



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

*FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLÁN*

**ESTUDIO COMPARATIVO DE LA ABSORCIÓN PERCUTÁNEA
IN VITRO DE TRICLOSAN A PARTIR DE UN SISTEMA
NANOPARTICULADO Y DOS FORMAS COMERCIALES,
DESTINADOS AL TRATAMIENTO DE ACNÉ**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

P R E S E N T A :

CLARA LUISA DOMÍNGUEZ DELGADO

ASESORES: DRA. ADRIANA GANEM RONDERO
DR. DAVID QUINTANAR GUERRERO

CUAUTITLÁN IZCALLI, EDO. DE MÉXICO

2006



Universidad Nacional
Autónoma de México

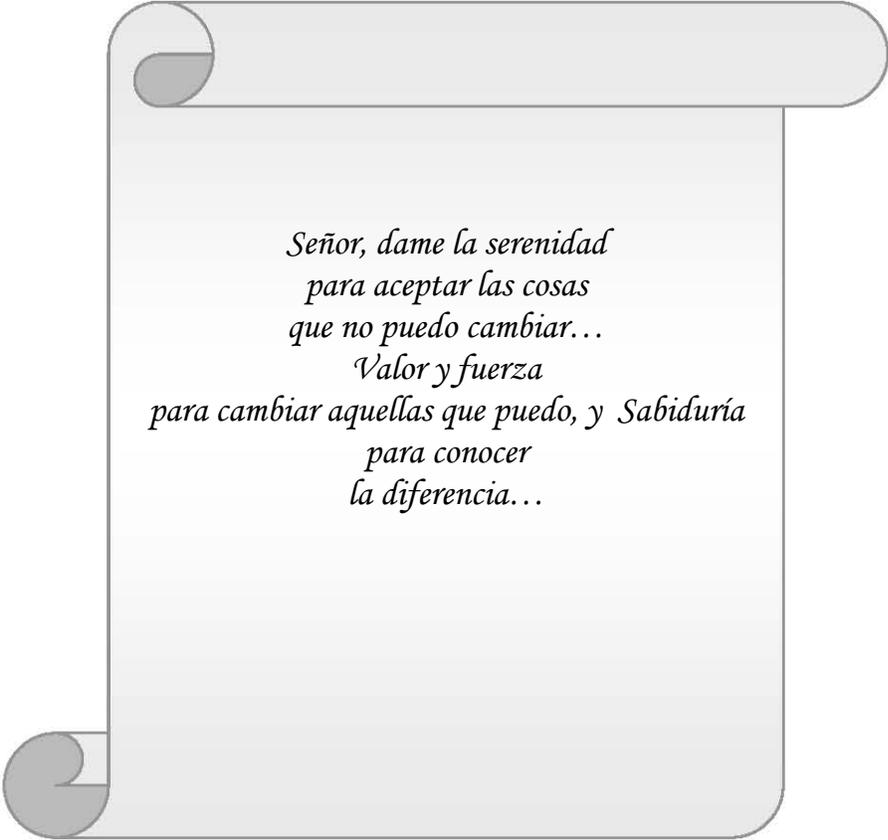


UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



*Señor, dame la serenidad
para aceptar las cosas
que no puedo cambiar...
Valor y fuerza
para cambiar aquellas que puedo, y Sabiduría
para conocer
la diferencia...*

DEDICATORIAS Y AGRADECIMIENTOS

A mis padres: Hedilberto y Gema, gracias por su apoyo, amor y comprensión, por darme la vida. Por enseñarme que con constancia y dedicación se logran las metas.

A mis hermanos, Biby, Bety y Venny; a mi sobrina Ale, por su apoyo, cariño y por estar conmigo en los momentos más importantes de mi vida, gracias.

A mis amigos: Lily, Wendy, Geras, Pedro, Néstor y Sergio gracias por compartir conmigo parte de su vida, por sus consejos, cariño y lealtad; por estar cerca de mí en momentos de virtud y de flaqueza.

A mi tíos: Carolina, Luisa, Eduardo; a mi abuelita Concepción; y a mi prima Margarita, por el apoyo brindado a lo largo de mi vida.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Adriana y al Dr. David por las enseñanzas adquiridas, por sus consejos, por ayudarme a la realización de éste trabajo y por impulsarme a seguir adelante.

A mis compañeros del Laboratorio de Posgrado en Farmacia: Elizabeth P., Elizabeth J., Lupita, Marlen, Miriam, Zaida, Eddy, Edgar, Gaddiel, José Juan, L. Arturo, Luis M., por compartir sus conocimientos y experiencias durante dicha estancia.

A la sección de Microscopía Electrónica de la FES-C y C.U. y al Técnico Rodolfo Robles, así como al I.Q. Iván Puente por el material fotográfico proporcionado.

A la FES-Cuautitlán, en especial a mis amigos de las generaciones de QFB 28, IQ 28 y 29, por los momentos vividos.

ÍNDICE GENERAL

I. ÍNDICE DE FIGURAS V

II. ÍNDICE DE TABLAS IX

III. ÍNDICE DE ABREVIATURAS XI

IV. INTRODUCCIÓN..... 1

1. MARCO TEÓRICO..... 3

1.1 LA PIEL.....3

 1.1.1 *Capas de la piel*.....4

 1.1.1.1 Epidermis y sistema de queratinización.....5

 a) Estrato basal.....6

 b) Estrato mucoso de Malpighi o espinoso.....7

 c) Estrato granuloso.....7

 d) Estrato lúcido7

 e) Estrato corneo8

 1.1.1.2 Características de la epidermis.....8

 1.1.1.3 Límite dermoepidérmico9

 1.1.1.4 Dermis.....9

 a) Colágeno10

 b) Elastina y reticulina.....11

 c) Sustancia fundamental11

 d) Fibroblastos12

 e) Mastocitos.....12

 1.1.1.5 Hipodermis13

 1.1.1.6 Anexos Cutáneos.....14

 a) Folículos pilosos14

 b) Glándulas sebáceas15

 c) Lípidos de la epidermis.....16

1.2 ABSORCIÓN PERCUTANEA17

 1.2.1 *Vías de penetración a través de la piel*18

 1.2.1.1 Diferencias entre la superficie de la epidermis y de los anexos19

 1.2.1.2 Propiedades Físicoquímicas que afectan la absorción percutanea20

a) Peso Molecular.....	20
b) Tamaño molecular.....	20
c) Punto de fusión.....	20
d) Coeficiente de reparto.....	20
e) pK_a	20
1.3 DIFUSIÓN PASIVA A TRAVÉS DE MEMBRANA LÍPIDICA.....	21
1.3.1 Celda de difusión tipo Franz.....	24
1.4 EL ACNÉ.....	26
1.4.1 Definición.....	26
1.4.2 Clasificación.....	27
1.4.3 Epidemiología.....	29
1.4.4 Etiología.....	29
1.4.5 Factores que intervienen en el desarrollo del acné:.....	34
1.4.5.1 Flora bacteriana.....	34
1.4.5.2 Hormonas androgénicas.....	36
1.4.5.3 Aumento en la producción de sebo y taponamiento de las glándulas sebáceas.....	37
1.4.5.4 Hiperqueratinización.....	38
1.4.5.5 Herencia y enfermedades congénitas.....	38
1.4.5.6 Algunas prescripciones médicas.....	39
1.4.5.7 Estrés.....	39
1.4.6 Cuadro clínico.....	40
1.4.7 El predominio y el impacto emocional causado por el acné.....	43
1.4.8 Evolución y pronóstico.....	45
1.4.9 Diagnósticos diferenciales.....	46
1.5 TRATAMIENTO GENERAL.....	47
1.6 SISTEMAS NANOPARTICULADOS.....	50
1.6.1 Nanopartículas.....	50
1.6.1.1 Clasificación.....	50
1.6.2 Métodos de preparación de nanopartículas.....	52
1.6.2.1 Emulsificación-evaporación.....	52
1.6.2.2 "Salting out".....	53
1.6.2.3 Desplazamiento de solvente.....	53
1.6.2.4 Emulsificación-Difusión.....	53
1.6.2.5 Proceso de emulsificación-difusión por desplazamiento de solvente.....	54
1.6.3 Caracterización de nanopartículas.....	57
1.6.3.1 Caracterización fisicoquímica.....	57

1.6.3.2	Análisis de la cantidad de fármaco encapsulado	57
1.6.3.3	Cinética de liberación y permeación del fármaco.....	58
1.6.4	<i>Relación de las nanopartículas con la piel</i>	58
1.7	PROPIEDADES FÍSICOQUÍMICAS DEL POLÍMERO EUDRAGIT® E 100	60
1.8	PROPIEDADES FÍSICOQUÍMICAS DEL TRICLOSAN	62
2.	OBJETIVOS	64
2.1	OBJETIVO GENERAL.....	64
2.2	OBJETIVOS PARTICULARES.....	64
3.	PARTE EXPERIMENTAL	65
3.1	MATERIAL Y REACTIVOS	65
3.2	MATERIAL BIOLÓGICO.....	65
3.3	APARATOS Y EQUIPOS	66
3.4	FORMULACIONES COMERCIALES UTILIZADAS EN EL PRESENTE ESTUDIO	67
3.5	METODOLOGÍA.....	68
3.5.1	<i>Determinaciones previas</i>	69
3.5.1.1	Espectros de Absorción	69
3.5.1.2	Determinación de la solubilidad de triclosán	69
3.5.1.3	Preparación de curvas de calibración en contacto con piel para la cuantificación de triclosán	69
3.5.1.4	Determinación de las condiciones para la preparación de las nanopartículas.....	70
3.5.2	<i>Preparación de nanopartículas por el proceso de emulsificación–difusión por desplazamiento de solvente</i>	72
3.5.3	<i>Caracterización de nanopartículas</i>	73
3.5.3.1	Tamaño de partícula	73
3.5.3.2	Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC)	73
3.5.3.3	Carga superficial.....	73
3.5.3.4	Determinación de triclosán en las nanopartículas.....	74
3.5.3.5	Morfología.....	75
3.5.4	<i>Obtención de la piel</i>	75
3.5.5	<i>Cinética de permeación para las tres formulaciones</i>	75
3.5.6	<i>Método de extracción del triclosán retenido en la piel permeada</i>	76

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	77
5. CONCLUSIONES.....	125
6. PERSPECTIVAS.....	127
7. ANEXOS.....	128
8. BIBLIOGRAFIA.....	146

I. INTRODUCCIÓN

En la actualidad uno de los principales objetivos del farmacéutico es el diseño de nuevos sistemas o dispositivos de liberación de fármacos que controlen la liberación del agente farmacológico en el sitio de acción a una velocidad terapéuticamente óptima. Específicamente en el caso de la vía cutánea, ésta ofrece diversas ventajas como sitio para la administración de fármacos, pero debido a su propiedad natural como barrera de protección, se hace necesaria la búsqueda de nuevos sistemas que favorezcan la penetración a través de la piel.

En estudios recientes se ha visto que el éxito en los sistemas tópicos y transdérmicos depende de la habilidad del fármaco para permear la piel en cantidades suficientes, con el fin de lograr un efecto terapéutico efectivo. Sin embargo, muchos de los principios activos bajo investigación, no poseen las características fisicoquímicas necesarias (grado de ionización, solubilidad, estabilidad y coeficiente partición) para penetrar en el tejido, por lo cual se requieren compuestos (promotores) y sistemas que proporcionen un aumento en la absorción de éstos.¹

El principal problema con las formulaciones farmacéuticas comerciales que contienen promotores, es que la irritación de la membrana limita severamente la aplicación clínica. Es por ello, que se ha recurrido a la formulación de diversos sistemas que por su estructura y propiedades particulares, se espera que favorezcan la absorción del fármaco incluido. Entre estos sistemas podemos mencionar a las nanopartículas (tanto lipídicas como poliméricas), las nanoemulsiones, las microemulsiones, los liposomas y los transfersomas, entre otros.

Por su estructura multifuncional, estabilidad y posible escalamiento, las nanopartículas aparecen como una alternativa muy interesante para la vectorización y liberación controlada de activos cosméticos. Debido a que uno de los factores patogénicos responsable para el desarrollo del acné es la colonización microbiana, el

triclosán, un agente antibacterial, es una alternativa para tratar el acné, por lo que fue seleccionado para ser usado en el presente estudio.

Con este estudio se pretende adquirir conciencia de la magnitud de esta patología considerando que, en ciertas ocasiones, constituye el reflejo de afecciones orgánicas subyacentes de severidad, lejos de significar una simple dermatosis. De este modo, en el presente trabajo se diseña, realiza y caracteriza la preparación de una suspensión de nanopartículas conteniendo triclosán, con el fin de proponerlo como una formulación tópica para el tratamiento del acné.

1. MARCO TEÓRICO

1.1 LA PIEL

Aunque la principal función de la piel es la de servir como barrera entre el medio externo y el interno, cumple además con múltiples funciones. Controla la pérdida de fluidos valiosos, evita la penetración de sustancias extrañas, nocivas y radiaciones, actúa como cojín frente a golpes mecánicos, regula la pérdida de calor, transmite los estímulos que le llegan y también es el reflejo de enfermedades sistémicas. Además, aporta señales sexuales y sociales por su color, textura y olor que posiblemente pueden ser incrementados fisiológicamente por la ciencia cosmética. Para los cosmetólogos, es esencial el conocimiento de la estructura y función de la piel, ya sea que se interesen por la mejora de la piel desde un punto de vista farmacológico o bien en la prevención de su lesión como resultado de un arte.

