicar en ese porcentaje; le ecuación que representa a respuesta de estas variables en base a los factores que se decidieron analizar es:

**Tiempo de disolución** =  $-13.1276 + 3.9467 * \text{HPMC K15M} - 1.6067 * \text{Lustreclear} + 0.1390 * \text{Sorbitol} + 0.0962 * \text{HPMC K15M} * \text{Lustreclear} - 0.2643 * \text{HPMC K15M} * \text{Sorbitol} + 0.2202 * \text{Lustreclear} * \text{Sorbitol}$

### 10.9.1.6. Fuerza de adhesión

Los resultados obtenidos de las 9 formulaciones elaboradas en la variable de respuesta fuerza de adhesión fueron analizados de forma estadística, donde el resultado máximo de fuerza de adhesión obtenido fue de 2.72 N y el valor mínimo fue de 1.12 N.

Se realizó el análisis estadístico de la variable de respuesta fuerza de adhesión, con la finalidad de observar la influencia de cada uno de los factores sobre la respuesta de esta variable.

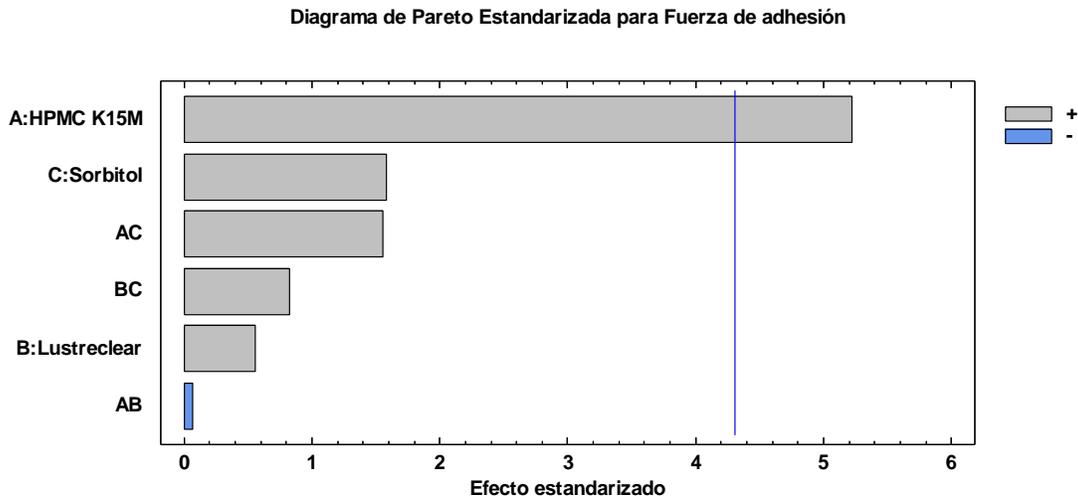


Figura 31.- Diagrama de Pareto para la Fuerza de adhesión

En el diagrama de Pareto estandarizado (figura 31) para la fuerza de adhesión se puede observar que el factor que influye en una mayor proporción es el HPMC K15M, el cual al aumentar su concentración aumentaría de forma positiva la fuerza de adhesión de la película; en múltiples trabajos publicados en los cuales se ha empleado el HPMC K15M, se ha visto que el HPMC K15M provee una buena fuerza de adhesión, la influencia de este factor sobre la variable de respuesta fuerza de adhesión, es estadísticamente significativa ( $p < 0.05$ ); de la misma manera el

sorbitol y el Lustreclear influyen de forma positiva en la fuerza de adhesión de la película, esto en menos medida, la integración entre el HPMC K15M y el Lustreclear es un factor que influye de forma negativa, sin embargo, es tan escasa su influencia que no afectaría en gran medida sobre la variable de respuesta. La influencia del sorbitol, Lustreclear, y las interacciones dobles entre los tres factores estudiados, no son estadísticamente significativos ( $p < 0.05$ ).

Se procede a realizar una optimización de la variable de respuesta fuerza de adhesión. Mediante la optimización de respuesta se puede observar que para obtener una máxima fuerza de adhesión los factores experimentales se deben de mantener en valores específicos, el HPMC K15M EN 40%, el Lustreclear en 20% y el sorbitol en 10%. Para buscar áreas de trabajo cercanas al punto óptimo, se elaboró una grafico de superficie estimada, para encontrar valores de los factores para obtener valores máximos de fuerza de adhesión.

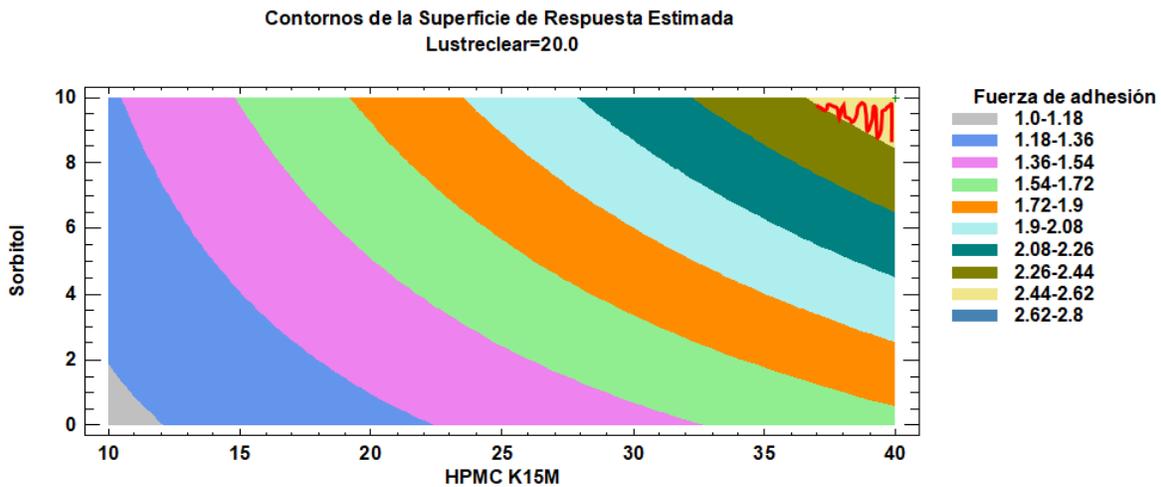


Figura 32.- Grafico de contorno de superficie estimada para la Fuerza de adhesión

En el gráfico de contornos de superficie (figura 32) se puede observar que, si mantenemos constante el valor de Lustreclear en 20%, podemos desplazar los valores de HPMC K15M entre 36% y 40%, y el valor de sorbitol entre 8.5% y 10%, y así obtener valores de fuerza máxima de adhesión entre valores de 2.44 N y 2.62 N (Región amarilla).

El análisis estadístico de la variable de respuesta, fuerza de adhesión, arrojo una  $R^2 = 94.30\%$ , lo cual indica que la respuesta de esta variable se puede explicar en ese porcentaje; la ecuación que representa la respuesta de la variable fuerza de adhesión es:

$$\text{Fuerza de adhesión} = 1.1093 + 0.0185 * \text{HPMC K15M} - 0.0070 * \text{Lustreclear} - 0.0551 * \text{Sorbitol} - 0.00005 * \text{HPMC K15M} * \text{Lustreclear} + 0.0023 * \text{HPMC K15M} * \text{Sorbitol} + 0.0025 * \text{Lustreclear} * \text{Sorbitol}$$

#### 10.9.1.7. Optimización de la respuesta

Cada una de las variables de respuesta que ha sido estudiada se han analizado de forma estadística, por lo cual se puede estimar el comportamiento de cada una de las variables en el caso de mover cada uno de los factores aumentando o disminuyendo la concentración de estos.

Se procedió a realizar un análisis de múltiples respuestas por el método de deseabilidad, en el cual se incorporan todas las respuestas analizadas, con la finalidad de obtener un valor óptimo deseado para cada respuesta, arrojando una deseabilidad en la cual la formulación se podría fabricar y obtener los valores deseados.

Se dispuso a realizar una optimización del sistema en el cual se indicó al programa estadístico, mantener valores cercanos a 0.1 mm de espesor, 120% de hinchamiento, 5 min de tiempo de desintegración de película, minimizar los valores de tiempo de disolución de película y maximizar los de fuerza de adhesión, dándole mayor prioridad a la fuerza de adhesión y al tiempo de disolución de la película, al hinchamiento se le dio una prioridad más baja a las anteriores, el tiempo de desintegración un nivel más bajo al anterior, y finalmente al espesor se le dio menos prioridad de entre todas las variables de respuesta esperadas.

Tabla 12.- Optimización de la deseabilidad

<b>Optimizar Deseabilidad</b>			
<b>Valor óptimo = 0.82192</b>			
<b>Factor</b>	Bajo	Alto	Óptimo
<b>HPMC K15M</b>	10	40	40
<b>Lustreclear</b>	5	20	12.51
<b>Sorbitol</b>	2	10	5.43
<b>Respuesta</b>			
<b>Espesor</b>	Óptimo		
	0.12	mm	
<b>Hinchamiento</b>	154.54	%	
<b>Tiempo de desintegración</b>	8.65	min	
<b>Tiempo de disolución</b>	131.09	min	
<b>Fuerza de adhesión</b>	2.13	N	

La optimización del sistema (tabla 12), dice que se puede obtener una deseabilidad del 82.19%, en la obtención de las variables de respuesta deseadas, si se mantiene la concentración de los factores en condiciones constantes en, HPMC K15M en 40%, Lustreclear en 12.51% y el sorbitol en 5.43%, y de esta manera obtener valores de las variables de respuesta de 0.12 mm de espesor, 154% de hinchamiento, 8.68 min de tiempo de desintegración de película, 131.09 min de tiempo de disolución de la película y 2.13 N de fuerza de adhesión.

Tomando en cuenta que el sorbitol era el factor que menos influía en las múltiples variables de respuesta, se dispuso a mantenerlo constante, con la finalidad de obtener un área de trabajo más grande, y de esta manera obtener valores de deseabilidad cercanos al punto óptimo.

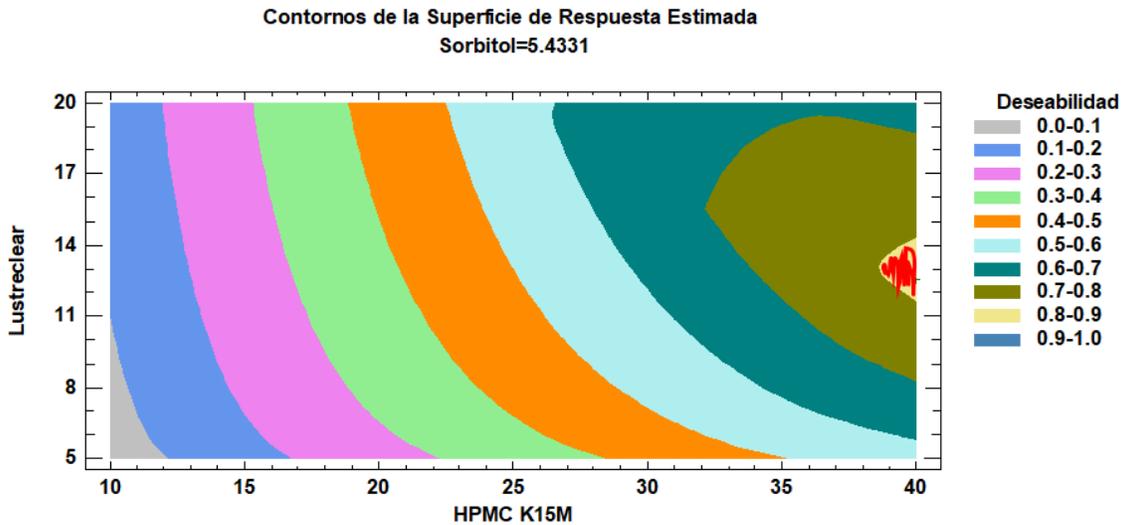


Figura 33.- Grafico de contorno de superficie estimada para la Optimización

En el gráfico de contornos de superficie de respuesta estimada (figura 33), podemos observar que al mantener el factor sorbitol como constante en un valor de 5.43%, podemos desplazar los otros factores analizados en el estudio, el HPMC K15M podemos moverlo entre valores de 38.5% a 40% y el Lustreclear entre valores de 11.5% a 14%, para que de esta manera se puedan obtener valores de deseabilidad de entre 80% y 90%.

#### 10.9.2. Comparación valores teóricos & experimentales

Las concentraciones obtenidas de la optimización de los diversos factores incorporados en el estudio, nos dan valores constantes de cada uno. Estos valores son utilizados para fabricar la formulación y evaluar las variables de respuesta con la finalidad de observar la variación que podría existir entre el valor teórico y el valor experimental de las películas.

Tabla 13.- Comparación de valores óptimos

	TEÓRICO	EXPERIMENTAL
<b>Espesor (mm)</b>	0.12	0.12 ± 0.01
<b>Hinchamiento (%)</b>	154.54	115.53 ± 24.19
<b>Tiempo de desintegración de la película (min)</b>	8.65	5.53 ± 0.51
<b>Tiempo de disolución de la película (min)</b>	131.09	142.27 ± 28.51
<b>Fuerza de adhesión (N)</b>	2.13	2.35 ± 0.31

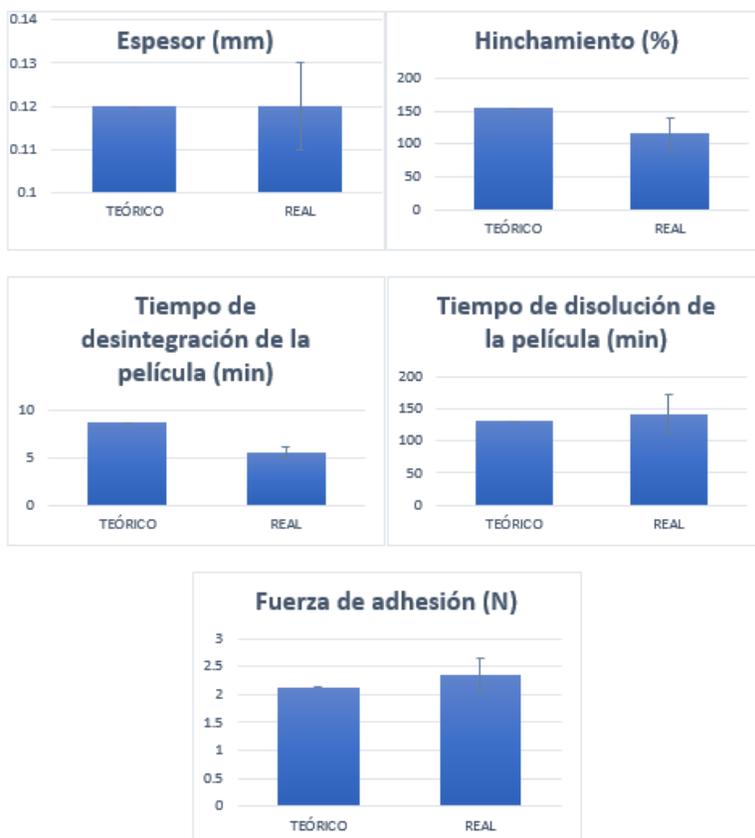


Figura 34.- Gráficos de la comparación de valores óptimos

Los resultados obtenidos de las diferentes variables de respuesta fueron analizados estadísticamente (figura 34), aplicando un estadístico de hipótesis por comparación de medias, en el cual se observa que los valores obtenidos para el espesor, el tiempo de disolución de la película y la fuerza de adhesión son similares al valor teórico esperado ( $p < 0.05$ ), mientras que los valores obtenidos en las variables de hinchamiento y tiempo de desintegración de película es diferente al esperado teóricamente ( $p > 0.05$ ).

#### 10.10. Cuantificación de fármaco en las películas

La concentración de fármaco utilizado en cada una de las formulaciones se manejó de forma constante (300 mg), por lo cual se cuantifico el fármaco en la formulación optima, utilizando el método analítico ya validado.

Tabla 14.- Fármaco incorporado en las películas

		Fármaco (mg/mL)
<b>Formulaciones optimas</b>	<b>1</b>	15.79
	<b>2</b>	12.61
	<b>3</b>	7.04
	<b>Promedio:</b>	<b>11.81</b>
	<b>Des Est:</b>	<b>4.43</b>

Al realizar la cuantificación de fármaco en las películas optimizadas se logra verificar que el promedio de fármaco recuperado en segmentos de 2x2 cm es de 11.81 mg  $\pm$  4.432 (tabla 14).

El área total de la caja Petri en la cual se vierte la solución polimérica es de 61.63 cm<sup>2</sup>, por lo cual al momento de realizar los cálculos para visualizar el total de fármaco que se logró incorporar en la matriz polimérica arroja un valor de 187.93 mg. De esta manera se observa que no existe la cantidad de fármaco que se incorporó inicialmente en la formulación, por lo cual se cuantifico el fármaco que quedaba adherida a las paredes del vaso de precipitado en el cual la solución polimérica fue preparada, en el cual mediante cálculos se determina que el fármaco presente en las paredes va de 34.358 mg  $\pm$  7.30.

#### 10.11. Fuerza de mucoadhesión

Se determinó la fuerza de mucoadhesión de la película optimizada, para lo cual se utilizó tejido fresco vaginal de cerdo (figura 35), el cual se consiguió en el rastro municipal, la muestra se conservó por algunas horas en solución salina, hasta su utilización.

Al momento de su utilización el tejido fue cortado con la ayuda de una navaja para dejar al descubierto la región del epitelio vaginal con el cual se realizaría la prueba.



Figura 35.- Tejido vaginal

Una vez que el tejido se encontraba disponible y en condiciones para su utilización se procedió a montar el equipo, el cual básicamente fue un soporte universal en el cual se colocó el sensor de fuerza, este se encontraba conectado a un taladro por medio de una cuerda y al otro extremo una pinza el cual sujetaría la película que entraría en contacto con el tejido vaginal.



Figura 36.- Montaje para la medición de mucoadhesión

Se procedió a realizar la medición de fuerza de mucoadhesión, el cual se realizó por triplicado, dando valores de 7.48 N, 8.64 N, 5.93 N, con un promedio de  $7.35 \text{ N} \pm 1.35$ .

