

PROYECTO FINAL DE CARRERA - BIOINGENIERÍA



Diseño de film vaginal para la liberación controlada de compuestos inorgánicos antivirales

María Belén Rufino

Tutora: Dra. Ana Enderle

Trabajo Final presentado para la obtención del título de Bioingeniero

Agosto 2021

Agradecimientos

A mi tutora, Dra. Ana Enderle, por su tiempo, su apoyo constante y su dedicación. Gracias por acompañarme y ayudarme durante todo el desarrollo.

Al laboratorio de Química Medicinal del CIBION y a la Dra. Mariela Bollini por permitirme trabajar en su laboratorio y utilizar sus instalaciones.

A la Dra. María Julia Culzoni por su asesoramiento y por compartir conmigo sus conocimientos sobre diseño de experimentos.

A mi familia y amigos que me acompañaron desde el primer día. Gracias por creer en mí, festejar cada pequeño logro y apoyarme durante estos años.

Abstract

According to WHO, 37,9 million people worldwide were living with HIV in 2018, and 1,7 million new infections were reported in the same year. Each year, female infections account for more than half of those newly infected, and women aged 15-24 account for 6,200 new infections each week worldwide. With regard to infection prevention, most of the methods currently available depend almost exclusively on man's willingness to use them.

Polyoxometalates are inorganic anionic compounds, consisting mainly of oxygens and transition metals in their highest oxidized state. It has been demonstrated that they exhibit antiviral, antibacterial and antifungal biological activities, which can be increased by combination with certain compounds.

In this Final Project, a vaginal film was developed for the containment and release of a hybrid Caff-Keggin POM, called CP3, with high anti-HIV activity that could be used as a method of infection prevention and whose use is controlled exclusively by women.

Design of Experiments techniques were used to establish the path forward to determine the desired composition that optimizes the release profile of the active compound, the disintegration of the polymeric matrix and the mechanical properties of the film. It was possible to obtain a composition with an acceptable desirability and that complies with the design conditions, with which it is proposed to continue with the characterization and evaluation in greater detail.

Keywords: Vaginal Film - HIV - Design of Experiments - Polyoxometalates

Resumen

Según la OMS, en el año 2018, 37,9 millones de personas en el mundo vivían con VIH y, en ese mismo año, se registraron 1,7 millones de nuevas infecciones. Cada año, las infecciones de mujeres representan más de la mitad de los nuevos infectados, y las mujeres de 15 a 24 años representan 6.200 nuevas infecciones cada semana en todo el mundo. Respecto a la prevención de la infección, la mayoría de los métodos disponibles en la actualidad dependen casi exclusivamente de la voluntad del hombre de utilizarlos.

Los Polioxometalatos son compuestos inorgánicos aniónicos, formados principalmente por oxígeno y metales de transición en su estado más alto de oxidación. Se ha demostrado que presentan actividades biológicas antivirales, antibacterianas y antifúngicas, y que la combinación con determinados compuestos la aumentaría.

En este Proyecto Final de Carrera se desarrolló un film vaginal para la contención y liberación de un Caff-Keggin POM híbrido, denominado CP3, con una alta actividad anti-VIH que podría ser utilizado como un método de prevención del contagio y cuyo uso sea controlado exclusivamente por la mujer.

Se utilizaron técnicas de diseño de experimentos para establecer el camino a seguir para determinar la composición deseada que optimice el perfil de liberación del compuesto activo, la desintegración de la matriz polimérica y las propiedades mecánicas del film. Se pudo obtener una composición con una deseabilidad aceptable y que cumpla con las condiciones de diseño, con la cual se propone continuar con la caracterización y evaluación con mayor detalle.

Palabras claves: Film Vaginal - VIH - Diseño de Experimentos - Polioxometalatos

Índice

1. Introducción	10
2. Objetivo del proyecto	12
3. Marco Teórico	13
3.1. Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH)	13
3.1.1. Estructura del virus	14
3.1.2. Mecanismo de contagio	15
3.1.3. Mecanismo de infección	16
3.1.4. Prevención del contagio de VIH	18
3.1.5. Tratamiento	19
3.2. Microbicidas para la prevención del VIH en mujeres	21
3.3. Polioxometalatos	21
3.3.1. Polioxometalatos híbridos	24
3.3.2. Actividad antiviral de los polioxometalatos	25
3.4. Administración vaginal de fármacos	25
3.5. Histología y fisiología vaginal	27
3.6. Utilización de la vía vaginal para la prevención de contagio de VIH	28
3.7. Films Vaginales	29
3.7.1. Preferencias de las mujeres	30
3.7.2. Selección de excipientes	31
3.7.3. Consideraciones de diseño	32
3.7.4. Proceso estándar de fabricación	32
3.7.5. Caracterización del producto terminado	33
3.8. Diseño de experimentos	35
3.8.1. Metodología de Superficie de Respuesta	36
3.8.2. RSM - Diseño de Mezclas Cruzadas	37
3.8.3. Evaluación de modelos y selección del óptimo	37
4. Materiales	38
4.1. Mezcla M1	38
4.1.1. CP3	38
4.1.2. Glicerol	40
4.1.3. Propilenglicol	40
4.1.4. PEG 400	40
4.2. Mezcla M2	41
4.2.1. PVA	41
4.2.2. HPMC	41
4.2.3. PEG 4000	42

4.3. Simulador de medio vaginal	42
5. Métodos	44
5.1. Diseño de sistema de dos mezclas cruzadas	44
5.2. Síntesis y caracterización de Caf-POM CP3	45
5.2.1. Síntesis de Caf ⁺ - $(C_9H_{13}N_4O_2)(OSO_3CH_3)$	45
5.2.2. Síntesis de P7 - $K_8 - \beta_2(SiW_{11}O_{39})_2 \cdot 13H_2O$	45
5.2.3. Síntesis de P3 - $K_5 - \beta_2(Ce(SiW_{11}O_{39})) \cdot 22H_2O$	46
5.2.4. Síntesis de CP3 - $(C_9H_{13}N_4O_2)_4(K)(CeSiW_{11}O_{39})$	46
5.2.5. Caracterización de CP3	46
5.3. Preparación de los films	47
5.3.1. Mezcla M2	48
5.3.2. Mezcla M1	48
5.3.3. Preparación de las formulaciones finales y secado	48
5.4. Caracterización visual	49
5.5. Ensayo de Flexibilidad	49
5.6. Ensayo de secado	49
5.7. Ensayo de liberación del fármaco	50
5.8. Ensayo de desintegración	50
6. Análisis de resultados	51
6.1. Caracterización de CP3	51
6.1.1. FT - IR	51
6.1.2. 1H RMN	51
6.1.3. Estabilidad de CP3 en SFV	53
6.2. Caracterización visual y ensayo de flexibilidad	53
6.3. Estudio del porcentaje residual de agua	55
6.4. Estudio del perfil de liberación	56
6.5. Estudio de la desintegración	62
6.6. Selección de la composición óptima del film	62
7. Conclusión y perspectivas futuras	78
Bibliografía	79

Índice de figuras

1.	Diagrama del curso temporal de un infección por VIH no tratada. La escala de tiempo es inicialmente semanas (fase aguda), luego meses y finalmente años (etapas 2 y 3).[6]	14
2.	Diagrama esquemático de la estructura de una partícula de VIH. [5]	15
3.	Representación esquemática del ciclo de replicación del VIH. [5]	17
4.	Fases de la infección tras la exposición al VIH. [9]	18
5.	Ciclo de vida del VIH mostrando los sitios de acción de diferentes clases de fármacos antirretrovirales. [2]	20
6.	Representación de las estructuras más típicas de POMs. En dorado se observan los grupos $[MO_6]$, en verde claro los heteroaniones centrales $[XO_n]$ y en verde oscuro los heteroaniones sustituyentes $[M'O_6]$ [16]	23
7.	Representación de los isómeros de la estructura de Keggin.	24
8.	Regiones del tracto genital inferior femenino.	27
9.	Ejemplo de film vaginal anticonceptivo VCF desarrollado por Apothecus Pharmaceutical (a), doblado en dos y posicionado sobre la punta del dedo listo para la inserción (b). [28]	29
10.	Prototipos de films evaluados en estudio. [31] Tamaño en pulgadas [Size]: (a) 2 x 2, (b) 1 x 1, (c) 1 x 2, (d) 1 x 3; Textura [Texture]: (a) suave/suave, (b) suave/texturado, (c) texturado/texturado; Color [Color]: (a) transparente, (b) translúcido, (c) opaco.	30
11.	Prototipos de films evaluados en estudio. [32] (a) Textura y espesor: de izquierda a derecha, texturado/fino, texturado/grueso, suave/fino; (b) Tamaño en pulgadas: de izquierda a derecha, 2 x 2, 1 x 1, 1 x 2, 1 x 3; (c) Color: de izquierda a derecha, transparente, translúcido, opaco.	31
12.	Proceso estándar de fabricación de un film vaginal, (1) Preparación de la formulación, (2) volcado en molde, (3) secado, (4) cortado, (5) separado y (6) empaquetado. [25]	33
13.	Ilustración del acoplamiento de catión cafeína al Ce-POM. Solo se muestran dos orientaciones para mayor claridad [4]	39
14.	Proceso seguido para la preparación de las mezclas M1 y M2.	48
15.	Espectro de 1H RMN de Caf^+ .	52
16.	Espectro de 1H RMN de CP3.	52
17.	Estudio de estabilidad de CP3 en SFV (Absorbancia vs tiempo).	53
18.	Film de composición 11	54
19.	Film enrollado utilizado para ensayo de flexibilidad. Vista frontal y lateral.	54
20.	A) Espectrofotometría UV-Vis y B) ampliación de la región 220-350 nm - Film 1	56
21.	A) Espectrofotometría UV-Vis y B) ampliación de la región 220-350 nm - Film 2	57
22.	A) Espectrofotometría UV-Vis y B) ampliación de la región 220-350 nm - Film 3	57
23.	A) Espectrofotometría UV-Vis y B) ampliación de la región 220-350 nm - Film 4	57
24.	A) Espectrofotometría UV-Vis y B) ampliación de la región 220-350 nm - Film 5	58
25.	A) Espectrofotometría UV-Vis y B) ampliación de la región 220-350 nm - Film 6	58

26.	A) Espectrofotometria UV-Vis y B) ampliación de la región 220-350 nm - Film 7 . . .	58
27.	A) Espectrofotometria UV-Vis y B) ampliación de la región 220-350 nm - Film 8 . . .	59
28.	A) Espectrofotometria UV-Vis y B) ampliación de la región 220-350 nm - Film 9 . . .	59
29.	A) Espectrofotometria UV-Vis y B) ampliación de la región 220-350 nm - Film 10 . . .	59
30.	A) Espectrofotometria UV-Vis y B) ampliación de la región 220-350 nm - Film 11 . . .	60
31.	A) Espectrofotometria UV-Vis y B) ampliación de la región 220-350 nm - Film 12 . . .	60
32.	A) Espectrofotometria UV-Vis y B) ampliación de la región 220-350 nm - Film 13 . . .	60
33.	A) Espectrofotometria UV-Vis y B) ampliación de la región 220-350 nm - Film 14 . . .	61
34.	A) Espectrofotometria UV-Vis y B) ampliación de la región 220-350 nm - Film 15 . . .	61
35.	Tabla de análisis de varianza para la respuesta R1.	63
36.	Gráfico de probabilidad normal de los residuos para la respuesta R1.	64
37.	Tabla de análisis de varianza para la respuesta R2.	65
38.	Coefficientes estimados para el modelo de la respuesta R2.	65
39.	Gráfico de probabilidad normal de los residuos para la respuesta R2.	66
40.	Tabla de análisis de varianza para la respuesta R3.	67
41.	Coefficientes estimados para el modelo de la respuesta R3.	67
42.	Gráfico de probabilidad normal de los residuos para la respuesta R3.	68
43.	Tabla de análisis de varianza para la respuesta R4.	69
44.	Coefficientes estimados para el modelo de la respuesta R4.	69
45.	Gráfico de probabilidad normal de los residuos para la respuesta R4.	70
46.	Tabla de análisis de varianza para la respuesta R5.	70
47.	Gráfico de probabilidad normal de los residuos para la respuesta R5.	71
48.	Gráfico de Box-Cox para la respuesta R6.	72
49.	Tabla de análisis de varianza para la respuesta R6.	73
50.	Coefficientes estimados para el modelo de la respuesta R6.	73
51.	Gráfico de probabilidad normal de los residuos para la respuesta R6.	74
52.	Tabla de análisis de varianza para la respuesta R7.	74
53.	Gráfico de probabilidad normal de los residuos para la respuesta R7.	75
54.	Gráficos de rampas para la solución 1.	76
55.	Gráficos de barras de deseabilidad individual frente a cada respuesta y combinada para la solución 1.	77

Índice de tablas

1.	Ensayos para la caracterización de films vaginales [25]	34
2.	Componentes del simulador de fluido vaginal y sus concentraciones	42
3.	Componentes del simulador de fluido vaginal y sus cantidades para preparar un litro de fluido	43
4.	Composición porcentual de masas deseada en el film final.	44
5.	Combinaciones de mezclas para diseño de experimentos	45
6.	Cantidades de M1 y M2 utilizadas.	47
7.	Valores de flexibilidad obtenidos.	55
8.	Evolución de peso día a día y el porcentaje residual de agua obtenidos.	56
9.	Concentraciones en mg/L de CP3 obtenidas para cada film a lo largo del tiempo.	62
10.	Modelado aplicado a cada respuesta.	63
11.	Solución elegida luego de la optimización numérica del modelo.	76

Glosario de contracciones

- OMS: Organización Mundial de la Salud
- VIH: Virus de Inmuno Deficiencia Humana
- SIDA: Síndrome de Inmuno Deficiencia Adquirida
- ARN: Ácido RiboNucléico
- HID: Dosis Infecciosa Humana
- ADN: Ácido DesoxiriboNucléico
- PEP: Profilaxis posexposición
- PrEP: Profilaxis preexposición
- CDC: Center for Disease Control
- FDA: Food and Drug Administration
- POM: Polioxometalato
- TM: Metal de transición
- SEM: Scanning Electron Microscopy
- SFV: Simulador de Fluido Vaginal
- ICH: International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use
- RSM: Metodología de Superficie de Respuesta
- PEG: Polietilen glicol
- PVA: alcohol polivinílico
- HPMC: hidroxipropilmetilcelulosa
- EA: Análisis Elemental
- RMN: Resonancia Magnética Nuclear
- ICP-AES: Espectroscopia de emisión atómica por plasma acoplado inductivamente
- FT-IR: Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier

1. Introducción

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), en el año 2018, 37,9 millones de personas en el mundo vivían con VIH. De estos, 27,5 millones se encontraban en África y 3,5 millones en América. En Argentina, en este mismo año se registraron 140.000 personas viviendo con VIH. De las 37,9 millones de personas afectadas, solo el 62 % recibía tratamiento antirretroviral.[1]

En ese mismo año, se registraron 1,7 millones de nuevas infecciones y 770.000 muertes a causa del VIH. Si bien la tendencia de nuevas infecciones por año se encuentra en descenso [1], la prevalencia del VIH está aumentando a nivel mundial, debido a una mayor expectativa de vida de las personas que reciben terapia antirretroviral. [2] Más de la mitad de los nuevos infectados cada año son mujeres, y las adolescentes y las mujeres jóvenes de 15 a 24 años representan 6.200 nuevas infecciones cada semana en todo el mundo, encontrándose la mayoría en el África subsahariana. [1]

El VIH es un virus que afecta el sistema inmunológico, principalmente las células CD4, y en estadios avanzados provoca el Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA), una enfermedad que progresa hacia el fallo del sistema inmune, lo que permite el desarrollo de infecciones y cánceres oportunistas potencialmente mortales.

Sólo 23 de los 38 millones de personas que viven actualmente con el VIH tienen acceso a un tratamiento eficaz y las nuevas infecciones que se producen cada año siguen superando el número de personas infectadas que inician la terapia antirretroviral. [1]

El VIH es uno de los desafíos de salud pública más grande del mundo y existe un compromiso mundial para detener las nuevas infecciones y garantizar que todas las personas con VIH tengan acceso al tratamiento.[3] Es por esto, que es necesario continuar tomando medidas y desarrollando nuevos métodos que ayuden a evitar el contagio.

En la actualidad en todos los países la gran mayoría de los métodos disponibles para la prevención del contagio dependen de la voluntad del hombre para utilizarlos, dejando a las mujeres en una situación de gran desventaja. Es por esto que se propone el diseño de un método cuya utilización dependa exclusivamente de la mujer.

Los polioxometalatos (POMs) son agrupaciones aniónicas que comprenden óxidos de metales de transición (principalmente Mo, V y W) que presentan una amplia diversidad de estructuras y propiedades, entre las que se destaca la actividad antiviral. En particular en este trabajo se utilizará un Caff-Keggin POM híbrido, denominado CP3, diseñado y caracterizado por el grupo de Química Medicinal del CIBION (grupo dedicado al descubrimiento de fármacos antivirales). Para la aplicación clínica de este compuesto, es necesario el diseño de un sistema de liberación controlada ya que posee problemas de solubilidad y de biodisponibilidad. Es por esto que se propone la utilización de un film vaginal, ya que permitiría la liberación del compuesto y el control por parte de la mujer del método

de prevención.

2. Objetivo del proyecto

El objetivo general de este proyecto final de carrera es lograr el diseño optimizado y desarrollar un film vaginal para la administración local del compuesto CP3, un Caff-Keggin POM híbrido caracterizado por el grupo de Química Medicinal del CIBION [4], para la prevención del contagio de VIH. Dentro de los parámetros de diseño del film se plantean los siguientes objetivos específicos:

- **Perfil de liberación:**

1. Observar una liberación de mínimo 50 % del contenido durante los primeros 10 minutos luego de entrar en contacto con el fluido vaginal
2. Observar una liberación de al menos el 85 % para los 60 minutos.

- **Rápida desintegración:** observar el comienzo de la desintegración dentro los primeros 3 minutos luego del contacto con el fluido vaginal.

- **Flexibilidad:**

1. Poder enrollar y mantener el film en un cilindro de 1 cm de diámetro de sección sin que se observen marcados en el mismo
2. Poder doblar el film por la mitad sin observar marcas permanentes.

- **Porcentaje residual de agua:** Conservar no más de un 10 % del peso residual de agua luego del secado.

3. Marco Teórico

3.1. Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH)

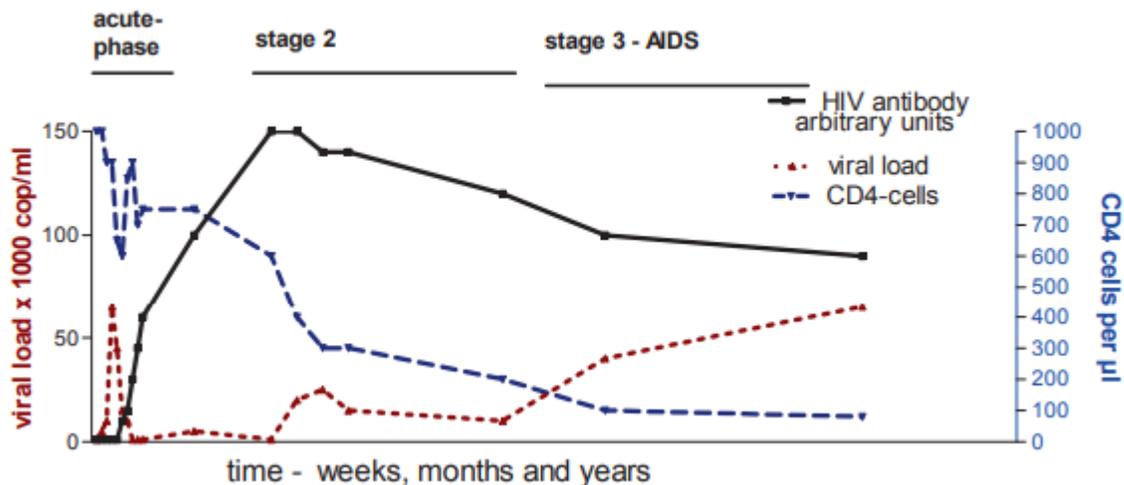
El virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) pertenece al género *Lentivirus* dentro de la familia de los *Retroviridae*, subfamilia *Orthoretrovirinae*. Las infecciones por *Lentivirus* suelen mostrar un curso de la enfermedad con un largo período de latencia clínica, replicación viral persistente y participación del sistema nervioso central.[5]

Sobre la base de las características genéticas y las diferencias en los antígenos virales, el VIH se clasifica en los siguientes dos tipos, que son morfológicamente indistinguibles: [6]

- VIH 1: evolucionó a partir de los virus de inmunodeficiencia no humana de los chimpancés de África Central (SIVcpz)
- VIH 2: evolucionó a partir de los virus de inmunodeficiencia no humana de los monos mangabeyes de África occidental (SIVsm)

Ambos virus causan potencialmente el SIDA, aunque la afección al sistema nervioso central puede ser más frecuente en la infección por VIH-2. Además, el VIH-2 se presenta menos virulento que el VIH-1 y el curso de la infección tarda más tiempo en progresar hacia el SIDA. [5]

La OMS clasifica a las personas infectadas con VIH en tres categorías (A1 - B2 - C3) en función del estado clínico y el conteo de células CD4. El estado A es asintomático, en el estado B se observan síntomas desde leves hasta pertenecientes al complejo ARC (cortos episodios de fiebre, diarrea, malestar, fatiga y pérdida de peso), y por último, el estado C coincide con el Síndrome de Inmuno Deficiencia Adquirida (SIDA). Con respecto al conteo de células CD4, en la etapa 1 el recuento de células CD4 en plasma es superior a 500 células/ μ l, en la etapa 2 entre 499 y 200 células/ μ l y en la etapa 3 por debajo de 200 células/ μ l, siendo el conteo de un persona sana de entre 500 y 1200 células/ μ l. El período total desde la infección hasta la evolución en SIDA puede variar desde 2 hasta más de 25 años, si no se recibe tratamiento. [6] En la Figura 1 se puede observar la carga viral y el conteo de células CD4 para los 3 estados mencionados anteriormente.