La superficie total de la piel oscila entre los 2 500 cm² del recién nacido a los 18000 cm² del adulto, en tanto que pesa aproximadamente 4.8 Kg en el hombre y 3.2 Kg en la mujer; la hipodermis pesa aproximadamente 12 Kg en hombres y 15 Kg en mujeres. En la mayor parte del cuerpo, la piel posee folículos pilosos con sus glándulas sebáceas asociadas. Sin embargo, la cantidad de pelo varía grandemente; en casos extremos, el cuero cabelludo, con sus grandes folículos pilosos, contrasta con el rostro femenino, que tiene grandes glándulas sebáceas asociadas con folículos muy pequeños que producen pelo veloso fino y corto. La piel de las palmas de las manos y plantas del pie carecen de folículos pilosos y glándulas sebáceas, y está surcada en su superficie por crestas y surcos continuos y alternos que forman patrones de espirales, lazos o arcos característicos de cada individuo conocidos como dermatoglifos. La piel lampiña se caracteriza también por su gruesa epidermis y por la existencia de órganos sensoriales encapsulados en el interior de la dermis. Las barreras a la permeabilidad están situadas en varias capas de células firmemente empaquetadas que forman la superficie de la epidermis; la protección mecánica es proporcionada por la dermis

subyacente más gruesa que se compone principalmente de tejido conjuntivo, esto es, sustancias secretadas por las células y situadas exteriormente a ellas. La epidermis aislada es tan impermeable como la piel completa, mientras que una vez que se elimina la epidermis, la dermis es completamente permeable. Si se arrancan de modo progresivo las capas de la epidermis por medio de una cinta adhesiva, se aumenta la permeabilidad de la piel y, como consecuencia, no existen dudas de que las células corneas del estrato córneo constituyen la barrera. Aunque no es probable que la grasa emulsionada de la superficie de la piel afecte grandemente a la permeabilidad, o que las glándulas sudoríparas y folículos pilosos sean más permeables que el epitelio superficial, si bien las sustancias pueden alcanzar las glándulas sebáceas por la ruta folicular.²

El epitelio superficial es predominantemente de naturaleza lipofílica, siendo por tanto particularmente impermeable al transporte pasivo de sustancias hidrofílicas (incluyendo especies con carga).³

1.1.1 Capas de la piel

La piel está constituida por 3 capas, situadas horizontalmente. De la superficie hacia el interior son las siguientes (Ver figura 1):

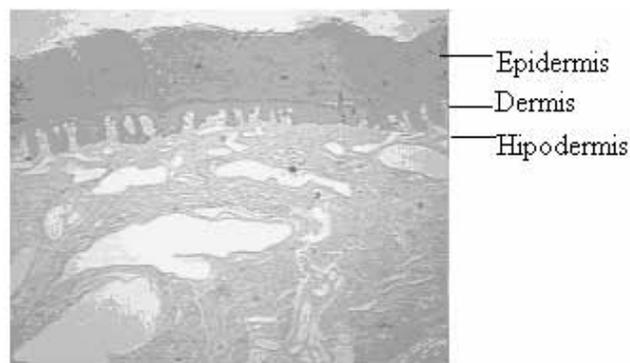


Figura 1. Epitelio queratinizado tomado de la superficie del cuerpo, imágenes tomadas en 45 X. El epitelio siempre descansa sobre una lámina basal que lo separa del tejido conectivo de soporte subyacente.³

1.1.1.1 *Epidermis y sistema de queratinización*

La epidermis es la capa externa de la piel. Está constituida por las siguientes capas (Ver figura 2):

- a) estrato basal
- b) estrato mucoso de Malpighi o espinoso
- c) estrato granuloso
- d) estrato lúcido
- e) estrato córneo

Es un epitelio estratificado pavimentoso cuyas células superficiales se cornifican. La estratificación es el resultado de cambio en el interior de los queratinocitos a medida que ascienden al exterior procedentes de la capa basal, en la que continuamente se están formando por mitosis, hacia la superficie de la piel, donde se desprenden. Hay otros tres tipos de células: melanocitos o células con pigmentos, células de Langerhans, que son incoloras y de forma dendrítica, y células de Merkel, que están relacionadas con el sentido del tacto.²

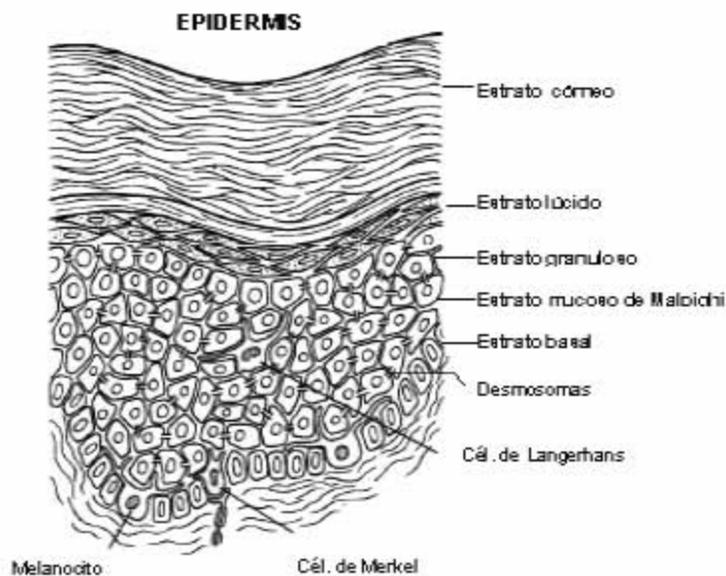


Figura 2. Esquema de la epidermis y sus apéndices.⁴

a) Estrato basal

El estrato basal o estrato germinativo es una capa continua que da origen a todos los queratinocitos. Generalmente, se describe como monocelular, pero, tanto en epidermis de espesor normal como en la patológica, parece que la mitosis no está limitada únicamente a las células en contacto con la membrana basal. Entre una división y la siguiente, la célula experimenta un ciclo. Inmediatamente después de la mitosis (M) existe una fase de crecimiento (G_1) que es seguida por un período de síntesis activa nuclear de DNA (S) y una corta fase de crecimiento premitótico (G_2). Cada período tiene un tiempo de tránsito; para el ciclo completo se debería emplear el término de “tiempo del ciclo celular”. La expresión tiempo de renovación o sus sinónimos tiempo de regeneración, o tiempo de reemplazamiento, significa el tiempo para la completa sustitución de una población celular. Aunque frecuentemente se afirma ser equivalente a tiempo de ciclo celular, esto sólo es verdad si todas las células están ciclando continuamente. En realidad, probablemente existe un compartimiento substancial (G_0) de células que no ciclan. Por tanto, es importante distinguir el tiempo de relevo de renovación del estrato córneo del tiempo de la epidermis viva.

La medida de duración del ciclo celular se ha estimado de modo variable para la epidermis humana normal en 163 horas, 308 horas, 457 horas y 213 horas, y para la epidermis psoriásica en 37 horas. Sin embargo, estas medidas se han realizado con el supuesto de que en la epidermis normal todas las células ciclan de modo continuo. Una explicación alternativa es que la epidermis psoriásica se diferencia de la normal no a causa del ciclo celular más corto, sino porque es mucho más elevada la proporción de las células que ciclan. El tiempo de reemplazamiento para la totalidad de la epidermis viva es aproximadamente de 42 días, y para el estrato córneo de unos 14 días, y generalmente se admite que los tiempos son considerablemente más cortos en la piel psoriásica.²

Las células del estrato basal tienen núcleos grandes; al microscopio electrónico, sus citoplasmas revelan muchos ribosomas, mitocondrias y, a veces, membranas lisas.

Especialmente, contienen numerosos finos tonofilamentos de aproximadamente 5µm de diámetro, que se presentan principalmente en haces sueltos, las tonofibrillas.

b) Estrato mucoso de Malpighi o espinoso

El estrato espinoso o capa de células de forma de púas se llama así porque las células presentan una apariencia espinosa por los numerosos desmosomas o placas de unión de sus superficies. Antes se creía que éstas eran puentes intercelulares a través de los cuales las tonofibrillas mantenían el tono de la epidermis. Estudios ultraestructurales han revelado que son estructuras laminadas. En la zona superior del estrato espinoso aparecen los gránulos recubridores de membrana también denominados cuerpos lamelados o de Odland.

c) Estrato granuloso

El estrato espinoso continúa con el estrato intermedio o estrato granuloso que contiene gránulos basófilos de una sustancia llamada queratohialina. En el estrato intermedio los cuerpos de Odland emigran finalmente hacia la periferia de la célula fusionando su membrana con la membrana celular y liberando su contenido rico en lípidos en el espacio intercelular. Los lípidos así liberados se organizan en forma de lamelas constituyendo de este modo el cemento intercelular, parte fundamental del proceso de formación de la barrera epidérmica.

d) Estrato lúcido

El estrato lúcido, no teñible por los métodos histológicos habituales, se puede reconocer únicamente en la piel de las palmas de las manos y plantas de los pies.

e) Estrato corneo

En el estrato corneo, los queratinocitos han perdido sus núcleos y prácticamente todos sus orgánulos y contenidos citoplasmáticos, incluyendo los gránulos de queratohialina. Las células están aplanadas y completamente llenas de queratina, en forma de haces de filamentos fijados en una sustancia opaca interfilamentosa. En la transición entre el estrato intermedio y el estrato córneo, se reconocen las células de transición o células T. Se puede demostrar que las células cornificadas en su epidermis, aunque no la de piel lampiña, están ordenadas en forma de apilamientos regulares y verticales que reflejan la organización dinámica subyacente.

Tanto las estructuras filamentosas de las capas epidérmicas más inferiores como la queratohialina del estrato intermedio, contribuyen a la formación de la queratina. La sustancia de las fibrillas, con cadenas peptídicas ordenadas helicoidalmente, se transforma en el estrato intermedio en una matriz rica en azufre que hace posible los enlaces de cistina. Las células córneas se desprenden continuamente de la superficie de la piel. Si se protegen zonas de la piel por capas durante períodos de tiempo prolongados, se puede atrapar el material exfoliado, pero el espesor del estrato córneo coherente permanece sin cambios. Por tanto, parece que las capas córneas se descaman en un nivel final que no está influenciado por las fuerzas externas.

1.1.1.2 Características de la epidermis

- No tiene nervios ni vasos sanguíneos.
- Se renueva constantemente.
- Se nutre con oxígeno y nutrimentos que se encuentran en las capas inferiores.
- Tiene infinidad de receptores sensoriales.

1.1.1.3 Límite dermoepidérmico

La sección del límite dermoepidérmico es ondulada; los llamados clavos reticulares o crestas interpapilares epidérmicas se proyectan de la epidermis hacia la dermis. En el límite existe una membrana basal (Ver figura 3), que al microscopio electrónico se observa como una membrana plasmática enrollada y tachonada con hemidesmosomas y desmosomas de unión, separada de la capa electrónicamente densa lámina basal por una lámina lúcida transparente. La lámina basal está anclada por debajo en la dermis por fibrillas y haces de finos filamentos. Sus funciones son:

- Soporte mecánico
- Barrera de regulación de la permeabilidad
- Fijación de las células basales al tejido conectivo
- Ayuda al desarrollo y morfogénesis de las células epiteliales.³

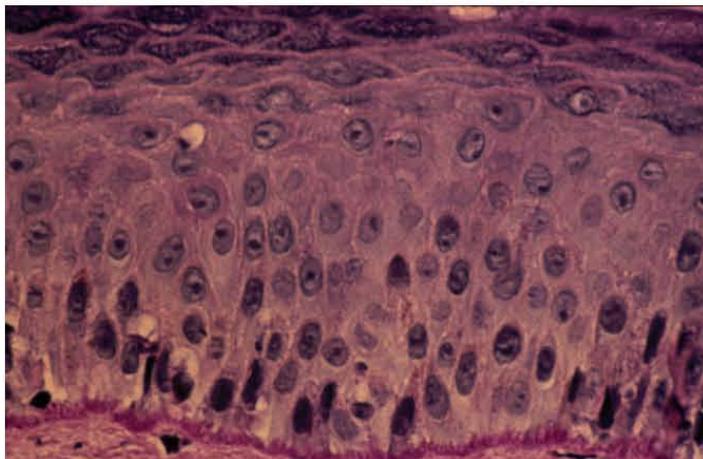


Figura 3. Epitelio queratinizado tomado de la superficie del cuerpo, imágenes tomadas en 100 X.⁵

1.1.1.4 Dermis

La dermis es un tejido resistente y elástico (tejido conjuntivo laxo) que actúa de almohadilla del cuerpo frente a lesiones mecánicas, y proporciona nutrientes a la

epidermis y apéndices cutáneos. Consta de una asociación de fibras de proteína (colágeno y elastina) con una sustancia amorfa fundamental que contiene mucopolisacáridos. Existen pocas células en esta matriz; la mayor parte de ellas son fibroblastos que secretan los componentes dérmicos, otras son los mastocitos o células cebadas, histocitos o macrófagos, linfocitos y otros leucocitos polimorfonucleares, plásmocitos y melanocitos. También la dermis alberga los sistemas nervioso, linfático y sanguíneo, y rodea los apéndices epidérmicos invaginados, esto es, los folículos pilosos con sus glándulas asociadas y las glándulas sudoríparas ecrinas.

a) Colágeno

El componente fibroso principal de la dermis es el colágeno que alcanza el 75% de su peso seco y el 18-30% en volumen. Al microscopio, las fibras de colágeno aparecen incoloras, como bandas onduladas ramificadas de 15µm de anchura. El microscopio electrónico revela que cada una de las fibras está compuesta de fibrillas sin ramificar de aproximadamente 100µm de ancho y es característica su disposición estriada cruzada con una periodicidad de 60-70µm. Las fibras de colágeno se pueden desintegrar por ácido acético al 0.01%, originando moléculas de peso molecular entre 300 000-360 000, de aproximadamente 180µm de largo. Cuando se neutralizan estas soluciones ácidas de tropocolágeno, reaparece la periodicidad de 64µm, que puede explicarse que el colágeno nativo está compuesto de moléculas de tropocolágeno enlazadas lateralmente con un solapamiento regular de un cuarto de su longitud.