#### 10.12. Compatibilidad Fármaco-excipiente

Mediante la espectroscopia Raman se evaluaron las mezclas físicas entre los componentes que se utilizan para la formulación de las películas. Se realizó mezclas

binarias 1:1 de HPMC K15M, Lustreclear, Sorbitol, Glicerina y el fármaco Metronidazol, con la finalidad de observar que no existiera interacción entre el fármaco y los excipientes de la formulación.

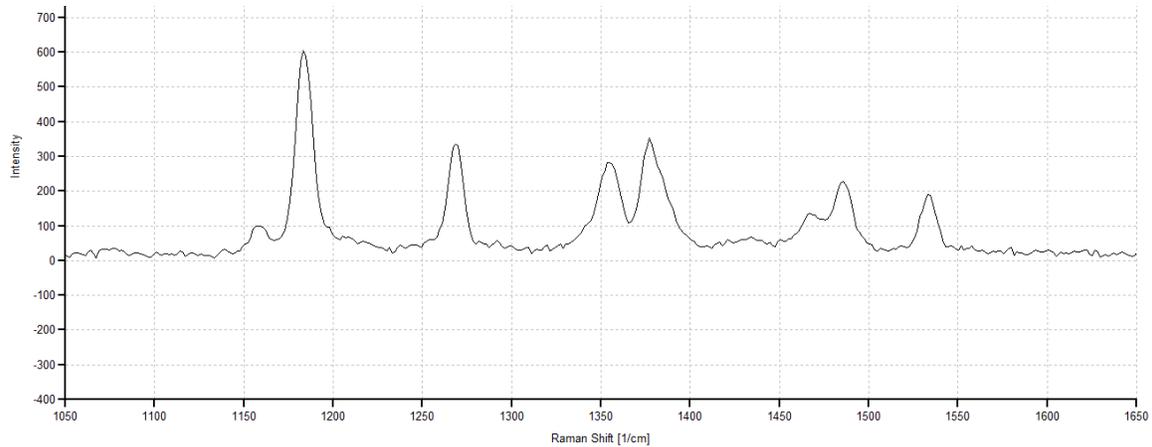


Figura 37.- Gráfico de lectura en espectroscopia Raman del Metronidazol.

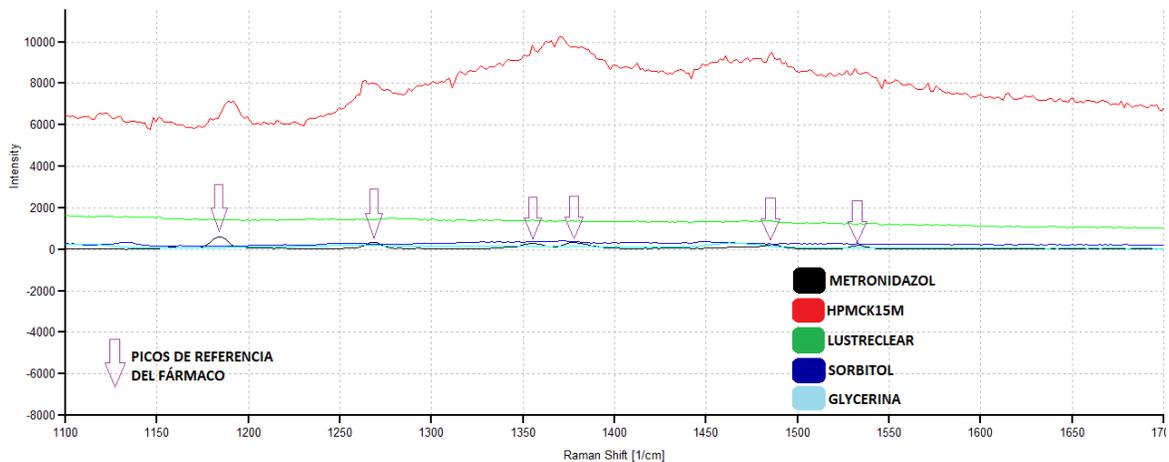


Figura 38.- Gráfico de lectura en espectroscopia Raman de cada uno de los excipientes y el fármaco incorporados en la formulación de la película.

Como podemos observar, el Metronidazol posee algunos picos característicos específicamente en los puntos a 1183.5, 1268.4, 1355, 1377.2, 1486 y 1534 (figura 38). Además, se puede observar las lecturas de cada uno de los excipientes individuales y de cómo estos tienen longitudes características por si solos. Se decidió que para observar alguna interacción entre el fármaco y los excipientes

estas señales deberían ser afectadas o desaparecer, por lo cual se tomaron lecturas constantes durante 1 mes, cada semana, sometiendo las muestras a un estrés de temperatura de 40 °C.

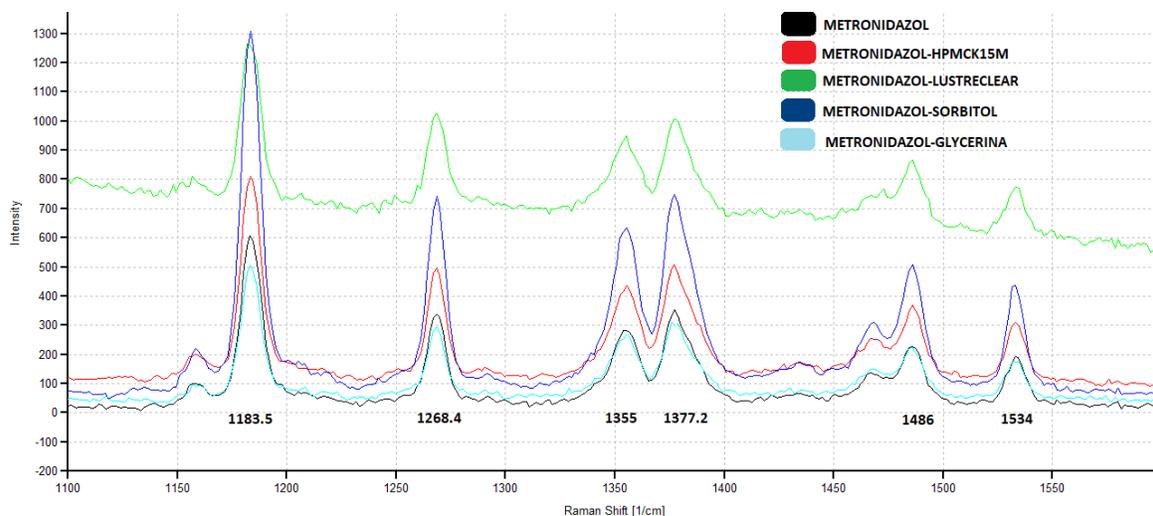


Figura 39.- Gráfico de lectura en espectroscopia Raman del Metronidazol, y las mezclas físicas 1:1, que se realizó del fármaco con cada excipiente de la formulación. (TIEMPO 0)

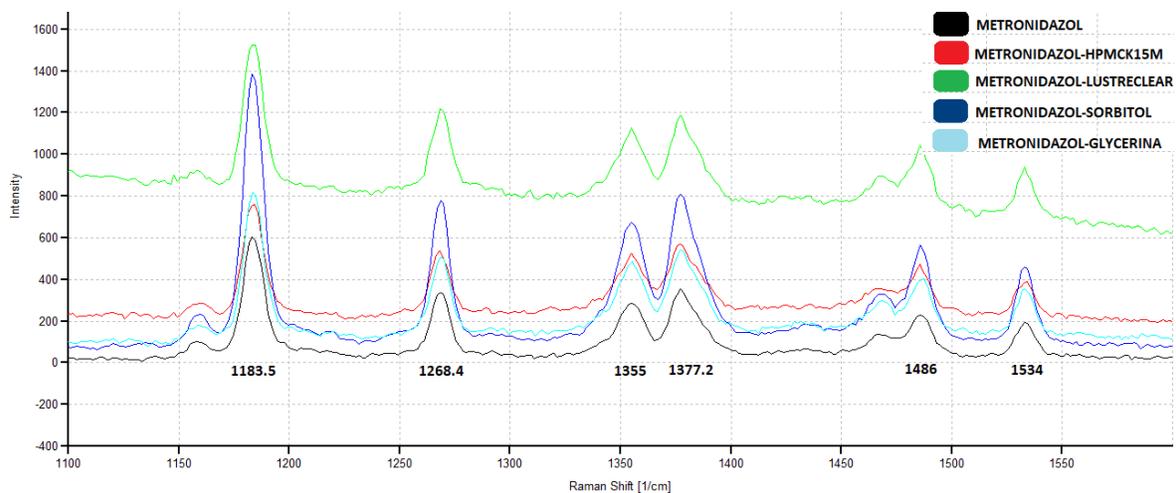


Figura 40.- Gráfico de lectura en espectroscopia Raman del Metronidazol, y las mezclas físicas 1:1, que se realizó del fármaco con cada excipiente de la formulación. (CUARTA SEMANA)

Al realizar la lectura en espectroscopia Raman de cada uno de los excipientes en mezcla con el fármaco 1:1 en el tiempo 0 (figura 39), se logran observar los picos característicos del fármaco, por lo cual, no existiría una interacción entre fármaco-

excipiente, la misma tendencia se logra observar con todos los excipientes incorporados en la formulación.

Al paso de 4 semanas se realizaron lecturas constantes, utilizando el mismo equipo en las mismas condiciones y a los mismos tiempo, dejando transcurrir 1 semana entre mediciones, por lo cual, al paso de estas semanas, no se logró observar un cambio en el espectro de las mezclas 1:1, siendo así en la semana número 4 (figura 40), después de haber transcurrido aproximadamente 30 días a un estrés de 40 °C, se siguen observando las longitudes máximas característicos del fármaco en los puntos 1183.5, 1268.4, 1355, 1377.2, 1486 y 1534.

#### 10.13. Validación del método analítico

Se realizó el desarrollo de un método para cuantificar el fármaco en un medio acuoso de buffer pH 4.5 con el método espectrofotométrico en la región UV. En la tabla 15 se expresan los diferentes resultados obtenidos de los diferentes parámetros evaluados. La curva de cuantificación se realizó con concentraciones de 25, 20, 15, 10 y 5 µg/mL.

Tabla 15.- Parámetros de validación del método analítico y resultados obtenidos

<b>Parámetros de validación del método analítico y resultados obtenidos</b>		
<b>Parámetro</b>	<b>Especificación</b>	<b>Resultado</b>
Linealidad	$R^2 \geq 0.98$ $CV < 3\%$ $IC_m =$ la pendiente no debe incluir el 0 $IC_b =$ el intercepto debe incluir el 0	$R^2 = 0.9998$ $CV = 1.22\%$ $IC_m = 0.05355201$ a $0.05435466$ $IC_b = -0.0016152$ a $0.01169519$
Repetibilidad	$CV \leq 3\%$	$CV = 1.11\%$
Exactitud	$CV \leq 3\%$ del porcentaje de recobro $IC_{recobro}$ debe incluir el 100%	$CV = 1.79\%$ $IC_{recobro} = 99.33 - 101.69\%$
LC	-	0.94 $\mu\text{g/mL}$
LD	-	0.31 $\mu\text{g/mL}$

Con base a los resultados se puede decir que el método es lineal. La veracidad se evaluó con el cálculo del porcentaje de recobro tomando en cuenta los datos de concentración teórica (conocida) y la concentración calculada a partir de las absorbancias obtenidas. El porcentaje de recobro fue de 101.69%, se considera el método veraz, y se encuentra entre 97 – 100% para métodos espectrofotométricos (Ríos, K.O.; 2018).

La repetibilidad permite ver el nivel de concordancia de los resultados obtenidos por los mismos instrumentos, métodos y analista, con un CV de 1.11% denota la precisión del método.

El límite de cuantificación del método fue de 0.94  $\mu\text{g/mL}$ , lo cual indica la concentración mínima del analito (fármaco) que es aceptable para el desempeño del método, es decir, la parte mínima de los resultados arrojados para tener una precisión y exactitud aceptables.

El límite de detección da a conocer la concentración de analito más baja que se logra detectar en el método; el método desarrollado logra detectar una concentración de 0.31  $\mu\text{g/mL}$  (Magnusson, B & Ornemark, U; 2014).

#### 10.14. Análisis de las películas mediante microscopia de contraste de fases

Se observó que al formular las películas y dejarlas al medio ambiente por un tiempo prolongado, éstas se tornaron un tanto opacas y rugosas por lo cual perdieron su transparencia y por lo cual se cree cambian sus propiedades físicas.

Se fabricaron películas mucoadhesivas con la formulación optimizada mediante el programa estadístico elaborándose con un contenido de fármaco de 300 mg y de igual manera se elaboró la película sin utilizar el fármaco, una vez elaboradas las películas fueron observadas al microscopio, considerando el día 1 como tiempo 0.

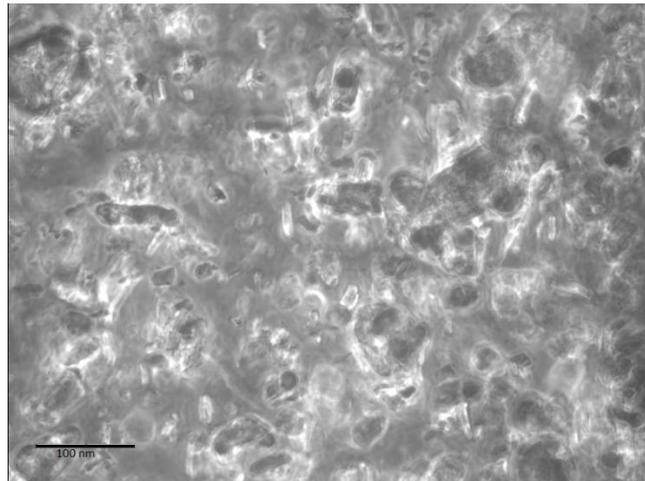


Figura 41.- Fotografía de película mucoadhesiva sin fármaco al tiempo 0 (Microscopia de contraste de fases) (Aumento en 40x)

La película sin fármaco fue observada al microscopio, observando que en la imagen únicamente se ven los materiales poliméricos dispersos formando la matriz polimérica (figura 41).

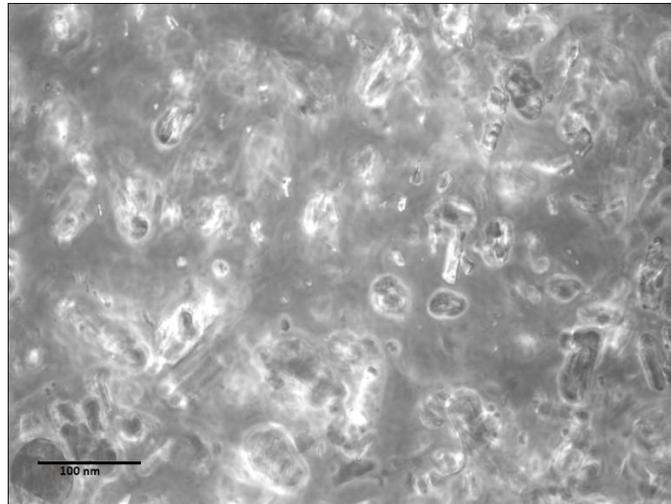


Figura 42.- Fotografía de película mucoadhesiva con fármaco al tiempo 0 (Microscopía de contraste de fases) (Aumento en 40x)

De igual manera la película que tenía un contenido de fármaco fue observada al tiempo 0 (figura 42), a lo cual se observa únicamente el material polimérico disperso, no se logran observar cristales del fármaco, por lo cual se puede aseverar que el fármaco se encuentra molecularmente disperso en la formulación al momento de realizar la película y que esta esté lista al tiempo 0.

Las películas formuladas fueron conservadas y resguardadas en bolsas de plástico y estas en aluminio a temperatura ambiente para conservar lo mejor posible la humedad. Estas películas fueron observadas al microscopio a la semana 1, 2, 3 y 4, detectando que al transcurrir el tiempo fueron apareciendo cristales inmersos en la matriz polimérica, detectables mediante la microscopía de contraste de fases, estos cristales aparecieron a partir de la semana 2 de lectura y aumentaron 3 o hasta 4 veces su cantidad hasta la semana 4 de la lectura.

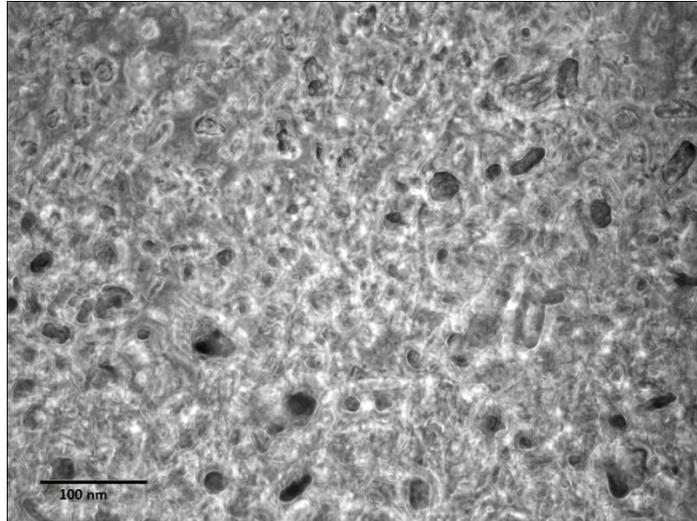


Figura 43.- Fotografía de película mucoadhesiva sin fármaco a la semana 4 (Microscopia de contraste de fases) (Aumento en 40x)

En la figura 43, podemos observar la fotografía a la semana 4 de la película que no contenía fármaco, se puede apreciar como esta no sufre algún cambio significativo al paso de las 4 semanas en las que se conservó mediante las mismas condiciones. El material polimérico que constituye la formulación sigue dispersa formando la matriz polimérica.