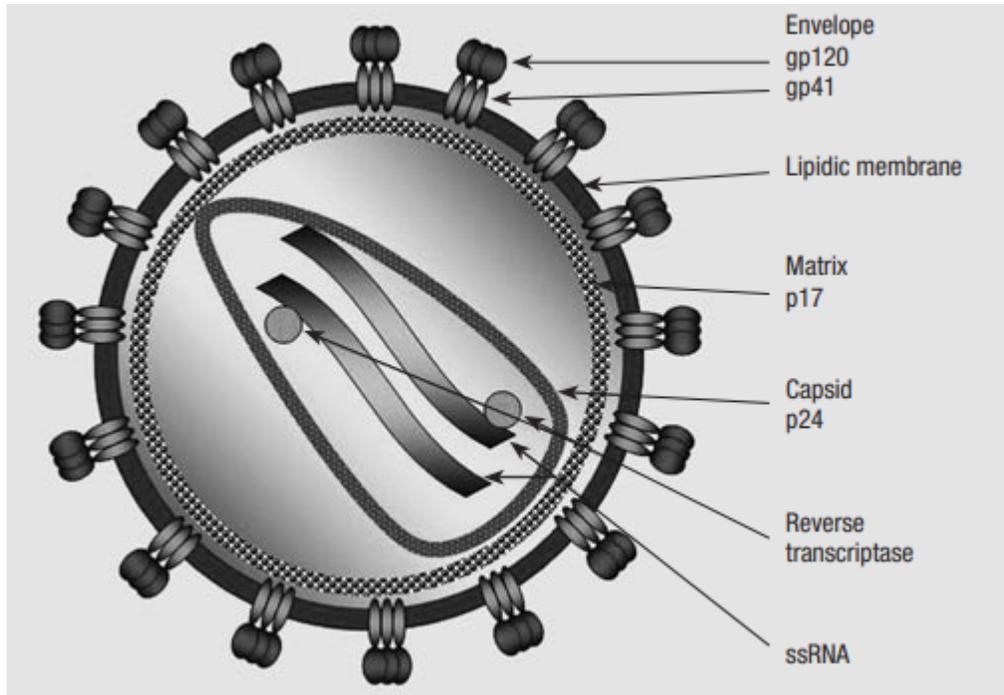


Figura 2: Diagrama esquemático de la estructura de una partícula de VIH. [5]

Cada membrana incluye heterodímeros de glicoproteínas compuestos por trímeros de la proteína *gp120* en la superficie externa y glicoproteínas *gp41* en la porción transmembrana, unidas entre sí. La unión entre estas no es covalente, por lo que *gp120* puede desprenderse espontáneamente y ser detectada en el suero o tejido linfático de pacientes infectados. La proteína de matriz *p17* se encuentra anclada al interior de la membrana lipoproteica. La membrana del virus y esta matriz proteica incluyen la cápside compuesta de polímeros del antígeno central *p24*. La cápside contiene dos copias de ARN viral combinadas con una proteína nuclear y las enzimas transcriptasa reversa, integrasa y proteasa.[5][6]

El virus, además, se caracteriza por otras proteínas accesorias y reguladoras que juegan un papel muy importante en la modulación de la replicación del mismo. Dentro de estas, se destacan la proteína *Tat*, que se expresa inmediatamente después de la infección y promueve la expresión génica y la proteína *Rev*, que asegura la exportación desde el núcleo al citoplasma del ARN.

3.1.2. Mecanismo de contagio

El virus puede entrar al cuerpo a través de las mucosas sanas, la piel o mucosa lesionada y por inoculación parenteral, con una dosis mayor requerida para la infección a través de las mucosas en comparación con la infección a través del torrente sanguíneo. Si bien dos vías de contagio muy estudiadas son la administración parenteral de drogas y la inhalación de drogas con epistaxis, la

mayoría de las nuevas infecciones se deben a transmisión sexual. [6]

El factor más importante en cuanto al aumento del riesgo de transmisión sexual del VIH es el número de copias por mL de ARN del virus en plasma (carga viral). [2] Una dosis infecciosa humana (HID, por sus siglas en inglés) corresponde a aproximadamente 500 a 1.000 partículas de VIH.

El contagio por transmisión sexual puede darse si se tiene sexo vaginal, anal u oral con una persona infectada cuya sangre, semen o secreciones vaginales entren en el cuerpo de la persona sana. El virus podría entrar en contacto con el torrente sanguíneo a través de llagas en la boca o pequeños desgarros que pueden ocasionarse en la vagina o recto durante la actividad sexual. [7] La transmisión puede darse a través del epitelio estratificado de la vagina y el extocervix o del epitelio columnar de simple capa del endocervix. [8]

Si bien las células epiteliales de la mucosa estratificada son CD4 negativas, las células Langerhans y linfocitos T que residen en esta zona son CD4 positivos, lo que los convierte en posibles objetivos del VIH. El virus podría lograr penetrar la mucosa para acceder a estas a través de pequeñas brechas en el epitelio, lo que le permitiría a su vez, estar en contacto con los tejidos del estroma que se encuentran densamente poblados de células dendríticas, macrófagos y linfocitos T que son CD4 positivos y quimiocinas CCR5 o CXCR4. [8]

La transmisión de madre a hijo se ha demostrado a partir de la 12^{va} semana de gestación, pero la transmisión se produce predominantemente ($\leq 90\%$) en el último trimestre y particularmente poco antes o durante el nacimiento. El VIH puede además, ser transmitido a través de la leche materna. [6]

3.1.3. Mecanismo de infección

El virus VIH infecta células pertenecientes al sistema inmunológico humano. Se destacan las *T helpers*, especialmente las células CD4 activas, los macrófagos y las células dendríticas.

En la Figura 3 se puede observar una representación esquemática del ciclo de replicación del virus. Este consiste de los siguientes pasos:

1. Unión y entrada
2. Eliminación de la envoltura
3. Transcripción
4. Integración del provirus
5. Síntesis de proteínas y ensamblaje del virus
6. Eclosión

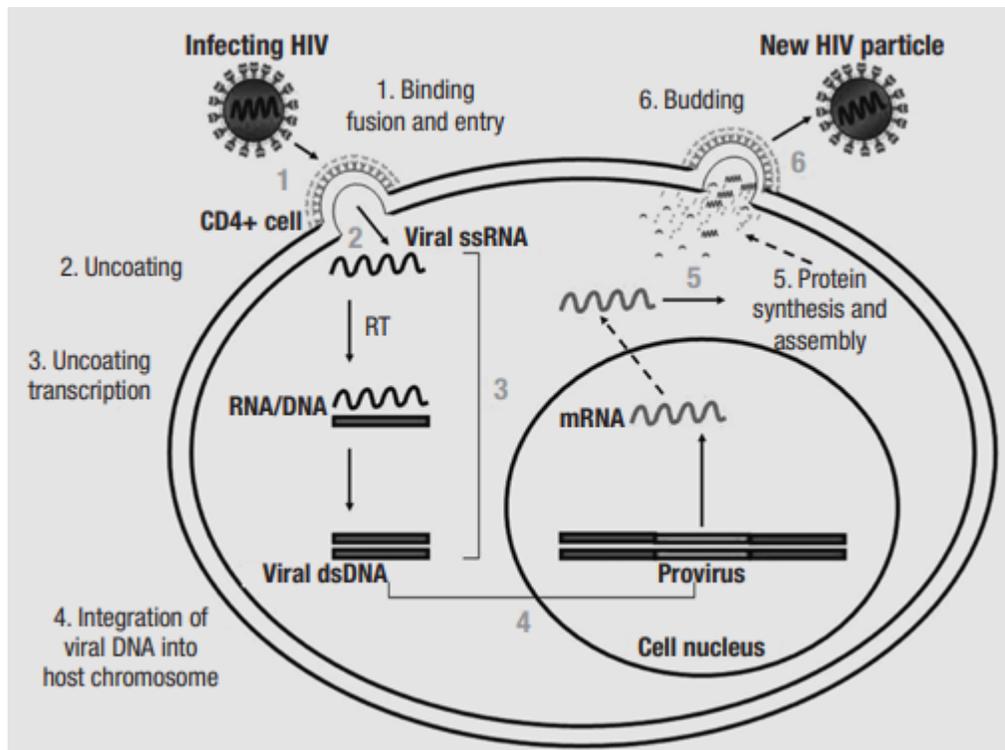


Figura 3: Representación esquemática del ciclo de replicación del VIH. [5]

El proceso de entrada del virus a las células está dado a través de tres eventos, unión del virus a la células, activación y fusión. En esta etapa, juegan un papel muy importante las subunidades *gp41* y *gp120* del virus. Por un lado, la subunidad *gp41* contiene un péptido hidrófobo fusógeno en su terminal amino, que es esencial para la fusión de las membranas viral y celular. Por el otro, la subunidad *gp120*, al unirse con la proteína CD4 del linfocito, desencadena un cambio estructural en la estructura del virus, que expone uno de sus dominios capaz de unirse a receptores de quimiocinas en la membrana del linfocito. Esta interacción célula - virus se produce a través de los correceptores de quimiocinas CCR5 y CXCR4. [2] La doble unión de *gp120*, tanto al receptor de CD4 como al de quimiocina permite una unión más estable del virus al linfocito, lo que a su vez permite que el péptido de fusión N-terminal de *gp41* penetre en la membrana celular.

Luego de la fusión de la membrana, el núcleo del virus es disuelto en el citoplasma de la célula target, liberando el ARN viral. Este, es luego convertido en ADN proviral por acción de las proteínas transcriptasa reversa e integrasa. La integración del ADN proviral y la expresión del provirus requieren que la célula target esté en un estado activado. Al activarse la célula, en el núcleo se produce la transcripción del ADN proviral en ARN mensajero. A continuación, el ARN viral mensajero migra al citoplasma, donde se sintetizan proteínas estructurales para conformar los nuevos viriones. Por último, dos cadenas de ARN viral se asocian con las enzimas de replicación y las proteínas nucleares

se ensamblan sobre ellas, formando la cápside. Esta partícula inmadura migra hacia la superficie de la célula, donde es eclosionada adquiriendo una nueva envoltura. [5][6]

En la Figura 4 se puede observar el desarrollo de la infección tras la exposición al VIH. Luego del cruce de alguna barrera física, la unión de una partícula de VIH a una célula CD4 requiere desde 30 minutos hasta 2 horas, la transcripción del genoma de ARN viral a ADN proviral se completa luego de 6 horas y la integración en el genoma del huésped toma otras 6 horas. A continuación de la integración, las partículas de virus son detectables aproximadamente 12 horas después. Uno o dos días después de la infección se puede detectar el VIH en el tejido linfático y dentro de 5 a 6 días en los ganglios linfáticos. Después de 10 a 14 días de la infección el VIH puede ser detectado en todo el cuerpo, incluyendo el sistema nervioso.

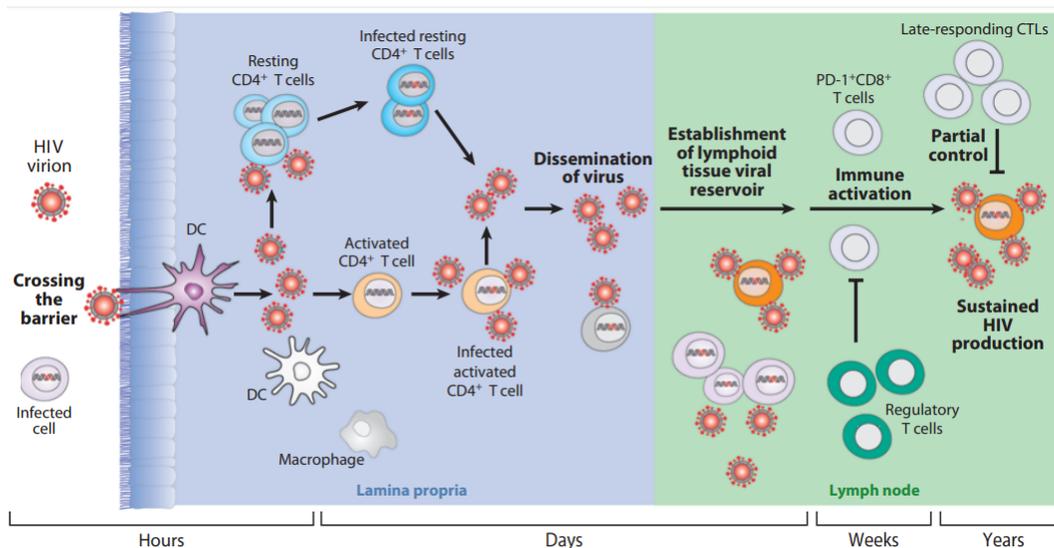


Figura 4: Fases de la infección tras la exposición al VIH. [9]

Se conoce como período ventana al lapso de tiempo en el que un individuo ha sido infectado con VIH pero aún no realizó la conversión serológica, es decir, que aún no ha desarrollado anticuerpos para el virus de VIH. Durante este período en el que el paciente ya ha sido infectado y puede contagiar, el recuento de anticuerpos puede ser tan pequeño que no es detectado en un test serológico.

3.1.4. Prevención del contagio de VIH

La prevención del contagio por transmisión sexual es la prioridad en el intento por controlar la epidemia de VIH. Ninguna de las medidas de prevención disponible a la fecha es suficientemente eficaz por sí sola, y se necesitan muchas intervenciones para controlar la epidemia. [2]. Al momento, la intervención más potente para reducir la transmisión sexual es la terapia antirretroviral en personas infectadas.

Dentro de los métodos de prevención disponibles al momento se destacan los siguientes:

- Utilización de preservativo con una efectividad del 80 % para la transmisión en relaciones sexuales de parejas heterosexuales y del 70 % en relaciones hombre-hombre.[10]
- Utilización del tratamiento como prevención. La correcta utilización del tratamiento según prescripción médica puede lograr una carga viral indetectable que no permite la transmisión.
- Utilización de profilaxis postexposición (PEP). Se trata de la utilización de antirretrovirales por un corto plazo (28 días) para reducir la posibilidad de contraer VIH luego de una posible exposición. Comenzar con la toma de la PEP en las primeras 72 horas luego de la exposición puede reducir en gran medida el riesgo de infección. [7]
- Utilización de profilaxis preexposición (PrEP). Consiste en la toma de medicamentos para el VIH diariamente por parte de personas con muy alto riesgo de contraerlo, para reducir las probabilidades. Según el CDC, la PrEP puede reducir el riesgo de contraer el VIH por vía sexual en más del 90 % y por el uso de drogas inyectables en más del 70 %. [11]
- No compartir jeringas ni reciclar material quirúrgico y utilizar siempre elementos estériles.

Además de los métodos mencionados anteriormente, se encuentran bajo estudio otras formas de prevención con foco principal en la mujer, como la administración de fármacos a nivel local para evitar la infección.

3.1.5. Tratamiento

A fines de la década de 1990 se desarrollaron las primeras terapias antirretrovirales combinadas, que fueron capaces de suprimir la replicación viral. El desarrollo de estas terapias permitió transformar el VIH de una enfermedad progresiva con un resultado fatal en una enfermedad crónica controlable y mejorar considerablemente la calidad de vida de los pacientes.

En la Figura 5 se puede observar una representación esquemática del ciclo de vida del virus en la que se señalan los puntos de acción de los siguientes tipos de fármacos antiretrovirales:

- Inhibidores de fusión
- Inhibidores de la transcriptasa reversa
- Antagonistas de receptores de quimiocinas
- Inhibidores de la proteasa
- Inhibidores de la integrasa

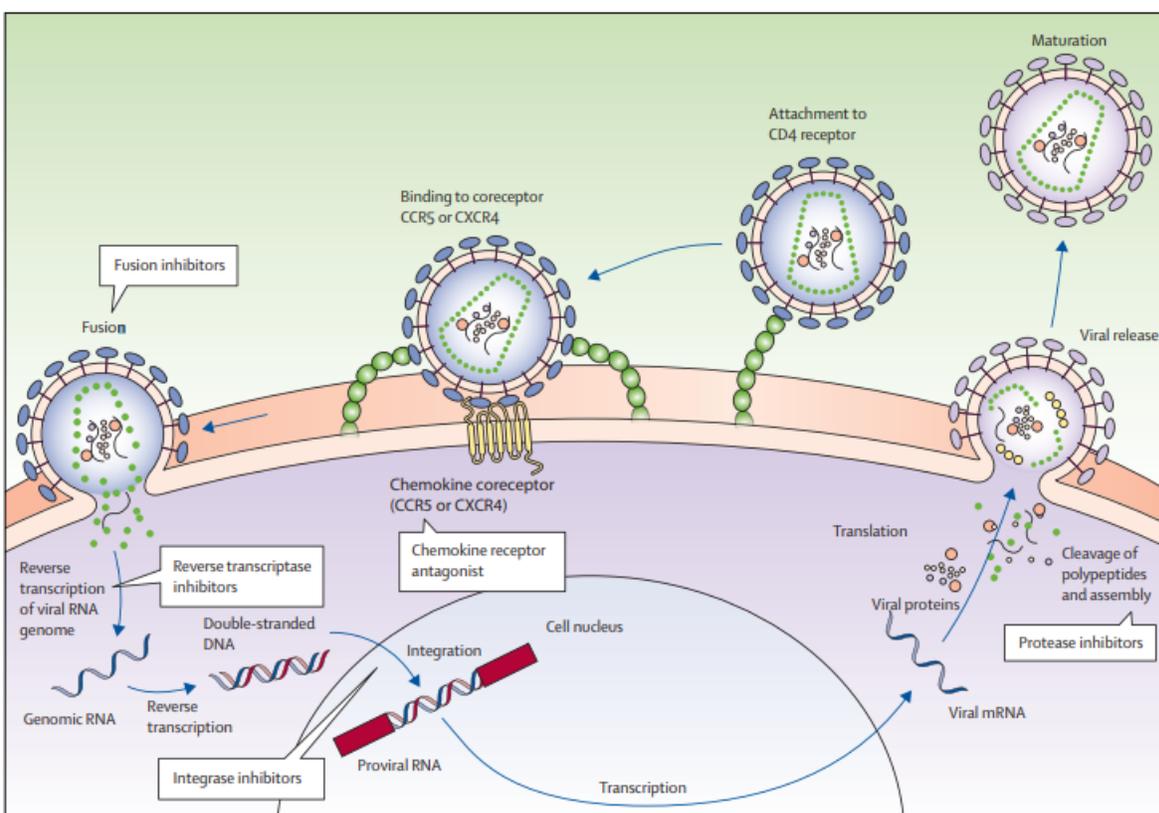


Figura 5: Ciclo de vida del VIH mostrando los sitios de acción de diferentes clases de fármacos antirretrovirales. [2]

La terapia estándar antirretroviral combina dos inhibidores nucleosídicos de la transcriptasa reversa con uno no nucleosídico, un inhibidor de la proteasa o un inhibidor de la integrasa.

A medida que el avance en los tratamientos permitió una expectativa de vida mayor, se ha observado una mayor generación de tolerancia frente a la combinación de fármacos. Además, se ha visto cuestionada la necesidad de realizar la terapia con 3 inhibidores distintos. Por más que estudios iniciales de nuevos regímenes de tratamiento mostraron una eficacia deficiente o toxicidad alta, recientemente los estudios SWORD 1 y 2 y GEMINI 1 y 2, que combinan la utilización de un solo inhibidor nucleosídico y uno no nucleosídico, llevados a cabo por ViiV Healthcare, lograron aprobación para el régimen de tratamiento por parte de la FDA.[12]

Si bien combinaciones de los tratamientos mencionados anteriormente pueden lograr controlar la enfermedad y mejorar considerablemente la calidad de vida de las personas infectadas, ninguno es una cura definitiva y esta aún se encuentra muy lejos. Esto es una razón más que resalta la relevancia de trabajar en el desarrollo de métodos de prevención del contagio.

3.2. Microbiocidas para la prevención del VIH en mujeres

La búsqueda de un microbiocida para la protección frente al VIH se vio impulsada por el deseo de contar con una herramienta de prevención que se encontrara bajo el control de las mujeres. Esto se debe a que en el momento que comenzaron a desarrollarse las investigaciones, al igual que ahora, la mayoría de los elementos de prevención en los que participan las mujeres se encuentran bajo el control de sus parejas masculinas y en numerosas situaciones muchas mujeres se encuentran en condiciones en las que no pueden negociar su uso con sus parejas.

Una ventaja muy considerable que presentan los microbiocidas en la prevención del contagio de VIH es que pueden satisfacer las necesidades de prevención en individuos y grupos para los cuales las formas de profilaxis preexposición oral diarias aún no han sido aceptadas. Además, los microbiocidas pueden brindar un control personal sobre la prevención del VIH y ofrecer la posibilidad de un uso discreto, cualidades que pueden ser particularmente importantes para las parejas receptivas en las relaciones sexuales, como las mujeres y los hombres y mujeres transexuales, que en conjunto representan la mayoría de las nuevas infecciones por el VIH en todo el mundo. [13]

Por otro lado, la posibilidad de incluir el microbiocida en alguna tecnología multipropósito que permita proporcionar beneficios adicionales, como la prevención de embarazos o infecciones de transmisión sexual, podría ayudar a reducir el estigma relacionado con el VIH y lograr una mayor adhesión.

Actualmente se encuentran más de 50 fármacos en desarrollo preclínico por su utilidad como microbiocida para la prevención del VIH y 12 microbiocidas candidatos en diversas etapas de desarrollo clínico. [14]

3.3. Polioxometalatos

Los polioxometalatos (POM) son conjuntos discretos de óxidos metálicos de transición temprana $[MO_x]$ con $x = 4 - 7$ y M siendo generalmente Mo, W o V y a veces Nb. Pueden ser vistos como arreglos de octaedros $[MO_6]$ que comparten bordes o vértices, cada uno con hasta dos vértices sin compartir donde se ubican los oxígenos terminales. [15] Las superficies del polianión están delimitadas por átomos de oxígeno débilmente enlazados o de enlace múltiple no básico, lo que desfavorece toda polimerización posterior.

Los POMs se observan en una gran variedad de estructuras que se pueden agrupar según la composición, el estado de oxidación de los metales y aspectos estructurales en heteropolianiones, isopolianiones, clusters de azul o marrón de molibdeno reducidos y polioxopaladatos. Los heteropolianiones son agrupaciones de óxidos metálicos que incluyen heteroaniones como SO_4^{2-} , PO_4^{3-} , AsO_4^{3-} y SiO_4^{4-} . En cambio, los isopolianiones están compuestos por clusters del óxido de metal, pero sin el heteroanión interno y suelen ser más inestables que los anteriores. A continuación se ejemplifican algunas de las estructuras más estudiadas y en la Figura 6 se pueden observar algunas

representaciones esquemáticas de las mismas:

- Estructura de Lindqvist: tiene formula general $[M_6O_{19}]^{n-}$, donde M es un metal de transición temprana. Se obtiene por combinación de octaedros MO_6 que comparten bordes.
- Estructura de Anderson-Evans: tiene formula general $[XM_6O_{24}]^{n-}$ en la que M es un metal de transición temprana y X otro metal. Se obtiene por combinación de octaedros XO_6 y octaedros MO_6 que comparten bordes.
- Estructura de Keggin: tiene formula general $[XM_{12}O_{40}]^{n-}$ en la que M es un metal de transición temprana y X otro metal, generalmente B, Si o P. Se obtiene por combinación de tetraedros XO_4 y octaedros MO_6 que comparten esquinas y bordes.
- Estructura de Wells-Dawson: tiene formula general $[X_2M_{18}O_{62}]^{n-}$ en la que M es un metal de transición temprana, generalmente V y X otro metal, generalmente P. Se obtiene por combinación de tetraedros XO_4 y octaedros MO_6 que comparten esquinas y bordes.

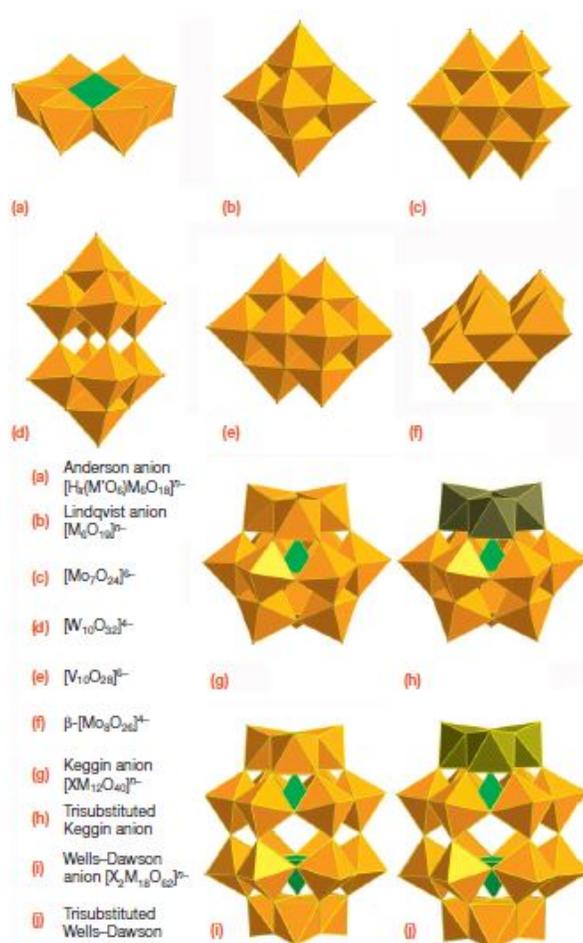


Figura 6: Representación de las estructuras más típicas de POMs. En dorado se observan los grupos $[MO_6]$, en verde claro los heteroaniones centrales $[XO_n]$ y en verde oscuro los heteroaniones sustituyentes $[M'O_6]$ [16]

En particular, el anión α -Keggin de fórmula general $[XM_{12}O_{40}]^{4-}$ consiste en cuatro grupos M_3O_{13} unidos entre sí en los vértices de un tetraedro y rodeando al heteroátomo central X. Cada una de estas unidades puede ser unida de dos maneras diferentes, lo que da lugar a 5 isómeros conocidos como isómeros "Baker-Figgis". El isómero α de simetría T_d es el más estable y abundante. Los isómeros β , γ , δ y ϵ se obtienen mediante una rotación de una, dos, tres y cuatro tríadas respectivamente con respecto al isómero α . En la Figura 7 se puede observar una representación esquemática de estos isómeros.