El colágeno de la piel se caracteriza por su elevado contenido de glicina, que constituye un tercio de la totalidad, además de prolina e hidroxiprolina. Las moléculas de tropocolágeno están constituidas por tres cadenas polipeptídicas, conteniendo cada una de ellas aproximadamente 1000 aminoácidos. Los fibroblastos producen un precursor conocido como procolágeno que tiene 300-400 aminoácidos adicionales en cada una de sus cadenas; estas prolongaciones se eliminan después de la secreción.²

b) Elastina y reticulina

Las fibras elásticas constituyen el 4% de peso seco y el 1% del volumen de la dermis. Son fibras frágiles, en línea recta, muy ramificadas que se pueden alargar hasta el 100% o más, retornando a su longitud original, cuando se elimina la tracción. La elastina se diferencia del colágeno en tener sólo aproximadamente un cuarto o un tercio de la cantidad de aminoácidos básicos y ácidos, solamente una décima parte de la cantidad de hidroxiprolina, relativamente gran cantidad de valina y un aminoácido conocido como desmoséno que aparece como único en ella y relacionado con los enlaces cruzados. No todos los componentes fibrosos se pueden identificar claramente, como colágeno o elastina en base a sus propiedades de tinción. Además de la elastina verdadera, se han diferenciado otras dos fibras similares y se han denominado oxitala y elaunina. Además, aproximadamente el 0.4% en peso seco de la dermis está constituido por fibras ramificadas que, a diferencia del colágeno, se tiñen de negro con el nitrato de plata y son conocidas como reticulina. Su periodicidad axial es idéntica a la del colágeno.

c) Sustancia fundamental

La sustancia fundamental amorfa en la que están las fibras y células contiene una variedad de hidratos de carbono, proteínas y lípidos, de los cuales los más importantes son los mucopolisacáridos ácidos. Estos son macromoléculas constituidas por dos unidades diferentes de sacáridos que se alternan regularmente. En la dermis, el ácido hialurónico, en que la D-glucosamina, con un grupo amino acetilado, alterna con el ácido D-glucurónico, y el sulfato de dermatan, en que el ácido L-idurónico alterna con D-galactosamina, son los preponderantes.

d) Fibroblastos

El término de fibroblasto debería denominar, de modo estricto, a una célula en su primer estadio, y fibrocito, a la que está plenamente diferenciada, pero la mayoría de los autores emplean fibroblasto para denominar una célula activa secretora, y fibrocito para una inactiva. Los fibroblastos se derivan del mesénquima. No existen dudas de que los fibroblastos secretan colágeno. Estos son la fuente de la elastina 140.

e) Mastocitos

Los mastocitos proceden igualmente de las células de migración del mesénquima. Se caracterizan por un citoplasma lleno de gránulos que se tiñen metacromáticamente con tintes básicos de anilina-púrpura con azul de metileno. Contienen heparina e histamina y pueden liberarlas. La ruptura de las células, con liberación de los gránulos, se observa en muchos tipos de lesiones cutáneas, y la histamina es la responsable de muchos de los incidentes asociados con inflamación, irritación y otras anomalías de la piel.²

La dermis es la parte más gruesa, en ella se encuentran:

- Las glándulas sebáceas que producen grasa.
- Las glándulas sudoríparas que producen sudor.
- Los nervios.
- Una red de vasos sanguíneos.
- Los folículos pilosos en los que nace el vello.³

La figura 4 muestra los componentes más importantes de la dermis mencionados anteriormente.

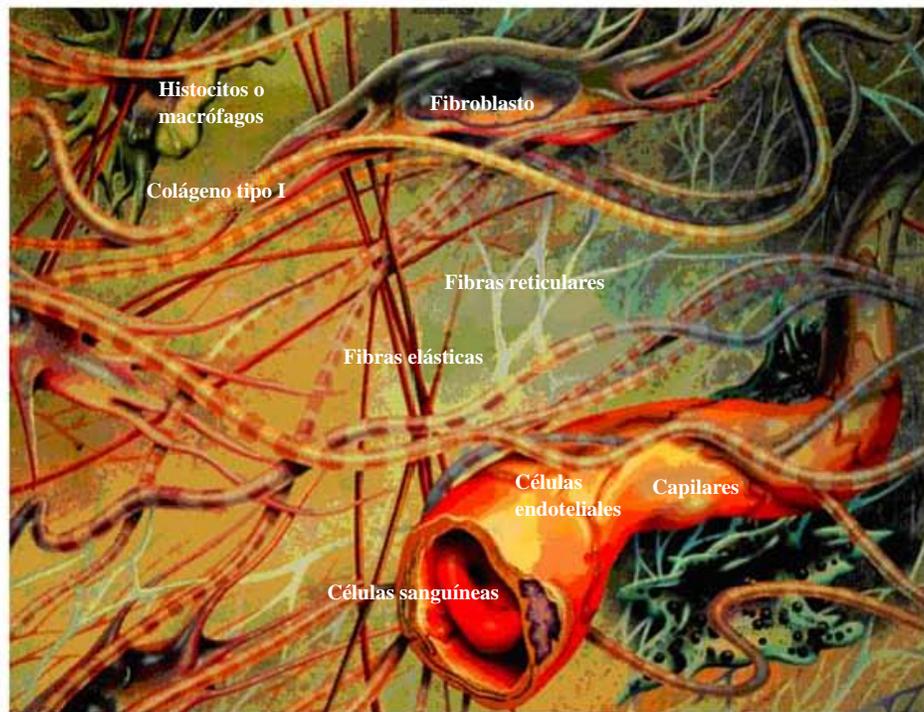


Figura 4. Esquema de los componentes de la dermis.⁵

1.1.1.5 *Hipodermis*

Es un tejido conjuntivo laxo constituido por grandes lóbulos de tejido graso limitados por tabiques de fibras colágenas delgadas y escasas fibras elásticas, como se muestra en la figura 5.²

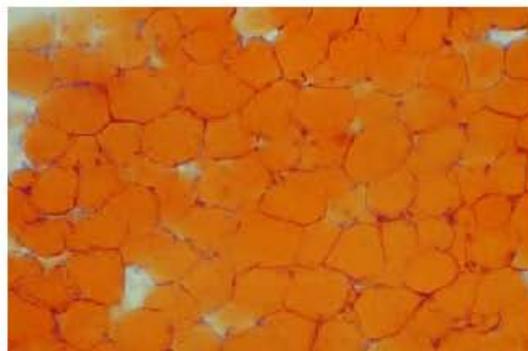


Figura 5. Zona hipodérmica tomada de la superficie del cuerpo, (100 X).⁵

1.1.1.6 Anexos Cutáneos

a) Folículos pilosos

Los folículos pilosos son invaginaciones tubulares de la epidermis como se muestra en la figura 6. El pelo se produce por queratinización de células formadas dentro de la matriz en la base del folículo. Esta matriz epidérmica rodea una pequeña papila dérmica que está invaginada en su base.²

Tanto el folículo piloso como el pelo al que da lugar se forman por interacción entre elementos epidérmicos y dérmicos hacia el tercer mes de la gestación. Consta de tres porciones:

-Infundíbulo: es la porción más superficial y se extiende desde la desembocadura en la superficie cutánea hasta la zona donde emerge la glándula sebácea.

-Istmo: está comprendido entre la desembocadura de la glándula sebácea y la inserción del músculo erector del pelo.

-Zona inferior: se extiende desde la inserción del músculo hasta el bulbo.

El canal folicular es amplio en toda su longitud y está relleno de queratina, sebo y flora bacteriana-micótica: *Propionibacterium acnes* y *Pityrosporum ovale*.⁶

Existen aproximadamente 120 000 folículos en el cuero cabelludo humano. Cada uno de ellos experimenta un ciclo de actividad en el cual una fase activa (anagen), que dura de uno a tres años o aún más, está seguida por una fase corta de transición (catagen) y una fase de reposo (telogen). Este proceso implica el cese de la mitosis en la matriz y la queratinización de la base expandida del pelo para formar un bastón que es retenido hasta que el folículo se activa de nuevo, cuando se cae el pelo. De este modo, aproximadamente 100 cabellos se pierden normalmente todos los días del cuero cabelludo.²

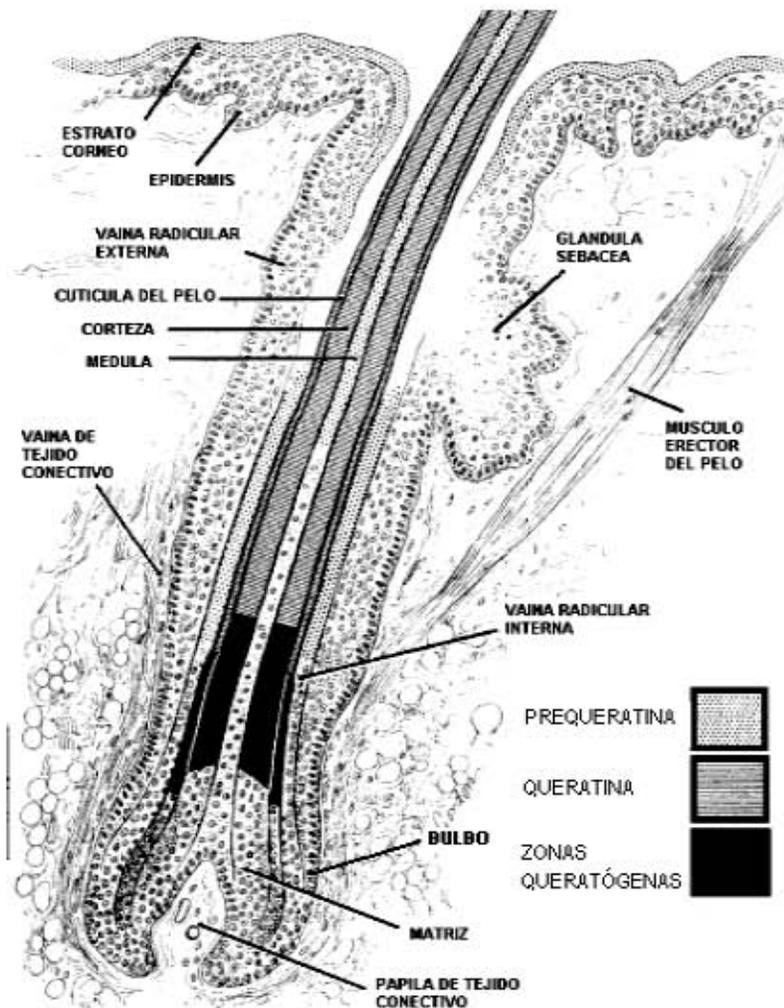


Figura 6. Esquema de la unidad pilosebácea así como de las áreas queratogénicas.²

Sucede que los folículos pilosos tienen un ritmo intrínseco, cuyo mecanismo queda sin descubrir, pero que puede ser muy modificado por hormonas circulantes y, de este modo, a su vez, por factores ambientales que actúan a través del hipotálamo y la pituitaria.

b) Glándulas sebáceas

La glándula sebácea está situada en la dermis media, se caracteriza por sintetizar el sebo, sustancia lipídica cuya función es la de lubricar y proteger la superficie de la

piel. Esta secreción glandular es de carácter continuo, con cierta predominancia durante el anagen del ciclo del folículo piloso. La secreción de cada lóbulo es de carácter holócrino, es decir, con ruptura de las células individuales, drenando desde los acinos al conducto sebáceo principal que va a desembocar en el canal piloso.²

Las glándulas sebáceas se encuentran en toda la piel, a excepción de las regiones palmoplantares, variando en tamaño y número según su localización: en la cara y cuero cabelludo son grandes y numerosas (400 a 900 por cm²), en el tronco son pequeñas y menos abundantes, incrementándose en la parte anterior del tórax y línea media de la espalda. La actividad de las glándulas sebáceas se encuentra bajo control hormonal. Es estimulada por andrógenos. En los varones, las glándulas son diminutas durante la prepubertad, pero experimentan un amplio engrandecimiento en la pubertad, incrementándose su producción en más de cinco veces. Los eunucos secretan aproximadamente la mitad del sebo que los varones normales, pero sustancialmente más que los muchachos; parece que la secreción depende de los andrógenos suprarrenales. Las mujeres adultas sólo secretan un poco menos que los varones; su actividad sebácea se mantiene por los andrógenos del ovario, así como por la corteza suprarrenal. El sebo humano se compone de glicéridos y ácidos grasos libres (57,5%), ésteres de ceras (26,0%), escualeno (12,0%), ésteres del colesterol (3,0%) y colesterol (1,5%). Los lípidos producidos por la epidermis superficial difieren por carecer de ésteres de ceras y escualeno y por tener una proporción mucho más elevada de ésteres de colesterol y colesterol. Los lípidos de la piel presentan grandes diferencias entre las especies.²

c) Lípidos de la epidermis

Se originan de fuentes endógenas (glándulas sebáceas, epidermis, bacterias, secreción écrina y apócrina) y exógenas (cosméticos, ungüentos y jabones). Se hallan integrando estructuras de membranas, secuestrados en organelos o fusionados en gotas, como en las células sebáceas. Sus funciones más importantes son: la formación

de una barrera al agua, iones y moléculas de gran tamaño y servir para la cohesión de los corneocitos. Los fosfolípidos predominan en la capa basal de la epidermis, siendo escasos en la capa córnea. Los esfingolípidos aumentan proporcionalmente a la maduración celular. Las ceramidas son más abundantes en el estrato córneo, al igual que los ácidos grasos libres, mientras que los esteroides libres y esterificados son abundantes en toda la epidermis.