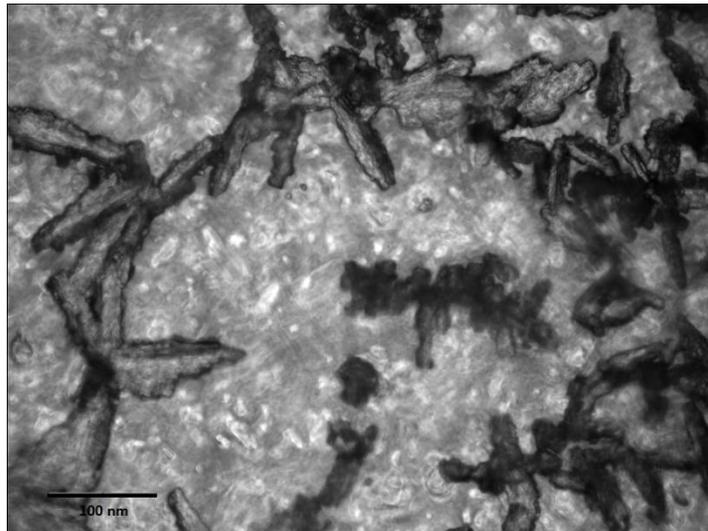


Figura 44.- Fotografía de película mucoadhesiva con fármaco a la semana 4 (Microscopia de contraste de fases) (Aumento en 40x)

En la figura 44 se pueden observar claramente los cristales del fármaco, y como estos se encuentran dispersas en la matriz polimérica, este efecto de recristalización

del fármaco se empieza a observar después de la primer semana, donde mediante las imágenes microscópicas se han podido observar pequeños cristales en la semana 1 de tiempo transcurrido, estos cristales han ido en aumento en número y tamaño conforme transcurre el tiempo; como bien se observó en el tiempo 0, al momento de la formulación de la película y realizar la observación en el microscopio, no se logró observar ningún cristal que se pueda atribuir al fármaco por el cual en ese momento el fármaco estaba molecularmente disperso en la matriz polimérica. Al paso de los días, propiamente después de la primera semana, estos cristales aparecieron, aumentando su tamaño y aglomerándose para formar cúmulos que pueden apreciarse a simple vista atribuyéndoles la opacidad y la rugosidad de las películas. La aparición de estos cristales básicamente pueden ser atribuibles a diversos factores, entre los principales podemos destacar la perdida de humedad de la formulación, por lo cual el fármaco recristalizaría en la formulación, observando estos cristales en mayor cantidad a lo largo del tiempo, por la pérdida constante de agua; un factor más a considerar fue la cantidad de fármaco utilizada en la formulación, ya que se trabajó con una cantidad alta de fármaco propiamente para las concentraciones de polímeros y disolventes que se han utilizado para este experimento, por lo cual básicamente se ha trabajado en un área de saturación del medio, por lo cual ante el mínimo cambio de condiciones en el sistema, como la son humedad, temperatura, entre otros, la recristalización del fármaco sería una situación inminente.

#### 10.15. Análisis del seguimiento fotográfico y espectrofotometría Raman

Las películas formuladas fueron evaluadas por un periodo de 4 semanas, esto debido a que se observaron en lotes fabricados ligeras inestabilidades en la apariencia física, se observaron cristales por lo cual se analizó mediante espectrofotometría Raman y a través de fotografías simples mediante un dispositivo móvil.

Se formularon películas con fármaco y películas sin fármaco y estas fueron analizadas en el tiempo 0, posteriormente se almacenaron cubriéndolas en una

bolsa de plástico y posteriormente ésta fue introducida en papel aluminio, para evitar la pérdida de humedad de la película, lo cual puede ocasionar su inestabilidad.

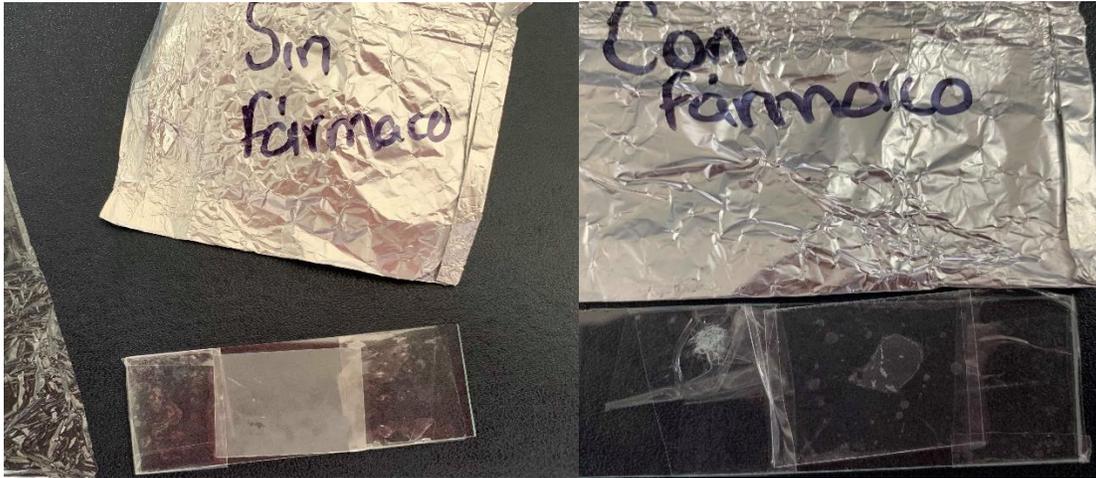


Figura 45.- Películas con fármaco y sin fármaco al tiempo 0

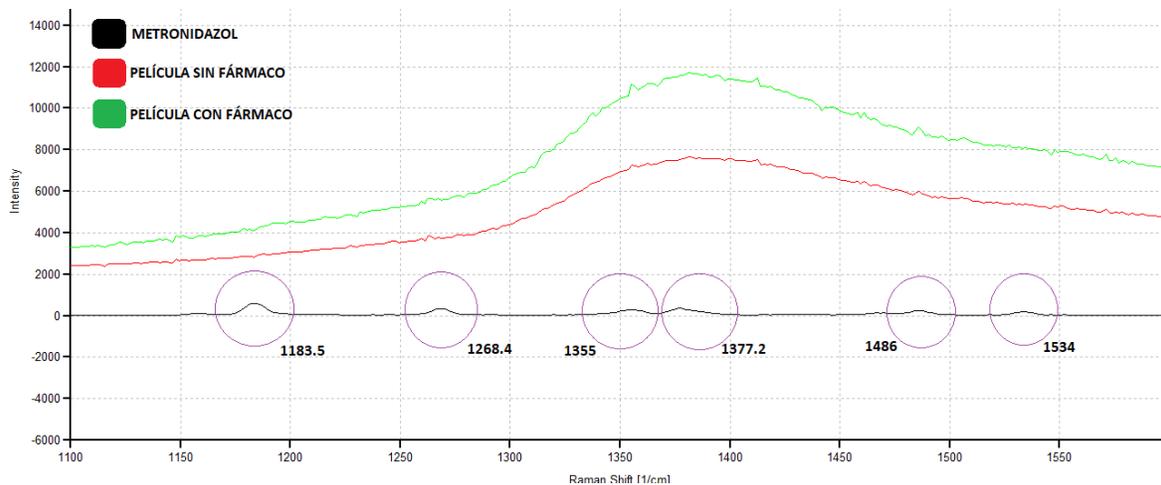


Figura 46.- Lectura de espectroscopia Raman al tiempo 0

Una vez formuladas las películas, estas se monitorearon por Raman, para ver si el método podía detectar la cristalización del fármaco en la película. Las lecturas del Raman a la película que contenía el fármaco indican que el fármaco está incorporado de forma molecular en la película por lo cual no puede ser detectado por el método Raman (figura 46). De igual manera se tomaron fotografías con ayuda de un dispositivo móvil en el cual se puede observar una película un tanto opaca en la película sin fármaco y una película totalmente transparente en la que contenía el fármaco, sin indicios a simple vista de una posible cristalización.

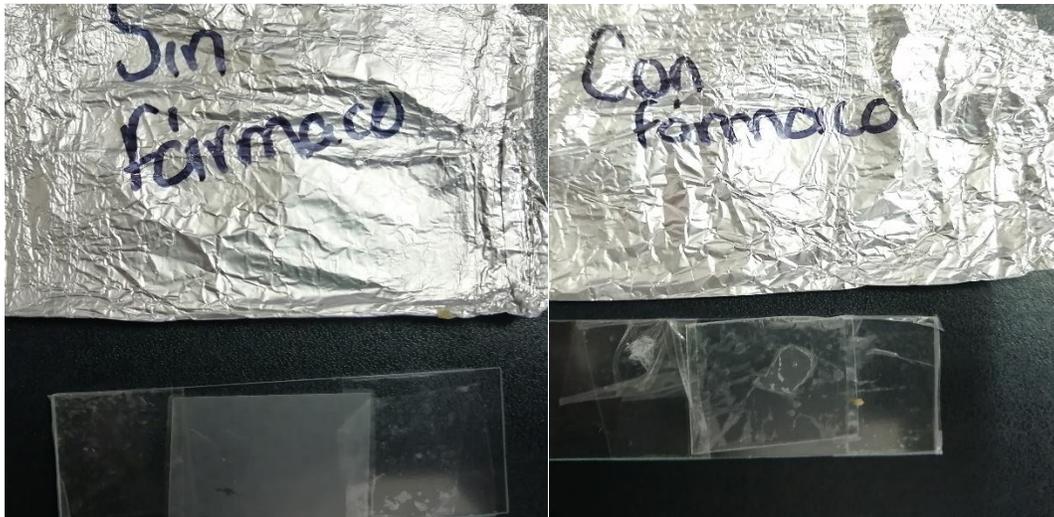


Figura 47.- Películas con fármaco y sin fármaco a la semana 4

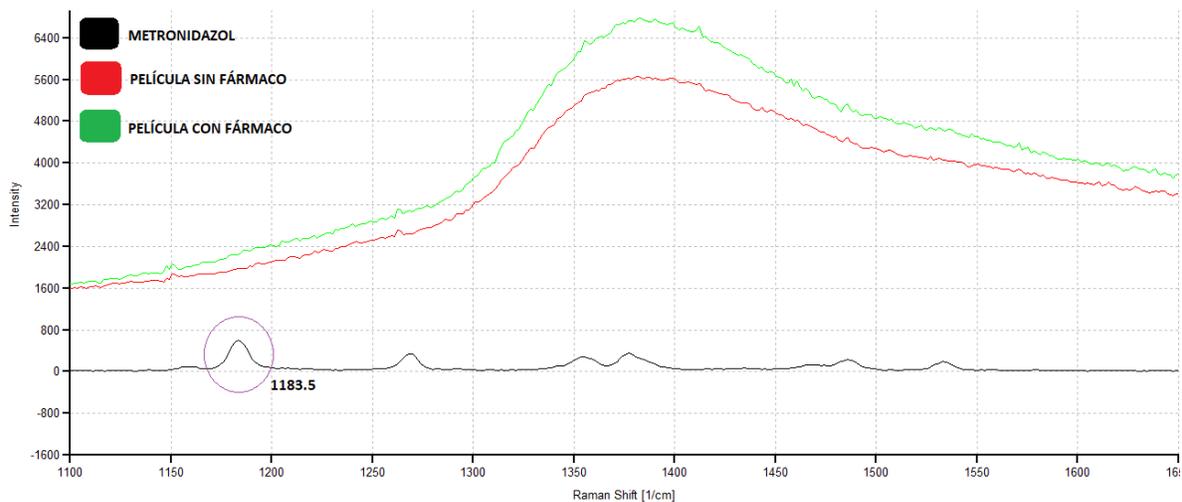


Figura 48.- Lectura de espectroscopia Raman la semana 4

A la semana cuatro, se tomaron lecturas en el equipo Raman (figura 48), en el cual se puede observar que, en las películas formulados con contenido de fármaco, éste no ha sido detectado, ya que se comparó la lectura del fármaco por si solo con la lectura de la película en el cual se observa que en el espectro no se llegan a ver las señales características del fármaco. En las fotografías tomadas de las películas, se logró ver que las películas sin fármaco mantenían un aspecto opaco a lo largo de las cuatro semanas, mientras que la película con fármaco mantiene un aspecto transparente, pero se llegan a observar ligeras líneas, manchas blancas, que asemejan a cristales los cuales se observan a simple vista, sin embargo el método

de espectroscopia Raman no lo detecto, lo cual podemos asemejarlo a diversos factores, los cuales van desde el hecho de que la cristalización no era lo suficientemente grande para ser detectada por el método, de igual manera se puede plantear el hecho de que el equipo no tiene la sensibilidad de leer muestras muy delgadas como las películas o también que las manchas que se observan corresponden a los polímeros formadores de la película por lo cual el Raman no fue capaz de detectarlo.

### 10.16. Liberación *in vitro*

La liberación del fármaco de las películas se realizó con la ayuda del aparato de **disolución IV**, en el cual se tomaron muestras a los tiempos 0, 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 30, 60, 120, 150, 180, 210 min, obteniendo la siguiente grafica de liberación.

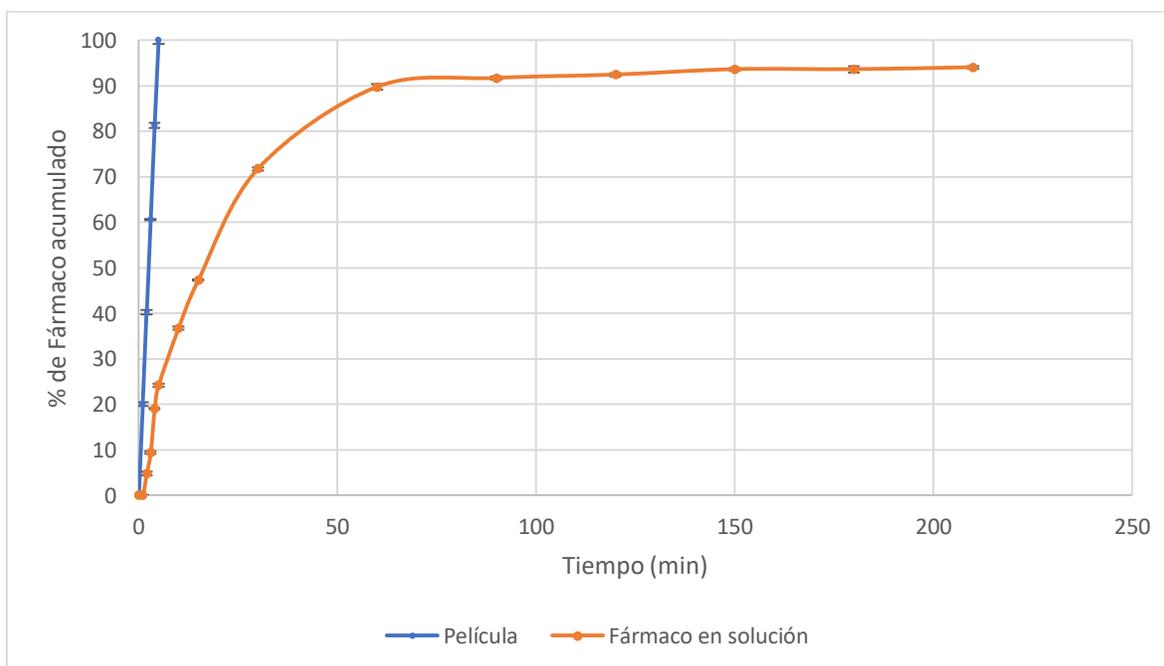


Figura 49.- Liberación *in vitro*

En la figura 49 se puede observar como la película libera el fármaco de forma inmediata, ya que a los primeros 5 minutos el total de fármaco puede ser cuantificado por completo. Mientras que el fármaco en solución colocado en la bolsa de diálisis se cuantifica alrededor del 90% a los 210 min, por lo cual podemos

deducir que la bolsa de diálisis es un impedimento para la cuantificación del fármaco.

### 10.17. Estudios microbiológicos

Primero se montaron pruebas en las cuales se utilizaron las tres cepas de *Candidas* donadas por el laboratorio 9 de la facultad de farmacia de la UAEM, para lo cual se utilizó el Fluconazol como fármaco control como lo indica el CLSI, y al Metronidazol que es el fármaco de interés para nuestros ensayos. Una vez estandarizadas las cepas a la longitud de onda determinada para tener un número de UFC controlado se procedió a sembrarlas en placas de Muller-Hinton con agar blando. Cabe señalar que esta prueba se realizó con la finalidad de observar la susceptibilidad de las cepas ante los determinados fármacos.

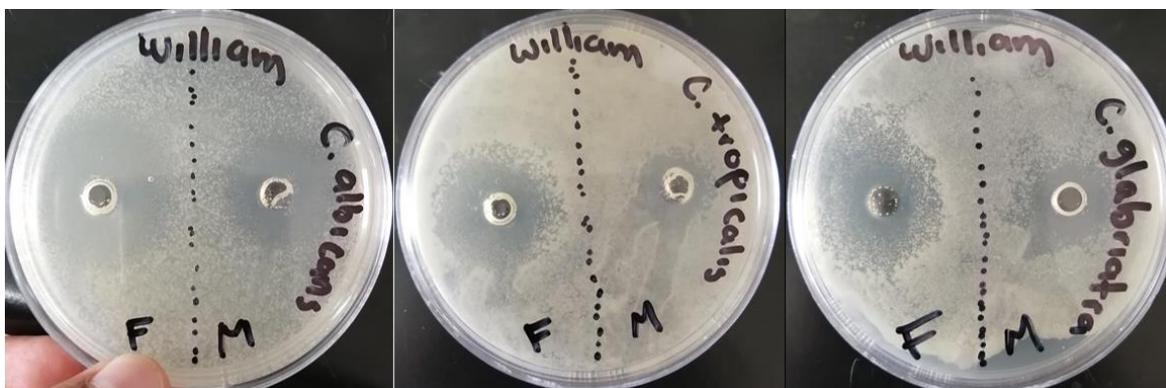


Figura 50.- Resultados de las pruebas de susceptibilidad ante Metronidazol y Fluconazol

Como podemos observar en la figura 50, las cepas de *Candida albicans*, *Candida tropicalis* y *Candida glabrata* son susceptibles tanto al Fluconazol (fármaco control) como al Metronidazol (fármaco de interés). Se pueden observar los halos de inhibición alrededor del pocillo generado con un penicilindro estéril, donde fue colocado el fármaco correspondiente en solución.

Posteriormente se procedió a montar cada una de las pruebas por triplicado, las pruebas de control con el Dimetil sulfoxido (DMSO), debido a que este disolvente es el que se utiliza como disolvente para ambos fármacos que son utilizados en solución, cada prueba se monta por triplicado en cada una de las cepas a experimentar.