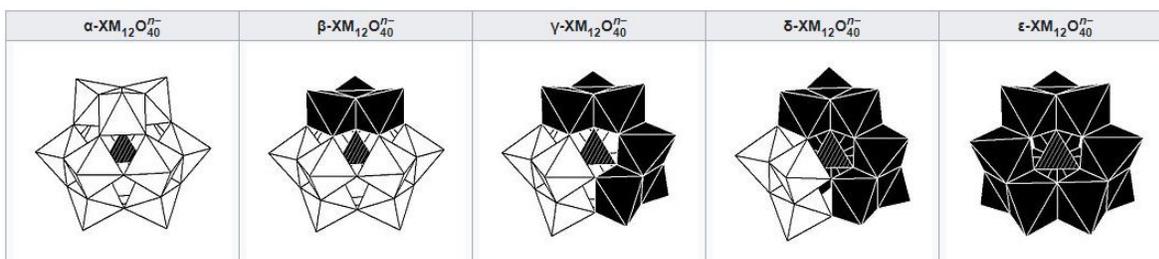


Figura 7: Representación de los isómeros de la estructura de Keggin.

Los POMs de estructura completa suelen ser débilmente básicos y nucleófilos, excepto cuando la carga superficial aumenta por la sustitución de metales o por la reducción del mismo. Los POMs incompletos o lacunares reaccionan con una gran variedad de metales de transición (TM) para dar POM sustituidos por TM. Con esta estrategia, muchos átomos de la tabla periódica han sido incorporados en un marco de POM, ampliando las propiedades de reactividad de los mismos. [15]

La estructura de Keggin, en particular, puede ser modificada por hidrólisis controlada, cambios de pH o soluciones de metales o sales de heteroaniones para remover alguno de sus centros. El resultado de esta modificación da lugar a una especie lacunar de forma $[\text{XM}_{11}\text{O}_{39}]^{n-}$. El sitio vacante lacunar puede incorporar metales funcionales, conocidos como heteroátomos secundarios, a través de los átomos de oxígeno de la superficie y/o a través de los átomos de oxígeno terminales situados en el sitio vacante. Esta característica es muy útil para la posterior funcionalización del POM.

Por ejemplo, el POM Keggin lacunar $[\text{SiW}_{11}\text{O}_{39}]^{8-}$, posee una mayor densidad de carga negativa que el Keggin saturado $[\text{SiW}_{12}\text{O}_{40}]^{4-}$. Esta mayor densidad de electrones facilita la conexión con un elevado número de iones metálicos, lo que da lugar a nuevas estructuras complejas. [17] Dentro de estas estructuras se destaca el POM sandwich con estructura de Keggin sustituido por Cerio $K_{13}[\text{Ce}(\text{SiW}_{11}\text{O}_{39})_2] \cdot 26\text{H}_2\text{O}$ que ha reportado un potente actividad anti-VIH. [18]

3.3.1. Polioxometalatos híbridos

La funcionalización de los POMs puede obtenerse mediante la vinculación covalente o no covalente con compuestos orgánicos, para introducir nuevas funcionalidades en el mismo. Estas nuevas estructuras híbridas abren un amplio espectro de posibilidades y desafíos de investigación, [19] y pueden ser agrupadas en dos clases. La primera, comprende las estructuras en las que el compuesto orgánico se encuentra unido de manera no covalente, generalmente por interacciones electrostáticas. La segunda clase, en cambio, incluye a aquellas en las que la unión es de manera covalente. El agregado de estos compuestos a la estructura puede conferirle propiedades y funciones nuevas muy variadas que van desde control de la disolución, precipitación y purificación hasta actividad antiviral, antifúngica o antibacterial.

Dentro de estos compuestos híbridos de Clase I, para este proyecto, se destacan los que se

obtienen por la unión iónica con un compuesto alcaloide derivado de la xantina, como son la cafeína, la teofilina y la teobromina. Se trata de compuestos nitrogenados con base en purinas que se encuentran bajo estudio por sus propiedades con potencial medicinal como inhibidores de enzimas y actividad antibacterial entre otros. [20]

Se ha encontrado evidencia de que los derivados de la xantina, en especial la cafeína, presentan actividad anti-VIH. Por ejemplo, se ha encontrado una relación entre el consumo de cafeína y los marcadores inmunológicos de la enfermedad, además de un aumento en el conteo de células CD4 y una disminución de la carga viral con un aumento del consumo de cafeína. [21] Por otro lado, resultados sugieren que la cafeína inhibe la vía ATR (proteína quinasa específica de la serina/treonina) y afecta a la transducción del VIH-1, y otros estudios se basan en la inhibición de la replicación del VIH-1 por parte de la cafeína y las metilxantinas relacionadas con la cafeína, debido a un efecto en la fase de integración del ciclo vital del virus. [22] [23]

3.3.2. Actividad antiviral de los polioxometalatos

La actividad antiviral de los POMs comenzó a ser estudiada y testeada *in vivo* en Francia, alrededor del 1972 por Raynaud y Jasmin. Las investigaciones de este grupo permitieron demostrar la inhibición por parte de los POMs de ADN polimerasas dependientes de ARN en retrovirus. Esto permitió a su vez, formar la hipótesis de su actividad contra el VIH, que más tarde demostraron. [24]

Luego, Witvrouw *et al.* [24] demostró que la actividad anti-VIH de los heteropolioxotungstatos tenía una relación estrecha con la estructura del POM y que podía inhibir la replicación de proteasas de VIH-1 y VIH-2. Sus descubrimientos llevaron a la conclusión de que la cantidad de estructuras de Keggin o Dawson en cada cluster era inversamente proporcional a la actividad anti VIH-2 pero la actividad anti VIH-1 no se veía afectada. Como se mencionó anteriormente, la glicoproteína gp120 de la envoltura del virus del VIH es de vital importancia ya que permite la unión a las células CD4+. Este grupo a su vez, demostró la inhibición de la unión del virus gracias al bloqueo de esta proteína.

3.4. Administración vaginal de fármacos

La administración de drogas por vía vaginal es un abordaje interesante para el tratamiento de afecciones tanto locales como sistémicas. La vía vaginal presenta varias ventajas en este aspecto para la administración de compuestos bioactivos frente a la administración parenteral u oral, debido a su gran superficie, alto flujo sanguíneo, el hecho de que evita el efecto de primer paso hepático, evita la eliminación presistémica dentro del tracto gastrointestinal y la posibilidad de auto administración por parte del usuario. [25] [26]

Por otro lado, se destacan algunas consideraciones a tener en cuenta durante el diseño, como por ejemplo antecedentes culturales, cuestiones de higiene personal, especificidad de género e in-

fluencia sobre las relaciones sexuales.

Originalmente la administración de drogas por vía vaginal se utilizó para la administración de anticonceptivos y drogas destinadas al tratamiento de infecciones vaginales, pero con el paso del tiempo se la ha comenzado a utilizar para la entrega de drogas activas localmente como antibacterianos, antifúngicos, antiprotozoarios, antivirales, inductores de parto, agentes espermicidas, prostaglandinas y esteroides entre otros.

Gran parte de la investigación relacionada con este área en los últimos años fue impulsada gracias a los microbiocidas y con foco principal en la prevención de la transmisión sexual de VIH. Un microbiocida es compuesto o formulación química que tiene como objetivo, al ser insertado en la vagina previo a las relaciones sexuales, prevenir o reducir el riesgo de transmisión sexual de infecciones. La administración vaginal de estos agentes puede lograrse a través de geles, films, pastillas y anillos vaginales.

De todas formas, los métodos de administración mencionados presentan algunas desventajas dentro de las cuáles se destacan las fugas y un tiempo de permanencia del fármacos relativamente bajo debido a acciones de auto limpieza del tracto vaginal. Teniendo en cuenta esto, al momento de diseñar la formulación es importante tener en cuenta los siguientes aspectos:

- Dispersión del fármaco por la vagina
- Tiempo de permanencia prolongado
- Interacción físico química adecuada con los fluidos vaginales
- Perfil de liberación del compuesto activo

El método elegido para la administración por vía vaginal debe ser diseñado para que cumpla con los siguientes requisitos: [27]

- Debe disolverse en el entorno vaginal
- No debe ser tóxico ni irritante
- No debe tener ninguna forma metaestable
- Debe poseer propiedades de humectación, emulsión y viscosidad
- Debe tener un tiempo de contacto adecuado al perfil de liberación
- Debe ser aceptado por el paciente, no debe tener efectos adversos en las relaciones sexuales, no debe tener olor ni color, no debe provocar fugas, irritación, picazón ni ardor.

El mecanismo de acción de cada agente microbicida definirá el sistema de administración por vía vaginal más adecuado. En caso de que el agente actúe bloqueando un receptor o correceptor en las células blanco, es necesario que el sistema sea capaz de entregar el fármaco al lugar de acción. Por otro lado, si actúa irrumpiendo la membrana viral antes de que se produzca la adhesión al blanco, el microbicida podrá ser entregado al lumen vaginal sin necesidad de penetrar de manera más profunda la mucosa vaginal.

3.5. Histología y fisiología vaginal

La vagina es un tubo fibromuscular colapsado de paredes delgadas de entre 7 y 10 cm que se extiende desde el exterior del cuerpo hasta el útero. [14] En el tracto genital inferior se reconocen las siguientes cuatro regiones anatómicas que se observan en la Figura 8:

1. El introito: cubierto por epitelio estratificado y queratinizado
2. Epitelio vaginal: cubierto por epitelio estratificado y no queratinizado
3. El ectocervix: cubierto por una capa de mucosa similar a la vaginal
4. El endocervix: cubierto por epitelio columnar simple con un gran número de glándulas.

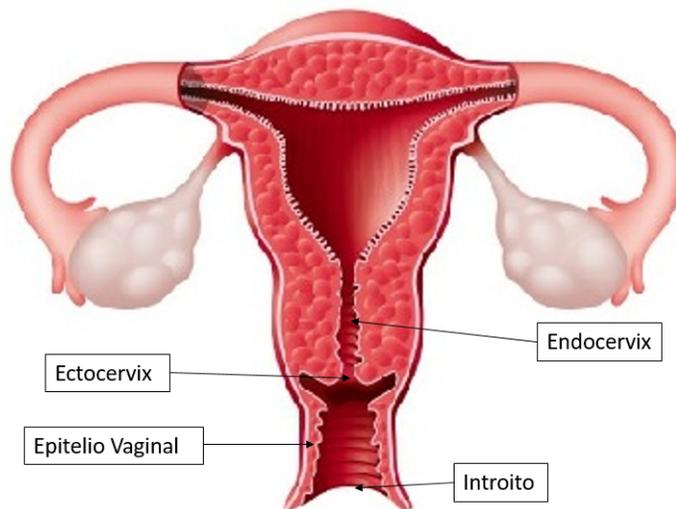


Figura 8: Regiones del tracto genital inferior femenino.

El epitelio vaginal se encuentra recubierto por el fluido vaginal, compuesto de secreciones de las glándulas vestibulares cervicales, transudado de plasma y fluidos endometriales. La mucosa cervical se encuentra compuesta por agua, mucina, glicoproteínas, proteínas plasmáticas, enzimas, aminoácidos, colesterol, lípidos y una serie de iones inorgánicos. [14] Estos protegen contra la entrada de

patógenos y puede ser tanto un blanco como una barrera para la administración del fármaco.

En lo que respecta a la prevención del VIH, los fluidos y mucosas vaginales juegan un doble rol. Por un lado, actúan como un mecanismo natural de protección, inhibiendo la transmisión del virus. Por otro lado, la presencia física de una capa de fluido en el epitelio así como la actividad enzimática en el fluido vaginal ha sido identificado como una barrera importante para la entrega y absorción de drogas desde los sitios de la mucosa. [14]

Otro aspecto importante a comprender durante el desarrollo de sistemas de administración de microbicidas, es el componente inmunológico del tracto genital femenino. A lo largo de toda la mucosa cervical y vaginal, se encuentran presentes células T y células presentadoras de antígenos. Se estima que los leucocitos representan entre el 6% y el 20% del número total de células en las trompas de Falopio, el endometrio, el cuello uterino y la mucosa vaginal. Las células T CD8+ representan alrededor del 50% de los leucocitos, con las células CD4+ predominando sobre otras células. Además se ha encontrado una banda de células CD4+ y CD8+ bajo el epitelio de los tejidos vaginales y ectocervicales. Además, se ha demostrado que las células de Langerhans están presentes en la mucosa epitelial. [14]

Otra propiedad de la vía vaginal que se debe tener en cuenta es su pH. Este normalmente se encuentra entre 3,5 y 5,0, pero puede ser alterado en algunos estados de enfermedad. [14] El bajo pH de la vagina proporciona una protección innata contra los patógenos.

3.6. Utilización de la vía vaginal para la prevención de contagio de VIH

En primer lugar, la administración vaginal de fármacos anti-VIH se presenta como una solución lógica ya que el tracto genital inferior femenino es el principal sitio de contagio para la mujer.

Al utilizar un método de prevención local en la vagina se puede limitar la exposición sistémica en comparación con otras vías de administración de fármacos como la oral o parenteral. Esto otorga la capacidad de limitar la aparición y gravedad de los efectos secundarios asociados a la exposición sistémica a los agentes anti-VIH.

Además de proporcionar una vía de administración de fármacos, una formulación vaginal puede proporcionar beneficios adicionales a la usuaria. Dentro de estos beneficios se puede destacar una barrera física a la penetración del epitelio por parte del virus y una mayor lubricación que disminuye la probabilidad de generación de abrasiones genitales y puede aumentar el placer sexual. [8]

Cabe destacar que al utilizar la vía vaginal, la eficacia del microbicida depende además de la eficacia del mismo, de la voluntad y capacidad de la persona de utilizar el producto de manera adecuada de acuerdo con las instrucciones.

3.7. Films Vaginales

Un film vaginal es un sistema polimérico de administración de fármacos que suele tener forma rectangular, superficie suave y homogénea y medidas laterales de entre 5 y 10 cm y que puede colocarse doblado previamente sin necesidad de un aplicador. En la Figura 9 se puede observar un ejemplo desarrollado por Apothecus Pharmaceutical.

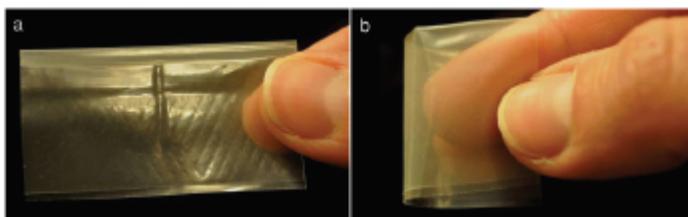


Figura 9: Ejemplo de film vaginal anticonceptivo VCF desarrollado por Apothecus Pharmaceutical (a), doblado en dos y posicionado sobre la punta del dedo listo para la inserción (b). [28]

Se trata de finas tiras de material polimérico soluble en agua que se disuelve al ser colocado en la cavidad vaginal para liberar el compuesto activo. Deben ser diseñados para que la disolución se produzca rápidamente al entrar en contacto con los fluidos vaginales para lograr un gel liso, viscoso y bioadhesivo, para lograr la permanencia en la vagina por un período de tiempo prolongado.

Se define a la bioadhesión como la unión de macromoléculas sintéticas o naturales a un tejido biológico y la mucoadhesión es un caso particular de esta en la que el tejido se encuentra cubierto de mucus, como es el caso de la vagina. El mecanismo para lograr la mucoadhesión comienza con una etapa de contacto, que implica la hidratación y dispersión del film, y luego continua por la etapa de consolidación, para fortalecer la unión polímero - mucosa. Esta unión se debe a interacciones principalmente de Van der Waals, enlaces por puente de hidrógeno e interacciones electrostáticas entre las cadenas poliméricas y la mucosa. [29]

El film diseñado debe además poseer un buen aspecto, preferentemente incoloro e inodoro, suave, flexible y con ausencia de bordes filosos para evitar lesiones durante la colocación. Dentro de los posibles componentes durante la formulación del film se incluyen el fármaco, polímeros solubles en agua, plastificantes, agentes de desintegración, colorantes y saborizantes.

En función de la velocidad de disolución al entrar en contacto con los fluidos vaginales, se encuentran los siguientes tres tipos de films: [30]

- Films de rápida desintegración: la liberación de partículas se produce casi instantáneamente.
- Films mucoadhesivos no desintegrables: suelen ser combinados con films de rápida desintegración para controlar el tiempo de permanencia.
- Films mucoadhesivos de desintegración media.

3.7.1. Preferencias de las mujeres

Dado que el único usuario del método de administración de fármacos por vía vaginal son mujeres es importante tener en cuenta sus preferencias y recomendaciones al momento de diseñar el mismo, por lo que se considerarán los resultados obtenidos en estudios realizados por dos grupos de investigación en poblaciones diferentes. Si bien es posible que las primeras impresiones por sí solas no impulsen la adhesión al método, es probable que la disposición de las usuarias a probar inicialmente un producto se vea afectada por esas impresiones.

El hecho de que no suele generar fugas y su bajo costo, el fácil almacenamiento, la fácil aplicación y el mayor tiempo de retención y estabilidad del compuesto activo lo convierten en la alternativa preferida por las mujeres frente a los geles vaginales. [26]

El grupo de Guthrie et al.[31] realizó un estudio, en el que entrevistó a 24 mujeres sobre sus opiniones y preferencias de tamaño, textura y color y el rol que cumplen en perceptibilidad, aceptabilidad y voluntad de uso del film vaginal. Las participantes debieron evaluar distintos prototipos de films que pueden ser vistos en la Figura 10. Los resultados arrojaron que el tamaño y la textura son importantes para facilitar la inserción, y que el color era más importante luego de ocurrida la disolución que antes de la inserción.

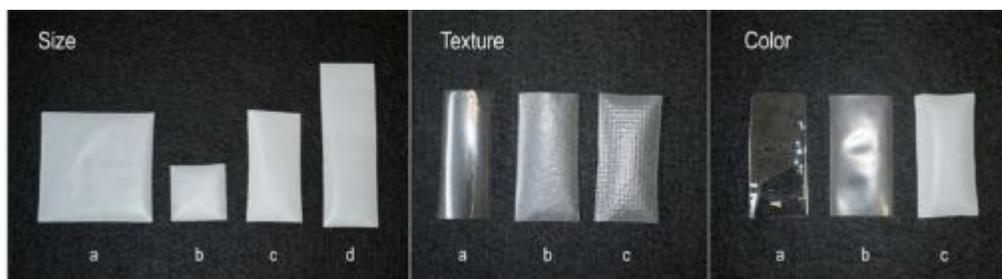


Figura 10: Prototipos de films evaluados en estudio. [31] Tamaño en pulgadas [Size]: (a) 2 x 2, (b) 1 x 1, (c) 1 x 2, (d) 1 x 3; Textura [Texture]: (a) suave/suave, (b) suave/texturado, (c) texturado/texturado; Color [Color]: (a) transparente, (b) translucido, (c) opaco.

Si bien todas las mujeres consideraron que el tamaño era un factor importante, algunas consideraron que los films más grandes serían más fáciles de insertar o que ofrecerían una mayor protección y otras pensaron que el film más pequeño podría insertarse con mayor facilidad, se disolvería más rápidamente y resultaría en menores pérdidas. Además, la gran mayoría de las entrevistadas concluyó que la textura podría mejorar la inserción al proveer un mejor agarre. Por último, opinaron que un color más opaco ayudaría a detectar fácilmente si el film se encuentra colocado de manera correcta. [31]

Por otro lado, el grupo de Fan et al.[32] realizó un estudio más extenso, en el que le presentó a 84 mujeres de entre 18 y 30 años los diferentes modelos de films que se observan en la Figura 11 para estudiar sus preferencias. Estas mujeres examinaron visual y manualmente la variedad de films,

al igual que otros tres dispositivos vaginales que se encuentran bajo estudio para la prevención del VIH: pastilla, anillo y gel.

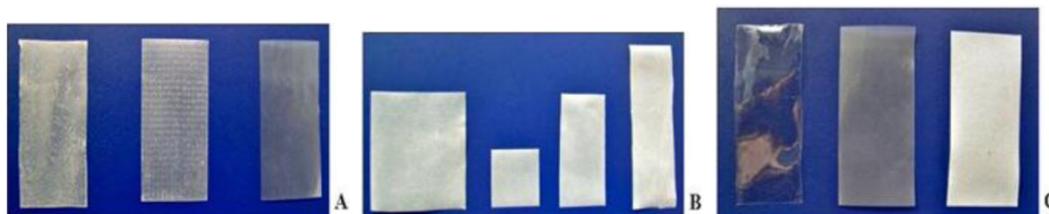


Figura 11: Prototipos de films evaluados en estudio. [32] (a) Textura y espesor: de izquierda a derecha, texturado/fino, texturado/grueso, suave/fino; (b) Tamaño en pulgadas: de izquierda a derecha, 2 x 2, 1 x 1, 1 x 2, 1 x 3; (c) Color: de izquierda a derecha, transparente, translúcido, opaco.

Los resultados arrojaron que la preferencia de las mujeres entrevistadas es un film liso y fino, translúcido y de 2" x 2". Estas preferencias fueron establecidas tomando como base los siguientes conceptos: facilidad y precisión de uso, eficacia, discreción, comodidad luego de la colocación y mínimo impacto y reducción al mínimo de la perturbación del estado de ánimo y las actividades sexuales. Si bien las razones por las cuales preferían una u otra característica variaron, todas coincidieron en que buscan un producto cómodo, eficaz, fácil de usar y mínimamente intursivo.

Además, la mayoría de las mujeres se mostraron receptivas al uso de un film vaginal para la prevención del contagio de VIH, a pesar de la falta de experiencia previa con los mismos. En general, expresaron creer que serían muy cómodos en el uso y fáciles de colocar y que otorgarían una percepción mínima de su uso por parte de ellas mismas o su pareja. También destacaron la posibilidad de sentir menos vergüenza en comparación con otros métodos de prevención y el control femenino de su uso.

La principal limitación de estos estudios radica en que se han basado en el examen visual y manual del producto más que en su uso real. A pesar de que la preferencia y la aceptabilidad del producto se determinan con mayor precisión por el uso real, la estrategia utilizada en estos estudios puede predecir la disposición de una mujer a adoptar un nuevo método o producto que es lo que nos concierne en este estado del desarrollo.

3.7.2. Selección de excipientes

La correcta selección y combinación de excipientes en el film vaginal es de vital importancia, ya que permite el desarrollo de una forma de dosificación aceptable, puede ayudar a mejorar la acción terapéutica y estabilidad del compuesto activo y reducir la toxicidad del fármaco.