1.2 ABSORCIÓN PERCUTANEA

Podemos definir la absorción percutánea de una sustancia como la suma de dos fenómenos que son, por una parte, su penetración desde el medio exterior hasta el seno de la piel entera y, por otra, su transporte a partir de las estructuras cutáneas, por la circulación sanguínea o linfática. El término percutánea indica que el paso se realiza a través de toda la epidermis y que la absorción puede tener lugar en los distintos niveles de la dermis. Tras la aplicación tópica de un fármaco sobre la piel, se pueden resumir los siguientes procesos:⁷

- a) *Adsorción*: Es el proceso por el cual el fármaco queda retenido en la superficie de la piel, generalmente por uniones fisicoquímicas, a componentes cutáneos de elevado peso molecular (queratina, melanina, etc.).
- b) *Permeación*: Consiste en el paso del fármaco a través de la piel por difusión desde una capa histológica a otra estructuralmente distinta.
- c) *Absorción*: La absorción es el proceso que sufre el fármaco, tras su aplicación sobre la piel, para acceder a la circulación sistémica.⁸

La absorción de un principio activo depende básicamente de:

- Su velocidad de disolución en el medio biológico que baña las membranas

- Sus caracteres fisicoquímicos propios, capaces de influir en los modos de absorción (pKa, coeficiente de reparto, estabilidad, etc). Esta aptitud del fármaco a ser más o menos absorbido se le llama absorbilidad y solo depende de sus propios caracteres fisicoquímicos.⁷

1.2.1 VÍAS DE PENETRACIÓN A TRAVÉS DE LA PIEL

El estrato córneo constituye la verdadera barrera que se opone al paso a través de la piel de los xenobióticos, en general, y de los fármacos, en particular. La acción barrera del estrato córneo es consecuencia de su propia estructura, en la que la queratina totaliza la mitad de su peso conjuntamente con proporciones variables de lípidos intrínsecos y procedentes de la secreción cutánea superficial. Sin embargo, si se elimina el estrato córneo, el resto de la epidermis se comporta como cualquier otra capa mucosa (sublingual, intestinal, etc.) de modo que el paso de los fármacos a través de esta estructura se realiza, igual que en el caso de otras mucosas, por difusión pasiva. No obstante, debe considerarse un hecho diferencial de la epidermis respecto a otras mucosas. En el caso de la epidermis, se trata de una estructura constituida por estratos pluricelulares, mientras que las mucosas son, en general, estratos unicelulares. Esta diferenciación se traduce en el hecho de que el paso de los fármacos a través de la epidermis es más lento que en otras mucosas, al ser mayor el espesor que debe atravesar el principio activo. No obstante las consideraciones expuestas, algunos fármacos no pueden penetrar a través del estrato córneo por difusión, alcanzar el estrato germinativo "viviente", llegar a la dermis y acceder a la circulación sistémica a partir de los capilares que irrigan esta zona.

En función de sus características fisicoquímicas y de otros factores que dependen de la tecnología farmacéutica con que han sido formulados, diversos fármacos quedan retenidos en la superficie de la piel sin prácticamente penetrar en el interior de la misma; en estos casos el fármaco queda adsorbido en la piel. En otros

casos, tras su aplicación sobre la piel mediante una formulación adecuada, el fármaco permea a través de la piel hasta un cierto nivel, quedando retenido antes de atravesar la dermis. Cabe considerar también como vías de paso de los fármacos a través de la piel los anexos, es decir, las zonas anatómicas en las que la epidermis pierde su continuidad. Los anexos penetran en la dermis desde el exterior al cual se abren; son las glándulas sudoríparas y los folículos pilosos y sus glándulas sebáceas. La vaina de los folículos y glándulas es de naturaleza epidérmica y, por lo tanto, queratinizada, pero este carácter se pierde en su parte inferior, ya en la dermis. Los fármacos pueden atravesar la piel a través de estos conductos y si alcanzan la zona no queratinizada difunden a través del sebo intrafolicular, en un caso, y de la secreción sudoral, en otro, llegando a la dermis y pudiendo absorberse sin necesidad de atravesar el estrato córneo. De acuerdo con lo expuesto, teóricamente pueden considerarse dos vías fundamentales para explicar el paso de los fármacos a través de la piel:

- a) *Transepidérmica*, es decir, a través del estrato córneo, con sus dos vertientes: intercelular e intracelular.
- b) *Transpendicular*, que a su vez puede desglosarse en:
 - Transfolicular, a través de los folículos pilosos y las glándulas sebáceas.
 - Transsudorípara, a través de los conductos y glándulas sudoríparas.⁸

1.2.1.1 Diferencias entre la superficie de la epidermis y los anexos

Con carácter muy general puede concretarse que las vías de paso de los fármacos a través de la piel pueden ser la epidérmica y folicular, con predominio de la primera; mientras que la vía transsudorípara tiene un papel bastante menos relevante. En lo que se refiere al paso de los fármacos, en la práctica, las distintas estructuras de la piel puede considerarse globalmente, puesto que, en las mismas condiciones, todas juegan al parecer un papel armónico y constante en el proceso del paso a través de la piel. Este proceso se desarrolla, en general, en dos estadios. Tras su administración se

establece, en primer lugar, un gradiente de concentración de fármaco desde las distintas vías de entrada del mismo. En un segundo estadio, el fármaco pasa a través de la piel por difusión pasiva, consiguiéndose un flujo del mismo normalmente constante a lo largo de todo el espesor de la piel. Como se ha comentado anteriormente, la vía de paso mayoritaria es la transepidérmica, dado que el estrato córneo constituye el 99% de la superficie cutánea. En este sentido, cabe señalar que la difusión intracelular supone atravesar las membranas córneas y los lípidos que impregnan la queratina. Por otra parte, si el fármaco pasa a través de la piel por vía intercelular, debe atravesar el espacio lipídico intercelular que une las células que constituyen el estrato córneo. Ambas vías de penetración están implicadas en la permeación de un fármaco disuelto. En la práctica, los fármacos pasarán a través de la piel por las dos vías, prevaleciendo una u otra en función de las características fisicoquímicas de aquellos.

1.2.1.2 Propiedades Fisicoquímicas que afectan la absorción percutanea

- a) Peso Molecular**
- b) Tamaño molecular**
- c) Punto de fusión**
- d) Coeficiente de reparto**
- e) pK_a**

Tanto el peso como el tamaño moleculares, como el punto de fusión, están directamente relacionados con el paso del fármaco a través de la piel. En general, cuanto menores son éstos valores, más fácil es el paso del fármaco a través de la piel. El coeficiente de reparto juega un papel muy importante en el paso de los fármacos a través de la piel. En principio, fármacos con un coeficiente de reparto n-octanol/agua inferior a 0.1 no serían candidatos a ser administrados por vía transdérmica. Los fármacos idóneos serían aquellos cuyo coeficiente de reparto n-octanol/agua esté comprendido entre 10 y 100. El pK_a condicionará, en función del pH de la formulación,

la fracción no ionizada presente de fármaco que, *a priori*, es la forma que más posibilidades tiene de penetrar a través de la piel.⁸

1.3 DIFUSIÓN PASIVA A TRAVÉS DE MEMBRANA LÍPIDICA

Como se ha demostrado desde las primeras investigaciones, sabemos que la mayoría de las moléculas se absorben a través de la piel por difusión pasiva. La velocidad de absorción a través del tegumento no es constante desde el inicio puesto que siempre se observa un periodo de latencia. El período de latencia representa el tiempo necesario para la penetración de la sustancia al interior de las estructuras córneas y para el establecimiento de un gradiente de difusión. Este tiempo es variable de un compuesto a otro; el período de latencia se determina por la extrapolación de la parte lineal de la curva sobre el eje de las abscisas (tiempos) y se expresa por la siguiente ecuación:

$$T1 = \frac{\delta^2}{6D}$$

donde: $T1$ = período de latencia

δ = espesor de la membrana

D = constante de difusión de la membrana en las estructuras cutáneas

Cuando se alcanza el equilibrio la cantidad de sustancia que abandona la membrana por su parte dérmica es igual a la que penetra en los estratos epidérmicos y la difusión está regulada por la ley de Fick:

$$\frac{dQ}{dt} = D \cdot P \cdot S \frac{dC}{dx}$$

en la que dQ/dt representa la velocidad de difusión, es decir, la cantidad de fármaco que atraviesa la membrana absorbente por unidad de tiempo, D el coeficiente de difusión a través de membrana, que se define como el número de moles del fármaco que difunden a través de una unidad de área cuando el gradiente de concentraciones

es también la unidad; sus dimensiones son área/tiempo; S representa el área total útil para la absorción y, por tanto, tendrá unidades de superficie; P el coeficiente de reparto *in vivo* entre la membrana lipoidea y el medio en el que está disuelto el fármaco en el lugar de absorción y es adimensional; dC/dx es la variación diferencial de concentraciones a uno y otro lado de la membrana con respecto al espacio recorrido, es decir el gradiente de concentraciones, expresado en unidades de concentración/longitud. Llamando delta (δ) al espacio recorrido, es decir, al espesor de la membrana o camino difusional y asimilando la diferencial (dC) al incremento en el gradiente de concentración (ΔC), la ecuación anterior se podría expresar del siguiente modo:

$$\frac{dQ}{dt} = \frac{D \cdot P \cdot S}{\delta} \Delta C$$

Si se tiene en cuenta que la velocidad de difusión es la misma que la velocidad a la que desaparece la cantidad de fármaco remanente en lumen, pero de signo contrario, se obtiene expresando las cantidades en concentraciones la ecuación siguiente:

$$\frac{-dQ}{V \cdot dt} = \frac{dA}{dt} = \frac{D \cdot P \cdot S}{V \cdot \delta} (A - C)$$

En la que dA/dt es la velocidad expresada en concentración/tiempo, V el volumen en el que se encuentra disuelto el fármaco, A la concentración en el lugar de absorción y C la concentración en plasma. Esta ecuación permite explicar adecuadamente las observaciones de los distintos autores.

De acuerdo con la ecuación, la velocidad de difusión es proporcional al área útil para la absorción justificando la mayor velocidad de absorción observada en intestino delgado comparada con la obtenida en estómago. Además según la ecuación, cuanto mayor es el coeficiente de reparto del compuesto, y por lo tanto su lipofilia, más rápidamente se absorbe el compuesto, apoyando así las observaciones discutidas anteriormente.

Los factores D , P , S , V y δ pueden considerarse constantes para un mismo fármaco y lugar de absorción, por lo que pueden englobarse en una única constante, llamada constante de absorción por membrana y que habitualmente se representa como $k_{a(mem)}$. La constante de velocidad de absorción se expresa en términos de tiempo recíproco. La constante de absorción depende a su vez de las características propias del fármaco, como por ejemplo su lipofilia, y al pH del medio. Así pues, para una determinada vía de administración, se considera que la constante de absorción caracteriza la capacidad de absorción inherente a cada fármaco. Debido a que el volumen de sangre es relativamente grande comparado con el volumen del lugar de absorción y a que la circulación sanguínea elimina rápidamente el fármaco absorbido, la concentración del mismo existente en plasma C , puede considerarse despreciable frente a la existente en el lugar de absorción. Esto se conoce como condición "sink", y hace referencia a la baja concentración de fármaco en el torrente circulatorio adyacente al lugar de absorción. Así, la anterior ecuación puede expresarse del siguiente modo:

$$- \frac{dA}{dt} = k_{a(mem)} \cdot A$$

Esta ecuación corresponde a una cinética de primer orden e indica que la velocidad del proceso de absorción de un fármaco a través de membrana lipoidea es proporcional a la concentración del mismo remanente en el lugar de absorción.⁸

Debe señalarse que la aplicación de la ley de Fick a los estudios de permeabilidad cutánea solo pueden realizarse respetando ciertas condiciones:

- Flujo (dQ/dt) constante
- Integridad del tegumento respectivo
- Concentración C_1 (concentración en el donador) de la sustancia aplicada, pequeña y constante, a lo largo de todo el estudio
- Medio receptor en el compartimento dérmico renovado, no saturado

La constante de permeabilidad se expresa como:

$$Kp = \frac{P * D}{\delta}$$

La constante de permeabilidad Kp caracteriza el poder de penetración de una sustancia a través de una membrana dada; será tanto más elevada cuanto mayor sea dicho poder. La constante de permeabilidad de una sustancia que difunde a través de todos los estratos de la piel es la resultante de varias constantes Kc , Ke , Kd , que son las constantes de permeabilidad del estrato córneo, la epidermis y la dermis, respectivamente. Estas constantes se obtienen experimentalmente mediante estudios de permeabilidad. En general la constante de permeabilidad de la piel entera Kp es similar a la del estrato córneo Kc :

$$Kp = Kc = \frac{P_c * D_c}{\delta_c}$$

donde el subíndice c caracteriza la resistencia a la difusión del estrato córneo.⁷

1.3.1 CELDA DE DIFUSIÓN TIPO FRANZ

El objetivo de una experimentación *in vitro* en la liberación transdérmica es entender y/o predecir la liberación y penetración de una molécula a través de la superficie de la piel hacia el interior del cuerpo de un animal viviente. Generalmente, esto se lleva a cabo usando una variedad de celdas de difusión, las cuales son utilizadas dependiendo de la naturaleza del estudio, y siguiendo diversos protocolos experimentales. Una celda de difusión consta de dos compartimientos, el compartimiento donador donde se coloca el principio activo en solución y el compartimiento receptor donde se coloca el solvente solo, ambos están separados por una barrera central a través de la cual el penetrante o soluto difundirá al solvente del compartimiento receptor. Se recomienda que las celdas de difusión diseñadas cumplan con los siguientes requerimientos:

a) Todos los materiales deben ser evaluados por su habilidad de absorber o adsorber el penetrante ensayado

b) El compartimiento donador debe proporcionar:

- Una fácil entrada para liberar el penetrante en la piel.
- Temperatura controlada.
- Control de la evaporación para vehículos volátiles y penetrantes

c) El compartimiento receptor deberá tener:

- Temperatura controlada
- Agitación constante
- Suficiente volumen para mantener infinitamente las condiciones sink

d) Fluido del receptor

- No deberá comprometer la función de la barrera
- Deberá tener características favorables de partición para recibir al penetrante
- Deberá ser capaz de mantener la viabilidad de la epidermis

Actualmente, los estudios de liberación transdérmica *in vitro* son conducidos en celdas de difusión vertical tipo Franz (Figura 7), ya que son fáciles de ensamblar y limpiar, mejoran la visibilidad de los líquidos y la rotación del agitador, además de estar condicionadas para controlar la temperatura. Estas celdas permiten simular lo que ocurriría en condiciones reales de aplicación, pues en el donador pueden colocarse no sólo soluciones, sino cualquier formulación o sistema de liberación tópico o transdérmico. Dichas celdas están hechas de vidrio Pyrex y consisten en dos partes, una cámara donadora y una receptora. Ambos compartimientos son ensamblados por unas pinzas metálicas. El líquido en el receptor es agitado por una barra magnética cubierta de teflón. Este dispositivo se sumerge en un baño de agua de temperatura constante y las muestras son removidas periódicamente y ensayadas por métodos apropiados.¹

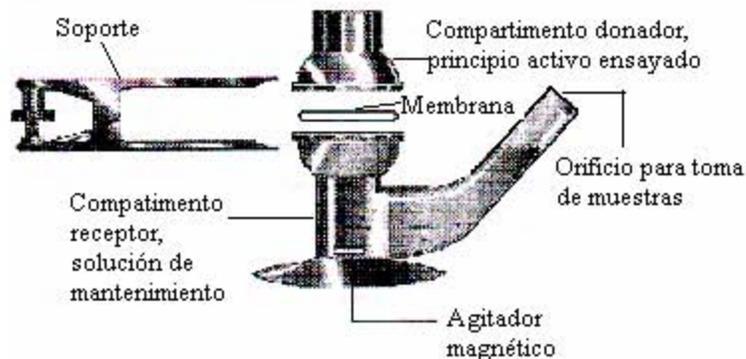


Figura 7. Celda de Difusión Tipo Franz.¹

1.4 EL ACNÉ

1.4.1 DEFINICIÓN

Es una enfermedad de carácter inflamatorio que afecta al pelo, al bulbo, y a la glándula sebácea. A todas estas estructuras se las conoce como unidad pilosebácea. De acuerdo a la profundidad y compromiso de las capas de la piel será más o menos grave o de difícil resolución.⁹

La reacción obstructiva e inflamatoria glandular sebácea va a originarse por múltiples factores. El acné juvenil es el propio de la edad puberal. Cabe señalar que el acné juvenil adopta múltiples formas clínicas, a veces con persistencia e incluso aparición en edades ya un poco tardías.