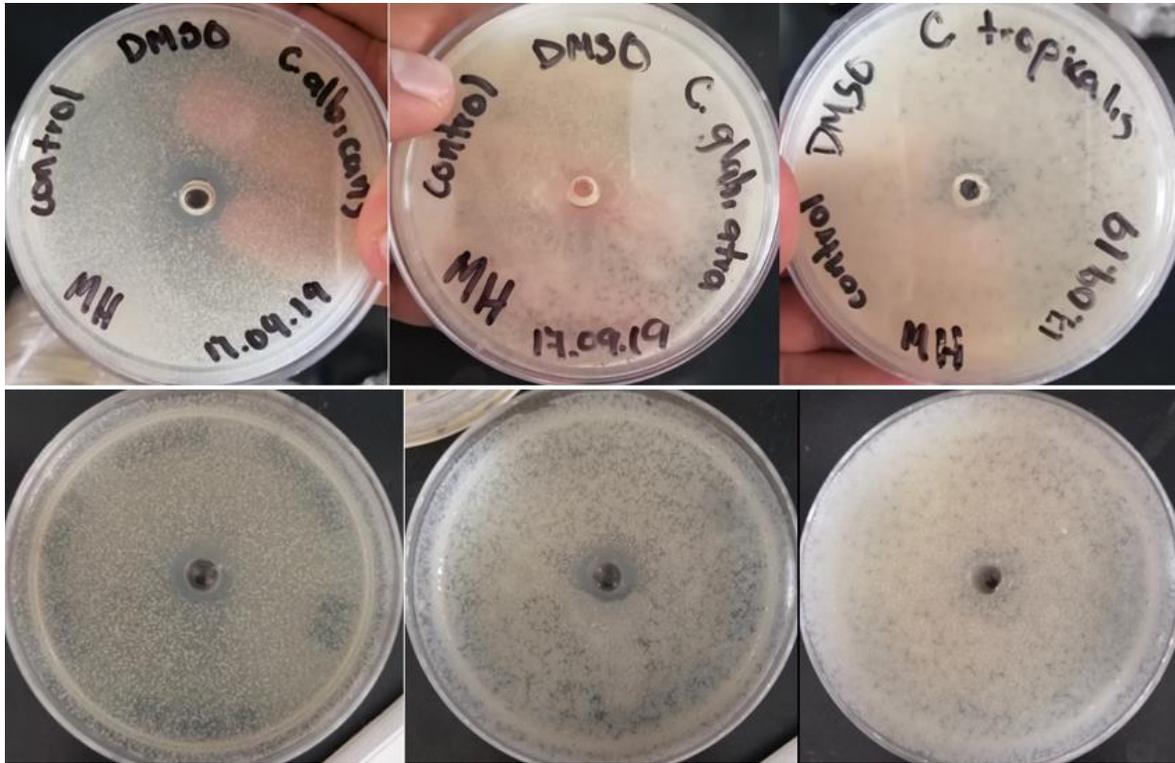


Figura 51.- Prueba control de DMSO

Como se observa en la figura 51 el DMSO no causó algún daño al desarrollo de las levaduras, por lo cual es un disolvente propio para la utilización en este experimento ya que los resultados que se obtengan no se verán influenciados por este disolvente. No hubo susceptibilidad de las levaduras a este disolvente por lo cual el crecimiento de las tres cepas con las que se trabajaron crecieron en todo el agar.

Una vez observado que el DMSO no tenía alguna actividad sobre el crecimiento de los microorganismos, se procedió a montar las pruebas con el fármaco control (Fluconazol) como lo indica el CLSI, se preparó la solución de Fluconazol a una concentración de 25  $\mu\text{g}/100\mu\text{L}$ , y esta solución fue colocada en el orificio generado con la ayuda de un penicilindro en el agar, donde posteriormente se inocularon las cepas correspondientes.

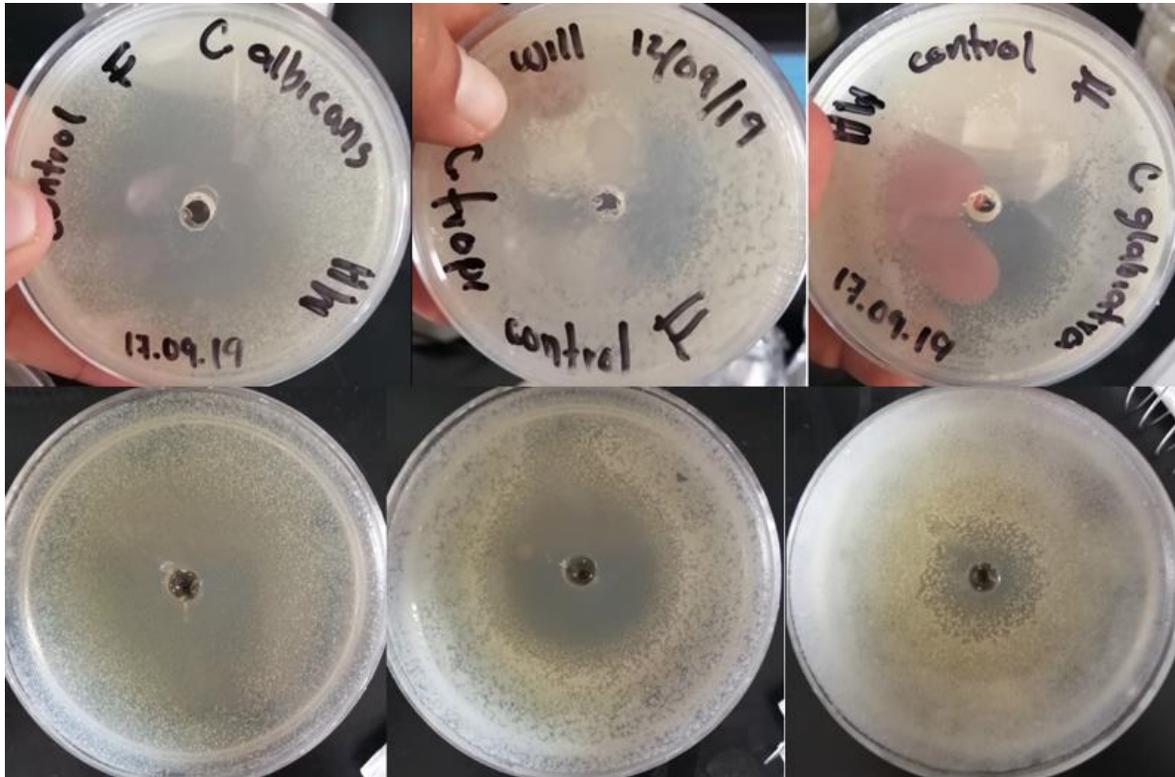


Figura 52.- Prueba control con Fluconazol

Después de 18 h de incubación se observaron cada una de las placas inoculadas con las diferentes cepas de *Candida*, observando los halos de inhibición generados por el fármaco (Fluconazol), como se observa en la figura 52, los halos de inhibición son marcados, percatándose de que en cada una de las cepas el halo de inhibición tiene un diámetro diferente, esto debido a que como bien se sabe, cada microorganismo es susceptible en diferente medida a los fármacos, algunos más que otros. Para determinar el área en el cual el Fluconazol fue capaz de inhibir el crecimiento microbiológico, se midió el diámetro del círculo formado por la inhibición y posteriormente el área del pocillo generado por el penicilindro donde se colocó la muestra fue restada del área del halo, dándonos un área de inhibición generado por el fármaco.

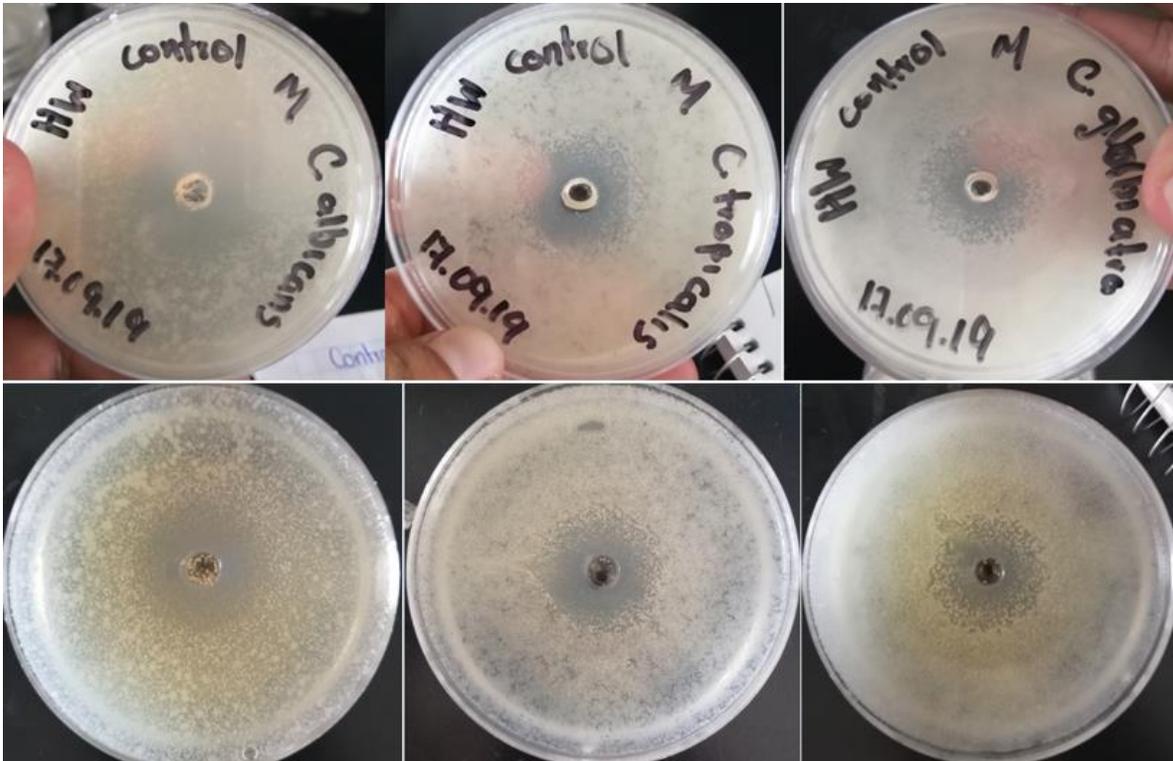


Figura 53.- Prueba control con Metronidazol

Como podemos apreciar en la figura 53, después de 18 h de incubación, en donde el Metronidazol fue colocado en el pocillo que fue generado al centro del agar con un penicilindro, para esto, se disolvió 11.5 mg de Metronidazol en 100  $\mu$ L de DMSO, los cuales fueron colocados en el orificio del centro del agar, el cual fue inoculado con anterioridad con el método de agar blando. Al paso del periodo de incubación se logran observar los halos de inhibición correspondientes a cada una de las cepas los cuales han sido generados por el fármaco (Metronidazol), como se observa el diámetro del halo varía en cada cepa dependiendo de la susceptibilidad de este ante el fármaco.

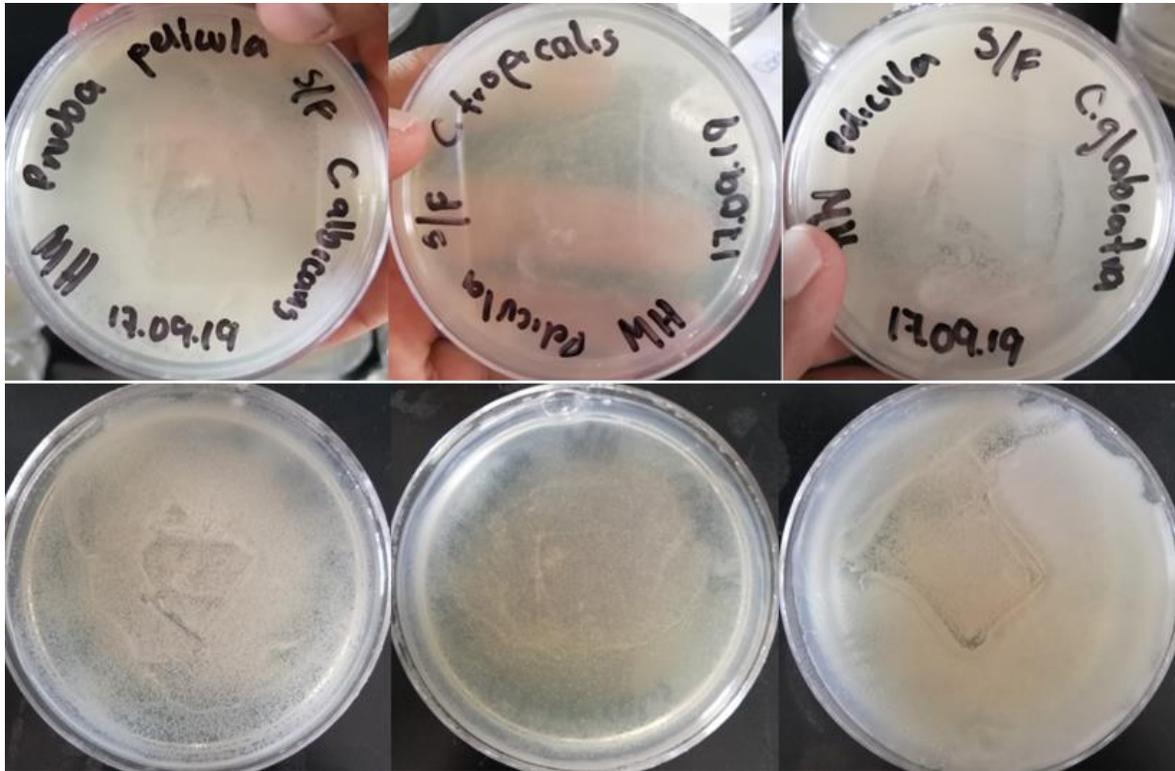


Figura 54.- Prueba de películas sin fármaco

En la figura 54 se puede observar cómo se montó una prueba control con las películas formuladas sin el fármaco (Metronidazol), esta prueba se montó con la finalidad de observar si los componentes de la formulación influían en cierta medida con la susceptibilidad de las cepas y al momento de montar la prueba con la película en la cual el fármaco iba a ir incorporado no arroje un falso positivo, en la imagen podemos percatarnos de que los materiales que constituyen la matriz polimérica no influyen en el desarrollo microbiológico.



Figura 55.- Prueba de película con fármaco

Las películas cargadas con el fármaco fueron formuladas y posteriormente se realizó la experimentación con estas (figura 55), se realizó el sembrado de las diferentes cepas utilizadas en este experimento y la película fue colocada para determinar su efectividad frente a estas cepas de *Candida*, como se puede apreciar en la imagen anterior después de las 18 h de incubación se puede apreciar los halos de inhibición generados en el agar por la película la cual contiene el fármaco (Metronidazol) de interés. El área de inhibición es un tanto irregular, sin embargo, se logró apreciar con facilidad cual es el área determinada por la inhibición del fármaco, observando que la susceptibilidad de *Candida albicans* es mayor en comparación con las otras dos cepas estudiadas. Los bordes son un tanto irregular, por lo cual se piensa que esto se debe a dos factores principales, en el primero destacamos que se puede deber a la nivelación de la incubadora, lo cual provocaría que la placa se encuentre inclinada hacia cierto lado, provocando que al momento de la disolución de la película el flujo sea mayor hacia una dirección determinada por lo cual se provocaría mayor inhibición hacia esa región, el segundo punto a

considerar es la forma de la película mucoadhesiva, la cual cuenta con cuatro vértices en los cuales, el vértice podría provocar que la difusión del fármaco no se dé uniformemente, lo cual provocaría espacios irregulares en la inhibición, sin embargo, el área de inhibición generada por la película es observable a simple vista, el área fue determinada calculando el área de inhibición, restando el área de la película.

Tabla 16.- Áreas de inhibición en los cultivos microbiológicos

	Microorganismo	Área de inhibición (cm <sup>2</sup> )	Promedio de área (cm <sup>2</sup> )			
<b>DMSO</b>	C. albicans	<b>Negativo</b>				
	C. tropicalis	<b>Negativo</b>				
	C. glabrata	<b>Negativo</b>				
<b>Fluconazol</b>	C. albicans	14.02	<b>13.81 ± 1.02</b>			
		14.71				
		12.70				
	C. tropicalis	15.40	<b>14.26 ± 1.05</b>			
		13.35				
		14.02				
	C. glabrata	16.12	<b>15.42 ± 1.21</b>			
		14.02				
		16.12				
<b>Metronidazol</b>	C. albicans	1.77	<b>3.61 ± 2.24</b>			
		6.11				
		2.96				
	C. tropicalis	2.04	<b>3.75 ± 1.50</b>			
		4.41				
		4.81				
	C. glabrata	0.63	<b>2.80 ± 2.09</b>			
		4.81				
		2.96				
<b>Película S/F</b>	C. albicans	<b>Negativo</b>				
		C. tropicalis	<b>Negativo</b>			
		C. glabrata	<b>Negativo</b>			

	Microorganismo	Área de inhibición (cm <sup>2</sup> )	Promedio de área (cm <sup>2</sup> )
Película C/F	C. albicans	13.63	<b>12.58 ± 2.21</b>
		10.04	
		14.06	
	C. tropicalis	5.92	<b>10.56 ± 4.72</b>
		15.35	
		10.40	
	C. glabrata	5.57	<b>4.97 ± 0.77</b>
		5.24	
		4.10	

Como se puede apreciar en la tabla 16, la inhibición del Fluconazol que es el fármaco utilizado como control según lo indica el CLSI tiene un promedio de inhibición sobre la cepa de *Candida albicans* de 13.81 cm<sup>2</sup> ± 1.02, y la película formulada con el fármaco incorporado tiene un área promedio de inhibición de 12.58 cm<sup>2</sup> ± 2.21, lo cual nos hace ver que no existe una gran diferencia entre el control que ya ha sido estudiado y reportado como un fármaco capaz de inhibir el crecimiento microbiológico de *Candida albicans*, la película mucoadhesiva formulada se encuentra a la par de este fármaco (Fluconazol), comparando la formulación con el fármaco (Metronidazol) en solución, podemos apreciar como el área de inhibición de la película es mayor de manera significativa en comparación con la inhibición provocada por el fármaco en solución, por lo cual se puede decir que la película es mejor que el fármaco por sí solo, esto puede deberse a que la desintegración de la película es muy rápida por lo cual el fármaco esta libre en el medio de forma inmediata y de que además la formulación como tal promueve la difusión del fármaco a través del agar por lo cual se espera un área de mayor inhibición en comparación al fármaco que no difunde por lo cual su área de inhibición es reducida. Esto puede ser de gran ayuda al momento de una esperada aplicación clínica de la formulación, ya que la película beneficiaría la difusión del fármaco, por lo cual al momento de la aplicación clínica el fármaco difundiría a través del mucus

vaginal, cubriendo una mayor área, lo cual sería benéfico para el paciente. Se realizó una prueba de comparación de medias en la cual se obtuvo como resultado que las medias entre el Metronidazol en solución y la película cargada con fármaco son diferentes por lo cual se deduce que la película cargada con el fármaco es mejor.