Los polímeros utilizados deben ser no tóxicos, no irritantes, carentes de impurezas lixiviables, poseer buenas capacidades de humectación y esparcimiento y propiedades de cizallamiento y resisten-

cia a la tensión adecuadas. [25] De ser posible, además, deberían tener un bajo costo de fabricación y empaquetamiento. Se ha estudiado que el tipo de polímero y su peso molecular influyen directamente en sus propiedades y en especial en la resistencia mecánica y el tiempo de desintegración. Los poliacrilatos, el polietilenglicol, el alcohol polivinílico y los derivados de la celulosa son los polímeros preferidos para estas formulaciones. [25]

Para poder obtener una correcta bioadhesión a la superficie de la mucosa, los polímeros utilizados deben tener un peso molecular de 100.000 Da o más, una excelente concentración de polímeros, una flexibilidad adecuada para controlar el grado de interpenetración entre los mismos y las membranas de la mucosa, tensiones superficiales capaces de extender el polímero en la superficie epitelial de la mucosa, grupos dadores de puente de hidrógeno y fuertes cargas aniónicas. [29]

La inclusión de plastificantes en la formulación permite aumentar la flexibilidad del film y asegurar una textura adecuada y la inclusión de agentes de desintegración puede ayudar a aumentar la velocidad de disolución en caso de que sea necesario. Dentro de los plastificantes más utilizados se destacan el polietilenglicol y la glicerina.

3.7.3. Consideraciones de diseño

Al momento de realizar la formulación y diseñar el film es importante tener presente los siguientes conceptos, que deberán ser luego evaluados durante la caracterización del producto terminado:

- Tasa de hidratación en un volumen limitado de fluidos vaginales
- Mecanismo y perfil de liberación del compuesto activo
- Tamaño
- Tolerancia local de la mucosa vaginal
- Contenido de humedad en el film
- Condiciones de almacenamiento
- Propiedades mecánicas del film

3.7.4. Proceso estándar de fabricación

El proceso estándar a escala de laboratorio para la fabricación de un film vaginal se basa en un moldeado con disolvente y consta de los siguientes pasos que se pueden ver esquematizados en la Figura 12.

1. Preparación de la masa del film por disolución o dispersión del fármaco y los excipientes en algún disolvente adecuado.

2. La masa es colocada en una superficie plana que permita una distribución equitativa y la evaporación de los disolventes más eficiente posible.
3. Secado a temperatura ambiente, con calor directo o en estufa con vacío.
4. Corte de los films al tamaño adecuado.
5. Separación de los films cortados.
6. Empaquetado de los films para lograr las condiciones de almacenamiento requeridas.

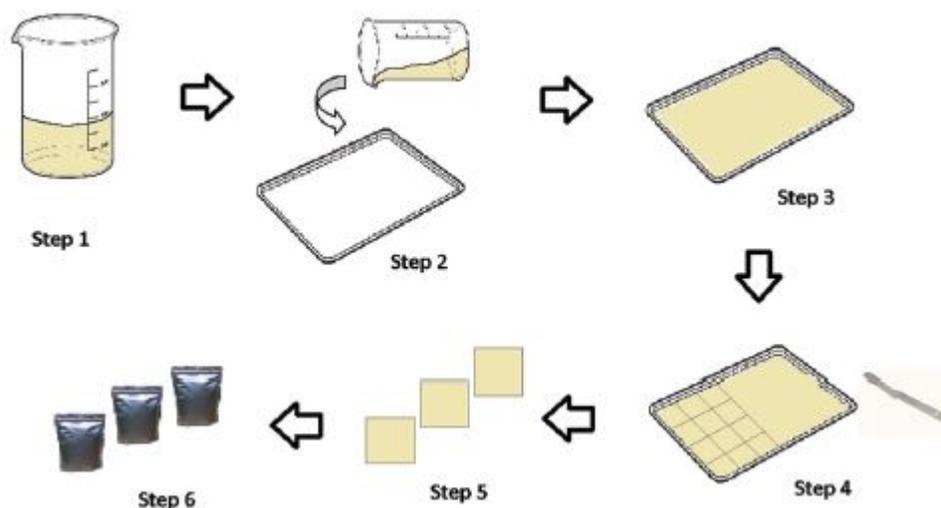


Figura 12: Proceso estándar de fabricación de un film vaginal, (1) Preparación de la formulación, (2) volcado en molde, (3) secado, (4) cortado, (5) separado y (6) empaquetado. [25]

3.7.5. Caracterización del producto terminado

Para poder determinar si el producto terminado cumple con las especificaciones planteadas es necesario evaluar sus propiedades químicas, físicas y mecánicas y sus parámetros de desempeño. En la Tabla 1 se describe los ensayos más importantes para la caracterización de un film vaginal.

Tabla 1: Ensayos para la caracterización de films vaginales [25]

Parámetro en estudio	Principio	Metodología
Plegabilidad	Capacidad del film de ser enrollado y doblado con la mano	<i>In mano</i> , el film se mantiene en un rollo de 1 cm de diámetro y puede ser doblado sin que se creen marcas permanentes
Espesor	Espesor medido con un micrómetro	Promedio entre 5 mediciones tomadas en el centro y en las 4 puntas
Morfología	Inspección visual de la superficie	SEM y microscopio de interferencia
Tracción	Resistencia a la tracción	Fuerza por unidad de sección transversal necesaria para romper el film
Elasticidad	Porcentaje de elongación	Registro de la elongación máxima previo a la rotura
Contenido de agua	Diferencia en peso causada por la pérdida de agua	Diferencia entre el peso del film antes y luego de colocarlo en un secador
Mucoadhesión	Cuantificación de las fuerzas entre el film y la capa mucosa del tejido target	Simulación de sistema vaginal dinámico
Índice de hinchazón	Capacidad del film de hincharse	Monitoreo del aumento de peso del film al ser sumergido en SFV
Desintegración	Pérdida de peso del film	Evaluación del peso del film luego de ser colocado en SFV y en un <i>orbital shaker</i> , removido y secado completamente a intervalos de tiempo predeterminados
Contenido y uniformidad del fármaco	Caracterización cualitativa	Monitoreo visual de la desintegración y correcto método de dosificación del fármaco
Liberación del fármaco	Perfil de liberación	Estudio del perfil de liberación al entrar en contacto con el SFV
Viscosidad	Realizado en la fase de gel	Rheometro o viscosímetro
pH	Realizado en la fase de gel	pHmetro
Compatibilidad	Compatibilidad fármaco - excipientes	Pruebas térmicas e isotérmicas mediante calorimetría de barrido y análisis del contenido del fármaco
Estabilidad	Estudios según reglamentación ICH	Color, olor, tiempo de ablandamiento, tiempo de disolución, pH, viscosidad, propiedades mecánicas y contenido de compuesto activo

En primer lugar, los resultados del estudio de la plegabilidad, resistencia a la tracción y elas-

ticidad del film son directamente dependientes de la selección de polímeros y plastificantes y el porcentaje de los mismos en la formulación. Es importante analizar los resultado de estos estudios para poder garantizar que el film podrá ser doblado como se requiere durante la colocación sin roturas.

Por otro lado, el grosor y la morfología de la superficie del film permiten la caracterización general del mismo y el correcto control del contenido de agua, mantener la estabilidad a lo largo del tiempo y evitar que el film se seque por completo y se quiebre al doblarlo para la colocación. Además, la capacidad del film de hidratarse al entrar en contacto con el fluido vaginal es crucial para su bioadhesión y puede influir en la estabilidad y el perfil de liberación del compuesto activo.

En lo que respecta a las mediciones en la fase de gel, pH y viscosidad, es importante tenerlas en cuenta ya que pueden influir en la liberación o retención del fármaco. La viscosidad del gel se encuentra relacionada con el tiempo de residencia del mismo en la vagina, permitiendo una residencia prolongada.

3.8. Diseño de experimentos

El diseño de experimentos es un enfoque sistemático para aplicar métodos estadísticos al proceso experimental con el fin de mejorar las variables de entrada o salida y los parámetros del proceso. Suele utilizarse como metodología para seleccionar los niveles de factores independientes que proporcionan la menor variación sobre la calidad requerida. El diseño experimental es también una poderosa herramienta para ajustar los datos experimentales a una función empírica para proporcionar información sobre un sistema. Con este enfoque, un experimento puede ser diseñado con un número determinado de factores en un número predeterminado de niveles basado en el producto o proceso observado. [33]

Un experimento bien diseñado es importante porque los resultados y las conclusiones que pueden extraerse del mismo dependen en gran medida de la forma en que se han recogido los datos. Para que el diseño sea útil, antes de comenzar con el mismo se deben seguir los siguientes pasos:

1. Determinar el objetivo de la experimentación.
2. Identificar los factores independientes y las respuestas de interés.
3. Identificar los rango admisibles de los factores independientes para poder delimitar la región de operabilidad.
4. Analizar las limitaciones experimentales para delimitar el entorno experimental.

En lo que respecta los tipos de diseños de experimentos, se destacan el factorial y la Metodología de Superficie de Respuesta (RSM). Los diseños factoriales se utilizan para estudiar el efecto en conjunto de varios factores sobre una única respuesta. Es aplicado para el estudio de factores

dicotómicos y en un diseño factorial 2^k , de k factores, el número total de combinaciones de niveles posibles es de 2^k , por lo que serán necesarias 2^k corridas de experimentos para poder arribar al resultado y se vuelve inviable muy rápidamente desde el punto de vista del tiempo y los recursos. [33] En cambio, en casos en los que los factores de interés son variables continuas, para las que no es posible una dicotomización simple, un enfoque alternativo para explorar los efectos de los factores individuales, las interacciones de bajo nivel y las relaciones no lineales se basa en la metodología de superficie de respuesta (RSM). [34]

3.8.1. Metodología de Superficie de Respuesta

La metodología de superficie de respuesta, o RSM por sus siglas en inglés, es un conjunto de técnicas matemáticas y estadísticas útiles para el modelado y el análisis de problemas en los que una respuesta de interés está influenciada por varias variables y el objetivo es optimizarla. [34]

En la mayoría de los casos de aplicación de RSM, la forma de la relación entre la respuesta y las variables independientes es desconocida. Por lo tanto, el primer paso será encontrar una aproximación adecuada para la verdadera relación funcional entre la respuesta y el conjunto de variables independientes. Normalmente, se emplea un polinomio de bajo orden en alguna región de las variables independientes. Si la respuesta está bien modelada por una función lineal de las variables independientes, entonces la función de aproximación es un polinomio de primer orden. En cambio, en caso de que la superficie que describe el problema presente curvaturas, se utiliza un polinomio de mayor grado.

La RSM es un procedimiento secuencial. El objetivo de aplicar esta metodología es conducir al experimentador de manera rápida y eficaz por un camino de mejora hacia la cercanía de la zona óptima de la superficie con un modelo de primer orden y luego aplicar un modelo más elaborado para localizar el óptimo.

Para poder aplicar los modelos es necesario incluir como mínimo la misma cantidad de puntos experimentales diferentes como coeficientes a estimar y para evaluar la falta de ajuste de los datos al modelo, se deben incluir repeticiones de algún punto, ya que permite calcular la varianza experimental. [33]

La RSM es un método eficaz para el análisis de experimentos multifactoriales ya que reduce el número de ensayos experimentales necesarios. Además, dependiendo de las preferencias del experimentador sobre los incrementos de los parámetros de entrada, las respuestas relevantes pueden optimizarse considerando criterios como el valor más deseado, la maximización o la minimización. [34]

Al momento de aplicar la técnica de RSM, se deben seguir los siguientes pasos:

1. Definir los objetivos de la optimización: plantear adecuadamente el problema a resolver y seleccionar la respuesta a evaluar.

2. Seleccionar los factores que resulten significativos.
3. Establecer la región de operabilidad y considerar las posibilidades instrumentales y la información sobre el sistema.
4. Seleccionar un entorno experimental y definir dónde se planearán los experimentos.
5. Elaborar un modelo matemático y obtener la superficie de respuesta. Evaluar los resultados.
6. Repetir pasos 4, 5 y 6 si fuera necesario.
7. Localizar el óptimo (punto o región) usando herramientas gráficas o analíticas.
8. Verificar experimentalmente: confirmar el valor de la respuesta utilizando los niveles óptimos de los factores.

3.8.2. RSM - Diseño de Mezclas Cruzadas

El diseño de mezclas, un tipo especial de RSM, es un método muy eficaz para determinar las proporciones de los componentes de una mezcla que entregan la respuesta óptima. El resultado varía en función de las proporciones, pero el total de estas se mantiene constante en 1. En este caso el espacio experimental será una figura con tantos vértices como componentes tenga la mezcla

Una gran ventaja de la aplicación de esta metodología es la posibilidad de aplicar restricciones a los parámetros para mantener las proporciones de los componentes de las mezclas dentro de un rango de porcentajes determinados por el diseñador. Además permite evaluar mezclas de gran número de componentes.

La elección del diseño de mezcla adecuado requiere tener en cuenta los siguientes aspectos: el número de factores e interacciones que se van a estudiar, la complejidad de cada diseño, la validez estadística y la eficacia de cada diseño, y la facilidad de aplicación y las limitaciones de coste y tiempo asociadas a cada diseño.

3.8.3. Evaluación de modelos y selección del óptimo

Luego de realizados los experimentos, los resultados de los mismos son analizados utilizando ANOVA, una técnica estadística utilizada para el estudio del efecto de uno o más factores sobre la media de una variable continua. Los resultados del test-F permiten la evaluación de los distintos modelos y la selección del que mejor describe a los efectos de los factores en el resultado.

Se buscará elegir el modelo más simple que describa el comportamiento del sistema y la eliminación de variables no significativas. Para esto se quiere un p valor del modelo significativo ($p < 0.05$), lo que implica una probabilidad menor al 5% de que el valor F del modelo se deba a ruido. También se busca un modelo con p valor de falta de ajuste no significativo ($p > 0.05$).

4. Materiales

Los productos químicos utilizados para síntesis y ensayos químicos fueron comprados a Sigma Aldrich, ABCR o ACROS y eran de grado reactivo. Los productos químicos se usaron sin purificación adicional a menos que se indique lo contrario. Los productos HPMC, PEG 400, PEG 4000, PVA, propilenglicol y glicerol utilizados (grado farmacéutico) fueron donados por el laboratorio LAFEDAR SA.

4.1. Mezcla M1

La mezcla denominada M1 cumplirá la función de co-solvente para asistir en la efectiva disolución y dispersión uniforme del fármaco hidrofóbico en la mezcla de polímeros M2. Los componentes elegidos para esta mezcla fueron basados en los descritos por *Giong et al.* [35] ya que sus trabajos demuestran que esta estrategia de utilización de un co-solvente es aplicable para la incorporación de fármacos hidrofóbicos en un film vaginal. Los materiales elegidos son además seguros para su aplicación en la vía vaginal.

Según lo determinado por *Giong et al.* [35] la mayor miscibilidad obtenida gracias a la utilización de un co-solvente podría deberse a enlaces por puente de hidrógeno entre sus regiones hidrofílicas y a la interrupción simultánea de la autoasociación del agua por parte de los grupos hidrofóbicos. [36]

Además de su capacidad para mejorar la solubilidad en agua del fármaco, estos agentes solubilizantes también demostraron actuar como plastificantes, mejorando la flexibilidad y la fabricación del film. Se comprobó que permiten la obtención de films menos rígidos, más lisos y más suaves que en situaciones en las que solo se utiliza una mezcla polimérica. [35]

Teniendo todos estos resultados en cuenta y las preferencias de las mujeres frente a la utilización de un film vaginal, se consideró importante añadir esta mezcla co-solvente al diseño ya que los beneficios que aportaría no pueden ser ignorados.

4.1.1. CP3

El compuesto CP3 ($C_9H_{13}N_4O_2$)₄(K)(CeSiW₁₁O₃₉) que se observa en la Figura 13 es un Caff-Keggin POM híbrido que resulta de la unión iónica entre cationes de la cafeína (caffeinium) con el compuesto denominado P3. Es altamente hidrofóbico y tiene un peso molar de 4050 g/mol.

CP3 fue desarrollado por el grupo de Química Medicinal del Centro de Investigaciones en Bionanociencias (CIBION) del CONICET [4] y este trabajo busca una novedosa aplicación del mismo a través de un dispositivo de liberación controlada ya que presenta problemas de solubilidad y biodisponibilidad.

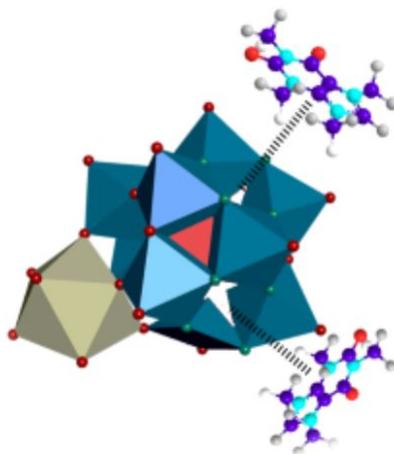


Figura 13: Ilustración del acoplamiento de catión cafeína al Ce-POM. Solo se muestran dos orientaciones para mayor claridad [4]

Con respecto a su actividad anti-VIH, presenta un IC_{50} de 611.7 pM. Este coeficiente, denominado concentración inhibitoria media máxima (IC_{50}) es una medida de la potencia de una sustancia para inhibir una función biológica específica. El IC_{50} es una medida cuantitativa que indica qué cantidad de una determinada sustancia inhibidora es necesaria para inhibir, *in vitro*, un determinado proceso o componente biológico en un 50%. En comparación con otros microbiocidas anti-VIH, tiene un IC_{50} 36 veces menor que Dapivirine (0,2 nM) [37] y casi 2 veces menor que CSIC (0,1 nM) [35]. Estos resultados indicaría una mayor efectividad para CP3. Se ha demostrado además que no presenta actividad citotóxica.

Por otro lado, mediante un ensayo de fuga de liposomas se ha demostrado que genera la destrucción de la membrana viral del VIH y esta podría ser la razón de su elevada actividad antiviral. En este ensayo, se utilizan vesículas lipídicas que simulan a la envoltura lipídica del virus con el objetivo de evaluar la capacidad del compuesto de destruirla. En el interior las vesículas se coloca el colorante carboxifluoresceína y se las trata con el compuesto. Si la fluorescencia aumenta debido a la fuga del colorante, se demuestra que los compuestos pueden alterar las membranas.

Un mecanismo que podría explicar la disrupción de la membrana lipídica es uno hidrolítico dirigido por el cerio del POM. Se ha encontrado evidencia de que el Ce(III) podría actuar como una proteasa artificial hidrolizando proteínas grandes y complejas. Además, la selectividad de la escisión podría atribuirse a las interacciones electrostáticas entre los residuos positivos de las glicoproteínas y la carga negativa del POM.

4.1.2. Glicerol

El glicerol ($C_3H_8O_3$) es un triol con una estructura base de propano sustituido en las posiciones 1, 2 y 3 por grupos hidroxilos. Cumple funciones de osmolito, disolvente, detergente y metabolito humano, entre otras. Se presenta en forma de líquido a una temperatura ambiente y es higroscópico e incoloro. Tiene un peso molecular de 92.09 g/mol. [38]

Los trabajos de *Giong et al.* [35] han demostrado que el glicerol actúa como humectante, mejorando la suavidad del film.

Dado que es un compuesto endógeno al cuerpo humano y a su rápida absorción [38], en las cantidades en las que será utilizado no se espera observar ningún tipo de reacción adversa como resultado de su administración en la población promedio.

4.1.3. Propilenglicol

El propilenglicol ($C_3H_8O_2$) es un propanodiol que existe como un líquido transparente, incoloro e higroscópico y está formado por un propano base en el que los hidrógenos de las posiciones 1 y 2 están sustituidos por grupos hidroxilos. Es utilizado como disolvente orgánico y diluyente en productos farmacéuticos y en muchas otras aplicaciones industriales. Tiene un peso molecular de 76.09 g/mol. [39]

Dado que es un compuesto endógeno al cuerpo humano y a su rápida absorción [39], en las cantidades en las que será utilizado no se espera observar ningún tipo de reacción adversa como resultado de su administración en la población promedio.

4.1.4. PEG 400

El polietilenglicol monooleato ($H(OCH_2CH_2)_nOH$) es un grado de polietilenglicol de bajo peso molecular. Se presenta como un líquido claro, incoloro y viscoso que es altamente hidrofílico. Es un excelente disolvente para un gran número de sustancias hidrofóbicas. Es por esto, que es utilizado ampliamente como disolvente y agente solubilizante de sustancias activas y excipientes en preparados líquidos y semisólidos en la industria farmacéutica y cosmética. La capacidad de este de formar complejos con sustancias activas es la responsable de su excelente poder disolvente. Tiene un peso molecular de 380-420 g/mol. [40]

Debido a su baja toxicidad y al hecho de que se encuentra aprobado para su uso por la FDA [41], en las cantidades en las que será utilizado no se espera observar ningún tipo de reacción adversa como resultado de su administración en la población promedio.

4.2. Mezcla M2

La mezcla denominada M2 será la matriz de polímeros que funcionará como soporte para el fármaco y mediará la bioadhesión a la mucosa vaginal. Los componentes elegidos para esta mezcla también fueron basados en los descriptos por *Giong et al.* [35].

Se decidió utilizar PVA porque se ha demostrado que es segura su utilización para las preparaciones vaginales y es el polímero base utilizado en el film anticonceptivo vaginal ya disponible comercialmente VCF [28]. El PVA actúa también como lubricante y aumenta la viscosidad, otorgando propiedades mucoadhesivas considerables. [42] Este aumento de la viscosidad y la mucoadhesividad provocarán en consecuencia un aumento en el tiempo de permanencia del film en la vagina, lo que a su vez puede aumentar la concentración del fármaco en el tejido cervicovaginal y mejorar la eficacia.

Por otro lado, la decisión de incluir HPMC y PEG 4000 en la matriz polimérica se basa en que estudios previos de liberación *in vitro* han demostrado que su incorporación proporciona una liberación inicial mayor del compuesto activo y aumentan la velocidad de desintegración. [43] [44]

4.2.1. PVA

El alcohol polivinílico (C_2H_4O) es un polímero que se obtiene a partir de acetatos de polivinilo donde los grupos acetato son sustituidos por hidroxilos. Es utilizado como excipiente en la industria farmacéutica y lubricante oftálmico, así como en la fabricación de cosméticos y otros productos. Se presenta en forma de polvo blanco inodoro. Es altamente hidrofílico y tiene un peso molecular de $2.65275e+25$ Da. [45]

Debido a su baja toxicidad y al hecho de que se encuentra aprobado para su uso por la FDA como excipiente [46], en las cantidades en las que será utilizado no se espera observar ningún tipo de reacción adversa como resultado de su administración en la población promedio.

4.2.2. HPMC

La hidroxipropilmetilcelulosa ($C_{56}H_{108}O_{30}$), es un polímero semisintético viscoelástico e inerte. Es utilizado como colirio, así como excipiente para mediar la liberación controlada de los principios activos en medicamentos orales y a su vez, se encuentra en una gran variedad de productos comerciales. Se presenta como un polvo blanco inodoro. Tiene un peso molecular de $7.596329e+26$ Da. [47]

Debido a su baja toxicidad y al hecho de que se encuentra aprobado para su uso por la FDA como excipiente [48], en las cantidades en las que será utilizado no se espera observar ningún tipo de reacción adversa como resultado de su administración en la población promedio.