También existen una serie de cuadros inflamatorios y obstructivos de la glándula que no tienen relación con el acné juvenil: las erupciones acneiformes y una especial dermatosis con elementos papulopustulosos que se denomina rosácea. La Figura 8 clasifica lo anteriormente explicado.



Figura 8. Clasificación de los cuadros obstructivos e inflamatorios.

1.4.2 CLASIFICACIÓN

Aunque existen varias clasificaciones y hay autores que incluso los catalogan en diez clases diferentes, sin embargo, se suele hablar de acné leve, moderado y grave, con mayor frecuencia.

- **Acné leve:** Aparece el comedón cerrado (de aspecto blanco o amarillento) y el comedón abierto (también conocido como punto negro o espinilla).
- **Acné moderado:** Se caracteriza por pápulas (lesiones elevadas) y dolorosas cuando se palpan) y pústulas (cuando las lesiones contienen pus).
- **Acné severo:** Las lesiones anteriores han dado lugar a nódulos y quistes que pueden llegar a ser muy dolorosos.

Según la presencia predominante de cada una de las lesiones elementales, se clasifica al acné de la siguiente forma:

- Grado I: Comedónico
- Grado II: Pápulo-pustuloso
- Grado III: Nodular
- Grado IV: Flemonoso o quístico

Ciertos autores agregan a esta clasificación una forma incipiente de acné que denominan "preacné" o "acné fisiológico".¹⁰

Actualmente la mayoría de los dermatólogos se inclinan por la clasificación de Burke y Cunliffe: estos autores hacen una minuciosa descripción de las lesiones clínicas del acné y lo dividen en:

Acné no inflamatorio: Sólo hay presencia de comedones cerrados y/o abiertos.

Acné inflamatorio: A su vez se subdivide en superficial y profundo: pápulas, pústulas y nodulos.

Existen otros tipos de acné como entidad, que no guardan ninguna relación con el acné juvenil, que son los llamados:

- **Acné Necrótico:** Se caracteriza por una necrosis folicular crónica de etiología desconocida. Las lesiones son pápulas rojizas de 2-5mm de diámetro que se necrosan con rapidez.
- **Acné Queloideo:** Se caracteriza por tener cicatrices hipertróficas, que pueden alcanzar varios centímetros de diámetro y más de 1cm sobre la superficie cutánea. Son más frecuentes en zona pretorácica y en la espalda a nivel de los hombros, pero se observan también en la cara, especialmente a nivel del ángulo maxilar inferior, y en el cuello.
- **Acné Conglobata:** Consta de una tétrada: formaciones nodulares severas, celulitis disecante del cuero cabelludo, hidrosadenitis supurativa y fístula pilonidal. Cabe señalar que esta forma grave de acné integra el Síndrome SAPHO (Sinovitis, Acné conglobata, Pustulosis palmo-plantar, Hiperostosis y Osteítis). Esta entidad fue descrita por primera vez en 1987. La hiperostosis se localiza fundamentalmente a nivel esternocostoclavicular. Se han descrito osteoartritis de tobillo y columna considerándose a estos trastornos como "seronegativos". Puede haber presencia de osteomielitis múltiple.¹¹

- **Acné Solar ó acné de Mallorca** es una erupción papulosa que aparece en algunos pacientes que se exponen a fuerte radiación lumínica. La humedad y el calor parecen desempeñar un papel nocivo en la aparición del acné.
- **Acné medicamentoso:** El producido por corticoesteroides administrados de manera general o local se manifiesta con monomorfismo de pápulas eritematosas, no visualizándose los comedones. También producen erupciones de tipo acneico los hidantoinatos, vitamina B6 y B12, levadura de cerveza, tuberculostáticos, testosterona, progestágenos, ioduros, etc.¹²

1.4.3 EPIDEMIOLOGÍA

Afecta al 85-90% de los adolescentes. Los varones suelen tener un acné mas severo, de duración mas corta, mientras que en las mujeres es de mas larga duración pero menos severo. El comienzo suele ser 1 a 2 años antes de iniciarse la pubertad, entre los 10 y 12 años, siendo su máxima expresión casi al final de ésta.¹³

En la pubertad la incidencia y la prevalencia deben estar cerca del cien por ciento. Prácticamente todos los adolescentes lo han padecido en mayor o menor grado, incluso algunos autores lo consideran normal cuando es ligero. Solo en los Estados Unidos afecta a arriba del 70-87% de los adolescentes, pero también afecta a los adultos (52% de los pacientes de acné son adultos) y los pacientes especialmente femeninos. Del 15-30% de los pacientes con acné necesitan tratamiento debido a la severidad de la enfermedad lo que representa un gasto de más de mil millones de dólares.¹⁴

1.4.4 ETIOLOGÍA

El acné es la condición superficial crónica más comúnmente vista por los dermatólogos. La patología de la enfermedad se centra sobre la unidad pilosebácea, consistiendo de un canal folicular con pelo, y un grupo de glándulas sebáceas

(productoras de sebo) glándulas que rodean y abren el folículo. Sólo se entienden parcialmente las causas de acné, aunque hay evidencia sustancial que varios factores interrelacionados están involucrados.^{15, 16, 17.}

La lesión inicial que ocurre uno o dos años antes de la pubertad, es el micro comedón, o poro tapado de células muertas. En respuesta al andrógeno prepuberto (o precursor, sulfato de dehidroepiandrosterona) liberado de las glándulas suprarrenales maduras, las glándulas sebáceas (las cuales son los órganos androgenicos blanco, con alta densidad de receptor del andrógeno) de la cara, pecho y espalda, aumentan su producción de sebo, una mezcla de lípidos. Brevemente después de esto, los queratinocitos, las células epiteliales del folículo productoras de queratina, sufren una diferenciación anormal y/o hiperproliferación, y después se depositan de manera cohesiva, así se empiezan a acumular en el conducto pilosebáceo.^{18, 19.}

Factores que posiblemente contribuyen a ésta hiperqueratinización y acumulamiento incluyen a los andrógenos, cambios en el lípido del sebo (incluso las deficiencias de ácido linoleico), retinoides, lipoxigenasas, la sustancia P (liberadas desde las fibras del nervio que rodean las glándulas sebáceas), la hormona liberadora de corticotropina(CRH), la interleucina-1 α folicular (IL-1 α); hay también evidencias preliminares en los que pueden estar involucrados los eventos inflamatorios.^{20, 21, 22.}

La profusión de células y de sebo en el canal folicular eventualmente forman una obstrucción que interfiere con la producción de la piel superficial, el proceso normal con el que las células muertas epiteliales son llevadas por el sebo al eje del pelo a ser liberado hacia la superficie de la piel. El resultado del folículo tapado es el microcomedón, y es invisible al ojo humano. En la pubertad, típicamente entre las edades de 10 y 14, la maduración gonadal surge con la liberación y activación de los andrógenos gonadales, más allá del crecimiento de la glándula sebácea (la glándula puede recoger las hormonas del suero, o lo hace localmente de los precursores), y la producción de sebo es anormalmente alto; los estrógenos y hormona de crecimiento (la

cual es máximamente secretada durante la adolescencia) pueden también contribuir al desarrollo de la glándula sebácea. Las glándulas sebáceas propensas al acné parecen ser distintas, comparándolas con las glándulas no propensas, ellas tienen una capacidad mayor de convertir la testosterona (vía la enzima 5 α -reductasa) con mayor potencia receptor-interacción al andrógeno, dihidrotestosterona.²³

Como el folículo se extiende desde la acumulación progresiva de sebo hasta la superficie celular, el comedón es entonces visible. Los comedones que alcanzan la superficie de la piel y están abiertos, se les llaman espinillas o puntos negros (black heads), debido a su color; y los que están por debajo de la piel son conocidos como puntos blancos (whiteheads), y aparece como pequeñas protuberancias que son del color de la piel o blancos. Las espinillas y los puntos blancos constituyen “el acné comedonal,” una fase temprana, no inflamatoria de la condición. El canal folicular tapado con abundante sebo es un gran medio para la reproducción de la bacteria *Propionibacterium acnes*, un miembro de la flora cutánea residente. Este difterioide (quien inicia la liberación de las moléculas quimiotácticas y proinflamatorias que asisten induciendo la fase inflamatoria del acné caracterizada por las lesiones inflamatorias, las pápulas y pústulas) crece en el ambiente anaerobio del comedón. Para la liberación de lipasas que los triglicéridos del sebo hidrolizan a el glicerol nutriente, *P. acnes* aprovecha el atrapamiento de sebo como una fuente de comida, y se reproduce. El subproducto de la reacción metabólica son ácidos grasos libres que irritan y dañan las paredes del folículo (más allá de la producción de células) e induce una respuesta inflamatoria. Es importante saber que los *P. acnes*, contribuyen a la patología inflamatoria por lo siguiente:

- Secretando varios productos extracelulares que atraen a los neutrofilos, linfocitos y macrófagos que se acumulan dentro del epitelio folicular y se infiltran perifolicularmente; estimulando a los neutrofilos a liberar enzimas, que rompen las paredes del folículo, estimulando una respuesta inflamatoria; activando el complemento; y liberando factores solubles que estimulan la liberación de IL-8 y

factor α de necrosis de tumor desde los macrófagos, por consiguiente los neutrofilos se fortalecen y se refuerzan con los linfocitos. En ésta y otras maneras, la bacteria es la principal promotora de la inflamación.^{24, 25.}

Note que aunque *P. acnes* es una bacteria residente, su aparición en la piel, en gran número, no ocurre hasta la maduración de las glándulas sebáceas y la producción de sebo sea intensificada. La presencia de la bacteria no es un requisito para que alguien tenga comedogénesis y la expresión clínica más temprana de acné. Debe darse énfasis a que el papel de *P. acnes* no es solo una infección simple.

Mientras la colonización de la bacteria en la unidad pilosebacea funciona para estimular la vía humoral y las células mediadoras (contribuyendo a la ruptura de la inflamación folicular y perifolicular, y así el desarrollo de la lesión de acné) no hay ninguna correlación entre el número de *P. acnes* y el grado de la severidad del acné. Además, el acné no es contagioso. El acné es una respuesta inflamatoria, no una infección en el sentido verdadero.

Se ha revisado el papel del “sistema inmunológico de la piel” con acné. La unidad pilosebácea es un órgano inmunocompetente, y los conductos de los queratinocitos y de los sebocitos (los dos principales tipos de células involucradas en la iniciación del acné) pueden actuar como células inmunes no-profesionales, reconociendo a los patógenos y presentando a los antígenos; ellas también poseen una variedad de receptores para neuropéptidos que, cuando son ocupados, causan la liberación de moléculas proinflamatorias. Estas células tienen el potencial para ser activadas por *P. acnes*, dando como resultado la proliferación y diferenciación, así como la liberación de varias citocinas capaces de dar acciones proinflamatorias, tales como la asistencia de leucocitos.²⁶

También, la presencia de lípidos del sebo alterados desde la unidad pilosebácea por los queratinocitos y sebocitos, pueden activar al sistema inmunológico innato y al

sistema inmunológico adaptativo, induciendo la inflamación del acné independiente de *P. acnés*. Como los sebocitos pueden sintetizar los ácidos grasos libres, y los queratinocitos derivados de la IL-1 α causan una anormal diferenciación/hiperproliferación que imitan a los encontrados en el microcomedón, los queratinocitos y sebocitos pueden tener un papel importante en el desarrollo de las lesiones de acné de inflamatorias y no inflamatorias.²⁷

El acné severo progresa a menudo (por lo que se refiere al número de lesiones y al grado de inflamación) como un niño que pasa la fase de la adolescencia, la severidad del acné está correlacionada más con el período de la pubertad que con edades en un determinado momento. Además, el predominio de acné en cualquier grupo de niños aumenta como las edades del grupo. El preadolescente y los pubertos son propensos al acné comedonal de tipo no inflamatorio (la fase más temprana y más moderada de acné) y, de hecho, unos puntos blancos o espinillas sobre la cara a veces son la primera señal de pubertad. Como la bacteria *P. acnés* prolifera en las lesiones y como las respuestas inmunes se elevan, el acné inflamatorio (la siguiente etapa de severidad) puede observarse. Esta etapa es caracterizada por comedones y también por algunas pápulas (lesiones de color rosa ligeramente inflamadas, aparentemente sin pus) y pústulas (lesiones rojas, llenas de pus).