Como bien se ha detallado con anterioridad, las películas sufren cambios físicos a través del tiempo, esto debido a diversas circunstancias entre las cuales hemos destacado con gran énfasis la pérdida de humedad en la formulación, por lo cual se ha realizado una prueba de la eficacia de las películas pasando un mes de tiempo, en el cual las películas se han formulado y se han resguardado por un lapso de un mes, en condiciones aisladas y tratando de mantener la humedad de estas, evitando cambios de temperatura, entre otras cosas, de este lote de películas formuladas se ha evaluado la inhibición de estas al tiempo 0, cabe destacar que estas pruebas fueron realizadas por triplicado en cepas de *Candida albicans* debido a que como se observó en las pruebas realizadas con anterioridad las películas formuladas con el fármaco incorporado tuvieron una mayor eficacia en estas cepas. De igual manera se realizó la prueba cortando las películas en forma circular para evitar la influencia de los vértices de las películas cuadradas, y no tomar este factor en cuenta al momento de observar el área de inhibición.



Figura 56.- Prueba de películas con fármaco en forma circular al tiempo 0

Como se puede observar en la figura 56, las películas formuladas y cortadas en forma circular han inhibido de gran manera el crecimiento microbiológico de las cepas de *Candida*, estas películas son utilizadas al tiempo 0 de su formulación, sin embargo se logra apreciar que la difusión del fármaco se inclinó más hacia una dirección por lo cual se puede concluir que la incubadora puede estar inclinada hacia una dirección, por lo cual al momento de iniciar la desintegración de la película donde el fármaco se libera, este se realiza hacia una dirección determinada por lo cual se observa que la inhibición no es uniforme. Se determinó el área de inhibición obteniendo un promedio de  $3.19 \text{ cm}^2 \pm 0.43$ .



Figura 57.- Prueba de películas con fármaco en forma circular a la semana 4

Una vez transcurrida las 4 semanas en las cuales las películas formuladas fueron conservadas tratando de evitar la pérdida de humedad de estas, las películas fueron utilizadas en las pruebas para determinar su efectividad en la inhibición del crecimiento microbiológico de las cepas de *Candida*. Como se aprecia en la figura 57 el área de inhibición es mucho menor a el área de inhibición obtenida al tiempo 0 de la formulación de las películas (figura 56). Se puede observar que el área de inhibición es poca, casi no es apreciable, por lo cual se puede considerar que la rigidez de las películas fue debido a la pérdida de humedad y la consecuente recristalización del fármaco, por lo cual el área obtenida después de las 18 h de

incubación es muy poca, esto puede deberse principalmente a que el fármaco ya no se encuentra en un estado molecular al interior de la película por lo cual al entrar en contacto con el agar este no difunde de forma inmediata, debido a que los cristales primeramente tienen que disolverse para posteriormente difundir a través del agar, por lo cual el área que abarcaría en su difusión sería menor que la conseguida al tiempo 0 de la fabricación de la película donde el fármaco se encuentra disuelto en la formulación por lo cual se difusión es inmediata una vez que se encuentra en contacto con el agar y la película es hidratada. Se caculo el área de inhibición obteniendo un área de  $0.69 \text{ cm}^2 \pm 0.30$ .

## 11. CONCLUSIONES

Se desarrollaron y optimizaron películas mucoadhesivas mediante la técnica de moldeo, utilizando una combinación de polímeros y plastificante, que mediante un diseño experimental a través del programa estadístico Statgraphics se obtuvo la formulación ideal en base a las características físicas que se decidieron evaluar. Las películas formuladas tienen buen espesor (0.12 mm), % de hinchamiento (115.53%), tiempo de desintegración de la película (5.53 min), tiempo de disolución de la película (142.27 min) y una fuerza de mucoadhesión 7.35 N. Se cuantificó el fármaco que se tiene en las películas obteniendo que, en cada  $\text{cm}^2$ , se tiene un aproximado de 2.95 mg. Se evaluó la liberación del fármaco de las películas, obteniendo películas de liberación inmediata, debido a que el fármaco es cuantificado en un 100% en los primeros 5 minutos. Al evaluar la estabilidad el fármaco mediante la espectroscopia Raman, se observó que después de someter la película a un estrés de temperatura de 40 °C por un mes, la película se mantuvo estable, sin crear ninguna interacción entre el fármaco y los excipientes. Sin embargo, después de cierto tiempo se logró apreciar a simple vista que las películas se tornaron opacas y ásperas, por lo cual se decidió observarlas al microscopio durante determinados tiempos a lo largo de un mes, observando que en estas se aprecia nivel microscópico cristales de fármaco después de la primer semana, ocasionando una inestabilidad en las películas, sirve destacar que estos cristales no fueron detectables por la espectroscopia Raman, por diversas circunstancias entre las cuales se puede destacar la sensibilidad del método. Estas películas de igual manera se evaluaron para verificar su efectividad inhibitoria del crecimiento de cepas de *Candidas*, los cuales son microorganismos de gran prevalencia reportados en alto grado en infecciones vaginales, por lo cual, se evaluó la efectividad de estas películas conforme a lo indicado el manual de CLSI, obteniendo una muy buena inhibición del crecimiento microbiológico al tiempo 0 de la fabricación de la película, de igual manera se evaluó la actividad inhibitoria de las películas al mes de ser fabricadas, observando que la inhibición disminuyó considerablemente, pudiendo deberse principalmente a la recristalización del fármaco.

## 12. PERSPECTIVAS

Las películas que han sido formuladas tienen propiedades físicas ideales al momento de su formulación, debido a que liberan el fármaco de forma inmediata por lo cual el fármaco puede estar disponible a los primeros minutos de la aplicación en la zona requerida, de igual manera poseen una buena fuerza de mucoadhesión, por lo cual podrá adherirse sin complicaciones a la mucosa vaginal, siendo perfectamente manipulable debido a su buen espesor y a su buena resistencia al plegado. Sin embargo, después de tiempo determinado estas se vuelven inestables, debido a la recristalización del fármaco.

La alternativa sugerida para evitar este proceso de recristalización, se basa en evitar la pérdida de humedad de la película, resguardando está en un lugar donde se evite los cambios de temperatura que ocurren en el ambiente, de igual manera una alternativa sugerida es reducir la cantidad de fármaco utilizada en la formulación, esto evitara llegar al punto máximo de saturación de a solución polimérica por la cual se evitaría la recristalización del fármaco. De igual manera una propuesta más sería aumentar las concentraciones de los primeros por lo cual la cantidad de fármaco no afectaría en la recristalización, para esto se tendrían que conseguir recipientes de mayor altura para de esta manera poder vaciar las soluciones poliméricas que serían de mayor volumen.

### 13. BIBLIOGRAFÍA

1. Aka-Any-Grah A, Kawthar Bouchemal, Armand Koffi, Florence Agnely, Min Zhang, Madeleine Djabourov, Gilles Ponchel (2010). Formulation of mucoadhesive vaginal hydrogels insensitive to dilution with vaginal fluids. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*
2. Allen LV, Popovich NG, Anse HC (2011). *Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems*, 9th ed. Williams & Wilkins, Philadelphia.
3. Amit A, Sharma Sharad, Ajazuddin, Khan Mohammed, Junaid Swarna (2011). Theories and factors affecting mucoadhesive drug delivery systems. *Internacional journal of research in ayurveda and pharmacy*, 2(4), 115-1161.
4. ASTM (2001). Standard test method for tensile properties of thin plastic sheeting. Designation D882-Annual book of ASTM standards, Philadelphia: ASTM, American Society for Testing Materials.
5. Barnhart S, Rathbone MJ, Hadgraft J, Roberts MS, Lane ME, (2008). Thin film oral dosage forms: Modified-release Drug Delivery Technology, Informa Healthcare. pp. 209–216.
6. Bassi Pallavi and Gurpreet Kaur (2015). Bioadhesive vaginal drug delivery of nystatin using a derivatized polymer: Development and characterization. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 96:173–184.
7. Bassi Pallavi and Gurpreet Kaur (2017). Polymeric films as a promising carrier for bioadhesive drug delivery: Development, characterization and optimization. *Saudi Pharmaceutical Journal*:25, 32–43.
8. Berkhout Robin (2002). *Candida albicans*. *Rev Iberoam Micol*.
9. Boateng JS, Auffret AD, Matthews KH, Humphrey MJ, Stevens HN, Eccleston GM (2010). Characterisation of freeze-dried wafers and solvent evaporated films as potential drug delivery systems tomucosal surfaces, *Int. J. Pharm.* 389:24–31.
10. Boddupalli BM, Mohammed ZNK, Nath A, Banji D (2010). Mucoadhesive drug delivery system: an overview, *J. Adv. Pharm. Technol. Res.* 1:381–387.
11. Botash Ann S (2004). Vaginitis: Lecture as Vice Chair for Educational Affairs, Director, CARE Program, Professor of Pediatrics, Department of Pediatrics, State University of New York Upstate Medical University.

12. Cantón Lacasa E, Estrella Martín Mazuelos and Ana Espinel-Ingroff (2007). Métodos estandarizados por el CLSI para el estudio de la sensibilidad a los antifúngicos (documentos M27-A3, M38-A y M44-A). Revista Iberoamericana de Micología - ISBN: 978-84-611-8776-8.
13. Cao N, Yang X, Fu Y (2009). Effects of various plasticizers on mechanical and wáter vapor barrier properties of gelatin films, Food Hydrocoll. 23:729–735.
14. Caramella CM, Silvia Rossi, Franca Ferrari, Maria Cristina Bonferoni, Giuseppina Sandri (2015). Mucoadhesive and thermogelling systems for vaginal drug delivery. Advanced Drug Delivery Reviews 92:39–52.
15. Cardona Arias, Jaiberth Antonio, Marleny Valencia Arredondo, Jennifer Suárez Henao, Daniela Herrera Posada (2015). Prevalencia de vaginosis bacteriana en usuarios de una institución presentadora de servicios de salud de Medellín Colombia. ISSN 0124-8146-Rev.Investigaciones Andina N. 30 Vol. 17-130p.
16. Carvalho, Flávia Chiva, Marcos Luciano Bruschi, Raul Cesar Evangelista, Maria Palmira Daflon Gremião (2010). Mucoadhesive drug delivery systems. Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences vol. 46, n. 1. <http://www.scielo.br/pdf/bjps/v46n1/02.pdf>
17. Castillo Cañadas AM (2011). Anatomía y fisiología del aparato reproductor femenino y de la mama. Complejo hospitalario universitario de Albacete.
18. Castro Ruiz Jean M, Vallejo Diaz BM and Helber J. Barbosa Barbosa (2016). Diseño de un Sistema bioadhesivo de clorhexidina empleando pullulan como matriz para uso en mucosa oral. Departamento de Farmacia, Universidad Nacional de Colombia. Rev. Colomb. Cienc. Quim. Farm., vol 45(1), 48-76.
19. Cazorla Luna Raúl (2015). Formulaciones de administración vaginal para la prevención del herpes genital. Facultad de Farmacia, Universidad Complutense.
20. Cilurzo FI, Cupone P, Minghetti F, Selmin L, Montanari (2008). Fast dissolving films made of maltodextrins, European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics 70:895–900.

21. Ciudad-Reynaud A (2007). Infecciones vaginales por *Candida*: Diagnóstico y tratamiento. *Rev Per Ginecol Obstet.* 53:159-166.
22. Córdova A (2003). Anatomía y fisiología del aparato reproductor masculino y femenino. Tema 46. Editorial Masson. Barcelona, España.
23. Costamagna S and Visciarellin E (2008). Parasitosis regionales. 2ª Ed. Buenos Aires; Editorial de la Universidad del Sur; ISBN: 978-987-1171-89-7.
24. Díez M and Díaz A (2011). Sexually transmitted infections: epidemiology and control. *Revista española de sanidad penitenciaria.* 13(2):58-66.
25. Dixit RS and Puthli (2009). Oral strip technology: overview and future potential, *Journal of Controlled Release* 139:94–107.
26. Domingo A (2005). Enfermedades de transmisión sexual. *Pediatr Integral.* 9(2):105-20.
27. Donders G (2010). Diagnosis and Management of Bacterial Vaginosis and Other Types of Abnormal Vaginal Bacterial Flora: A review. *Obstetrical and Gynecological survey.* 65(7):46.
28. Fawcett DW (1995). Tratado de histología. 12º edición. Interamericana-McGraw Hill. España. Pp. 930.
29. Felton P, Donnell PO, McGinity J (2008). Mechanical properties of polymeric films prepared from aqueous dispersions, in: J. McGinity, L. Felton (Eds.), *Aqueous Polymeric Coatings for Pharmaceutical Dosage Forms*, 3rd edition, Informa Healthcare, New York. pp. 105–128.
30. Flores Paz R, Rivera Sánchez R, García Jiménez E, Arriaga Alba M (2003). Etiología de la infección cérvico vaginal en pacientes del Hospital Juárez de México. *Salud Publica Mex;* 45 suppl 5:S694-S697.
31. Fuentes Yalli, Lina and Ana Pastor de Abram (2009). Preparación, caracterización y evaluación de películas de quitosano proveniente de calamar gigante “*Dosidicus gigas*” para uso médico. Pontificia Universidad Católica del Perú. *Rev Soc Quim Peru.* 75(1).
32. Fulzele SV, Satturwar PM, Dorle AK (2002). Polymerized rosin: novel film forming polymer for drug delivery, *Int. J. Pharm.* 249:175–184.

33. García MA, Soberón E, Cortés M, Rodríguez R, Herrera JL, Alcántara A (2002). Guía de validación de métodos analíticos. Editada por el colegio nacional de Químicos farmacéuticos biólogos México, A.C.
34. González-Pedraza A, Mota Vázquez R, Ortiz Zaragoza C and Ponce Rosas RE (2004). Factores de riesgo asociados a vaginosis bacteriana. *Aten:* 34(7):360-5
35. Hearnden V, Sankar V, Hull K, Juras DV, Greenberg M, Kerr AR, Lockhart PB, Patton PL, Porter S, Thornhill MH (2012). New developments and opportunities in oral mucosal drug delivery for local and systemic disease, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 64:16–28.
36. Hernández Alvarez HM; Sariago Ramos I; Sarracent Pérez J (2009). Infección humana por *Trichomonas vaginalis* y su relación con otros agentes patógenos. *Revista Cubana de Obstetricia y Ginecología.* 35(4):108-117.
37. Holmes KK and Stamm WF (1999). Bacterial vaginosis. In: Holmes KPK, Mardh P, editors. *Sexually Transmitted Diseases.* 3rd ed. New York: McGraw-Hill. pp:563-86.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2004.11.034>.  
[http://www.chospab.es/area\\_medica/obstetriciaginecologia/docencia/seminarios/2011-2012/sesion20111102\\_1.pdf](http://www.chospab.es/area_medica/obstetriciaginecologia/docencia/seminarios/2011-2012/sesion20111102_1.pdf)
38. <https://www.drugbank.ca/structures/DB00916/image.svg>
39. Hussain F and Ahsan F (2005). The vagina as a route for systemic drug delivery, *J. Control. Release* 103:301–313.
40. Indira MY and Srujana K (2012). Mucoadhesive buccal films of gibenclamide: Development and evaluation. <http://www.jpionine.org> on Thursday. IP: 132,248.103.1
41. Lindenberg M, Kopp S, Dressman JB (2004). Classification of orally administered drugs on the World Health Organization Model List of Essential Medicines according to the biopharmaceutics. Classification system. *Eur J Pharm Biopharm* 58:265–278.

42. Llabot JM, Palma SD, Manzo RH, Allemandi DA (2007). Design of novel antifungal mucoadhesive films. Part II. Formulation and in vitro biopharmaceutical evaluation, *Int. J. Pharm.* 336:263–268.
43. López Abraham AM, Artilles Mde L, Fernández Masso JR, San Martín DG, Alonso M, Álvarez Rodríguez E (2005). Evaluation of an agglutination method with latex particles sensitised for the diagnosis of vaginal trichomoniasis. *Revista cubana de medicina tropical.* 57(2):133-6.
44. Magnusson B and Ornemark U (2014). *Eurachem Guide: The fitness for purpose of analytical methods (2da ed.) EURACHEM.*
45. Mavroidi A, Tzouvelekis LS, Tassios PT, Fletmetakis A, Danilidou M, Tzelepi E (2000). Characterization of *Neisseria gonorrhoeae* strains with decreased susceptibility to fluoroquinolones isolated in Greece from 1996 to 1999. *J. Clin. Microbiol.* 38: 3489-91.
46. Mollan M, Ghebre-Sellassie I, Martin C (2003). Historical overview. *Pharmaceutical Extrusion Technology*, CRC Press. pp. 1–18.
47. Morales JO and McConville JT (2011). Manufacture and characterization of mucoadhesive buccal films. College of Pharmacy, University of Texas at Austin, USA. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 77:187-199.
48. Owen DH and Katz DF (1999). A vaginal fluid simulant, *Contraception* 59:91–95.
49. Patel VM, Prajapati BG, Patel MM (2007). Effect of hydrophilic polymers on buccoadhesive eudragit patches of propranolol hydrochloride using factorial design, *AAPS Pharm. Sci. Technol.* 8:E119–E126.
50. Peh KK, Wong CF (1999). Polymeric films as vehicle for buccal delivery: swelling, mechanical, and bioadhesive properties, *J. Pharm. Pharm. Sci.* 2:53–61.
51. Perea EJ (2010). Infecciones del aparato genital femenino: vaginitis, vaginosis y cervicitis; Departamento de Microbiología; Universidad de Sevilla; Sevilla, España; *Medicine.* 10(57):3910-4.