4.2.3. PEG 4000

El PEG 4000 ($H(OCH_2CH_2)_N OH$) es un grado de polietilenglicol de alto peso molecular. Se presenta como un sólido blanco, higroscópico e hidrofílico. Tiene un peso molecular de 3600-4000 g/mol.[49]

Debido a su baja toxicidad y al hecho de que se encuentra aprobado para su uso por la FDA [50], en las cantidades en las que será utilizado no se espera observar ningún tipo de reacción adversa como resultado de su administración en la población promedio.

4.3. Simulador de medio vaginal

Al aplicar formulaciones terapéuticas o anticonceptivas en la zona de la vagina, estas se encontrarán en contacto con una variedad de fluidos. El flujo, la retención, la cinética de liberación de fármacos y bioactividad de estas formulaciones depende de las interacciones que tenga con los fluidos. Es por esto que para poder realizar una correcta evaluación del comportamiento de los films es necesario evaluarlos en un medio que simule las condiciones de fluidos típicas en la vagina.

Para lograr esto se utilizó un simulador de fluido vaginal como el propuesto por Owen y Katz [51] para poder aproximarse con el mayor grado de similitud posible al fluido vaginal promedio real.

Tabla 2: Componentes del simulador de fluido vaginal y sus concentraciones

Compuesto	Concentración (g/L)
Proteínas (albumina)	0,018
Ácido láctico	2
Ácido Acético	1
Glicerol	0,16
Urea	0,4
Glucosa	5
Ion Sodio	1,38
Ion Cloruro	2,13
Ion Calcio	0,12

Tabla 3: Componentes del simulador de fluido vaginal y sus cantidades para preparar un litro de fluido

Compuesto	Cantidad (g)
NaCl	3,51
KOH	1,4
Ca(OH) ₂	0,222
Albumina Bovina	0,018
Ácido Láctico	2
Ácido Acético	1
Glicerol	0,16
Urea	0,4
Glucosa	5
HCl	Hasta ajustar pH en 4,2

En la Tabla 2 se puede observar la composición del fluido y la concentración deseada para cada uno de los componentes y en la Tabla 3 las cantidades necesarias para preparar un litro del mismo.

5. Métodos

5.1. Diseño de sistema de dos mezclas cruzadas

Para poder determinar la composición del film ideal, se busca maximizar las respuestas bajo estudio utilizando la metodología de respuesta de superficie (RSM). Se buscará confeccionar un film con la composición porcentual en masa que se observa en la Tabla 4.

Tabla 4: Composición porcentual de masas deseada en el film final.

M1			M2			
PVA	HPMC	PEG 4000	PEG400	Propilenglicol	Glicerol	CP3
53	23,5	23,5	60	20	18	2

Para el diseño de experimentos, el modelado de la superficie-respuesta y el cálculo de la deseabilidad fue utilizado el software Stat-Ease Design-Expert 8.0.0 (Stat-Ease, Inc., Minneapolis, USA). La composición porcentual de cada compuesto y los rangos utilizados en la experimentación fueron determinados tomando como base el trabajo de *Giong et al.* [35], ya que el mismo desarrolla un film vaginal para la liberación de un fármaco de características similares a las de CP3.

Se creó un diseño de 15 corridas en 3 bloques del tipo D-optimal y modo cuadrático. El rango utilizado para la mezcla M1 fue 0.25 - 0.35 y para M2 0.65 - 0.75 y se analizaron las siguientes respuestas:

- R1: Liberación del fármaco al minuto 1
- R2: Liberación del fármaco al minuto 3
- R3: Liberación del fármaco al minuto 6
- R4: Liberación del fármaco al minuto 15
- R5: Liberación del fármaco al minuto 30
- R6: Porcentaje residual de agua
- R7: Flexibilidad

En la Tabla 5 se puede observar para cada combinación el número de corrida y el bloque al que pertenece. En las columnas A y B se observa la proporción en porcentaje para cada una de las mezclas M1 y M2 respectivamente en la formulación final.

Tabla 5: Combinaciones de mezclas para diseño de experimentos

Run	Block	A:M1	B:M2
1	Block 1	35	65
2	Block 1	25	75
3	Block 1	25	75
4	Block 1	31,7	68,3
5	Block 1	25	75
6	Block 2	25	75
7	Block 2	25	75
8	Block 2	35	65
9	Block 2	30	70
10	Block 2	30	70
11	Block 3	30,6	69,4
12	Block 3	25	75
13	Block 3	25	75
14	Block 3	28,3	71,7
15	Block 3	35	65

5.2. Síntesis y caracterización de Caf-POM CP3

5.2.1. Síntesis de Caf⁺ - (C₉H₁₃N₄O₂)(OSO₃CH₃)

El proceso de síntesis utilizado es una adaptación del presente en literatura. [52] La cafeína (5,0 g; 25,7 mmol) fue disuelta en nitrobenzono (75 mL) a 100 °C durante 1 h. Luego, se añadió dimetil sulfato (5,2 mL) a la solución y esta se sometió a reflujo a 100 °C por 24 h. Pasadas las 24 h, se enfrió a temperatura ambiente, añadió exceso de dietil eter y se decantó el disolvente. El residuo fue lavado con dietil eter varias veces para obtener un sólido blanco. El rendimiento de la reacción es del 72 %. (1,2 g; 3,7 mmol)

5.2.2. Síntesis de P7 - K₈ - β₂(SiW₁₁O₃₉)₂x13H₂O

El proceso de síntesis utilizado es una modificación del presente en la literatura. [53] El metasilicato de sodio (0,5 g; 4,09 mmol) fue disuelto a temperatura ambiente en 10 mL de agua destilada y filtrado (solución A). En un vaso de precipitados de 100 mL se disolvió tungstato de sodio (8,26 g; 25,18 mmol) en 3 mL de agua destilada hirviendo (solución B). A la solución B en ebullición, se le añadió una solución acuosa 4 M de ácido clorhídrico (8,25 mL) gota a gota, durante 10 minutos con agitación vigorosa para disolver el precipitado de ácido túngstico. A continuación, se añadió la solución A seguida de una solución acuosa de ácido clorhídrico 4 M (2,5 mL). Esta solución se

mantuvo en ebullición por 1,5 h. Luego, se añadió cloruro de potasio (6,8 g) y se agitó magnéticamente durante 15 minutos. Por último, la solución fue filtrada con un embudo de vidrio sinterizado de porosidad media para recoger un sólido blanco.

La purificación del producto se obtuvo mediante la disolución en agua, filtrado y reprecipitado de la sal por adición de cloruro de potasio sólido (6 g). El precipitado luego de la filtración, fue lavado con dos porción de una solución de cloruro de potasio 1 M (20 mL cada una) y secado al aire.

5.2.3. Síntesis de P3 - $K_5 - \beta_2(Ce(SiW_{11}O_{39}))x22H_2O$

El proceso de síntesis utilizado es una modificación del presente en la literatura. [54]. A una solución 1 M de cloruro de potasio (100 mL) se le añadió cloruro ceroso ($CeCl_3$; 0,16 g) y P7 sintetizado anteriormente (2,5 g; 0,16 mmol). El pH de la solución fue ajustado a 5,0 mediante la adición gota a gota de una solución acuosa de ácido clorhídrico 0,1 M. Luego, la solución se agitó a 50 °C durante 30 minutos y se dejó enfriar a temperatura ambiente. La filtración y la lenta evaporación en un recipiente abierto a temperatura ambiente dio lugar a cristales incoloros después de aproximadamente 1 semana.

5.2.4. Síntesis de CP3 - $(C_9H_{13}N_4O_2)_4(K)(CeSiW_{11}O_{39})$

P3 (0,12 g; 0,035 mmol) y Ca^{+} (0,15 g; 0,47 mmol) fueron disueltos en agua y agitados durante 2 horas en RT y se observó la formación de un precipitado durante la noche. Luego de filtrarlo y lavarlo varias veces, el compuesto fue secado al vacío. El peso molar obtenido del compuesto es de 4050 g/mol. [4]

5.2.5. Caracterización de CP3

Los análisis para la caracterización del compuesto fueron realizados por el grupo de Química Medicinal del CIBION. La espectroscopia UV-VIS se realizó en un espectrofotómetro SHIMADZU UV-Vis-NIR UV- 3600 (SHIMADZU, Kyoto, Japón). El análisis elemental (EA) se realizó en un analizador elemental Carlo Erba 1108 (Carlo Erba Reagent, Egelsbach, Alemania). Los espectros de RMN de 1H y ^{13}C se registraron en espectrómetros Bruker Avance 600 (Bruker, Massachusetts, Estados Unidos) (1H : 600,13 MHz; ^{13}C : 150,90 MHz) y Bruker Avance 500 (Bruker, Massachusetts, Estados Unidos) (1H : 500,14 MHz, ^{13}C : 125,76 MHz); la espectroscopia de emisión atómica por plasma acoplado inductivamente (ICP-AES) se realizó en un espectrómetro Perkin Elmer Plasma 400 (Perkin Elmer, Massachusetts, Estados Unidos). La espectroscopia FT-IR se realizó en un equipo Bruker Vector 22 FTIR (Bruker, Massachusetts, Estados Unidos). Las muestras se prepararon como pellets de KBr. Las señales se indican como números de onda en cm^{-1} utilizando las siguientes abreviaturas: vs = muy fuerte, s = fuerte, m = medio, w = débil y b = amplio.

La estabilidad del compuesto en simulador de medio vaginal se midió por espectroscopia UV-VIS en un espectrofotómetro SHIMADZU UV-Vis-NIR UV- 3600 (SHIMADZU, Kyoto, Japón). Se preparó una solución madre, de la cual se tomaron 3 alícuotas que fueron medidas durante 24 hs.

5.3. Preparación de los films

El proceso utilizado es una modificación del presente en la literatura [35] con las cantidades necesarias para 5 films de 0,2 g para cada una de las corridas del diseño que se observan en la Tabla 6.

Tabla 6: Cantidades de M1 y M2 utilizadas.

Run	Block	M1	M2	M1 [mg]	M2 [mg]	M2 [ml]
1	Block 1	35	65	420	780	7,8
2	Block 1	25	75	300	900	9
3	Block 1	25	75	300	900	9
4	Block 1	31,7	68,3	380	820	8,2
5	Block 1	28,3	71,7	340	860	8,6
6	Block 2	25	75	300	900	9
7	Block 2	25	75	300	900	9
8	Block 2	35	65	420	780	7,8
9	Block 2	30	70	360	840	8,4
10	Block 2	30	70	360	840	8,4
11	Block 3	30,6	69,4	367	833	8,33
12	Block 3	25	75	300	900	9
13	Block 3	35	65	420	780	7,8
14	Block 3	28,3	71,7	340	860	8,6
15	Block 3	35	65	420	780	7,8

En la Figura 14 se observa una representación esquemática del proceso realizado que se detalla a continuación.

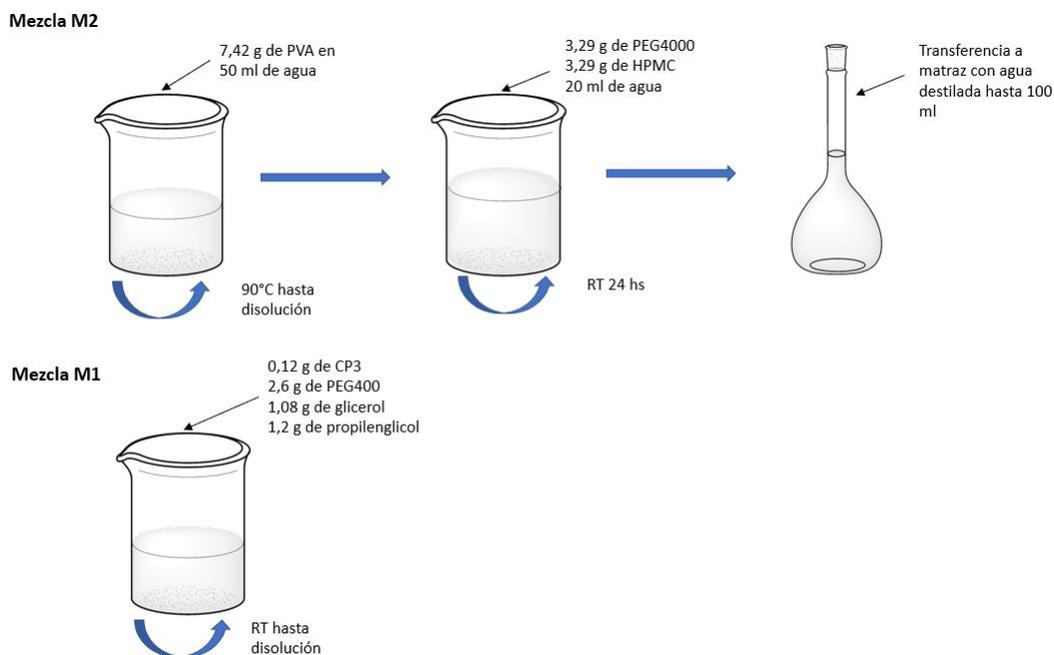


Figura 14: Proceso seguido para la preparación de las mezclas M1 y M2.

5.3.1. Mezcla M2

En primer lugar se prepararon 100 ml de una solución 10% m/v de la mezcla M2. Para esto se colocaron 7,42 g de PVA en 50 ml de agua y se lo llevó a agitación magnética vigorosa a 90 °C hasta completa disolución. Luego se añadió 3,29 g de PEG4000, 3,29 g de HPMC y 20 ml de agua y se llevó la mezcla a un agitador magnético. Luego de 24 hs de agitación se transfirió la mezcla M2 a un matraz y enrazó con agua destilada a 100 ml.

5.3.2. Mezcla M1

Cerca del fin de las 24 hs de agitación de la mezcla M2, se comenzó con la preparación de la mezcla M1. Para esto, se colocó 0,12 g de CP3, 2,6 g de PEG400, 1,08 g de glicerol y 1,2 g de propilenglicol en un vaso y se sometió a agitación magnética hasta completa disolución.

5.3.3. Preparación de las formulaciones finales y secado

Por último, se combinó en 15 frascos las cantidades de M1 y M2 necesarias para formar la composición de cada uno de los 15 films. Se realizaron 5 films para cada una de las corridas, 4 en moldes de silicona cuadrados de 4 cm de lado y 1 en un molde de silicona rectangular de 6,5 cm por 3 cm. Estos 5 films permiten tener suficiente cantidad de film para realizar todos los posteriores ensayos en duplicado y un extra ante cualquier eventualidad.

Debido a la alta viscosidad de las mezclas y para evitar pérdidas durante el proceso de medido, primero se pesó la cantidad deseada de M1 directamente en el frasco final y luego se añadió el volumen de M2 requerido. Los frascos fueron llevados a un orbital shaker SK-O330-Pro (DLAB, California, Estados Unidos) por aproximadamente 15 minutos hasta disolución completa. Para poder asegurar la igualdad de condiciones para todos los films de cada bloque, las mezclas finales fueron realizadas en 3 días separados, uno por bloque, y ambas mezclas M1 y M2 se mantuvieron en agitación constante durante los 3 días, para evitar precipitaciones.

Luego de preparadas las mezclas para cada film, se tomó 1,5 ml de cada una con jeringa, se lo mezcló con 500 μ l de agua destilada y se lo colocó en los moldes de silicona correspondientes. Luego de confirmar visualmente la distribución uniforme de la mezcla en cada molde, se secaron por 24 hs en estufa a 60 °C.

5.4. Caracterización visual

Luego de que el secado en estufa haya concluido, fueron inspeccionados cualitativamente, buscando una apariencia suave, flexible, lisa y translúcida. Además, se buscó la presencia de precipitaciones de las partículas del fármaco o de los polímeros deshidratados en la superficie del film. Estos resultados son interesantes ya que podrían indicar que la composición de los co-solventes y los polímeros utilizados en la formulación son adecuados para la solubilización y dispersión del fármaco en el film.

Luego de finalizada la inspección visual, los films fueron almacenados en placas de Petri rotuladas y adecuadamente cerradas para evitar la humidificación de los mismos.

5.5. Ensayo de Flexibilidad

La inspección cualitativa de la flexibilidad se calificó en una escala porcentual de 0 % a 100 % definida por la capacidad del film para ser enrollado y doblado. El 100 % de flexibilidad se definió como la capacidad del film de mantener un cilindro de 1 cm de diámetro y de ser doblado por la mitad sin crear un pliegue permanente. El 0 % de flexibilidad se definió como la incapacidad del film de mantener un cilindro de 1 cm de diámetro y de producir un pliegue con marcado permanente luego de ser plegado. Todas las mediciones se realizaron por duplicado.

5.6. Ensayo de secado

Para poder cuantificar el porcentaje residual de agua en los films luego del secado en estufa por 24 hs a 60 °C, se pesó el film y colocó en un desecador. Se repitió el proceso de pesado y colocación en el desecador cada 24 hs hasta alcanzar un peso constante. El porcentaje residual de agua fue calculado como la diferencia porcentual entre el peso luego del secado en estufa y el peso constante

obtenido luego de varios días en el desecador. Todas las mediciones se realizaron por duplicado y en ensayos independientes.

5.7. Ensayo de liberación del fármaco

El perfil de liberación de CP3 fue cuantificado con el film en un volúmen constante de 5 ml de SFV en un orbital shaker a 60 rpm. Se tomaron muestras de 1 ml a 1, 3, 6, 15 y 30 minutos con reposición de medio para mantener un volumen constante y fueron analizadas mediante un espectrofotómetro. Todas las mediciones se realizaron por duplicado y en ensayos independientes.

5.8. Ensayo de desintegración

Para evaluar cualitativamente la desintegración de los films, estos fueron colocados en 5 ml de SFV en un orbital shaker a 60 rpm mientras se observó la desintegración por 30 minutos. Por otro lado, se sumergió al film en SFV por 1 y 3 minutos para estudiar su desintegración en intervalos de tiempo similares a los utilizados en el ensayo de liberación del fármaco. Todas las mediciones se realizaron por duplicado.

6. Análisis de resultados

6.1. Caracterización de CP3

Como se mencionó anteriormente, la caracterización de CP3 fue llevada a cabo por el grupo de Química Medicinal del CIBION y la caracterización completa puede encontrarse en [4]. Los resultados obtenidos de la caracterización son coherentes con las estructuras moleculares de cada compuesto. A continuación se muestran los resultados del FT-IR y ¹H-RMN para los compuestos intermedios de la síntesis y los resultados del estudio de estabilidad en simulador de medio vaginal.

6.1.1. FT - IR

- **Caf⁺**: 3445 (b), 3075 (b), 2959 (w), 1720 (s), 1676 (vs), 1587 (m), 1551 (s), 1464 (m), 1349 (m), 1310 (m), 1253 (s), 1220 (s), 1095 (w), 1056 (m), 1007 (s), 883(m), 746 (s), 651 (w), 609 (m), 580 (s)
- **P7**: 3447 (b), 2361 (w), 1616 (m), 991 (s), 948 (s), 878 (vs), 808 (vs), 729 (vs), 535 (s).
- **P3**: 3447 (b), 2361 (w), 1623 (m), 1000 (s), 950 (s), 904 (s), 887 (s), 869 (s), 804, 707 (s), 511 (m)
- **CP3**: 3439 (b), 3089 (m), 2962 (m), 2361 (w), 1719(vs), 1670 (vs), 1584 (s), 1549 (vs), 1464 (s), 1346 (s), 1306 (m), 1261 (m), 1185(m), 1117 (w), 1094 (w), 1005 (m), 958 (s), 890 (vs), 855 (vs), 770 (vs), 720 (s), 602 (m), 509 (m)

6.1.2. ¹H RMN

- **Caf⁺**: (400 MHz, D₂O) 8.93 (s, 1H), 4.16 (s, 3H), 4.10 (s, 3H), 3.78 (s, 3H), 3.68 (s, 3H), 3.34 (s, 3H). En la Figura 15 se puede observar el espectro correspondiente.
- **CP3**: (600 MHz, DMSO-d₆) 9.05 (s, 1H), 4.27 (s, 3H), 4.14 (s, 3H), 3.80 (s, 3H), 3.35 (H₂O), 3.27 (s, 3H). En la Figura 16 se puede observar el espectro correspondiente.

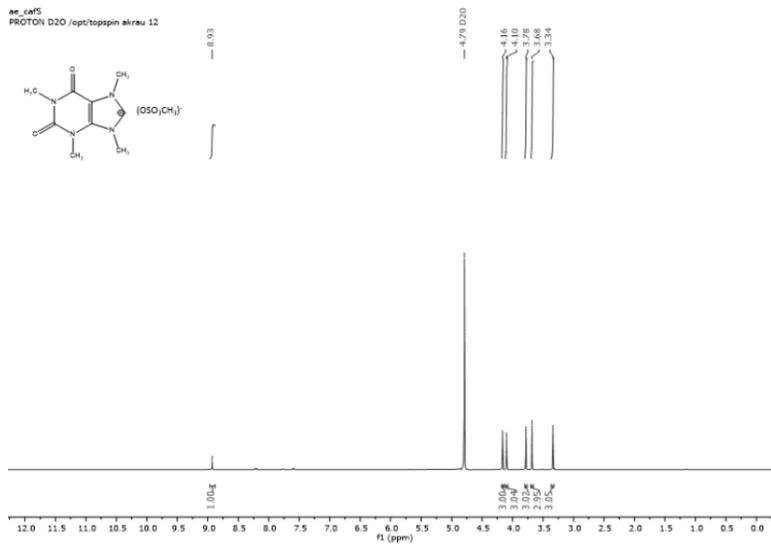


Figura 15: Espectro de 1H RMN de CaF⁺.

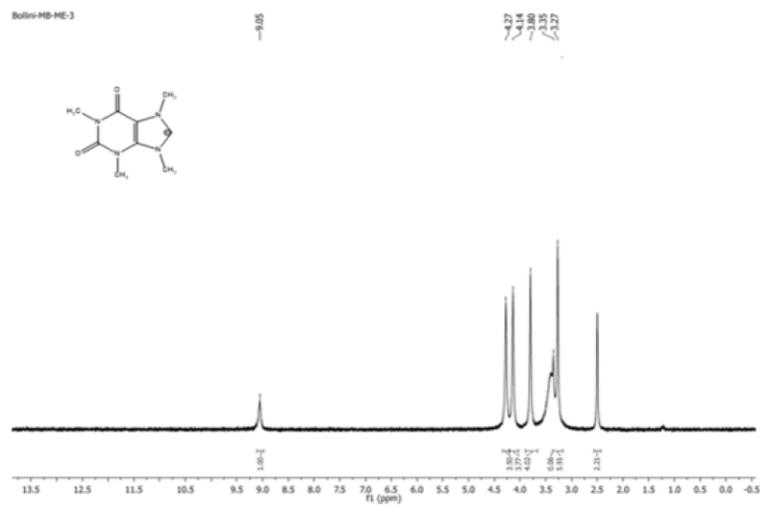


Figura 16: Espectro de 1H RMN de CP3.

6.1.3. Estabilidad de CP3 en SFV

Con respecto a la estabilidad de CP3 en el simulador de medio vaginal, se puede observar en la Figura 17 que en el transcurso de las 24 horas en las cuales fue medido no se evidencian variaciones en la absorbancia del mismo, por lo que se puede concluir que el compuesto es estable y conservó su estructura.