El acné que está compuesto de quistes o nódulos (grandes y profundas zonas de inflamación) es una condición más rara y más seria. La mayoría de los pacientes tiene una mezcla de lesiones no inflamatorias e inflamatorias, y no es raro que cualquier lesión, pueda progresar del comedón, a la pápula, a la pústula, y lesiones nodulocísticas, antes de resolverse.²⁸

En los casos más severos, se pueden formar forúnculos y abscesos deformantes que pueden resultar en cicatrices. De acuerdo a la figura 9, en el orificio de salida del folículo sebáceo se forma un tapón de células muertas que se acumulan junto con el sebo y en la mayoría de los casos algunas bacterias formando lesiones en la piel, que

pueden ser no inflamatorias (comedones) y lesiones inflamatorias (pápulas, pústulas, lesiones nodulocísticas, y quistes).³

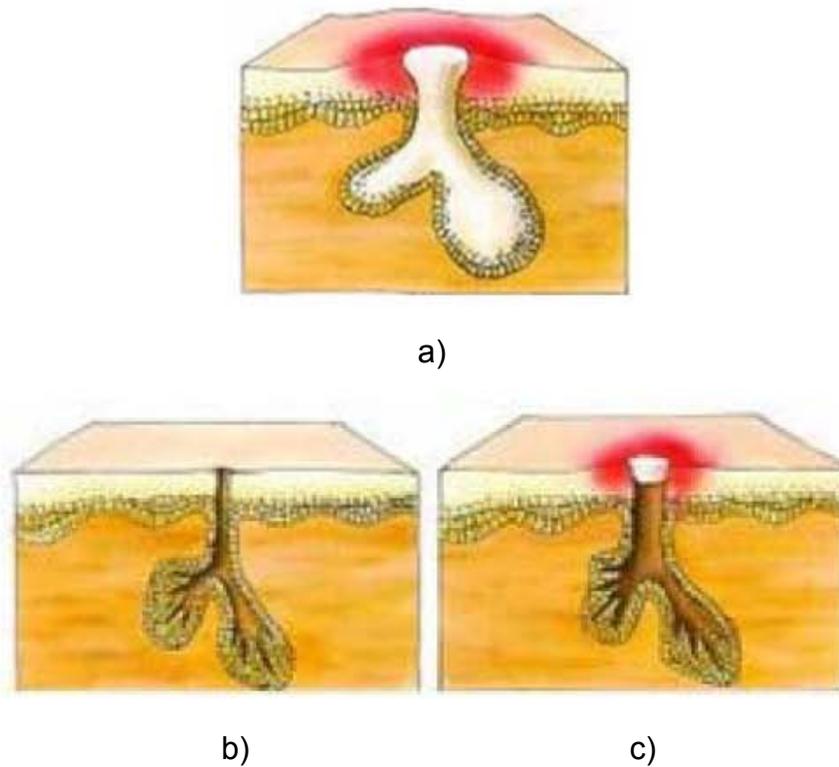


Figura 9. Tipo de comedones: a) Lesiones inflamatorias o forúnculos; b) Lesión no inflamatoria o comedón abierto (espinilla); c) Lesión inflamatoria o comedón cerrado.³

1.4.5 FACTORES QUE INTERVIENEN EN EL DESARROLLO DEL ACNÉ:

1.4.5.1 FLORA BACTERIANA

El acné es un desorden de los folículos pilosebáceos que se caracterizan por ser no inflamatorios (los comedones) y lesiones inflamatorias (las pápulas, pústulas y lesiones nodulocísticas).²⁹

El acné es una enfermedad multifactorial en la que la propionibacteria, *Propionibacterium acnes*, bacteria anaerobia gram-positiva y otras bacterias que forman parte de la microflora cutánea residente, se piensa que juegan un papel importante en la patogénesis de lesiones inflamadas. Estos microorganismos *Propionibacterium acnes* y *Staphylococcus epidermidis* parecen comenzar el proceso inflamatorio produciendo factores quimiotácticos en neutrofilos. Una vez que los neutrofilos son atraídos por quimioatrayentes bacterianos y alcanzan el sitio, ellos liberan los mediadores inflamatorios, tal como la enzima lisosomal y especies de oxígeno reactivo produciendo así la inflamación.^{9, 30, 31,32.}

Debido a que los principales microorganismos son susceptibles a diferentes antibióticos y antimicrobianos tópicos, se ha sugerido que deben usarse para eliminar las lesiones inflamadas y así controlar el acné. Sin embargo debido a la emergente resistencia de *Propionibacterium acnés* a la tetraciclina y a la eritromicina, el uso de antibióticos en la terapia del acné debe ser minimizado (en bajas dosis y en períodos cortos). Así el triclosán siendo no tóxico y usado en bajas dosis y en un sistema nanoparticulado es una valiosa alternativa en el tratamiento del acné.^{33, 34}

Un factor para promover el desarrollo y estancia de las bacterias antes mencionadas son los lípidos, los cuales se encuentran ubicuamente en la superficie de la piel, y están principalmente compuestos de triacilgliceroles derivados del sebo. Los microorganismos *Propionibacterium acnes* y *Staphylococcus epidermidis* presentan actividad lipasa (las lipasas actúan sobre los triglicéridos produciendo ácidos grasos libres que son muy irritantes y comedogénicos), así las lipasas, pueden ser importantes para la colonización y persistencia de organismos residentes en la piel, posiblemente en términos de nutrición o por la liberación de ácidos grasos libres los cuales pueden promover la adherencia y colonización en folículos sebáceos.^{35, 36}

No se ha encontrado relación entre el número de bacterias contenidas en la piel y los conductos y la severidad del acné. Probablemente es más importante el ambiente en el que se mueven las bacterias (pH y tensión de oxígeno), que su número total para

el desarrollo de las lesiones. El pH superficial normal se ha estimado que ésta en el rango de 5.0–6.0.

El que el pH cutáneo sea inferior a 7 significa que la piel dispone de una barrera de protección ácida con propiedades bactericidas y fungicidas de fundamental importancia para la salud. Si el pH se ubica por encima o debajo del rango permitido se produce una disfunción del sistema de defensa de la piel que propicia acné, dermatitis seborréica, irritaciones después del afeitado o infecciones.³⁷

1.4.5.2 HORMONAS ANDROGÉNICAS

Las hormonas que tienen más influencia en el acné son los andrógenos que estimulan las glándulas sebáceas y a los folículos pilosos (aumentando el crecimiento del vello en el cuerpo, es decir el hirsutismo), así como la presencia de bacterias en la piel. Debido a sus efectos en la alteración de la producción de andrógenos, dosis bajas de contraceptivos orales han sido prescritas por dermatólogos desde hace varios años para tratar de resolver el acné hormonal.³⁸

Así la reducción de producción de andrógenos por estrógenos sistémicos reduce la producción del sebo en la piel y mejora el acné.³⁹

En el varón, los andrógenos circulantes provienen de la secreción testicular y suprarrenal. En la mujer, el 50% provienen de los ovarios y de las suprarrenales, y el otro 50 % de una interconversión periférica a partir de la androstenediona y la dihidroepiandrosterona. El acné en mujeres puede ser influenciado por los cambios hormonales asociados con la menstruación (en líneas generales se constata una disminución progresiva del sebo durante la primera mitad del ciclo), el embarazo, el estrés, enfermedades ováricas o desequilibrios endocrinos.

Algunas personas que se encuentran en la fase de madurez temprana continúan teniendo niveles altos de andrógenos, producción de sebo, y un número sustancial de microcomedones, aún en esta fase la presencia de acné es atípico. Todavía, el número de personas cuyo acné persiste pasando la edad de 25 años y más allá, no es insignificante. Ocho por ciento de adultos con edades entre 25–34 años y 3% de aquéllos que tienen edades entre 35–44 años tienen el acné. En lugar de ser una manifestación “fisiológica” (como se propone para el acné juvenil), el acné en muchas de las personas en este grupo puede en cambio ser patológico.²⁸

La hiperandrogenicidad, como un ejemplo, es una perturbación conocida para agravar el acné, y puede provenir de diversas patologías tales como, hiperplasia suprarrenal congénita, enfermedades poliquísticas del ovario (hay un incremento de la secreción gonadal de andrógenos a nivel del hilio y de la teca interna. La presencia de acné en una mujer adolescente o adulta con niveles de testosterona sérica superiores a 300 ng/dl sugiere la presencia de un tumor ovárico), y anomalías del metabolismo local de los andrógenos.²⁰

1.4.5.3 AUMENTO EN LA PRODUCCIÓN DE SEBO Y TAPONAMIENTO DE LAS GLÁNDULAS SEBÁCEAS

En el acné hay un incremento en la producción de sebo comparado con personas normales. Esto no depende solamente de la glándula sebácea, sino que existen otros factores de tipo hormonal, bacteriano o metabólico que juegan un rol en la evolución del proceso.

La presencia de andrógenos junto con una sensibilidad anormal a ellos de la glándula sebácea y su conducto e infección por bacterias lleva como consecuencia del estímulo hormonal, que las glándulas sebáceas produzcan una gran cantidad de sebo.

Esto conduce a una congestión dentro del folículo y el consiguiente atrapamiento del sebo. (Ver etiología)

Además, algunos cosméticos estimulan el acné, ya que llegan a tapar los poros de la piel, especialmente si son grasos.

1.4.5.4 HIPERQUERATINIZACIÓN

Como ya se explicó anteriormente la presencia de andrógenos estimula la producción excesiva de sebo y esto a su vez estimula a los queratinocitos (células epiteliales del folículo productoras de queratina) y sufren una diferenciación anormal o hiperqueratinización. Los cambios iniciales se observan en la zona infrainfundibular: hay un incremento en la proliferación epitelial y las células córneas quedan adheridas entre sí, sin poder desprenderse; el material queratinoso se hace cada vez más denso y desorganizado y los gránulos de queratohialina están aumentados. Se produce así una hiperqueratosis de retención formándose un verdadero tapón córneo, esto último causa también el atrapamiento del sebo y así las lesiones acnéicas. (Ver etiología)

1.4.5.5 HERENCIA Y ENFERMEDADES CONGÉNITAS

Se sabe que existe una cierta predisposición a padecer acné cuando algún familiar cercano lo ha sufrido anteriormente, hay coincidencia significativa de formas clínicas entre hermanos o antecedentes paternos. También se han descrito formas de cromosomas complementarios anormales XYY en pacientes con formas graves de acné noduloquístico.

El acné en niños de temprana edad es casi nulo. Generalmente el pelo y la glándula sebácea cambian de tamaño en los distintos períodos de la vida. Al nacimiento se encuentran aumentados de tamaño en relación a la edad pre-puberal,

probablemente por influjo androgénico en el útero: esto explica el acné neonatal. Sin embargo también puede darse por enfermedades congénitas, en la literatura se identificaron dos subconjuntos de pacientes de temprana edad con anormalidad endocrina, los cuales mostrarón señales de virilización, como el envolvimiento facial de vello.^{40, 41.}

1.4.5.6 ALGUNAS PRESCRIPCIONES MÉDICAS

Medicamentos para prevenir la epilepsia, varios tratamientos como la administración de corticosteroides (cortisona), las píldoras anticonceptivas, testosterona y esteroides anabólicos, gonadotropinas y ACTH también aumentan el acné.⁴²

Contrariamente a esto, la supresión de la actividad adrenocortical (andrógenos producidos por la glándula adrenal principalmente) con prednisolona, disminuye la producción de sebo. Así como también los estrógenos desempeñan un rol opuesto al de los andrógenos. Al menos a dosis farmacológicas, los estrógenos suprimen la actividad y el tamaño de la glándula sebácea tanto en el hombre como en los animales de experimentación, además de reducir los niveles de andrógenos.

1.4.5.7 ESTRÉS

Un gran número de condiciones internas y externas pueden afectar el acné, una repercusión que se puede haber seleccionado durante la evolución. La tensión o mejor conocido como estrés, por ejemplo, particularmente cuando éste es severo o prolongado, puede agravar la condición. Cuando una persona esta con estrés, su cuerpo produce hormonas como el cortisol (hipercorticalismo adrenal).

Los estudios muestran que esta hormona de tensión primaria puede estimular una sobreproducción de las glándulas sebáceas en la piel. Este exceso de sebo, con las células muertas de la piel y bacterias, puede causar el acné. Esto puede, a su vez, llevar a más tensión en un ciclo de tensión-acné.

Además el neuropéptido, sustancia P la cual es asociada con el estrés, aumenta el crecimiento de las glándulas sebáceas y puede estar involucrado en este sentido. La hormona liberadora de la corticotropina (CRH), coordinadora del cuerpo para las respuestas del estrés, también está implicada, ya que los receptores de CRH han sido recientemente encontrados en los sebocitos. Los aumentos de andrógenos circulantes, como resultado del estrés o la activación de la fatiga inducida de la glándula suprarrenal, empeoran también el acné.

De hecho, el acné puede ser un rasgo dinámico que viene y va con la circunstancia, quizá influyendo en dicha condición la dieta o salud pobre, o los efectos deletéreos (así como las posibles causas de tales efectos) del estrés.^{16, 21, 43.}

1.4.6 CUADRO CLÍNICO

El acné aparece cuando las glándulas sebáceas, que producen grasa y desembocan en el mismo folículo del pelo, generan más secreción de la que la piel es capaz de eliminar por descamación, de tal forma que se producen tapones de grasa en los folículos (comedones).

Al romperse el tapón pueden entrar células muertas de la piel que con la grasa acumulada y las bacterias de la zona forman nódulos infectados llamados pústulas. Si estas áreas infectadas de la piel son profundas, pueden expandirse para formar quistes.

Un quiste sebáceo se forma cuando la glándula sebácea continúa produciendo grasa. En vez de romper la pared del folículo, éste continúa agrandándose y formando un bulto duro (conocido como quiste) debajo de la piel. El quiste normalmente no es doloroso a menos que llegue a estar infectado. El paciente presenta lesiones múltiples en cara, cuello y parte superior del tórax.