52. Prabhushankar GL, Gopalakrishna B, Manjunath KM, Girish CH (2010). Formulation and evaluation of levofloxacin dental films for periodontitis, *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.* 2:162–168.
53. Rediguieri CF, Porta V, Nunes D, Nunes TM, Junginger HE, Kopp S, Midha KK, Shah VP, Stavchansky S, Dressman JB, Barends DM (2011). Biowaiver monographs for immediate release solid oral dosage forms: metronidazole. *Journal of pharmaceutical sciences*, Vol. 100, no. 5.
54. Repka MA, Battu SK, Upadhye, Thumma S, Crowley MM, Zhang F, Martin C, McGinity JW (2007). Pharmaceutical applications of hot-melt extrusion: Part II Drug Development and Industrial Pharmacy 33:1043–1057.
55. Ríos Cárdenas KO (2018). Preparación y caracterización de hidrogeles de quitosán y poloxámero 407, cargados con un lisado plaquetario. Tesis para obtener grado. UAEM.
56. Rodríguez IC, Cerezo A, Salem II (2000). Sistemas de liberación bioadhesivos. *Ars Pharmaceutica*, 41: v1; 115-128.
57. Rojas J, Ramírez T, Jaimes F (2004). Prevalencia de Vaginosis bacteriana en el embarazo. *Ginecol obstet.* 50(2):101-5.
58. Ross MH and Pawlina W (2013). *Histología: texto y atlas color con biología celular y molecular*. 6<sup>o</sup> edición. Primera reimpresión. Buenos aires: Medica paramericana.
59. Sahar S and Boddohi S (2017). New formulation and approach for mucoadhesive buccal film of rizatriptan benzoate. *Prog Biomater.* 6:175–187.
60. Salamat-Miller N, Chittchang M, Johnston TP (2005). The use of mucoadhesive polymers in buccal drug delivery, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 57:1666–1691.
61. Sandri GS, Rossi F, Ferrari MC, Bonferoni C (2007). Strategies to improve systemic and local availability of drugs administered via vaginal route, in: E. Touitou, B.W. Barry (Eds.), *Enhancement in Drug Delivery*, Taylor and Francis CRC Press, Boca Raton FL. pp. 441–470.

62. Saroj KR and Prabhakar B (2010). Bioadhesive Polymeric Platforms for Transmucosal drug delivery systems. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*: 9 (1): 91-104
63. Sassi AB, McCullough KD, Cost MR, Hillier SL, Rohan LC (2004). Permeability of tritiated water through human cervical and vaginal tissue, *J. Pharm. Sci.* 93: 2009–2016, <http://dx.doi.org/10.1002/jps.20107>.
64. Senel SG, İkinci S, Kaş A, Yousefi-Rad MF, Sargon AA (2000). Chitosan films and hydrogels of chlorhexidine gluconate for oral mucosal delivery, *J. Pharm.* 193:197–203.
65. Shennan A, Crawshaw S, Briley A, Hawken J, Seed P, Jones G, Poston L (2006). A randomised controlled trial of metronidazole for the prevention of preterm birth in women positive for cervicovaginal fetal fibronectin: the PREMETS study, *BJOG*. 113(1):65-74.
66. Shidhaye SS, Saindane NS, Sutar S, Kadam V (2008). Mucoadhesive bilayered patches for administration of sumatriptan succinate, *AAPS Pharm. Sci. Technol.* 9:909–916.
67. Smart JD (2005). The basics and underlying mechanisms of mucoadhesion, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 57:1556–1568.
68. Sobel JD (2000). Bacterial vaginosis. *Annu Rev Med.* 51:349-56.
69. Suresh SD, Chandrasekharan G, Sudarsanan D, Prathapan A (2018). Mucins: Structural diversity, biosynthesis, its role in pathogenesis and as possible therapeutic targets. *Critical Reviews in Oncology / Hematology* 122. 98–122.
70. Tolosa JE, Chaithongwongwatthana S, Daly S, Maw WW, Gaitan H, Lumbiganon P (2006). The International Infections in Pregnancy (IIP) study: variations in the prevalence of bacterial vaginosis and distribution of morphotypes in vaginal smears among pregnant women. *American journal of obstetrics and gynecology*. 195(5):1198-204.
71. Tortora G and Derrickson B (2012). *Principios de Anatomía y fisiología*. 13<sup>o</sup> edición. Editorial panamericana. España. P.p. 1154.

72. Unemo M and Shafer W (2014). Antimicrobial Resistance in *Neisseria gonorrhoeae* in the 21st Century: Past, Evolution, and Future. *Clinical Microbiology Reviews*. 27(3):587-613.
73. Valdeiglesias-Cabrera N and Medrano-Vásquez AO (2001). Vaginitis en mujeres sexualmente activas. Centro de Salud Urubamba. *SITUA*. 10(19):47-49.
74. Valenta C (2005). The use of mucoadhesive polymers in vaginal delivery, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 57:1692–1712.
75. Vallejo Díaz BM and Perilla JE (2008). Elementos conceptuales para estudiar el comportamiento bioadhesivo en polímeros. *Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm.* Vol. 37 (1).
76. Vallejo Díaz BM and Perilla JE (2008). Elementos conceptuales para estudiar el comportamiento bioadhesivo en polímeros. *Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm.* Vol. 37 (1)
77. Vanegas G, Boggiano G, Castro E (2011). Prevalencia de vaginosis bacteriana en trabajadoras sexuales chilenas. *Rev Panam Salud Pública*. 30(1):46-50.
78. Vermani K and Garg S (2000). The scope and potential of vaginal drug delivery, *Pharm. Sci. Technol.* 359–364, [http://dx.doi.org/10.1016/S1461-5347\(00\)00296-0](http://dx.doi.org/10.1016/S1461-5347(00)00296-0).
79. Villa Giraldo M, Escobar Botero S, Tamayo Acevedo L (2002). Validación de la prueba de Papanicolaou en el diagnóstico de vaginosis bacteriana. *Antioquia, Colombia*. 15(1):50-5.
80. Viridén A, Wittgren B, Larsson A (2009). Investigation of critical polymer properties for polymer release and swelling of HPMC matrix tablets, *Eur. J. Pharm. Sci.* 36:297–309.
81. Voynow JA and Rubin BK (2009). Mucins, Mucus, and Sputum. *CHEST*. 135:505-512.
82. Yan WS, Wen J, Liu Z (2009). Determination of reduced Young's modulus of thin films using indentation test, *Acta Metall. Sin. (Engl. Lett.)* 22:468–480.

83. Young GL and Jewell D (2001). Topical treatment for vaginal candidiasis (thrush) in pregnancy. Cochrane Database of Systematic Reviews, Issue 4. Art. No CD000225. DOI:10.1002/14651858.CD000225.
84. Zhang J, Ying Y, Pielecha-Safira B, Bilgili E, Ramachandran R, Romañach R, Davé RN, Iqbal Z (2014). Raman spectroscopy for in-line and off-line quantification of poorly soluble drugs in strip films. International Journal of Pharmaceutics 475:428–437.

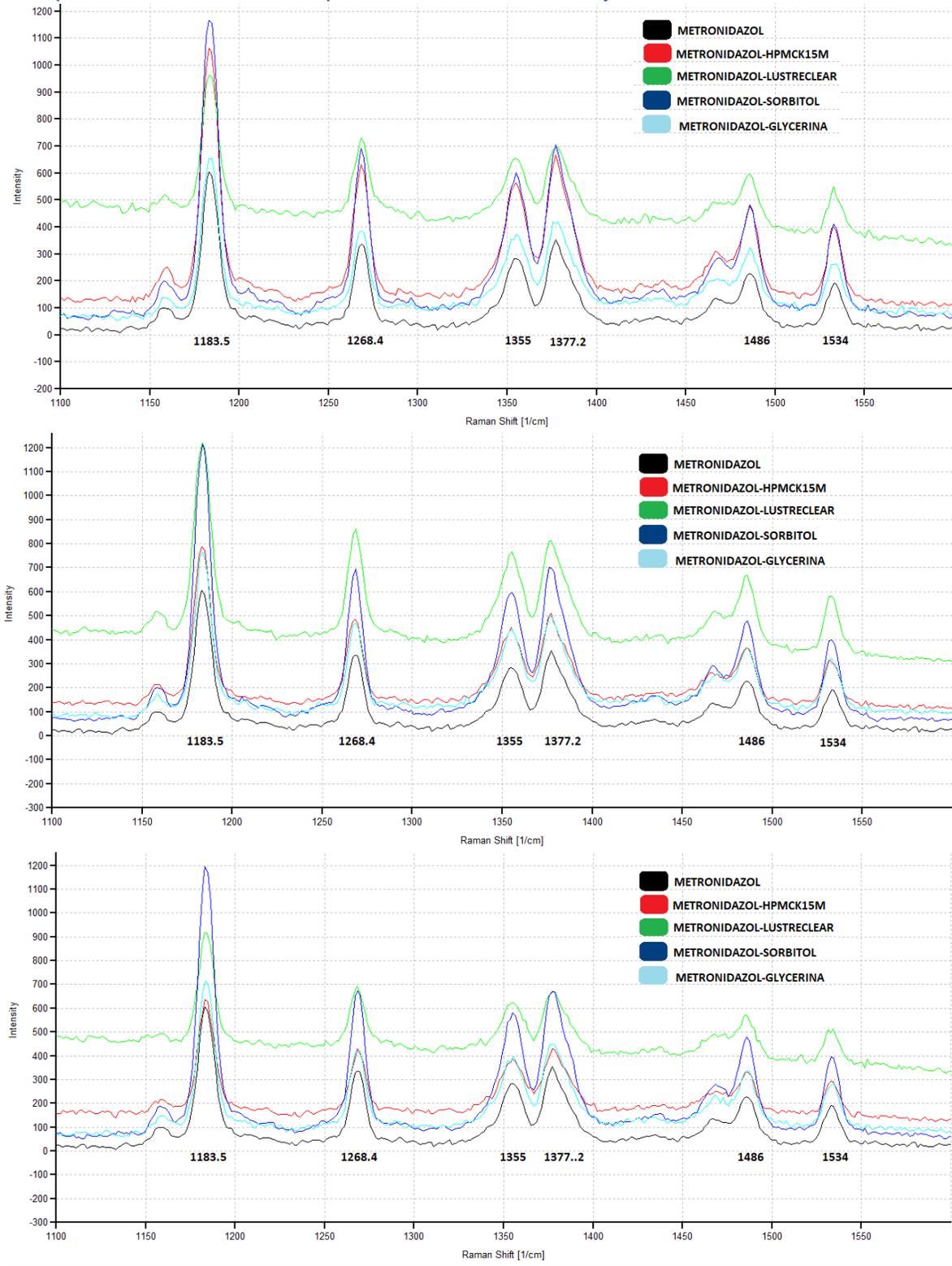


Exactitud del método analítico

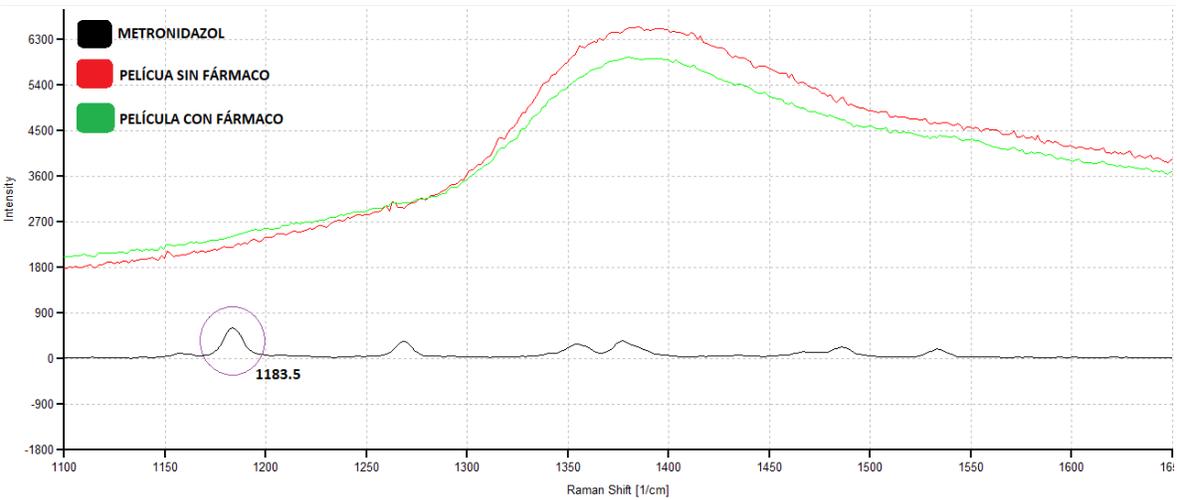
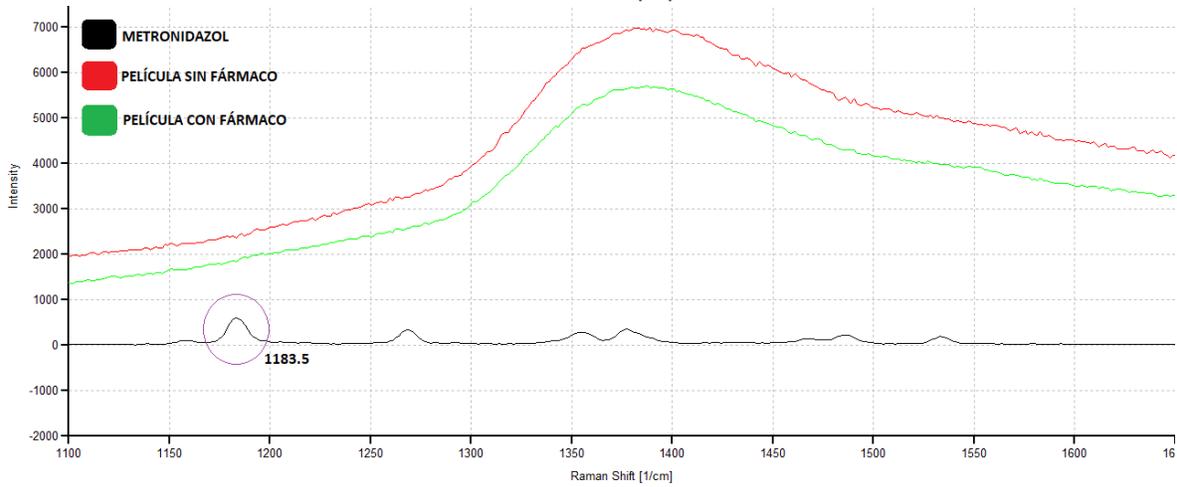
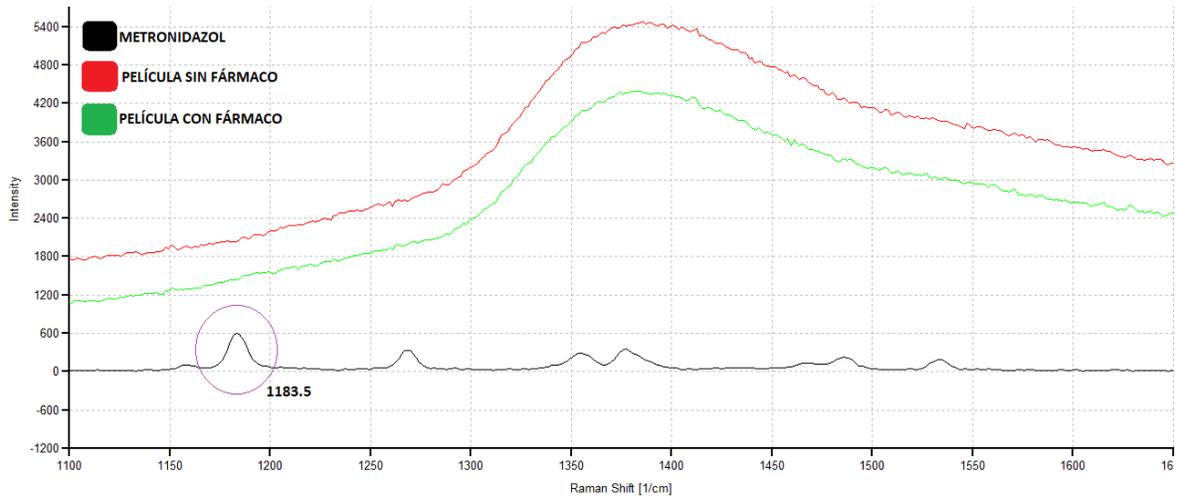
CONCENTRACIÓN	ABS	ABS/CONCENTRACIÓN
5	0.2782	0.05564
5	0.281	0.0562
5	0.2765	0.0553
15	0.812	0.054133333
15	0.843	0.0562
15	0.8266	0.055106667
25	1.3566	0.054264
25	1.3274	0.053096
25	1.3295	0.05318
	MEDIA:	0.054791111
	DES.VES:	0.00118473
	%CV:	<b>2.162267599</b>

CONCENTRACIÓN TEÓRICA	CONCENTRACIÓN REAL	% DE RECOBRO
MEDIA:	14.99135802	100.5185185
DES.VES:	8.498397785	1.807311692
%CV:	56.68864536	1.797988787
INTERVALO CONFIANZA:	5.552184529	1.180755275
LIMITE INFERIOR:	9.439173496	99.33776324
LIMITE SUPERIOR:	20.54354255	101.6992738