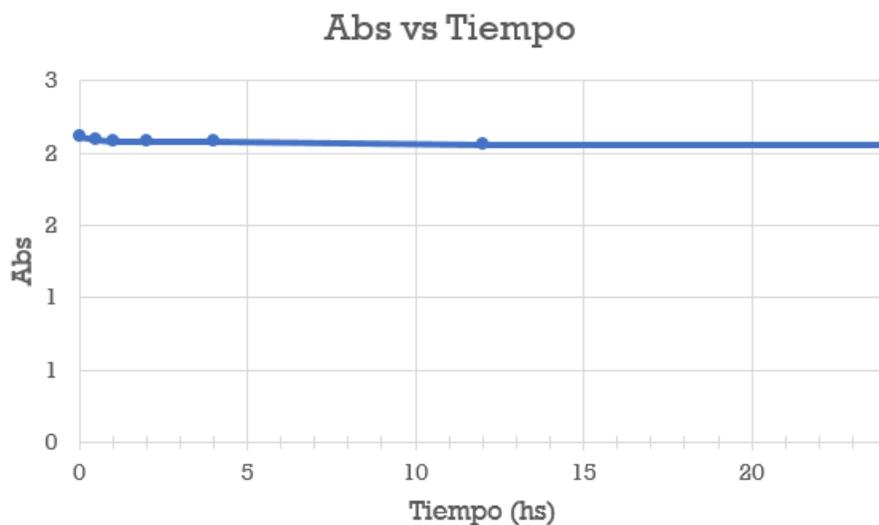


Figura 17: Estudio de estabilidad de CP3 en SFV (Absorbancia vs tiempo).

6.2. Caracterización visual y ensayo de flexibilidad

De la inspección visual de los films se puede observar que todos presentaban una apariencia suave, flexible, lisa y traslúcida. En la Figura 18 se muestra un ejemplo de un film de composición 11. Se reconoce además algunos detalles como pequeñas burbujas o imperfecciones en los bordes, que se deben al proceso de fabricación y que podrían ser evitadas con mínimas modificaciones en el mismo.

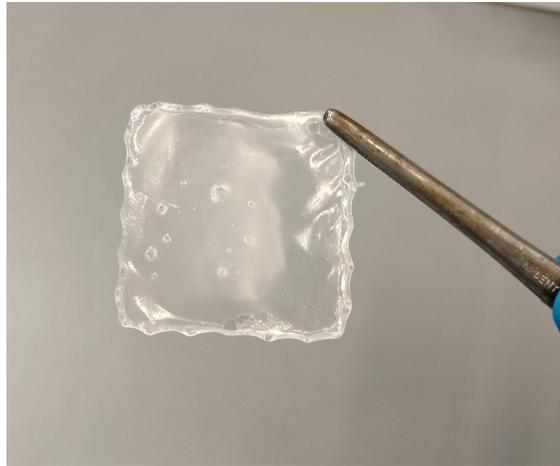


Figura 18: Film de composición 11

En el 90 % de los films no se observaron precipitaciones y en los casos en que sí, cabe destacar eran prácticamente despreciables y que no pertenecían a films de una misma corrida. Dado que no se observó ningún patrón en las precipitaciones, estas se atribuyen al proceso de fabricación y no a la composición de las mezclas. Al momento de seleccionar las porciones de film a utilizar para los ensayos posteriores se evitó tomar porciones en las que se evidenciaran las precipitaciones y de ser posible se evitó utilizar los films completamente, ya que se contaba con cantidad extra.

En la Figura 19 se puede observar una vista lateral y superficial de un film enrollado para la realización del ensayo de flexibilidad. Se puede comprobar que puede mantener el cilindro de 1 cm de diámetro como era esperado.



Figura 19: Film enrollado utilizado para ensayo de flexibilidad. Vista frontal y lateral.

Tabla 7: Valores de flexibilidad obtenidos.

Film	Flexibilidad
1	96 %
2	100 %
3	100 %
4	95 %
5	97 %
6	97 %
7	95 %
8	100 %
9	97 %
10	100 %
11	98 %
12	100 %
13	100 %
14	97 %
15	100 %

En la Tabla 7 se observan los resultados del ensayo de flexibilidad. Todos los films presentaron una buena flexibilidad y ninguno presentó marcados luego de ser doblado. Ningún film fue descartado por falta de flexibilidad. Los valores de flexibilidad menores al 100 % se deben en todos los casos a una menor flexibilidad en los extremos del film, lo cual podría ser mejorado con pequeñas modificaciones al proceso de fabricación y con la utilización de un molde con laterales más uniformes.

6.3. Estudio del porcentaje residual de agua

Se obtuvo un porcentaje residual de agua promedio del 4,96 % $\pm 0,015$, menor al 10 % máximo deseado. En la Tabla 8 se observa la evolución de peso día a día y el porcentaje residual de agua para cada film. Cabe destacar, además, que ningún film individual superó el 10 % de agua residual.

Tabla 8: Evolución de peso día a día y el porcentaje residual de agua obtenidos.

Film	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Día 6	Perdida de peso
1	64	61,6	60,8	60,5	60,5	60,6	5,31 %
2	52,2	50,3	50	49,8	49,8	49,8	4,60 %
3	52,8	51	50,4	50,3	50,3	50,2	4,92 %
4	70,2	67,6	66,8	66,5	66,5	66,7	4,99 %
5	51,5	49,6	48,8	48,6	48,6	48,8	5,24 %
6	48,7	47,3	46,2	46,2	46,2	46,8	3,90 %
7	87,1	84,1	83	82,6	82,6	82,8	4,94 %
8	58,4	56,2	55,5	55	55	55,4	5,14 %
9	47,5	45,8	45,1	44,9	44,9	45,3	4,63 %
10	49,1	44,8	44,2	44,2	44	44,2	9,98 %
11	40,9	39,8	39,2	38,6	38,6	39,2	4,16 %
12	33,7	32,9	32,4	32	32	32,7	2,97 %
13	34,3	33,5	32,6	32,6	32,6	32,7	4,66 %
14	58,3	56,7	55,8	55,6	55,6	55,8	4,29 %
15	67,9	65,9	64,5	64,3	64,3	64,7	4,71 %

Estos resultados podrían contribuir para validar el proceso de fabricación ya que indicarían que el mismo no introduce en el film agua en exceso y que el período de tiempo y temperatura utilizados para el secado es apropiada.

6.4. Estudio del perfil de liberación

En las Figuras 20 a 34 se observan los espectros obtenidos para cada uno de los films a los 1, 3, 6, 15 y 30 minutos de colocarlos en el SFV.

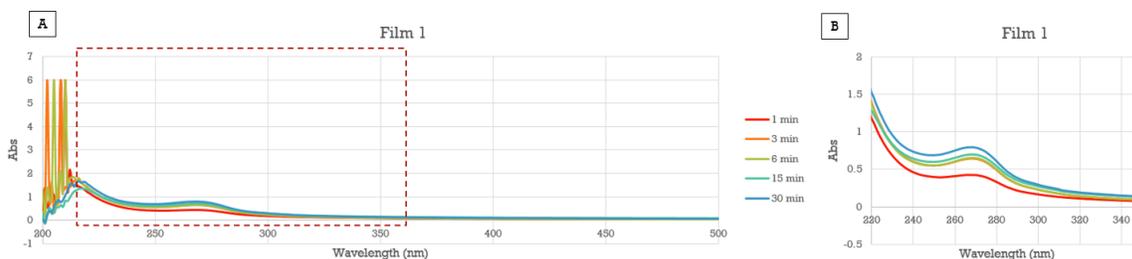


Figura 20: A) Espectrofotometría UV-Vis y B) ampliación de la región 220-350 nm - Film 1

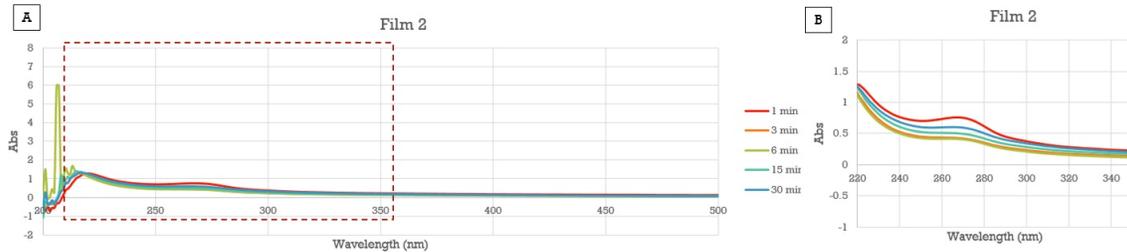


Figura 21: A) Espectrofotometria UV-Vis y B) ampliación de la región 220-350 nm - Film 2

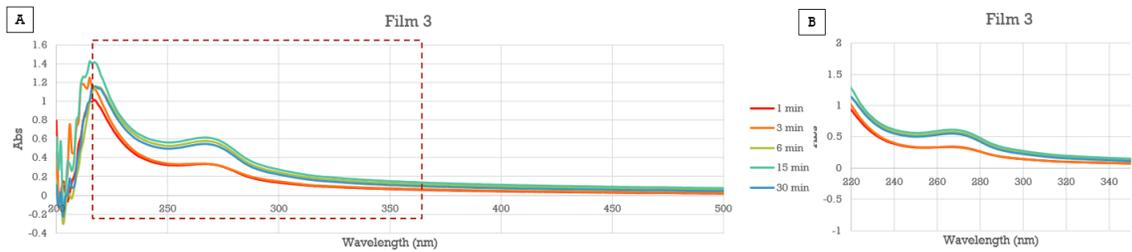


Figura 22: A) Espectrofotometria UV-Vis y B) ampliación de la región 220-350 nm - Film 3

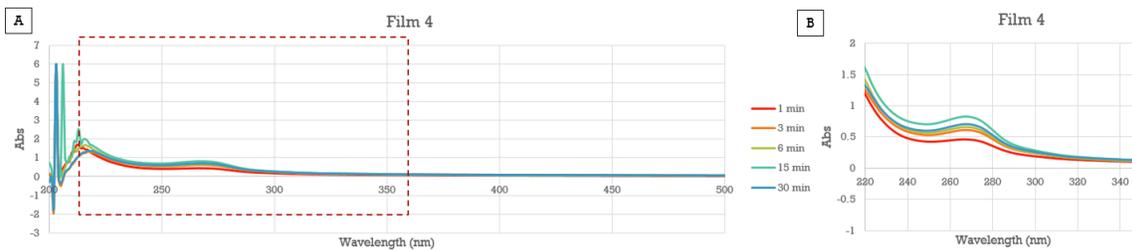


Figura 23: A) Espectrofotometria UV-Vis y B) ampliación de la región 220-350 nm - Film 4

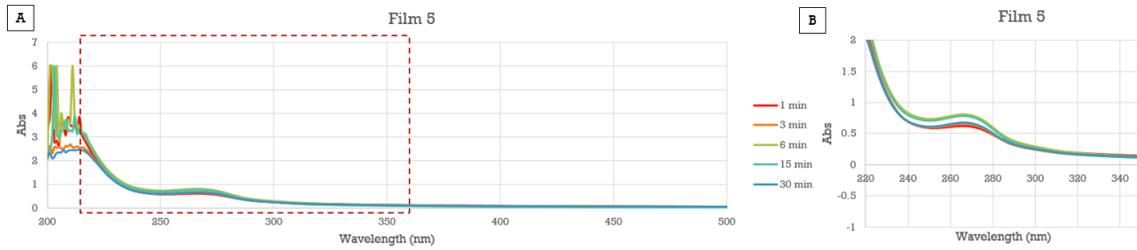


Figura 24: A) Espectrofotometría UV-Vis y B) ampliación de la región 220-350 nm - Film 5

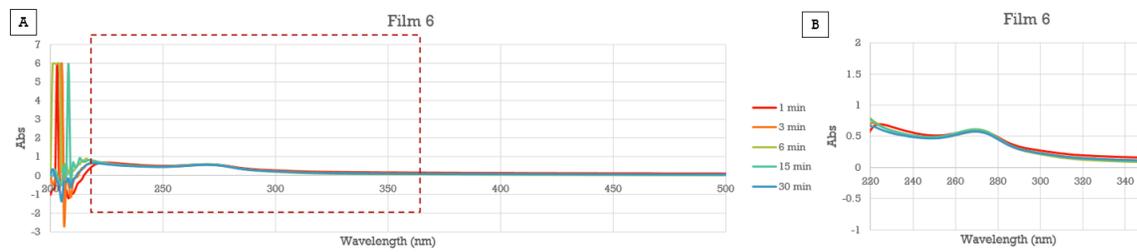


Figura 25: A) Espectrofotometría UV-Vis y B) ampliación de la región 220-350 nm - Film 6

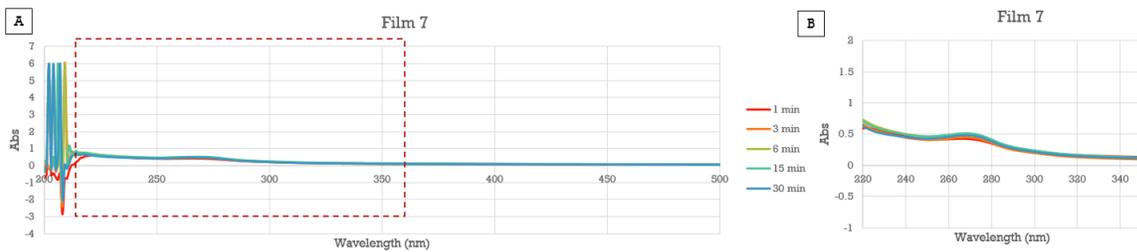


Figura 26: A) Espectrofotometría UV-Vis y B) ampliación de la región 220-350 nm - Film 7

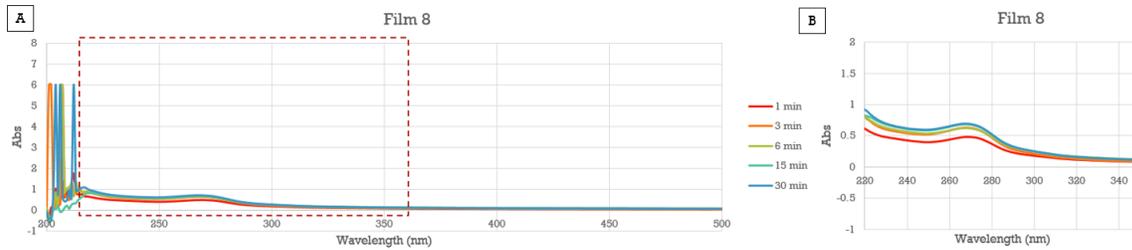


Figura 27: A) Espectrofotometria UV-Vis y B) ampliación de la región 220-350 nm - Film 8

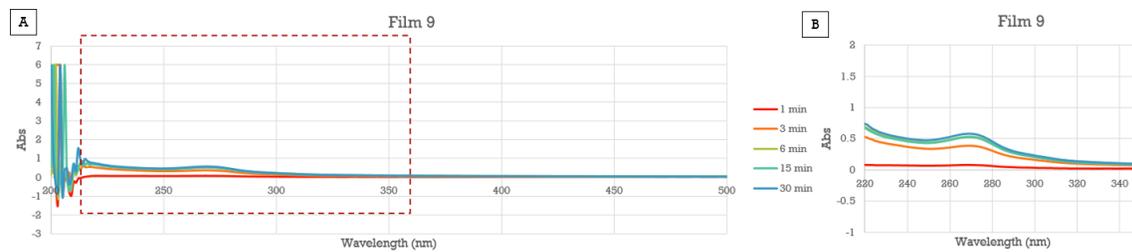


Figura 28: A) Espectrofotometria UV-Vis y B) ampliación de la región 220-350 nm - Film 9

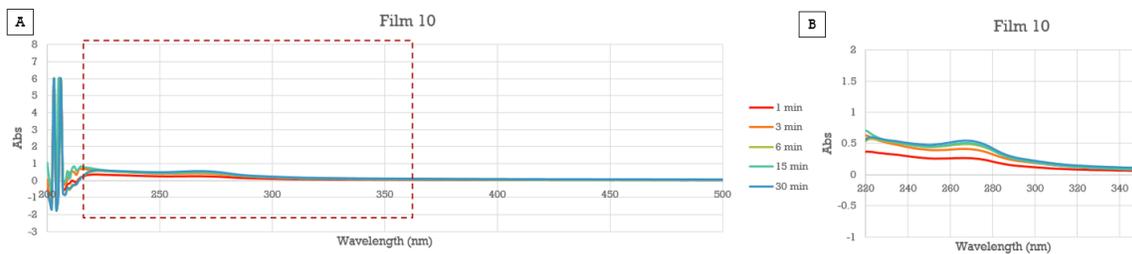


Figura 29: A) Espectrofotometria UV-Vis y B) ampliación de la región 220-350 nm - Film 10

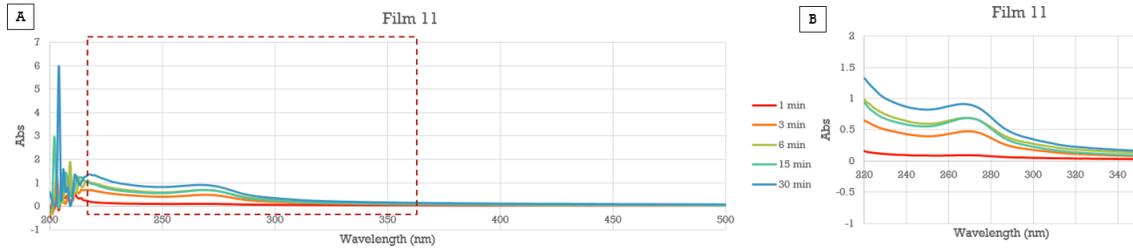


Figura 30: A) Espectrofotometria UV-Vis y B) ampliación de la región 220-350 nm - Film 11

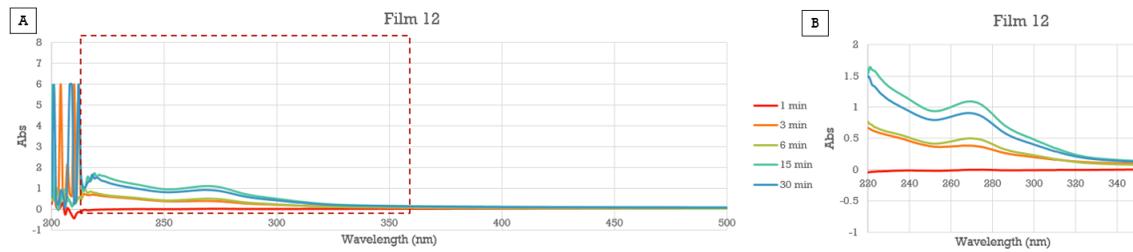


Figura 31: A) Espectrofotometria UV-Vis y B) ampliación de la región 220-350 nm - Film 12

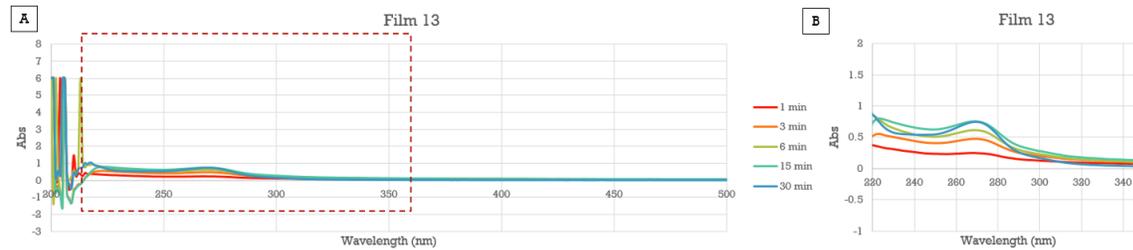


Figura 32: A) Espectrofotometria UV-Vis y B) ampliación de la región 220-350 nm - Film 13

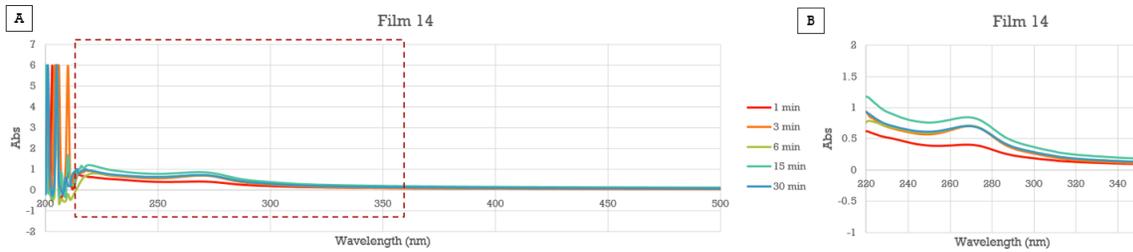


Figura 33: A) Espectrofotometria UV-Vis y B) ampliación de la región 220-350 nm - Film 14

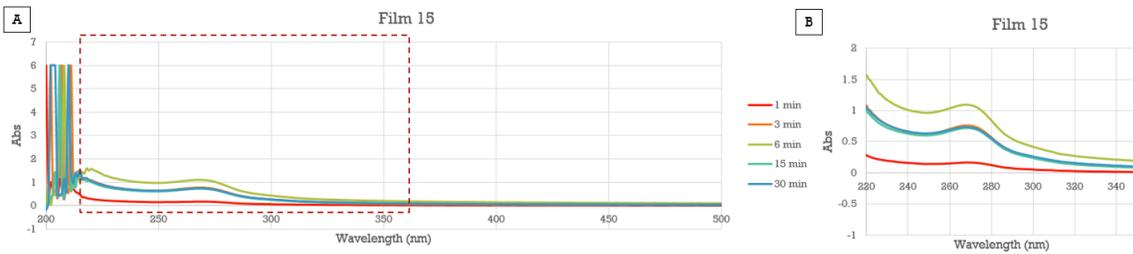


Figura 34: A) Espectrofotometria UV-Vis y B) ampliación de la región 220-350 nm - Film 15

Para poder utilizar la información obtenida en las curvas anteriores se confeccionó la curva de calibración con concentraciones conocidas de CP3 de ecuación $y = 18,709x$, donde x es la concentración e y la absorbancia. El máximo de absorbancia para CP3 se observa en la longitud de onda de 263 nm.

En la Tabla 9 se pueden observar las concentraciones en mg/L obtenidas para cada film que serán utilizadas luego como input en el modelo para determinar la composición ideal del film.

Tabla 9: Concentraciones en mg/L de CP3 obtenidas para cada film a lo largo del tiempo.

Film	1 min	3 min	6 min	15 min	30 min
1	23.4	19.6	20.5	29.9	26.1
2	39.5	23.1	21.8	26.8	31.8
3	21.0	20.3	26.5	27.4	26.2
4	22.1	36.8	34.0	38.1	40.8
5	32.9	34.2	42.4	41.1	35.2
6	30.2	28.8	30.7	30.1	28.7
7	22.4	23.3	26.4	26.5	25.0
8	24.1	32.1	32.3	35.5	35.8
9	3.9	19.7	26.7	26.5	29.5
10	13.9	21.6	25.3	26.2	28.1
11	4.5	23.9	35.3	34.4	47.4
12	6.4	20.8	27.0	42.3	33.0
13	13.7	38.3	33.8	34.7	39.2
14	21.3	34.9	36.2	43.4	36.2
15	27.2	39.7	34.7	51.8	36.6

6.5. Estudio de la desintegración

En lo que respecta a la desintegración, se pudo observar que al minuto 1 la misma ya había comenzado para todos los films y que para el minuto 3 todos se encontraban ya en fase de gel. Estos resultados podrían proporcionar una buena y rápida mucoadhesión. Además se observó disolución completa antes de los 15 minutos.

Dado que la desintegración es muy rápida y no se contaba con los elementos para poder retirar el gel del SFV asegurándose de que la extracción sea completa para poder pesarlo, no se pudo obtener una medida porcentual de la desintegración en función del tiempo. Es por esto que esta variable será excluida del diseño.

6.6. Selección de la composición óptima del film

Para poder determinar la composición óptima del film, los valores correspondientes a cada una de las respuestas (R1-R7) fueron introducidas en el software y analizadas para buscar el modelo que mejor las describa.