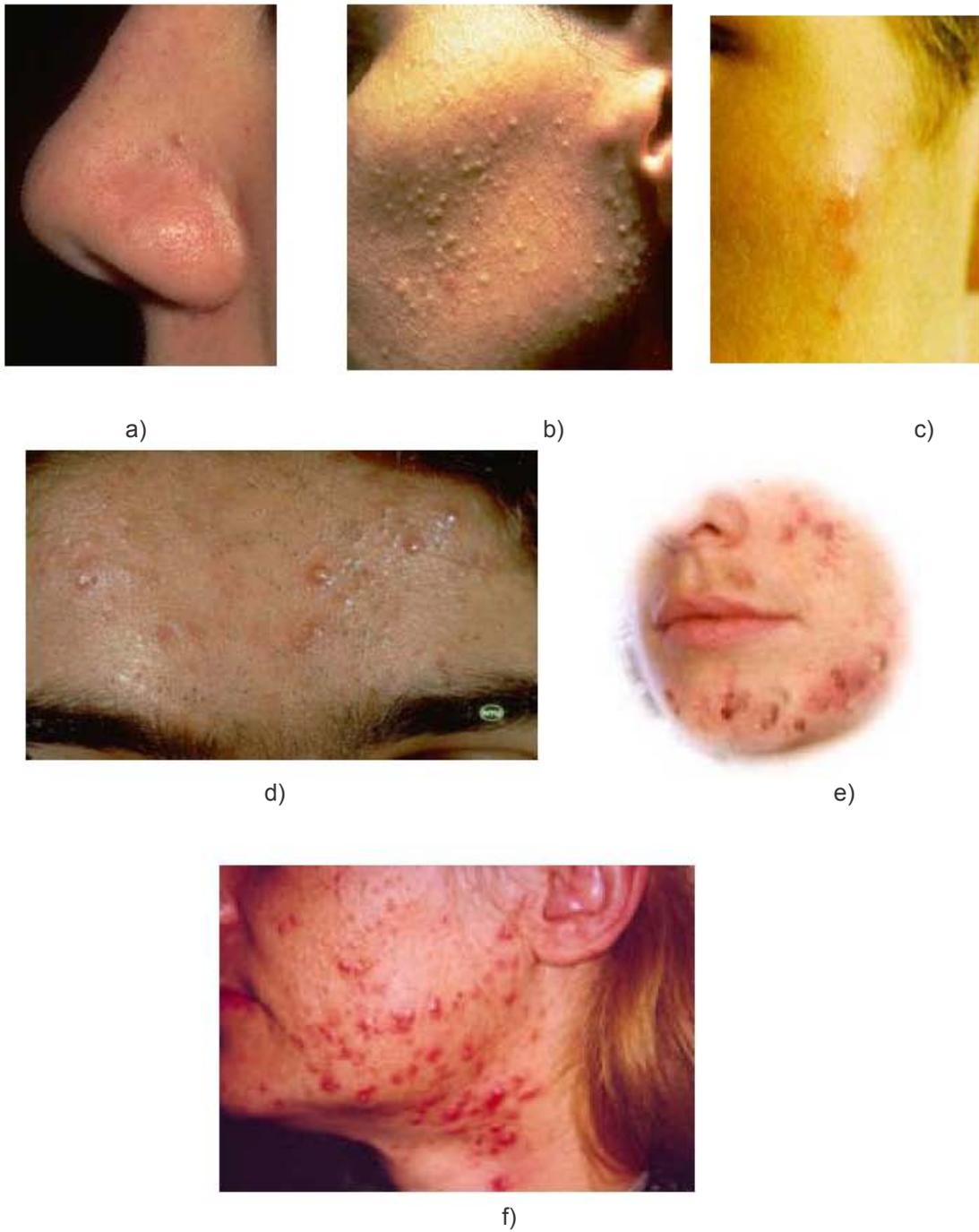


Figura 10. Lesiones de acné: a) Comedones; b) y c) Acné pápular; d) Acné pustular; e) Acné nodular; f) Acné quístico. (Fotografías tomadas por la Academia Americana de Dermatología, de la Biblioteca Nacional de Dermatología y el Instituto Sulzberger para la Educación Dermatológica).

Comedones: Esta lesión, que adopta una estructura semidura, queda adaptada a la zona del canal excretor sebáceo, taponándolo. Se visualizan como pápulas puntiformes de menos de 1 mm de diámetro cubiertas por una epidermis normal, sin ninguna reacción inflamatoria. En la imagen a) de la Figura 10 se muestran los comedones en la nariz de una paciente con acné.

Pápula: Una pápula es definida como una lesión sólida inflamatoria y no inflamatoria, ligeramente elevada (5 milímetros o menos) arriba de la superficie de la piel. Un grupo de pequeñas pápulas y microcomedones pueden aparecer casi invisibles pero se sienten al tacto, las imágenes b) y c) (Figura 10) muestran pápulas en la cara de pacientes con acné.

Pústula: Es una cúpula formada, lesión frágil conteniendo pus, que típicamente consiste de una mezcla de células superficiales muertas y bacterias. Una pústula que se forma sobre un folículo sebáceo usualmente tiene un cabello en el centro. Las pústulas del acné que sanan sin progresar para formar un quiste, generalmente no dejan cicatrices. En la imagen d) de la Figura 10 se muestran las pústulas en la frente de un paciente con acné.

Nódulo: Es un cúpula sólida formada o una lesión irregularmente formada. El nódulo es caracterizado por la inflamación que se extiende desde capas muy profundas de la piel y puede causar destrucción del tejido, lo cual puede resultar en cicatrices. Los nódulos pueden ser dolorosos. El acné nodular es una forma severa del acné y puede no responder a algunos tratamientos. En su evolución las formas nodulares son de lenta resolución y en el mejor de los casos van a regresar hacia formas papulosas en no menos de ocho a doce semanas. En la imagen e) de la Figura 10, se muestra la cara de un paciente con acné nodular.

Quistes: Un quiste es una lesión que contiene material semilíquido que consiste de células muertas epiteliales muertas, pus y bacterias, ésta lesión es más grande que una pústula, puede estar severamente inflamada, se extiende desde capas muy profundas

de la piel, pueden ser muy dolorosas y generalmente dejan cicatrices. Los quistes y nódulos generalmente aparecen juntos en una forma de acné severo llamado nodulocístico. Esta forma severa de acné es a menudo resistente a los tratamientos y generalmente deja cicatrices después de sanar. En la imagen f) (Figura 10) se observa en la cara y cuello de una paciente con acné, el acné quístico y nodular.⁴⁴

1.4.7 EL PREDOMINIO Y EL IMPACTO EMOCIONAL CAUSADO POR EL ACNÉ

Después de comenzar la pubertad, el acné persiste típicamente durante cinco a diez años, el 40% de víctimas buscan la intervención médica para los casos severos. Las personas de casi todas razas y etnias son susceptibles, y algunos estudios han demostrado que las variaciones étnicas y familiares tienen un grado alto de concordancia con las contribuciones genéticas. Significativamente, el acné está normalmente limitado, la resolución algunas veces espontánea se da en la adolescencia tardía o llegando a los veinte años de edad. El adolescente le da mucha importancia, porque afecta su aspecto físico y su imagen corporal pudiendo generar un gran impacto emocional, y causando una baja autoestima. Por este motivo es que no se debe restar importancia al cuadro y mucho menos retrasar el tratamiento.^{45, 46.}

El acné aparece cuando el individuo apenas comienza con la madurez. Para los afectados, las marcas pueden ser la causa de problemas psicológicos severos que incluyen la consternación crónica, la ansiedad, la vergüenza, la depresión, la falta de confianza, y la ansiedad social, así como el efecto en sus vidas, que incluyen una disminución de la función sexual, que puede ser tan comparablemente devastador como la artritis u otras enfermedades.⁴⁷

De hecho, la vista de incluso una sola, pequeña espinilla o lesión en la cara de un individuo puede ser perturbadora. El impacto social de la enfermedad es profundo, afectando adversamente relaciones personales y la vida social. Considerado el efecto negativo de este estímulo visual en los observadores, uno puede tener una dura

antipatía en nuestras especies con las irregularidades de la piel de esta clase: nosotros parecemos reaccionar reflexivamente con disgustos o incluso hastío a los comedones y las lesiones inflamatorias de acné.⁴⁸

De acuerdo a algunos estudios psicológicos, la piel pura parece también ser una señal de salud y vigor. Se han proporcionado evidencias acerca de que la textura de la piel facial es un factor que es muy juzgado, así la piel que es más homogénea (lisa) es más atractiva. Los autores sugieren que el estado de la piel es una señal de la selección sexual a la viabilidad del sistema inmunológico de un individuo, y esos desórdenes de la piel indican una inmunidad reducida con una incapacidad para defenderse contra el ataque por micro y macroparasitos.⁴⁹

En este contexto, un individuo con acné da la apariencia de albergar una infección o enfermedad que de hecho es (enfermedad, se refiere a una desviación de la condición considerada como normal o promedio para los miembros de una especie, y qué es perjudicial a un individuo afectado bajo condiciones que no son hostiles a la mayoría de individuos de esa especie,- ej., diarrea, náusea, fiebre, dolor, e inflamación, etc-. Una enfermedad puede causarse o puede ser el resultado del contacto por microorganismos y/o patógenos.).⁵⁰

El acné puede preverse como una pseudo infección, un producto de activación inmune que produce una desfiguración. La localización del acné es interesante: el acné se expresa típicamente en la cara y a veces el tronco del cuerpo, es decir en las áreas del cuerpo que tiene las glándulas sebáceas más grandes y más abundantes; la localización en los individuos que están en el período de la pubertad se encuentra a la mitad de la cara, con lesiones que aparecen en la zona "T", es decir en las regiones de la frente, nariz y barbilla. El por qué sólo algunas de las glándulas sebáceas del cuerpo sufren la hipertrofia necesaria, y el por qué la nariz parece estar más involucrada que la frente o mejillas, no es bien conocido, aunque es un hecho que la enzima 5 α -reductasa se expresa más abundantemente en los sebocitos faciales, y esa proliferación de los sebocitos en respuesta a los andrógenos, así como la producción de sebo, depende de

la localización del folículo, y en la existencia de folículos propensos al acné. Se especula que el acné se localiza en las áreas superiores del cuerpo, las de primera visibilidad.^{28, 51.}

Cuando se esta cerca de cumplir los años veinte, es cuando el acné disminuye ó desaparece en la mayoría de las personas. Sin embargo hay personas que tienen más de veinte años y siguen con dicho padecimiento, esto puede deberse a muchas circunstancias relacionadas con diversas patologías.⁵¹

1.4.8 EVOLUCIÓN Y PRONÓSTICO

Excepto en casos muy intensos el pronóstico es bueno, aunque la evolución es muy lenta. Si se exprimen las lesiones, las bacterias que causan los forúnculos se pueden extender y empeorar la condición así como dejar cicatrices.

El acné empeora durante el invierno y mejora en verano (aunque en invierno hay menos secreción de sebo), debido al efecto beneficioso del sol. Lo anterior se explica debido a que la bacteria *P. acnes* es un organismo que contiene porfirinas, que mueren por la exposición a longitudes de onda específicas de luz.

La fotosensibilidad de la bacteria produce una mejoría notable para la mayoría de los individuos que padecen acné después de la exposición a la luz del sol, y ha animado el desarrollo de luz visible artificial, como el tratamiento para ésta enfermedad. La luz visible es principalmente absorbida por el oxihemoglobina, las densidades de energía de irradiación altas se usan para tratar las lesiones vasculares. Las densidades de energía de irradiación bajas pueden, estimular la producción del procolágeno cutáneo, secundario a un calentamiento de tejidos perivasculares dérmicos que alteran el metabolismo celular local (el calentamiento puede resultar en la destrucción del folículo sebáceo o la glándula sebácea asociada con el folículo para así reducir el nivel de la producción de sebo), así los aparatos de luz visible artificial se utilizan más en la

práctica cosmética para mejorar la apariencia de las arrugas y es eficaz en el tratamiento de las cicatrices producidas por el acné.^{52, 53, 54.}

Es importante señalar que en este caso estamos hablando de estaciones del año particularmente en Suiza, país en el cual las temperaturas de invierno son desde -10 °C a 6 °C, y en el verano son de 6° a 20°C, por lo cual para un país como el nuestro, las temperaturas de verano para Suiza serían aproximadamente las temperaturas de invierno para México.

La dieta presenta escasa o nula influencia sobre el acné; no obstante algunas personas son sensibles a ciertos alimentos. Asimismo, el acné también puede aparecer con cada ciclo menstrual en las mujeres jóvenes y puede desaparecer o empeorar notablemente durante el embarazo.⁴⁸

El acné tiene el peor pronóstico cuando hay cicatrices inestéticas y en los casos que el aspecto de la cara produce trastornos psicológicos intensos. No obstante normalmente una vez que aparece el acné ligero, involuciona en dos o tres años desapareciendo casi por completo y recuperándose la piel satisfactoriamente.

Lavar las zonas afectadas varias veces al día resulta poco eficaz, aunque mejora el aspecto de los pacientes con cara grasienta, se puede utilizar cualquier jabón los jabones antibacterianos no resultan particularmente beneficiosos y si bien los jabones abrasivos pueden secar mejor las lesiones pueden también irritar la piel. Existen tratamientos farmacológicos que el médico indicará atendiendo a la gravedad del acné y a la edad del paciente.^{3, 55}

1.4.9 DIAGNOSTICOS DIFERENCIALES

No es fácil confundir un acné juvenil con otras afecciones dermatológicas, pero es evidente que hay algunas patologías que merecen ser señaladas. Lo más probable

es la confusión entre pústulas acneicas y lesiones de foliculitis faciales piógenas o candidiásicas.

Las foliculitis por gramnegativos se consideran una complicación del tratamiento prolongado con tetraciclinas; el paciente, en vez de seguir mejorando, hace un rebrote con numerosas lesiones de tipo pústula superficial y profunda e incluso con lesiones nodulares. También en algunos varones pueden prestarse a confusión las denominadas "pseudofoliculitis", es decir, la inflamación originada por la retención de un pelo de la barba que no consigue emerger a la superficie, dando lugar a una reacción inflamatoria perifolicular.