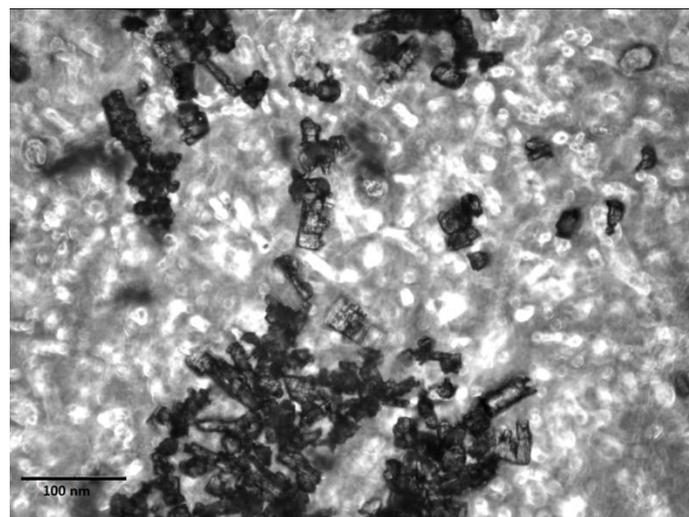
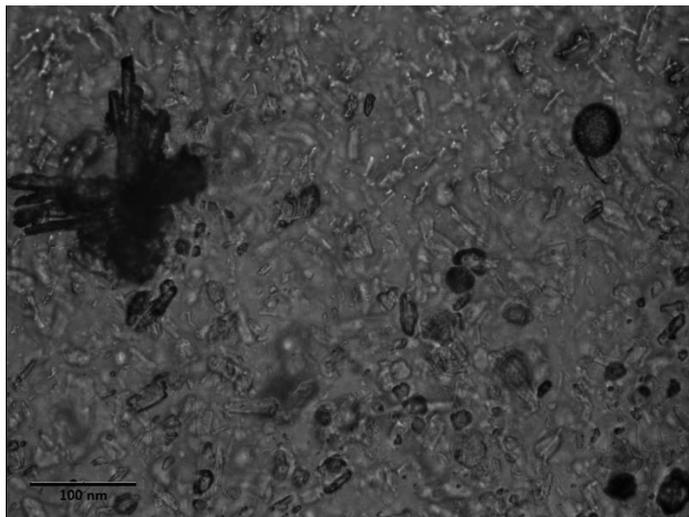
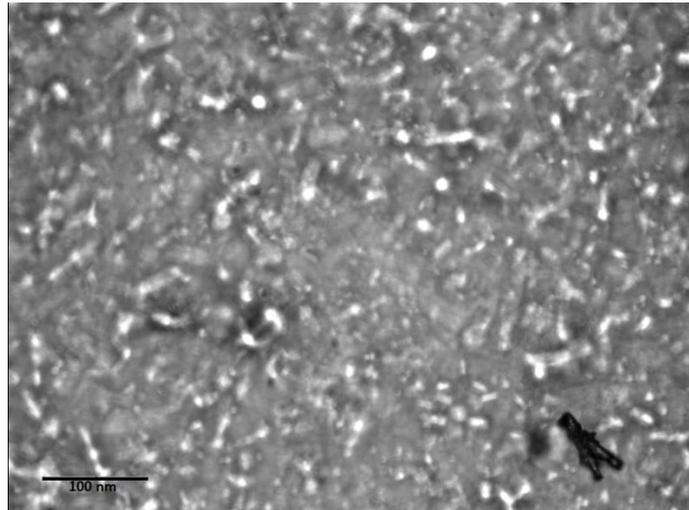
### Compatibilidad fármaco excipiente a la semana 1, 2 y 3.



### Seguimiento espectrofotométrico Raman de las películas de la semana 1, 2 y 3.

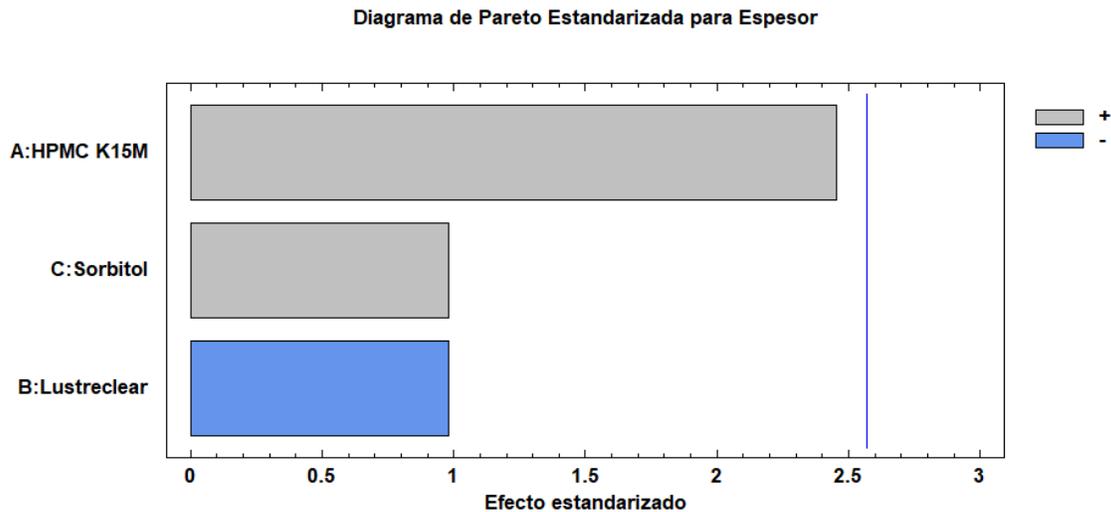


Fotografías de microscopia de contraste de fases de las películas con fármaco a la semana 1, 2 y 3. (Aumento en 40x)



### Espesor (Considerando interacciones primarias)

Los diferentes resultados obtenidos de espesor de las diferentes formulaciones fueron analizados con el programa estadístico. Se realizó un análisis estadístico con la finalidad de observar la influencia de cada uno de los factores evaluados, con la finalidad de observar el efecto que cada uno producía de forma individual sobre las variables de respuesta.

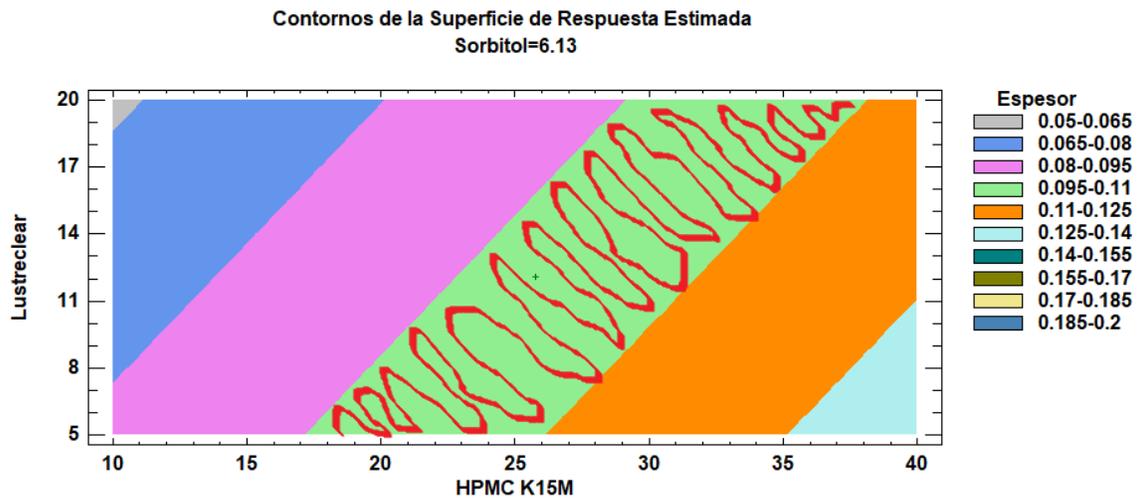


En el diagrama de Pareto para espesor mostrado anteriormente se analizó únicamente el efecto que ejerce cada uno de los factores de manera individual sobre el espesor de la película. Se puede observar que el HPMC K15M es el factor que influye en mayor proporción en la variable espesor, por lo cual al aumentar la cantidad de HPMCK15M el espesor aumenta de manera positiva, de igual manera en el diagrama se puede distinguir que el sorbitol es un plastificante que al aumentar en cantidad de igual manera afecta de manera positiva en el aumento del espesor aunque en menor proporción que el HPMC K15M, por el contrario se logra visualizar que el lustreclear es un factor que entre mayor cantidad exista el espesor ira disminuyendo ya que tiene un efecto negativo sobre este, al observar los tres

factores de estudio se logra observar que ninguno afecta de forma estadísticamente significativa sobre el espesor de la película ( $p < 0.05$ ).

Observando el diagrama de Pareto, se logra ver que el sorbitol es el factor que afecta en menor proporción la variable espesor por lo cual se realiza una optimización de respuesta, estableciendo el valor de espesor en 0.1 mm, con la finalidad de obtener valores de los factores, para posteriormente fabricar la película y obtener el valor deseado de espesor.

Para obtener un valor de espesor de 0.1 mm, se debe mezclar 25.77% de HPMC K15M, 12.06% de lustreclear y 6.13% de sorbitol. Con la finalidad de obtener valores cercanos a la optimización, se obtuvo un gráfico de contorno de superficie estimada.



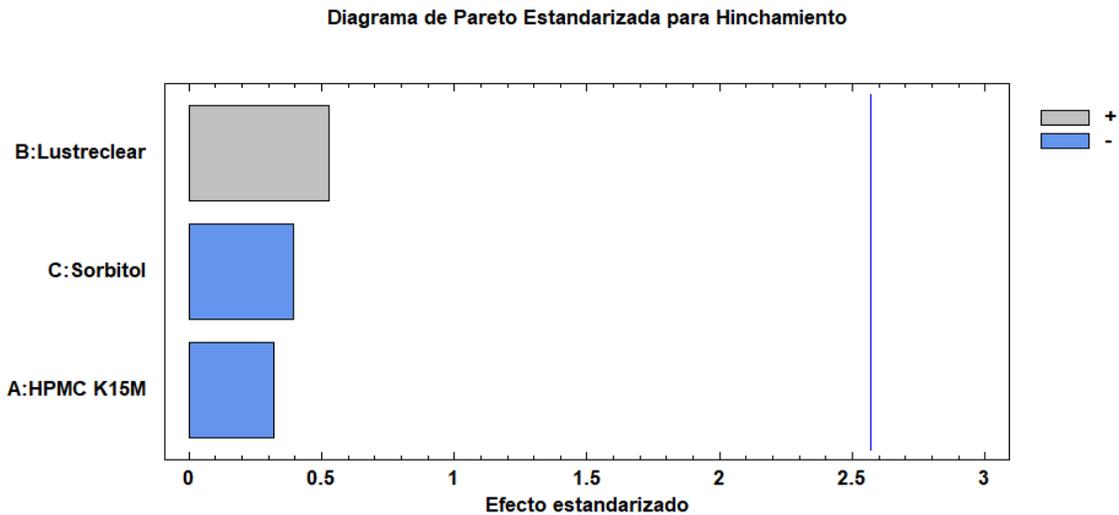
El gráfico de contorno de superficies estimadas es una herramienta que nos permite desplazar los diferentes factores en estudio con la finalidad de poder obtener los valores de espesor deseados, si mantenemos el sorbitol en un valor de 6.13%, y desplazamos los valores de lustreclear entre 5% y 20% y los valores de HPMCK15M

entre valores de 17% a 38%, podremos obtener valores de espesor entre 0.095 mm a 0.11 mm (Región verde).

El análisis estadístico de esta variable de respuesta nos da una **R= 61.36%**, lo cual nos indica la reproducibilidad del método.

### Hinchamiento

Se obtuvieron diversos resultados de hinchamiento de las diversas formulaciones, el hinchamiento más alto obtenido de 220.62% y el hinchamiento más bajo fue de 88.46%, los resultados fueron analizados en el programa estadístico, con la finalidad de observar los efectos de cada uno de los factores sobre la variable hinchamiento.

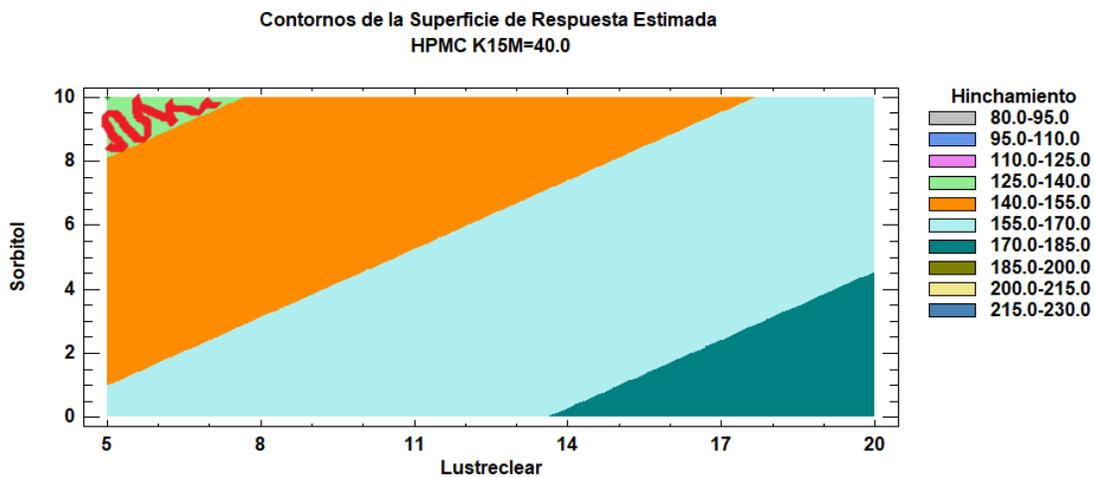


En el diagrama de Pareto estandarizado para el hinchamiento se puede apreciar como el lustreclear es el factor que incluye en mayor proporción en el hinchamiento de la película, sin embargo lo hace de una manera negativa, cuanto mayor sea la cantidad de lustreclear en la formulación influirá en mayor medida de una forma negativa en el hinchamiento de la película, caso contrario al sorbitol, ya que este influye de una manera positiva el hinchamiento de la película, pero lo hace en menor medida al lustreclear, de igual manera el HPMC K15M influye de una manera positiva el hinchamiento de la película, sin embargo su influencia es en menor

medida que el lustreclear y el sorbitol, los tres factores estudiados no afectan de una forma estadísticamente significativa el hinchamiento de la película ( $p < 0.05$ ).

Se establece realizar una optimización del hinchamiento de la película mediante el programa estadístico, estableciendo el valor de hinchamiento en 120%, esto se requiere para que la película libere el fármaco en un buen tiempo y este realice su efecto terapéutico en la zona.

Para obtener un valor de 135.99%, que es el valor que el programa estadístico nos da, el más cercano al objetivo, para esto se debe colocar 40% de HPMC K15M, 5% de lustreclear y 10% de sorbitol en la formulación. Para obtener un área de trabajo más extenso se procede a obtener un gráfico de contorno de superficie de respuesta.

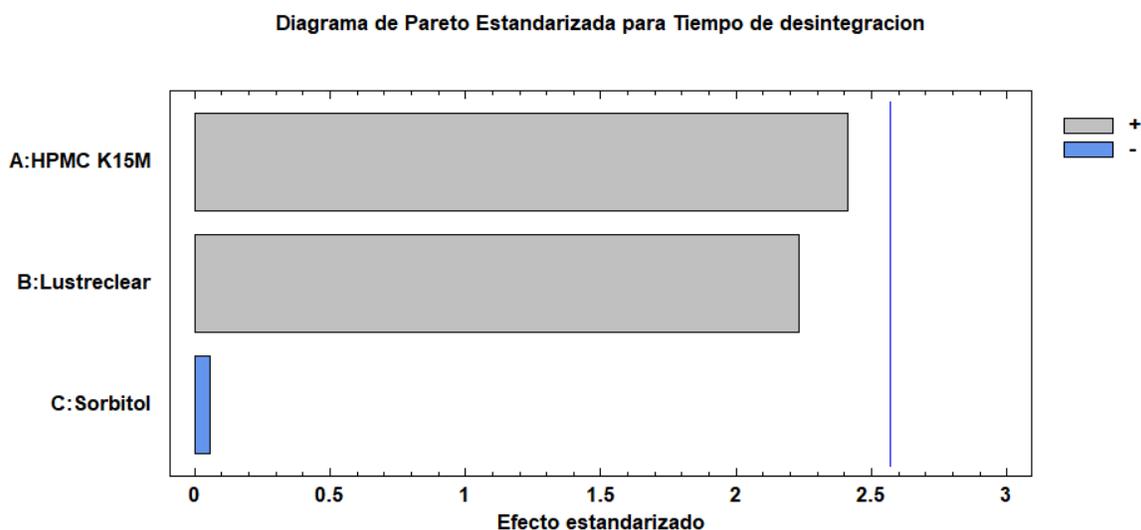


En el gráfico de contorno de superficie podemos observar cómo se puede obtener valor de hinchamiento entre 125% y 140% (Región verde), si mantenemos constante el valor de HMC K15M en 40% y desplazamos el valor de sorbitol entre valores de 8% a 10% y los valores de lustreclear de 5% a 7.5%.

El análisis estadístico de esta variable de respuesta nos arroja una **R= 9.65%**, lo cual nos indica la reproducibilidad del método.

## Tiempo de desintegración de la película

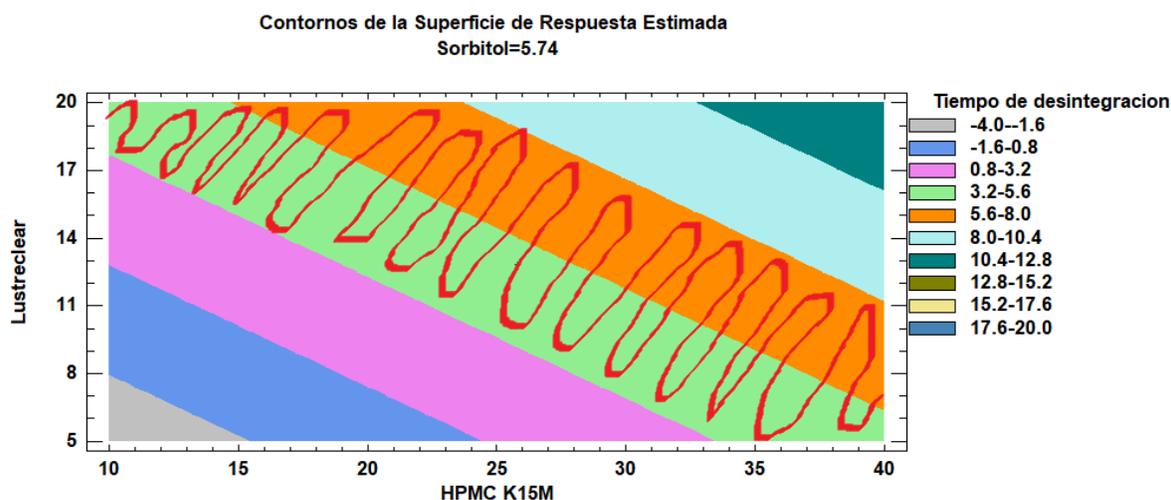
Los 9 resultados obtenidos de tiempo de desintegración de la película fueron analizados mediante el programa estadístico, el tiempo mínimo de desintegración de la película en las diversas formulaciones fue de 0.25 min y el máximo fue de 17.05 min. Se realizó un análisis de los diferentes resultados obtenidos para observar la influencia de cada uno de los factores de manera individual sobre esta variable.