En la Tabla 10 se puede observar un resumen del modelado aplicado a cada respuesta.

Para la respuesta R1: liberación del fármaco al minuto 1, se utilizó como modelo la media ya que se obtuvo falta de significancia en los demás modelos. Como se puede observar en la Figura 35 se obtuvo un valor F de falta de ajuste de 1.02 y el p valor correspondiente es de 0.5312. En el

Tabla 10: Modelado aplicado a cada respuesta.

Respuesta	Modelo	Transformación	Valor p
R1	Media	No	-
R2	Grado 4	$y' = (y + k)^\lambda$, con $k = 0$ y $\lambda = -0,03$	0.0092
R3	Grado 4	$y' = (y + k)^\lambda$, con $k = 0$ y $\lambda = -0,58$	0.0492
R4	Grado 4	$y' = (y + k)^\lambda$, con $k = 0$ y $\lambda = -1,88$	0.0206
R5	Media	No	-
R6	Lineal	$y' = (y + k)^\lambda$, con $k = 0$ y $\lambda = -1,38$	0.0309
R7	Media	No	-

gráfico de la Figura 36 se puede comprobar la normalidad de los residuos.

Response 1 R1: Drug Rel. 1 min

ANOVA for Mean Mixture Model

*** Mixture Component Coding is L_Pseudo. ***

Analysis of variance table [Partial sum of squares - Type III]

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F Value	p-value Prob > F
Block	4.63	2	2.32		
Model	0.000	0			
Residual	10.45	12	0.87		
Lack of Fit	7.01	8	0.88	1.02	0.5312 not significant
Pure Error	3.44	4	0.86		
Cor Total	15.08	14			

Figura 35: Tabla de análisis de varianza para la respuesta R1.

Design-Expert® Software
R1: Drug Rel. 1 min

Color points by value of
R1: Drug Rel. 1 min:
3.9505
0.3882

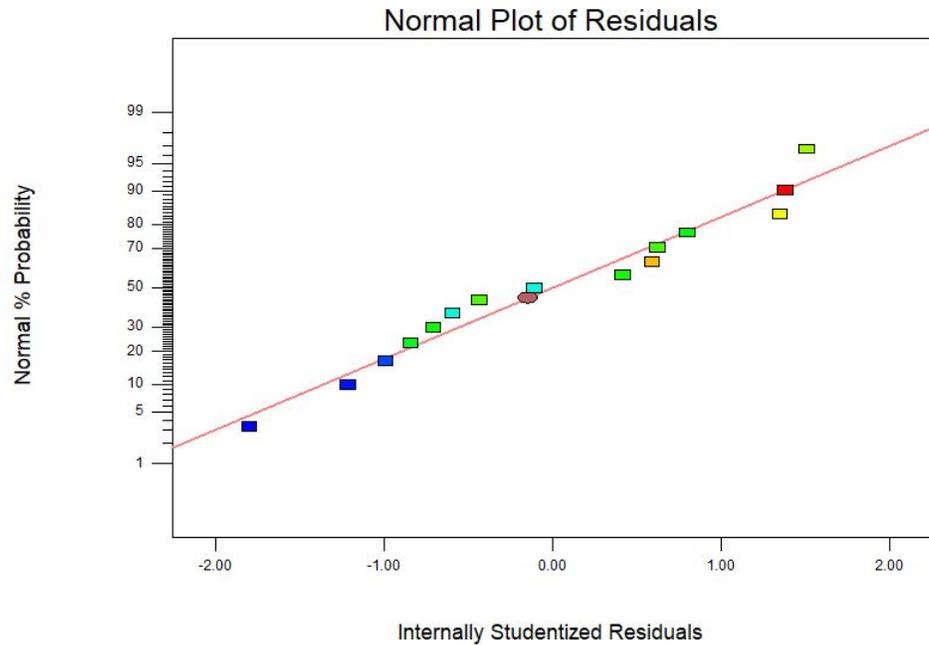


Figura 36: Gráfico de probabilidad normal de los residuos para la respuesta R1.

Para la respuesta R2: liberación del fármaco al minuto 3, se aplicó una transformación el tipo $y' = (y + k)^\lambda$, con $k = 0$ y $\lambda = -0,03$ y se eligió un modelo de grado 4 en el que se eliminó el término cúbico por no significancia de su coeficiente. Como se puede observar en la Figura 37, se obtuvo un valor F de 7.18 con un valor p significativo para el modelo. Se obtuvo además un valor p de 0.0732 no significativo para la falta de ajuste del modelo. En la Figura 38 se observan los coeficientes obtenidos para el modelo. En el gráfico de la Figura 39 se puede comprobar la normalidad de los residuos.

Response 2 **R2: Drug Rel. 3 min.**

Transform: Power **Lambda: -0.03** **Constant: 0**

ANOVA for Reduced Quartic Mixture Model

***** Mixture Component Coding is L_Pseudo. *****

Analysis of variance table [Partial sum of squares - Type III]

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F Value	p-value	Prob > F
Block	1.040E-004	2	5.199E-005			
Model	5.126E-004	3	1.709E-004	7.18	0.0092	significant
Linear Mixtur	1.093E-004	1	1.093E-004	4.59	0.0607	
AB	1.632E-004	1	1.632E-004	6.86	0.0278	
AB(A-B) ²	4.027E-004	1	4.027E-004	16.93	0.0026	
Residual	2.141E-004	9	2.379E-005			
Lack of Fit	1.843E-004	5	3.686E-005	4.95	0.0732	not significant
Pure Error	2.978E-005	4	7.446E-006			
Cor Total	8.306E-004	14				

Figura 37: Tabla de análisis de varianza para la respuesta R2.

Component	Coefficient		Standard Error	95% CI		VIF
	Estimate	df		Low	High	
Block 1	4.547E-003	2				
Block 2	-2.219E-003					
Block 3	-2.328E-003					
A-M1	0.97	1	2.450E-003	0.96	0.97	1.38
B-M2	0.97	1	2.189E-003	0.97	0.98	1.35
AB	0.038	1	0.015	5.217E-003	0.071	3.00
AB(A-B) ²	-0.78	1	0.19	-1.20	-0.35	2.76

Figura 38: Coeficientes estimados para el modelo de la respuesta R2.

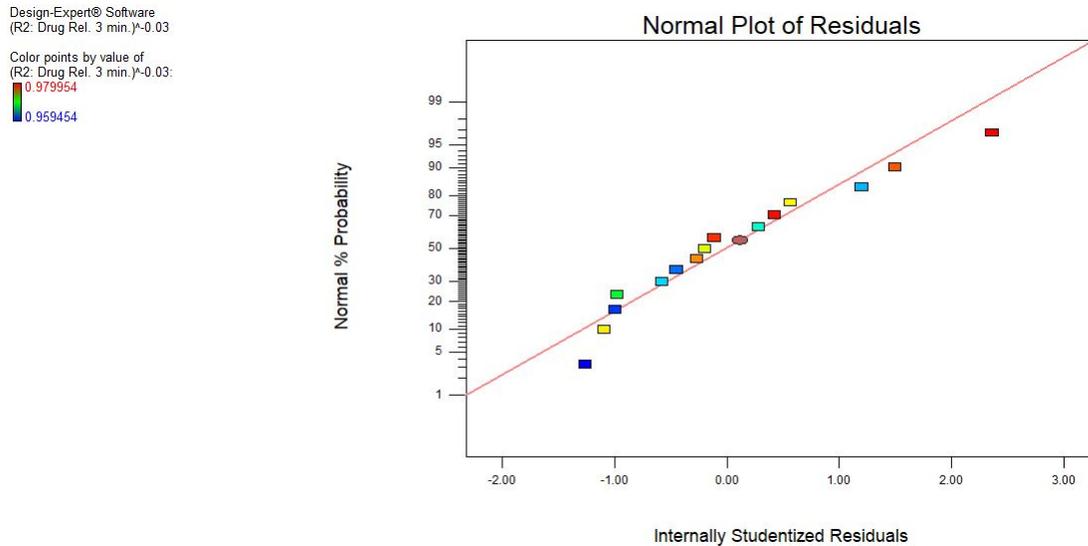


Figura 39: Gráfico de probabilidad normal de los residuos para la respuesta R2.

Para la respuesta R3: liberación del fármaco al minuto 6, se aplicó una transformación el tipo $y' = (y + k)^\lambda$, con $k = 0$ y $\lambda = -0,58$ y se eligió un modelo de grado 4 en el que se eliminó el termino cúbico por no significancia de su coeficiente. Como se muestra en la Figura 40, se obtuvo un valor F de 4.11 con un valor p significativo de 0.0429 para el modelo. Se obtuvo además un valor p de 0.0730 no significativo para la falta de ajuste del modelo. En la Figura 41 se observan los coeficientes obtenidos para el modelo. En el gráfico de la Figura 42 se puede comprobar la normalidad de los residuos.

Response 3 R3: Drug Rel. 6 min.
 Transform: Power Lambda: 0.58 Constant: 0

ANOVA for Reduced Quartic Mixture Model
 *** Mixture Component Coding is L_Pseudo. ***

Analysis of variance table [Partial sum of squares - Type III]

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F Value	p-value	Prob > F
Block	0.11	2	0.053			
Model	0.33	3	0.11	4.11	0.0429	significant
Linear Mixtur	0.012	1	0.012	0.46	0.5144	
AB	4.801E-003	1	4.801E-003	0.18	0.6798	
AB(A-B) ²	0.21	1	0.21	8.05	0.0195	
Residual	0.24	9	0.026			
Lack of Fit	0.20	5	0.041	4.92	0.0738	not significant
Pure Error	0.033	4	8.299E-003			
Cor Total	0.67	14				

Figura 40: Tabla de análisis de varianza para la respuesta R3.

Component	Coefficient		Standard Error	95% CI		VIF
	Estimate	df		Low	High	
Block 1	-0.13	2				
Block 2	0.033					
Block 3	0.10					
A-M1	1.87	1	0.082	1.68	2.05	1.38
B-M2	1.78	1	0.073	1.61	1.94	1.35
AB	-0.21	1	0.49	-1.31	0.89	3.00
AB(A-B) ²	17.86	1	6.29	3.62	32.10	2.76

Figura 41: Coeficientes estimados para el modelo de la respuesta R3.

Design-Expert® Software
 (R3: Drug Rel. 6 min.)^0.58
 Color points by value of
 (R3: Drug Rel. 6 min.)^0.58:
 2.31116
 1.5168

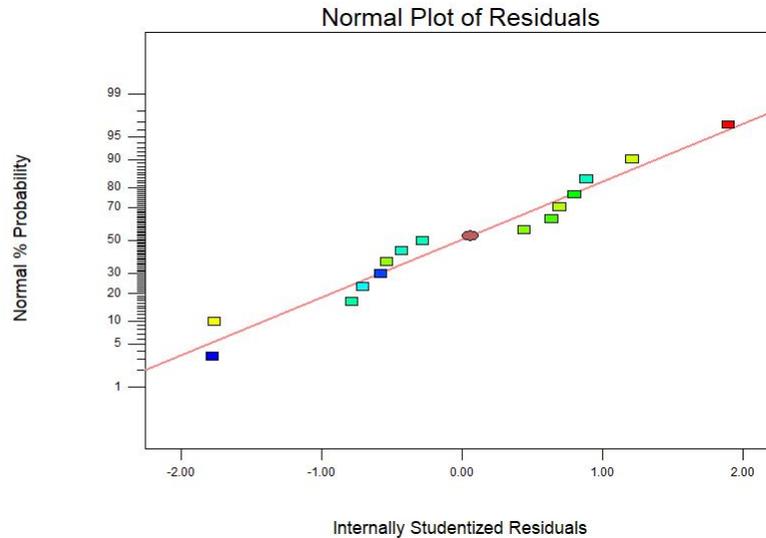


Figura 42: Gráfico de probabilidad normal de los residuos para la respuesta R3.

Para la respuesta R4: liberación del fármaco al minuto 15, se aplicó una transformación el tipo $y' = (y + k)^\lambda$, con $k = 0$ y $\lambda = -1,88$ y se eligió un modelo de grado 4 en el que se eliminó el termino cúbico por no significancia de su coeficiente. Como se muestra en la Figura 43, se obtuvo un valor F de 5.45 con un valor p significativo de 0.0206 para el modelo. Se obtuvo además un valor p de 0.5094 no significativo para la falta de ajuste del modelo. En la Figura 44 se observan los coeficientes obtenidos para el modelo. En el gráfico de la Figura 45 se puede comprobar la normalidad de los residuos.

Response 4 R4: Drug Rel. 15 min
 Transform: Power Lambda: -1.88 Constant: 0

ANOVA for Reduced Quartic Mixture Model
 *** Mixture Component Coding is L_Pseudo. ***

Analysis of variance table [Partial sum of squares - Type III]

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F Value	p-value	Prob > F
Block	0.011	2	5.694E-003			
Model	7.876E-003	3	2.625E-003	5.45	0.0206	significant
Linear Mixtur	1.223E-003	1	1.223E-003	2.54	0.1454	
AB	2.329E-003	1	2.329E-003	4.84	0.0554	
AB(A-B) ²	6.594E-003	1	6.594E-003	13.69	0.0049	
Residual	4.335E-003	9	4.816E-004			
Lack of Fit	2.421E-003	5	4.843E-004	1.01	0.5094	not significant
Pure Error	1.913E-003	4	4.783E-004			
Cor Total	0.024	14				

Figura 43: Tabla de análisis de varianza para la respuesta R4.

Component	Coefficient		Standard Error	95% CI		VIF
	Estimate	df		Low	High	
Block 1	0.021	2				
Block 2	0.011					
Block 3	-0.032					
A-M1	0.098	1	0.011	0.073	0.12	1.38
B-M2	0.13	1	9.850E-003	0.10	0.15	1.35
AB	0.14	1	0.066	-4.144E-003	0.29	3.00
AB(A-B) ²	-3.15	1	0.85	-5.07	-1.22	2.76

Figura 44: Coeficientes estimados para el modelo de la respuesta R4.

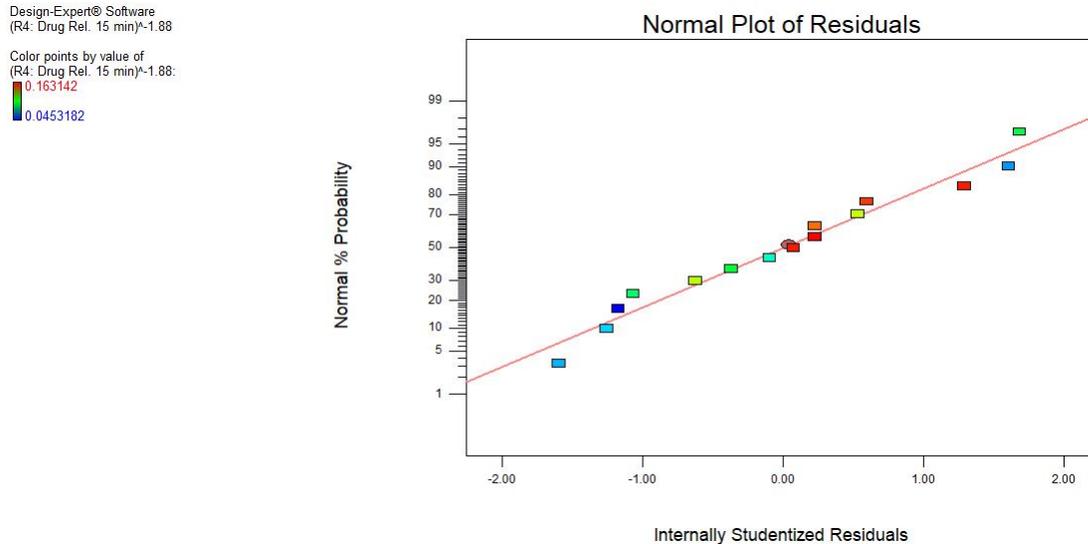


Figura 45: Gráfico de probabilidad normal de los residuos para la respuesta R4.

Para la respuesta R5: liberación del fármaco al minuto 30, se utilizó como modelo la media ya que se obtuvo falta de significancia en los demás modelos. Como se puede observar en la Figura 46 se obtuvo un valor F de falta de ajuste de 3.39 y el p valor correspondiente es de 0.1266. Este p valor no significativo implica que hay una alta probabilidad de que la falta de ajuste del modelo se deba a ruido. En el gráfico de la Figura 47 se puede comprobar la normalidad de los residuos.

Response 5 R5: Drug Rel. 30 min

Transform: Power Lambda: -0.55 Constant: 0

ANOVA for Mean Mixture Model

*** Mixture Component Coding is L_Pseudo. ***

Analysis of variance table [Partial sum of squares - Type III]

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F Value	p-value
Block	0.015	2	7.622E-003		
Model	0.000	0			
Residual	0.023	12	1.951E-003		
Lack of Fit	0.020	8	2.551E-003	3.39	0.1266 not significant
Pure Error	3.009E-003	4	7.523E-004		
Cor Total	0.039	14			

Figura 46: Tabla de análisis de varianza para la respuesta R5.

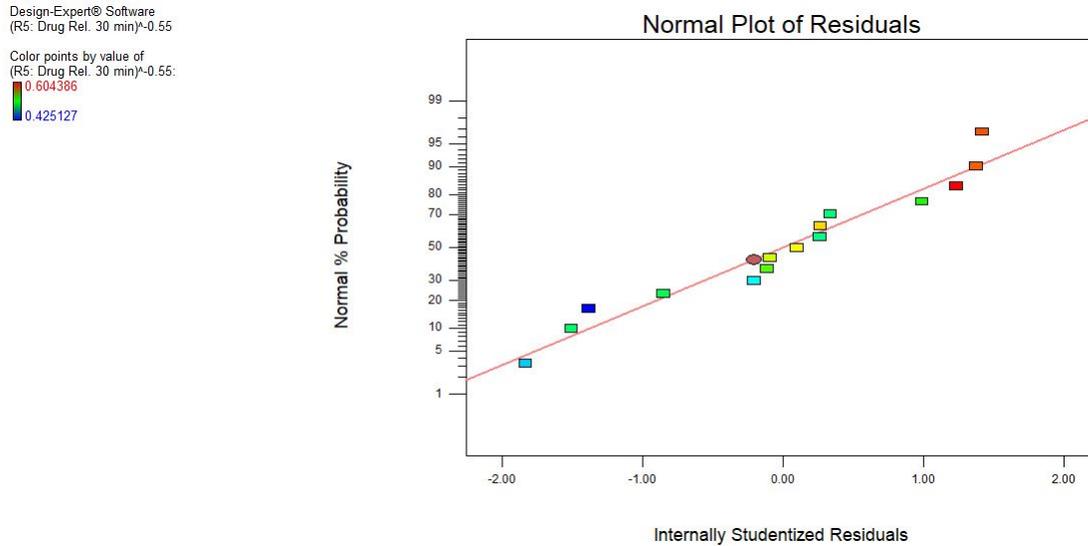


Figura 47: Gráfico de probabilidad normal de los residuos para la respuesta R5.

Para la respuesta R6: porcentaje residual de agua, por estudio del gráfico de Box-Cox que se observa en la Figura 48 y por sugerencia del programa, se aplicó una transformación del tipo $y' = (y + k)^\lambda$, con $k = 0$ y $\lambda = -1,38$.

Design-Expert® Software
(R6: % Weight Loss)-1.38

Lambda
Current = -1.38
Best = -1.38
Low C.I. = -2.77
High C.I. = -0.06

Recommend transform:
Power
(Lambda = -1.38)

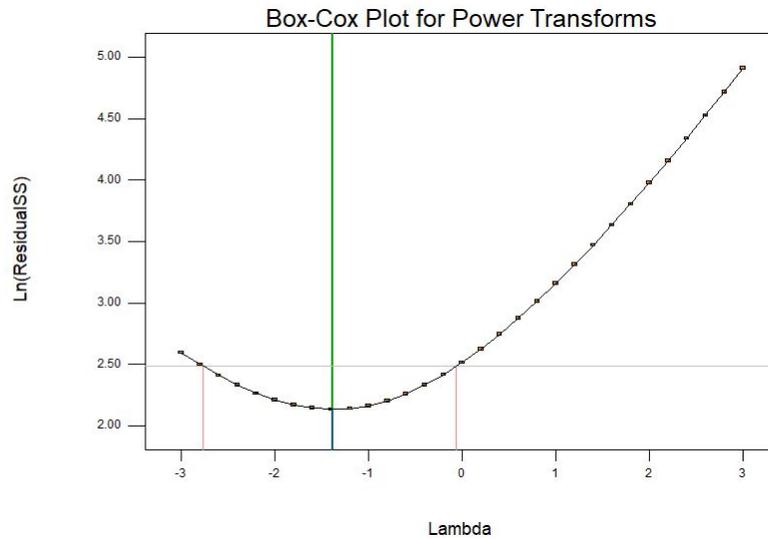


Figura 48: Gráfico de Box-Cox para la respuesta R6.

Para esta respuesta se utilizó un modelo lineal, con un valor F 6.13. Como se observa en la Figura 49, se obtuvo un valor p significativo de 0.309 para el modelo. Se obtuvo además un valor p de 0.5508 no significativo para la falta de ajuste del modelo. En la Figura 50 se observan los coeficientes obtenidos para el modelo y se destaca que el 0 no forma parte del intervalo de confianza de ninguno. En el gráfico de la Figura 51 se puede comprobar la normalidad de los residuos.

Response 6 R6: % Weight Loss

Transform: Power Lambda: -1.38 Constant: 0

ANOVA for Linear Mixture Model

*** Mixture Component Coding is L_Pseudo. ***

Analysis of variance table [Partial sum of squares - Type III]

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F Value	p-value Prob > F	
Block	4.793E-003	2	2.397E-003			
Model	5.267E-003	1	5.267E-003	6.13	0.0309	significant
Linear Mixtur	5.267E-003	1	5.267E-003	6.13	0.0309	
Residual	9.459E-003	11	8.599E-004			
Lack of Fit	5.927E-003	7	8.467E-004	0.96	0.5508	not significant
Pure Error	3.532E-003	4	8.831E-004			
Cor Total	0.020	14				

Figura 49: Tabla de análisis de varianza para la respuesta R6.

Component	Coefficient		Standard Error	95% CI		VIF
	Estimate	df		Low	High	
Block 1	-0.016	2				
Block 2	-0.015					
Block 3	0.031					
A-M1	0.095	1	0.013	0.066	0.12	1.09
B-M2	0.14	1	0.012	0.12	0.17	1.09

Figura 50: Coeficientes estimados para el modelo de la respuesta R6.

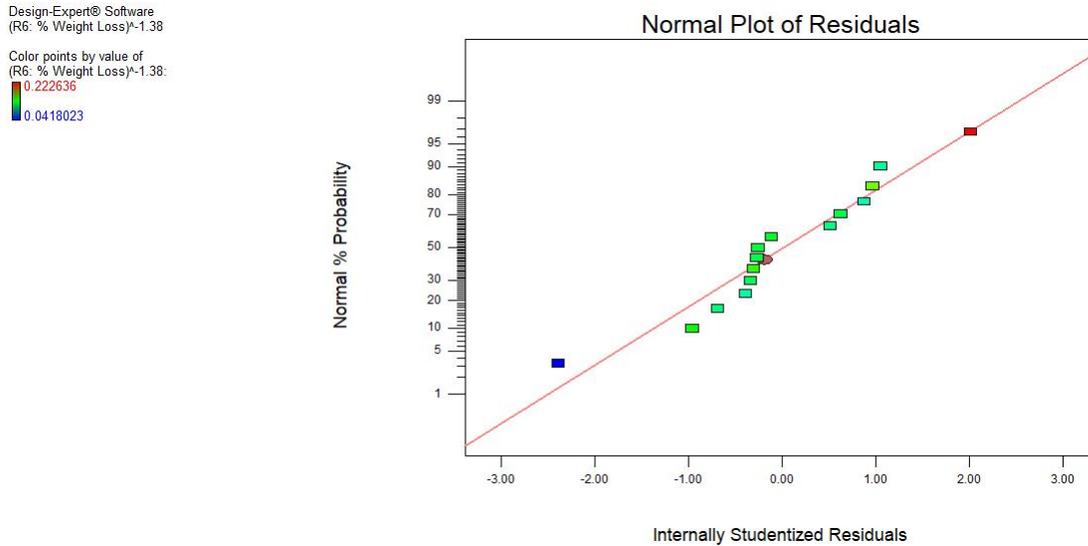


Figura 51: Gráfico de probabilidad normal de los residuos para la respuesta R6.