En el diagrama de Pareto estandarizado para el tiempo de desintegración, se puede apreciar que el HPMC K15M es el factor que influye en mayor medida el tiempo de desintegración de la película, afectando de manera positiva el tiempo, por lo cual entre mayor cantidad de HPMC K15M se agregue a la formulación, mayor será el tiempo de desintegración de la película, el mismo caso ocurre con el lustreclear pero en medida que el HPMC K15M, por su parte el sorbitol es el factor que influye en menor medida, pero este lo hace de forma negativa por lo cual entre mayor cantidad de sorbitol se agregue a la formulación el tiempo de desintegración de la película disminuirá, los tres factores estudiados no influyen de una manera estadísticamente significativa en la variable tiempo de desintegración ( $p < 0.05$ ).

Se decide realizar una optimización de la respuesta, manteniendo como valor óptimo 5 min de tiempo de desintegración, para que la película inicie la liberación del fármaco en ese tiempo.

Para obtener un tiempo de desintegración de 5 min, se debe colocar 25.78% de HPMC K15M, 12.81% de lustreclear y 5.74% de sorbitol en la formulación. Para tener un área de trabajo más amplia se decide obtener un gráfico de contorno de superficie.



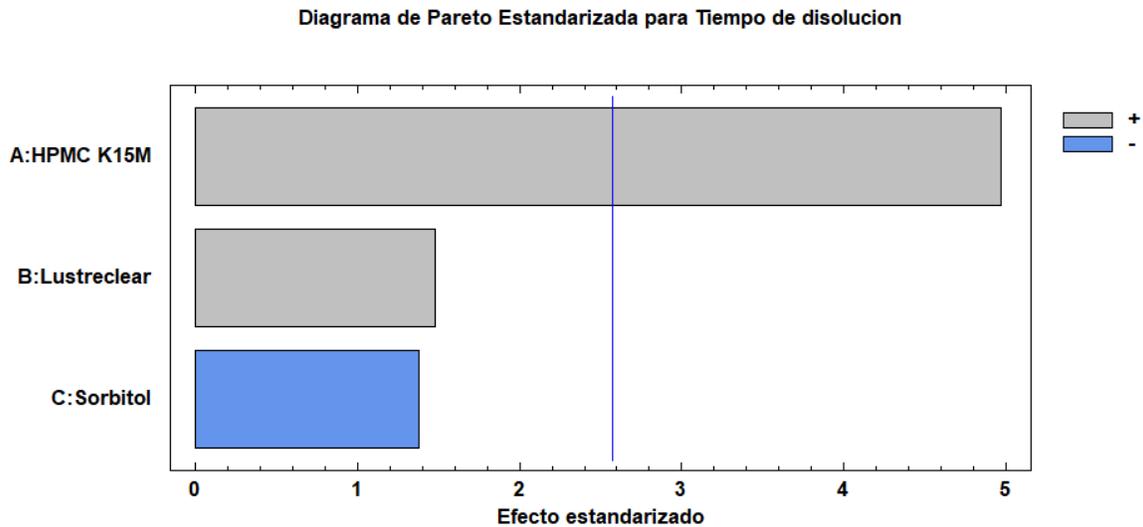
En el gráfico de contorno de superficie de respuesta para el tiempo de desintegración de la película, podemos observar que si mantenemos el sorbitol en 6.74% y desplazamos los valores de HPMC K15M en valores de 33% a 40% y lustreclear en valores de 17.5% a 20%, podremos obtener valores de 3.2 min a 8 min de tiempo de desintegración de la película (Región verde y naranja).

El análisis estadístico de esta variable nos arrojó una **R= 68.36%**, lo cual nos indica la reproducibilidad del método.

#### Tiempo de disolución de la película

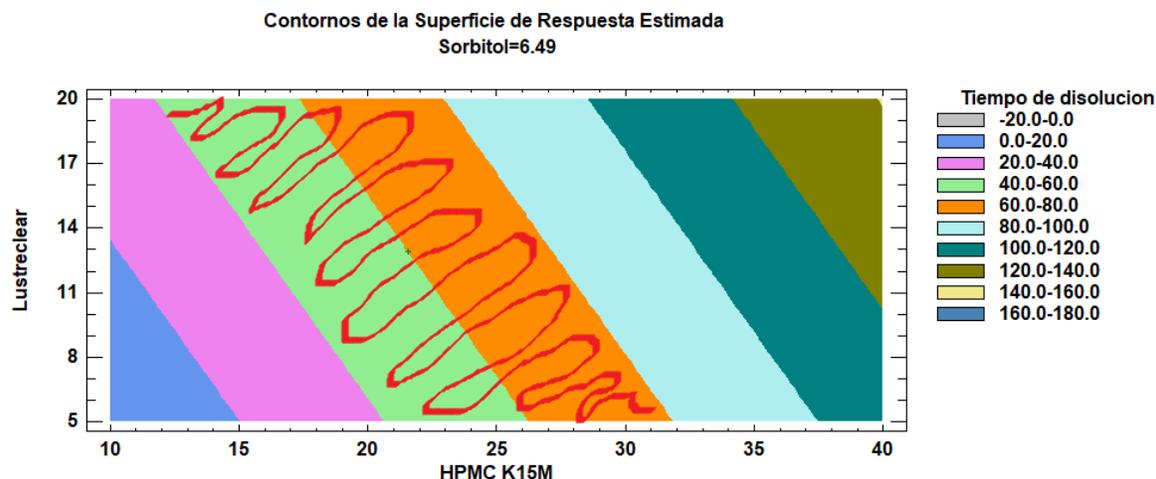
Los diversos resultados obtenidos de tiempo de disolución de película de las diversas formulaciones, fueron analizados de forma estadística, el tiempo de disolución de película más corto fue de 8.15 min y el valor máximo fue de 165.37

min, el análisis se realizó con la finalidad de observar la influencia de cada uno de los factores en estudio con respecto a la variable de respuesta.



En el diagrama de Pareto estandarizado para el tiempo de disolución de la película, podemos observar como el HPMC K15M es el factor que afecta en mayor medida el tiempo de disolución de película, la afectación de esta variable es estadísticamente significativa ( $p < 0.05$ ), por lo cual si aumentamos el valor de HPMC K15M en la formulación se incrementaría el tiempo de disolución de la película, el lustreclar actúa de forma positiva incrementando el tiempo de disolución de la película en cuanto este se encuentre en mayor proporción en la formulación, sin embargo esta variable no es estadísticamente significativa ( $p < 0.05$ ), por el caso contrario el sorbitol afecta en menor proporción de forma negativa, por lo cual al aumentar el nivel de sorbitol en la formulación el tiempo de disolución de película disminuiría, esta variable no es estadísticamente significativa ( $p < 0.05$ ).

Para obtener un tiempo de disolución mínimo, se decide realizar una optimización de la respuesta, el valor mínimo de respuesta para esta variable, de acuerdo al programa estadístico es de 60 min, manteniendo el valor de HPMC K15M en 21.55%, lustreclar en 12.92% y sorbitol en 6.49% en la formulación, se decide obtener un gráfico de contorno de superficie estimada para tener un área mayor de trabajo.



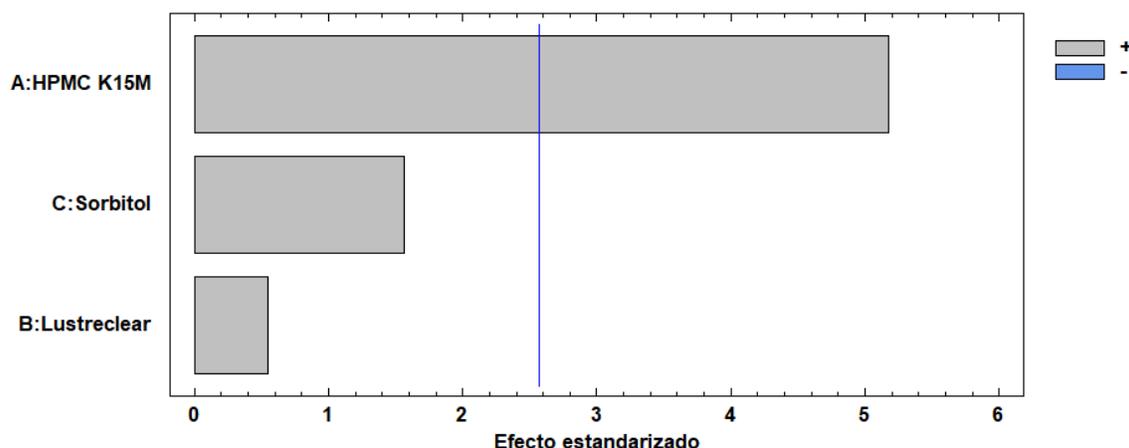
En el gráfico de contorno de superficie se puede observar que si mantenemos constante el valor de sorbitol en 6.49%, y se desplaza el HPMC K15M en valores de 20.5% a 32% y el lustreclear en valores de 5% a 20% podremos obtener tiempos de disolución de película de 40 min a 80 min (Región verde y naranja).

El análisis estadístico de esta variable, nos arroja una **R= 85.20%**, lo cual nos indica la reproducibilidad del método.

### Fuerza de adhesión

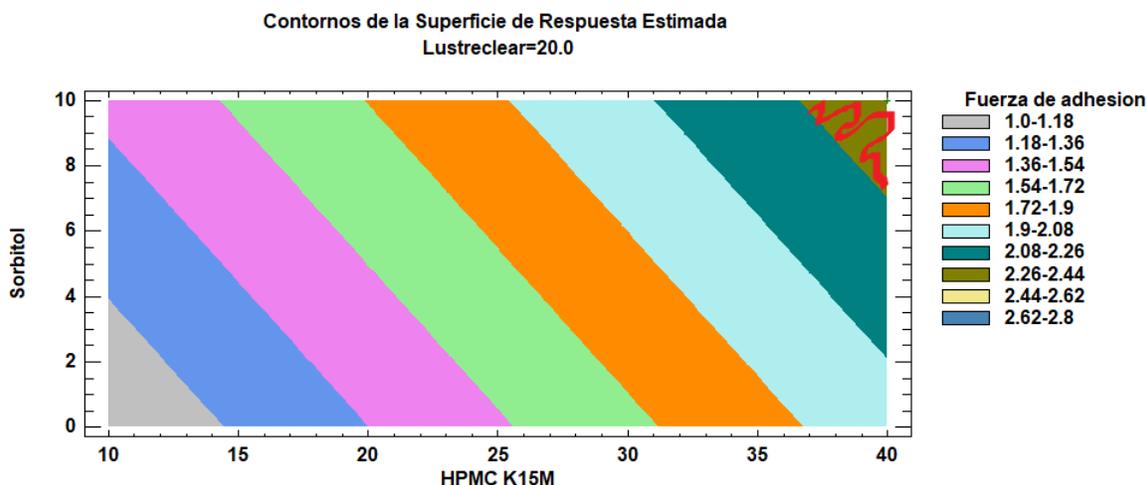
Los resultados obtenidos de las diversas formulaciones fueron analizados de manera estadística para observar la influencia de cada uno de los factores sobre la variable fuerza de adhesión, el valor mínimo de fuerza de adhesión obtenido de las formulaciones fue de 1.12 N y el valor máximo fue de 2.72 N.

Diagrama de Pareto Estandarizada para Fuerza de adhesión



En el diagrama de Pareto estandarizado para fuerza de adhesión se logra apreciar como el HPMC K15M es el factor que influye en mayor medida sobre esta variable, cabe destacar que la influencia de este valor es estadísticamente significativo ( $p < 0.05$ ), ya que influye de manera positiva con la fuerza de adhesión, por lo cual si aumentamos la proporción de HPMC K15M aumentaríamos la fuerza de adhesión, el sorbitol y el lustreclear de igual manera aumentarían la fuerza de adhesión en medida que se aumente su proporción en la formulación pero este impacto es menor al generado por HPMC K15M además de que estos valores no son estadísticamente significativos ( $p < 0.05$ ).

Se decide realizar una optimización de la respuesta intentando maximizar la fuerza de adhesión, el programa estadístico nos indica que el valor máximo alcanza 2.36 N, manteniendo valores de HPMC K15M en 40%, lustreclear en 20% y sorbitol en 10%, se logra obtener un gráfico de contorno de superficie estimada para de esta manera poder tener una mejor área de trabajo.



En el gráfico de contorno de superficie estimada para la fuerza de adhesión, se puede observar que, si se mantiene el valor de lustreclear constante en 20%, podemos desplazar los valores de HPMC K15M entre 36.5% y 40% y los valores de sorbitol entre 7.5% a 10% para obtener valores de fuerza de adhesión entre 2.26 N y 2.44 N (Región verde militar).

El análisis estadístico de esta variable nos arroja una **R= 85.51%**, lo cual nos indica la reproducibilidad del método.

### Optimización de la respuesta

Cada una de las variables de respuesta ha sido estudiada de forma individual, para conocer el comportamiento de estas en base a las modificaciones que se les pueda realizar a la cantidad utilizada de cada uno de los factores en estudio.

Se realizó un análisis de múltiples respuestas por el método de deseabilidad, en el cual se incorporan todas las respuestas analizadas de cada una de las variables con la finalidad de obtener un valor deseado por cada variable de respuesta, arrojando una deseabilidad en la cual la formulación podría fabricarse.

Se realizó la optimización del sistema tomando en consideración un espesor de 0.1 mm, un valor cercano a 120% de hinchamiento, 5 min de tiempo de desintegración de película, 60 min de tiempo de disolución de la película y maximizar la respuesta de fuerza de adhesión, dándole mayor prioridad a la fuerza de adhesión y al tiempo

de disolución, al hinchamiento se le dio una prioridad más baja, al tiempo de desintegración un nivel más bajo al anterior y finalmente al espesor un nivel más bajo al anterior.

### Optimizar Deseabilidad

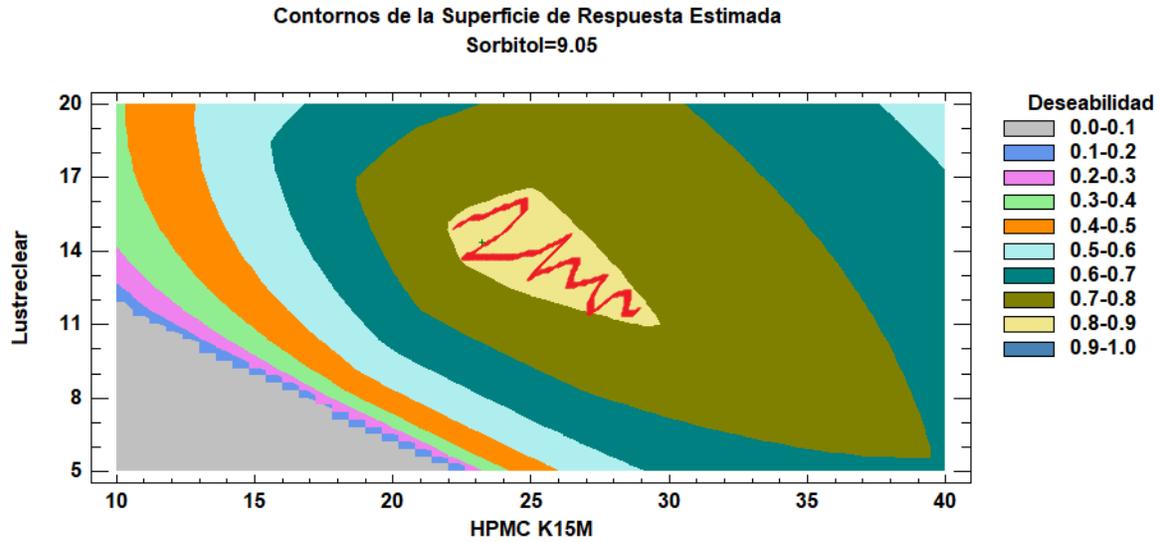
Valor óptimo = 0.838505

<b>Factor</b>	<b>Bajo</b>	<b>Alto</b>	<b>Óptimo</b>
<b>HPMC K15M</b>	10.0	40.0	23.23
<b>Lustreclear</b>	5.0	20.0	14.35
<b>Sorbitol</b>	2.0	10.0	9.05

<b>Respuesta</b>	<b>Óptimo</b>
<b>Espesor</b>	0.1
<b>Hinchamiento</b>	159.73
<b>Tiempo de desintegración de película</b>	5.0
<b>Tiempo de disolución de película</b>	59.53
<b>Fuerza de adhesión</b>	1.75

La optimización de la deseabilidad, nos dice que en un 83.85%, se puede realizar una película con las características deseadas, manteniendo los valores de HPMC K15M en 23.23%, lustreclear en 14.35% y sorbitol en 9.05%, para de esta manera tener valores de respuesta de espesor en 0.1 mm, porcentaje de hinchamiento en 159.73%, tiempo de desintegración de película en 5 min, tiempo de disolución de la película en 59.53 min, fuerza de adhesión de 1.75 N.

Tomando en consideración que el sorbitol era el factor que influía en menor proporción en las diferentes variables de forma individual, se obtuvo un gráfico de contornos de superficie para la respuesta estimada.



En el gráfico de contornos de superficie, podemos observar que si mantenemos constante el valor del sorbitol en 9.06, podemos obtener un área de trabajo, desplazando los valores de HPMCK15M en valores de 22% a 30% y lustreclear de 11% a 16%, obteniendo valores de deseabilidad de la respuesta entre 80% y 90% (Región amarillo claro).