Para la respuesta R7: flexibilidad, se utilizó como modelo la media por falta de significancia en los demás modelos. Como se puede observar en la Figura 52 se obtuvo un valor F de falta de ajuste de 3.19 y el p valor no significativo correspondiente es de 0.1386. En el gráfico de la Figura 53 se puede comprobar la normalidad de los residuos.

Response 7 R7: % Pliability

ANOVA for Mean Mixture Model

*** Mixture Component Coding is L_Pseudo. ***

Analysis of variance table [Partial sum of squares - Type III]

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F Value	p-value Prob > F
Block	5.73	2	2.87		
Model	0.000	0			
Residual	48.00	12	4.00		
Lack of Fit	41.50	8	5.19	3.19	0.1386 not significant
Pure Error	6.50	4	1.63		
Cor Total	53.73	14			

Figura 52: Tabla de análisis de varianza para la respuesta R7.

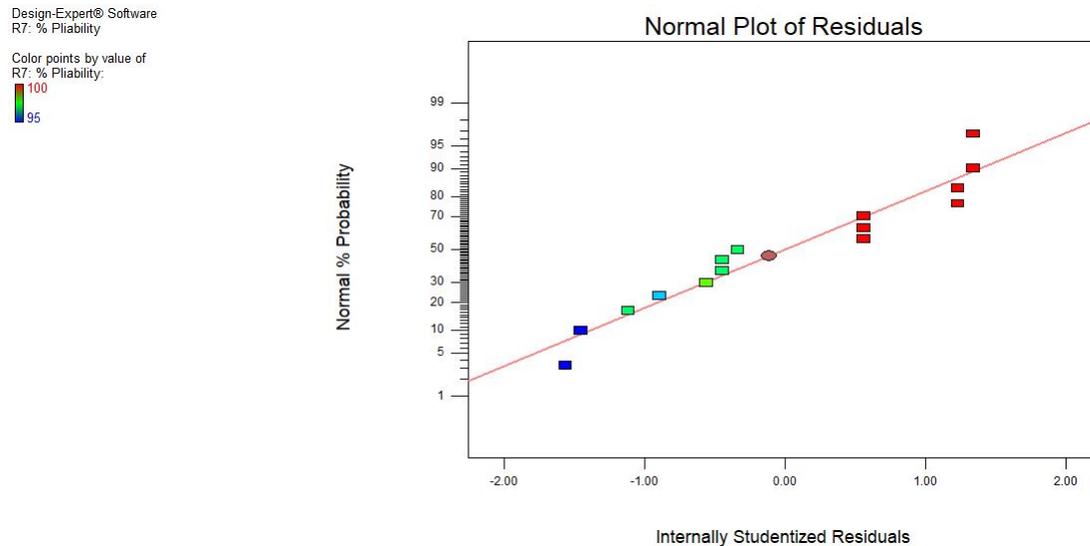


Figura 53: Gráfico de probabilidad normal de los residuos para la respuesta R7.

Para la optimización numérica del diseño se utilizaron los siguientes criterios. Se decidió dar mayor importancia a la respuesta R2 y menor a las respuestas R4 y R5, ya que se busca que el film tenga una rápida liberación inicial. Además se eligió una importancia de 4 para la respuesta R6 ya que influye directamente en el almacenamiento del film, y uno que no requiera demasiados cuidados especiales de guardado podría mejorar la adopción entre los usuarios. Teniendo en cuenta los objetivos planteados para las características del film óptimo, se buscó maximización de todas las respuestas excepto R6.

- M1: objetivo dentro del rango
- M2: objetivo dentro del rango
- R1: maximización e importancia 4 de 5
- R2: maximización e importancia 5 de 5
- R3: maximización e importancia 4 de 5
- R4: maximización e importancia 3 de 5
- R5: maximización e importancia 3 de 5
- R6: minimización e importancia 4 de 5
- R7: maximización e importancia 3 de 5

De las soluciones obtenidas, con valores de deseabilidad aceptables, luego de la optimización numérica se eligió la solución 1 que se observa en la Tabla 11, ya que es la que presenta el mayor valor de deseabilidad.

Tabla 11: Solución elegida luego de la optimización numérica del modelo.

Solución	M1	M2	Deseabilidad
1	0.254	0.746	0.740

En la Figura 54 se muestra la ubicación de los factores y respuestas para la solución 1. Se puede observar que todas las respuestas cumplen con las condiciones deseadas y que la respuesta R2, a la que mayor importancia se le había otorgado, se encuentra por encima del extremo superior de la rampa. Esto muestra que el film tendría una buena liberación inicial. Por otro lado, el porcentaje residual de agua predicho se encontraría por debajo del límite superior de 10 %.

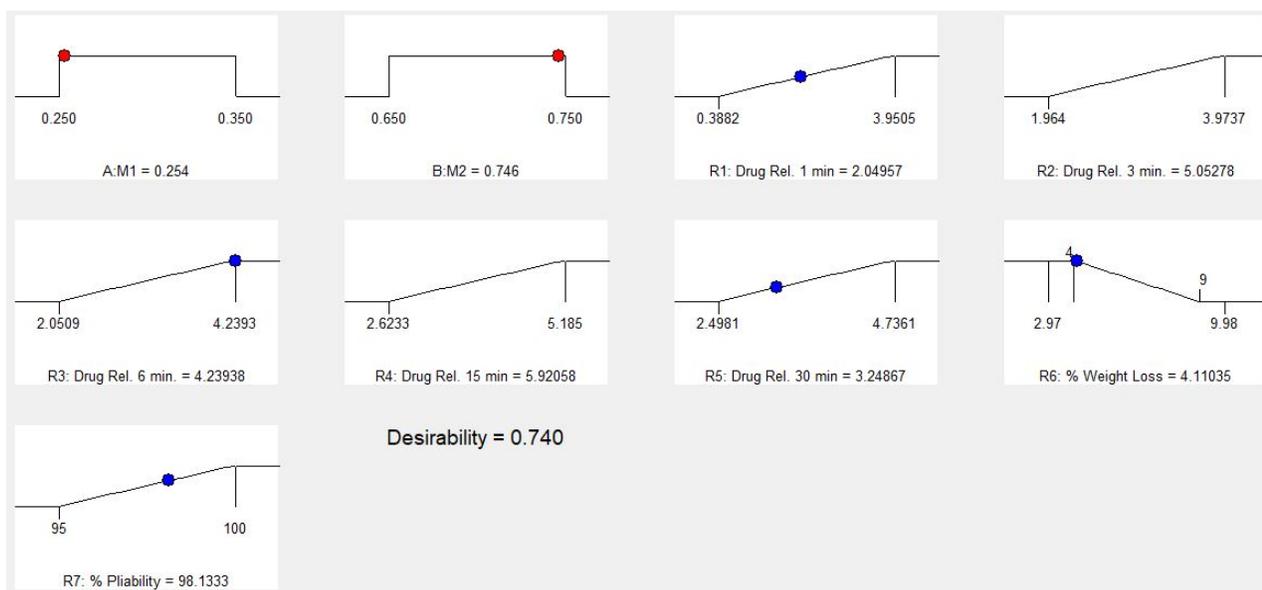


Figura 54: Gráficos de rampas para la solución 1.

Lo observado en la Figura 54 se corresponde con las desabilidades de la Figura 55. En este gráfico, se puede ver el aporte de cada respuesta a la construcción de la deseabilidad global. Se observa una deseabilidad del 100 % para las respuestas R2, R3 y R4. El valor bajo de deseabilidad para la respuesta R5 podría deberse a una alta exigencia al modelo en el momento de la sección de los criterios de optimización. Sin embargo, dado que la importancia de las demás respuestas es mayor, no se le exigirá un valor mayor al modelo para esta respuesta. La deseabilidad para las respuestas R1 y R7 es menor de lo deseado, pero al tratarse de respuestas que fueron modeladas con la media, es esperable. Por último, se observa un muy buen valor de deseabilidad para la respuesta R6.

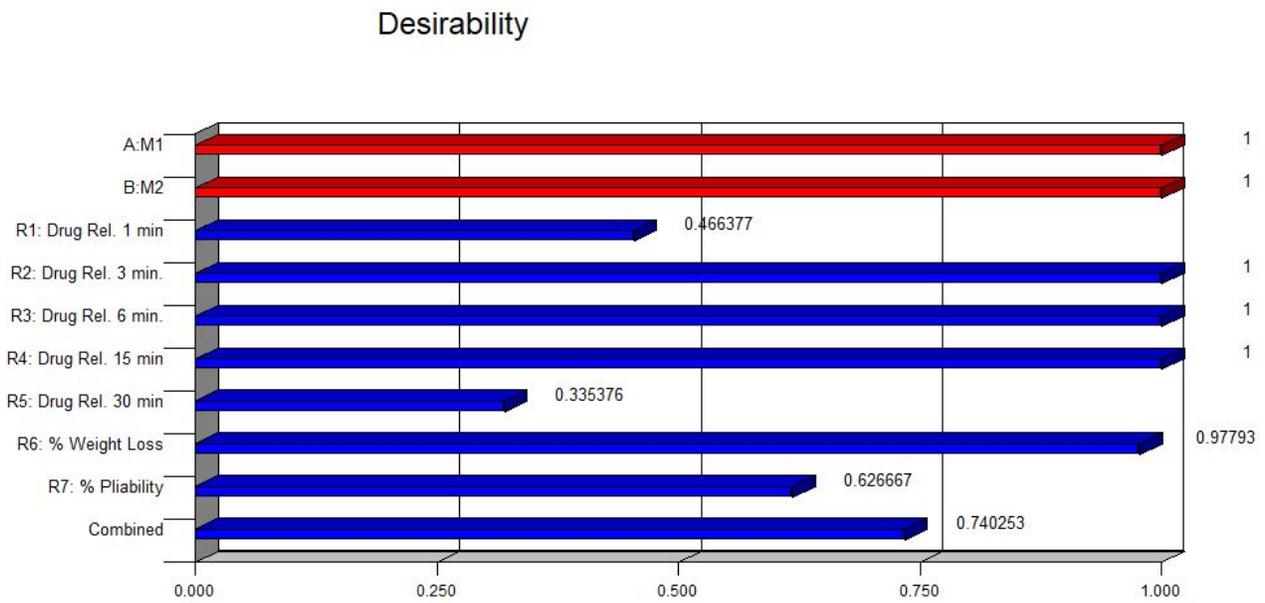


Figura 55: Gráficos de barras de deseabilidad individual frente a cada respuesta y combinada para la solución 1.

7. Conclusión y perspectivas futuras

El VIH es uno de los desafíos sanitarios más importantes del mundo y, si bien se cuenta con tratamientos eficientes que pueden mejorar drásticamente la calidad de vida de las personas infectadas, aún no se cuenta con una cura. Además, el número de nuevas personas infectadas cada año sigue superando el de personas que acceden a un tratamiento eficaz. Por lo tanto, el desarrollo de métodos de prevención continúa siendo una prioridad.

En este trabajo, se pudo encontrar una composición posible para un film vaginal de desintegración rápida para la liberación controlada de un novedoso compuesto inorgánico con alta actividad anti-VIH que podría ser utilizado como un método de prevención del contagio.

Se desarrolló un diseño de experimentos que permitió el análisis de la influencia de las proporciones de los componentes en el comportamiento del producto terminado además de la aproximación a la composición óptima. A partir de los resultados expuestos, se concluye que dentro del rango de composiciones estudiadas se pudieron obtener films que cumplen con las características deseadas de una rápida liberación y desintegración inicial luego del contacto con el fluido, buena flexibilidad y bajo porcentaje residual de agua en el mismo luego del secado. De esta manera, se alcanzó el objetivo planteado para este trabajo final de carrera.

Como continuación del trabajo se propone la caracterización y evaluación en detalle de la composición identificada como cercana a la óptima. Se considera importante poner el foco en la mucoadhesión, caracterización cualitativa del contenido y uniformidad del fármaco y la estabilidad frente a cambios de temperatura y humedad. Además se considera interesante evaluar la posibilidad de incluir otros compuestos, como espermicidas o agentes que prevengan el contagio de enfermedades de transmisión sexual, en el film en combinación con CP3. La inclusión de estos podría aumentar la adhesión al método y la receptividad del mismo. Dentro de los aspectos a mejorar a futuro en el método de fabricación propuesto se destacan la utilización de moldes de laterales lisos para evitar acumulaciones en estas zonas y que se debe prestar especial atención a lograr una distribución uniforme del film previo al secado. Otra opción a considerar sería la utilización de un dispositivo aplicador de films, como es el Elcometer.

Por último, durante el desarrollo del trabajo se pudo adquirir gran cantidad de conocimientos, tanto teóricos como prácticos. La utilización de distintas técnicas para la confección de los films y su posterior evaluación permitió la interiorización con el trabajo de laboratorio. Además, se logró tener una visión general de lo que implica participar en un proyecto de investigación, formando parte de la planificación, ejecución y modificación sobre la marcha en función de los resultados obtenidos y las situación cambiante día a día producto de desarrollar el trabajo en un contexto de pandemia.

Bibliografía

- [1] *HIV/AIDS, Data and statistics*. URL: <https://www.who.int/hiv/data/en/>. (consultado: 11.02.2020).
- [2] G Maartens, C Celum y SR Lewin. "HIV infection: epidemiology, pathogenesis, treatment, and prevention". En: *Lancet* 19384.9939 (2014), págs. 258-271.
- [3] *The Global HIV/AIDS Epidemic*. URL: <https://www.hiv.gov/hiv-basics/overview/data-and-trends/global-statistics>. (consultado: 11.02.2020).
- [4] AG Enderle y col. "Increased in vitro Anti-HIV Activity of Caffeinium-Functionalized Polyoxometalates." En: *ChemMedChem*. 16 (2021).
- [5] E Fanales-Belasio y col. "HIV virology and pathogenetic mechanisms of infection: a brief overview". En: *Ann Ist Super Sanità* 46.1 (2010), págs. 5-14.
- [6] Subgroup 'Assessment of Pathogens Transmissible by Blood' German Advisory Committee Blood (Arbeitskreis Blut). "Human Immunodeficiency Virus (HIV)". En: *Transfus Med Hemother* 43.3 (2016), págs. 203-222.
- [7] *HIV/AIDS*. URL: <https://www.mayoclinic.org/diseases-conditions/hiv-aids/symptoms-causes/syc-20373524>. (consultado: 25.03.2020).
- [8] LM Ferguson y LC Rohan. "The importance of the vaginal delivery route for antiretrovirals in HIV prevention". En: *Ther Deliv* 2.12 (2012), págs. 1535-1550.
- [9] S Moir, TW Chun y AS Fauci. "Pathogenic Mechanisms of HIV Disease". En: *Annu Rev Pathol*. 6.1 (2011), págs. 223-248.
- [10] S Deeks y col. "HIV infection". En: *Nat Rev Dis Primers* 1.15035 (2015).
- [11] *Profilaxis de Preexposición*. URL: <https://www.cdc.gov/hiv/spanish/basics/prep.html>. (consultado: 25.03.2020).
- [12] KC Corado, MR Caplan y ES Daar. "Two-drug regimens for treatment of naïve HIV-1 infection and as maintenance therapy". En: *Drug Des Devel Ther*. 12.1 (2018), págs. 3731-3740.
- [13] JM Baeten, CW Hendrix y SL Hillier. "Topical Microbiocides in HIV Prevention: State of the Promise". En: *Annu Rev Med*. 71 (2020), págs. 361-367.
- [14] LC Rohan y AB Sassi. "Vaginal Drug Delivery Systems for HIV Prevention". En: *AAPS* 11.1 (2009), págs. 78-87.
- [15] JJ Carbó, C Bo y JM Poblet. *Structure and Reactivity of Polyoxometalates*. Comprehensive Inorganic Chemistry II. Elsevier Ltd., 2013. ISBN: 9780080965291.
- [16] M Hutin y col. *Polyoxometalates: Synthesis and Structure*. Comprehensive Inorganic Chemistry II. Elsevier Ltd., 2013. ISBN: 9780080965291.
- [17] Sven Herrmann. *New Synthetic Routes to Polyoxometalate Containing Ionic Liquids*. Springer Spektrum, 2015. ISBN: 978-3-658-08796-8.

- [18] E. De Clerq. "Antiviral metal complexes." En: *Metal-based drugs*. 4.3 (1997), págs. 173-192.
- [19] A. Proust y col. "Functionalization and post-functionalization: a step towards polyoxometalate-based materials." En: *Chem Soc Rev*. 41.22 (2012), págs. 7605-7622.
- [20] N Singh y col. "Xanthine scaffold: scope and potential in drug development". En: *Heliyon* 4.10 (2018), págs. 1-38.
- [21] Ramamoorthy V y col. "The Relationship Between Caffeine Intake and Immunological and Virological Markers of HIV Disease Progression in Miami Adult Studies on HIV Cohort." En: *Viral Immunol*. 30.4 (2017), págs. 271-277.
- [22] Daniel R y col. "Caffeine inhibits human immunodeficiency virus type 1 transduction of non-dividing cells." En: *J Virol*. 79.4 (2005), págs. 2058-2065.
- [23] G Nunnari y col. "Inhibition of HIV-1 replication by caffeine and caffeine-related methylxanthines." En: *Virology*. 335.2 (2005), págs. 177-184.
- [24] M Witvrouw y col. "Potent Anti-HIV (Type 1 and Type 2) Activity of Polyoxometalates: Structure-Activity Relationship and Mechanism of Action". En: *J Med Chem*. 43.5 (2000), págs. 778-783.
- [25] RM Machado y col. "Vaginal Films for Drug Delivery". En: *J Pharm Sci* 102.7 (2013), págs. 2069-2081.
- [26] S Borges, J Barbosa y P Teixeira. "Drug Delivery Systems for Vaginal Infections". En: *Frontiers in Clinical Drug Research: Anti-Infectives* 2.3 (2015), págs. 233-258.
- [27] Sahoo CK y col. "Intra vaginal drug delivery system: an overview". En: *Am J Adv Drug Deliv* 1.1 (2013), págs. 43-55.
- [28] *VCF Vaginal Contraceptive Film*. URL: <https://dailymed.nlm.nih.gov/dailymed/fda>. (consultado: 18.04.2021).
- [29] MN Pereira y GM Gelfuso. "Formulations Prepared with Bioadhesive Polymers for Application in Vaginal Mucosa." En: *SM J Polym Sci*. 1.1 (2017), pág. 1001.
- [30] S Garg y col. "Advances in development, scale-up and manufacturing of microbicide gels, films, and tablets". En: *Antiviral Res* 88.Suppl 1 (2010), S19-S29.
- [31] KM Guthriea y col. "Vaginal film for prevention of HIV: using visual and tactile evaluations among potential users to inform product design". En: *Pharm Dev Technol* 23.3 (2018), págs. 311-314.
- [32] MD Fan y col. "Preferred Physical Characteristics of Vaginal Film Microbicides for HIV Prevention in Pittsburgh Women". En: *Arch Sex Behav* 46.4 (2017), págs. 1111-1119.
- [33] Douglas C. Montgomery. *Design and Analysis of Experiments*. Wiley, 2012. ISBN: 978-1-118-14692-7.
- [34] Alan R. Nelson. *A Review of the NIOSH Roadmap for Research on Asbestos Fibers and Other Elongate Mineral Particles*. The National Academies Press, 2012. ISBN: 978-0-309-14015-7.

- [35] T Gong y col. "Preformulation and Vaginal Film Formulation Development of Microbicide Drug Candidate CSIC for HIV prevention". En: *J Pharm Innov.* 12.2 (2017), págs. 142-154.
- [36] SK Patil y col. "Strategies for solubility enhancement of poorly soluble drugs." En: *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research.* 8.2 (2011), pág. 7.
- [37] DJ Murphy y col. "Pre-clinical development of a combination microbicide vaginal ring containing dapivirine and darunavir." En: *J Antimicrob Chemother.* 69.9 (2014), págs. 2477-2488.
- [38] *Glycerin*. URL: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/source/hsdb/492>. (consultado: 18.02.2021).
- [39] *Propylen glycol*. URL: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/source/hsdb/174>. (consultado: 18.02.2021).
- [40] *Polyethylene glycol monooleate*. URL: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Polyethylene-glycol-monooleate>. (consultado: 18.02.2021).
- [41] *PEG-400*. URL: <https://cosmeticsinfo.org/ingredient/peg-400>. (consultado: 18.02.2021).
- [42] JO Morales y JT. McConville. "Manufacture and characterization of mucoadhesive buccal films." En: *Eur J Pharm Biopharm.* 77.2 (2011), págs. 187-199.
- [43] A Akil y col. "Development and Characterization of a Vaginal Film Containing Dapivirine, a Non-nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitor (NNRTI), for prevention of HIV-1 sexual transmission." En: *Drug Deliv Transl Res.* 1.3 (2011), págs. 209-222.
- [44] B Perissutti y col. "Formulation design of carbamazepine fast-release tablets prepared by melt granulation technique." En: *Int J Pharm.* 256.1-2 (2003), págs. 53-63.
- [45] *Polyvinyl alcohol*. URL: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Polyvinyl-alcohol>. (consultado: 18.02.2021).
- [46] *Polyvinyl alcohol*. URL: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/source/hsdb/1038>. (consultado: 18.02.2021).
- [47] *Hydroxy propyl methyl cellulose*. URL: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Hydroxy-propyl-methyl-cellulose>. (consultado: 18.02.2021).
- [48] *Hydroxypropylmethylcellulose*. URL: <https://www.sciencedirect.com/topics/neuroscience/hydroxypropylmethylcellulose>. (consultado: 18.02.2021).
- [49] *2-2-[2-(2-2-[2-(2-Ethoxy-ethoxy)-ethoxy]-ethoxy)-ethoxy]-ethoxy-ethanol*. URL: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/448032>. (consultado: 18.02.2021).
- [50] *Poly(ethylene glycol)*. URL: https://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty_EN_CB6145866.htm. (consultado: 18.02.2021).
- [51] DH Owen y df Katz. "A Vaginal Fluid Simulant". En: *Contraception* 59.2 (1999), págs. 91-95.

- [52] A Kascatan-Nebioglu y col. "Synthesis and Structural Characterization of N-Heterocyclic Carbene Complexes of Silver(I) and Rhodium(I) from Caffeine". En: *Organometallics* 23.8 (2004), págs. 1928-1931.
- [53] Alvin P. Ginsberg. *Inorganic Syntheses, Volume 27*. Inorganic Syntheses. Wiley, 2001. ISBN: 978-0-470-13258-6.
- [54] BS Bassil y col. "The Monolanthanide-Containing Silicotungstates $[Ln(\beta_2 - SiW_{11}O_{39})_2]^{13-}$ (Ln = La, Ce, Sm, Eu, Gd, Tb, Yb, Lu): A Synthetic and Structural Investigation". En: *Inorganic Chemistry* 46.7 (2007), págs. 2452-2458.