Es difícil confundir un acné con una rosácea, no obstante pueden existir formas incipientes de rosácea sobre lesiones persistentes de un acné de largo tiempo. Por otro lado, el último período de acné rosácea presenta pápulas y pústulas, pero no hay comedones. No hay que olvidar las sífilides acneiformes ni ciertas formas de compromiso facial del lupus eritematoso sistémico.

Hay que recordar también la erupción acneiforme que origina en ocasiones el síndrome de Behçet, con localización habitual en la espalda. No hay lesiones de tipo comedón ni nódulos; básicamente este síndrome es un gran brote de lesiones aftosas en mucosas oral y genital con alteraciones sistémicas. En estos pacientes deberá efectuarse un estudio inmunológico, por probable neutropenia cíclica.

1.5 TRATAMIENTO GENERAL

Si bien en el tratamiento del acné hay que utilizar medicación tópica y sistémica, no hay que dejar de lado la faceta psicossomática de esta patología. El dermatólogo tiene que dedicar mucho tiempo a la primera consulta de un joven con acné para poder lograr que el paciente se sienta cómodo y confíe en el profesional.

El factor psicológico es clave en el joven acnéico. Es sabido que el acné empeora en etapas de ansiedad o depresión y se va generando un círculo vicioso, pues al empeorar el acné aumenta su alteración emocional y viceversa.

El médico debe saber distinguir entre un adolescente con acné que presenta además un cuadro de ansiedad y un paciente con un cuadro psiquiátrico importante que además tiene acné: este último tiene que ser derivado inicialmente a Psiquiatría.

Para lograr éxito en el tratamiento del joven acnéico ansioso debe proponérsele apoyo psicoterapéutico a cargo de un psicólogo, debido a que la palabra psiquiatra lo aterroriza. Habitualmente en pacientes con una pequeña alteración de angustia (exámenes, familia, competencia deportiva) puede ser suficiente con una larga charla optimista.

La limpieza minuciosa de las zonas acnéicas es imprescindible para eliminar la polución y lograr una mayor eficacia de los productos locales. Es necesario explicarle al detalle cómo debe lavarse correctamente el rostro, pecho y espalda ya que muchos adolescentes no saben hacerlo bien.

Hoy día, en una sociedad con principios estéticos distorsionados y excluyentes, es una gran satisfacción para el dermatólogo liberar al adolescente, al menos de un complejo, mientras se van develando en la mentalidad del joven los verdaderos valores de la vida.⁵⁴

En la tabla 1 se muestran diversos fármacos que son utilizados como tratamiento para el acné.

Tabla 1. Fármacos generalmente utilizados para el tratamiento de acné.^{9, 10.}

	Fármacos	Descripción	Observaciones
Antibióticos	Tetraciclinas (Doxiciclina y minociclina)	Poseen menos efectos indeseables y vida media más prolongada.	Ya se han reportado casos de resistencia del <i>P.acnes</i> ; la minociclina es la que genera menor resistencia bacteriana. ²⁹
	Macrolidos (Roxitromicina)	Supera en efectividad a eritromicina y claritromicina. ²⁹	Generalmente es bien tolerada.
	Sulfonamidas (Trimetroprima y sulfametoxazol)	Se consideran actualmente antibióticos de tercera línea y se reservan para acné III y IV.	El objetivo de este tratamiento es la profilaxis de la piodermitis estafilocócica.
	Clindamicina y Eritromicina (uso tópico)	Produce una disminución de los ácidos grasos libres en la superficie cutánea y de los microorganismos en los comedones.	Los efectos secundarios locales son mínimos y la sensibilización excepcional.
Hormonas	Anticonceptivos de acción antiandrogénica (Acetato de ciproterona y etinil estradiol)	Serían de elección en adolescentes con signos de androgenización (hirsutismo y/o alopecia, seborrea y, por supuesto, acné).	La eficacia de estos anticonceptivos en el tratamiento del acné es muy similar a la de los bifásicos. ²⁰
	Anticonceptivos monofásicos de última generación (gestodeno)	Presentan una capacidad antiandrogénica superior a los convencionales con desogestrel. ⁵⁶	Han demostrado ser eficaces, administrados oralmente. ³⁸
Retinoides	Ácido retinoico 13 CIS o isotretinoína (Preferentemente de uso tópico)	De elección para acné severos. Tienen la capacidad de aumentar la mitosis de las células epidérmicas y su recambio, produciendo una capa de células córneas menos cohesiva que se descama con mayor facilidad (acción queratolítica).	Posee muchos efectos indeseables: es hepatotóxico, teratogénico, aumento de la diátesis hemorrágica.
	Adapaleno	Se ha demostrado que produce menos irritación que la tretinoína. ⁵⁷	De uso tópico (en geles)
Antihistamínicos	Terfenadina y loratadina	Se utilizan en casos de eczema sobreañadido y prurito.	A dosis habituales son de elección, ya que no tienen efecto sedante.
Corticoides	Prednisona	Tienen acción antiinflamatoria, inmunodepresora y frenadora de andrógenos adrenales. Están indicados en las formas nódulo-quistísticas al principio del tratamiento.	La prolongación del tratamiento puede dar lugar al acné esferoidal.
Queratolíticos de uso tópico	Azufre	Asociado al ácido salicílico y/o resorcina, se le han atribuido propiedades antisépticas, antiparasitarias y antiseborreicas.	Su uso está en declive por su capacidad irritativa, olor y color desagradables.
	Ácido salicílico	Presenta un importante efecto queratolítico. Tiene acción antiinflamatoria antiséptica, antifúngica y bactericida.	Casi siempre asociado a soluciones de resorcina y/o azufre, favorece la descamación. ⁴⁶
	Peróxido de benzóilo	Por acción de la cisteína libera oxígeno creando un medio aeróbico desfavorable para la proliferación del <i>P. acnes</i> (efecto bacteriostático).	Se utiliza en geles, lociones, cremas e incluso jabones. Su acción comedolítica aún no se ha confirmado. ³⁴

1.6 SISTEMAS NANOPARTICULADOS

En la actualidad uno de los principales objetivos del farmacéutico es el diseño de nuevos sistemas o dispositivos de liberación de fármacos que controlen la liberación del agente farmacológico en el sitio de acción a una velocidad terapéuticamente óptima. Debido a su estructura multifuncional, estabilidad y posible escalamiento, las nanopartículas aparecen como una alternativa muy interesante para la vectorización y liberación controlada de activos cosméticos.⁵⁸

1.6.1 NANOPARTÍCULAS

Las nanopartículas son sistemas sólidos coloidales, las cuales debido a su talla submicrónica (10-1000nm) son generalmente estables en suspensión. El término nanopartícula es usado como el nombre colectivo para describir tanto a las nanoesferas como a las nanocápsulas. La diferencia entre estas dos formas está ligada a la morfología y arquitectura de la entidad.

1.6.1.1 Clasificación

- **Nanoesferas:** Las nanoesferas están formadas por una densa matriz polimérica donde el activo puede ser dispersado y/o adsorbido en la superficie de la partícula, como se muestra en la figura 11.
- **Nanocápsulas:** Las nanocápsulas están compuestas de un núcleo aceitoso envuelto por una membrana polimérica, de tal manera que los activos pueden ser disueltos en un aceite constituyendo el corazón lípofílico de la nanocápsula o bien, el mismo aceite puede ser la sustancia con actividad, lo anterior se esquematiza en la figura 11.⁵⁹

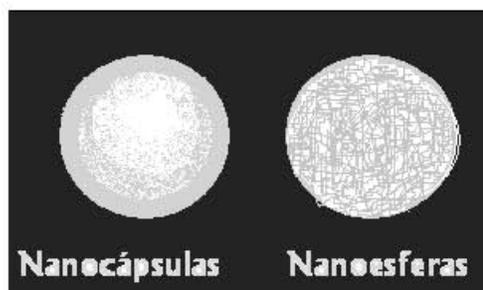


Figura 11. Representación esquemática de las nanopartículas.

Los materiales usados para preparar nanopartículas pueden ser clasificados ampliamente en dos grupos: polímeros sintéticos y compuestos naturales tales como proteínas y lípidos. Diferentes métodos han sido propuestos para preparar nanopartículas de compuestos naturales, los cuales involucran el uso de calor o sonicación, altos volúmenes de solventes orgánicos o aceites y agentes de entrecruzamiento tóxicos. Sin embargo, incertidumbre de la fuente y pureza de la macromolécula, así como el potencial de antigenicidad, restringen el uso de éste tipo de nanopartículas por vía dérmica. Similares inconvenientes han sido reportados para nanopartículas poliméricas preparadas por polimerización de monómeros dispersados. No sólo la mayoría de las nanopartículas formadas de éstos monómeros son no biodegradables, sino que los subproductos producidos después de la reacción pueden ser dérmicamente no compatibles, además de dejar residuos más o menos tóxicos tales como monómeros, oligómeros e iniciadores.

Además, son probables las reacciones cruzadas con el activo cosmético o la degradación de los componentes, cuando se recurre a la radiación para inducir la polimerización. Considerando las limitaciones de las nanopartículas obtenidas de moléculas naturales y por polimerización, las técnicas utilizando polímeros preformados son preferidas, en particular si éstos son biodegradables.⁵⁸

1.6.2 MÉTODOS DE PREPARACIÓN DE NANOPARTÍCULAS

Los métodos a partir de polímeros preformados pueden ser clasificados en las siguientes categorías:

1.6.2.1 *Emulsificación-evaporación*

En esta técnica el polímero y el activo son disueltos en un solvente orgánico volátil inmiscible al agua, el cual es emulsificado en una solución acuosa que contiene un estabilizante formando una emulsión aceite en agua (o/w). Esta emulsión es entonces expuesta a una fuente de alta energía tal como un dispositivo de ultrasonido o se hace pasar a través de homogenizadores, molinos coloidales o microfluidizadores, con objeto de reducir el tamaño del glóbulo. Finalmente por una remoción del solvente orgánico a temperatura ambiente o con calor por agitación y/o con rotavapor a presión reducida, se obtiene una dispersión fina de nanopartículas.

Esta técnica, fue utilizada por primera vez para la preparación de nanoesferas. Se fundamenta en el procedimiento propuesto por Vanderhoff en 1979. Este método fue adoptado posteriormente para la producción de nanoesferas de diferentes polímeros incluidos PLGA, PCL, PHB (poli-β- hidroxibutarato), copolímeros del ácido acrílico y derivados de celulosa. Los solventes utilizados comúnmente son cloroformo y cloruro de metileno; algunos agentes estabilizantes que se han utilizado en este método incluyen polisorbatos, poloxameros, dodecil sulfato de sodio y polivinilalcohol. Este método ha permitido el encapsulamiento con alta eficiencia de sustancias tales como testosterona, indometacina, ciclosporina A y acetato de triamcinolona. Recientemente se ha propuesto el encapsulamiento de albúmina bovina formando una doble emulsión agua/aceite/agua (w/o/w) alcanzando eficiencias de encapsulamiento hasta del 70%.⁵⁹

60

1.6.2.2 "Salting out"

Esta técnica consiste en disolver el polímero y el principio activo en un solvente semipolar miscible en agua (acetona). Esta solución se dispersa mediante agitación magnética en un gel que contiene un electrolito, el cual actúa como agente de "salting-out" (acetato o cloruro de magnesio), y un agente estabilizante (alcohol polivinílico). Una vez formada la emulsión se adiciona una cantidad suficiente de agua para que el solvente difunda dentro de la fase acuosa, esto promueve la formación de las nanopartículas. El solvente y el agente "salting-out" se eliminan por medio de filtración tangencial o ultracentrifugación.

1.6.2.3 Desplazamiento de solvente

Esta técnica involucra el uso de un solvente orgánico que es completamente miscible con la fase acuosa, típicamente acetona aunque también puede emplearse etanol o metanol. Este método permite la obtención de nanopartículas sin necesidad de formar previamente una emulsión. En este caso la precipitación del polímero es inducida directamente en un medio acuoso (conteniendo o no un surfactante) por la adición de la fase acuosa a la solución del polímero con agitación magnética. La aplicación de este método se limita a fármacos que son muy solubles en solventes polares, pero ligeramente solubles en agua para evitar pérdida de fármaco durante la difusión del solvente.

1.6.2.4 Emulsificación-Difusión

Esta última técnica es considerada como una modificación del proceso de "salting out", pero suprimiendo el uso de sales y por tanto evitando prolongadas etapas de purificación. Involucra el uso de solventes parcialmente miscibles con agua, los

cuales son previamente saturados en agua con el objeto de asegurar el equilibrio termodinámico entre ambos líquidos. El polímero es disuelto en el solvente (saturado con agua) y esta fase orgánica se emulsifica con agitación vigorosa en una solución acuosa que contiene el estabilizante. La subsiguiente adición de agua al sistema causa que el solvente difunda hacia la fase externa, dando como resultado la formación de nanopartículas.

1.6.2.5 *Proceso de emulsificación–difusión por desplazamiento de solvente.*

En esta técnica el polímero y el activo son disueltos en un solvente orgánico parcialmente miscible al agua, el cual es emulsificado con agitación vigorosa, en una solución acuosa que contiene un estabilizante formando una emulsión aceite en agua (o/w). Este procedimiento de emulsificación es seguido por una remoción del solvente orgánico con rotavapor a presión reducida, produciendo una dispersión fina de partículas poliméricas con un tamaño promedio menor a 5 micras.

Los estabilizantes juegan un rol importante en la preparación y estabilidad de las dispersiones poliméricas coloidales. Éstos facilitan la formación de la emulsión y prevén la aglomeración y coalescencia de las partículas poliméricas dispersadas durante la evaporación del solvente y el almacenamiento.

El mecanismo de formación de nanopartículas es atribuido a una inherente inestabilidad química del sistema. Como el solvente es parcialmente miscible en agua y las fases interna y externa son saturadas mutuamente, la difusión del solvente desde la fase interna a la fase externa durante la destilación causa la aparición de regiones de supersaturación local del polímero cerca de la interfase y las nanopartículas son formadas debido a la transformación de la fase y la agregación de éstas que ocurre en esas regiones.⁶¹

Una representación esquemática de este mecanismo de inestabilidad química es mostrada en la figura 12.

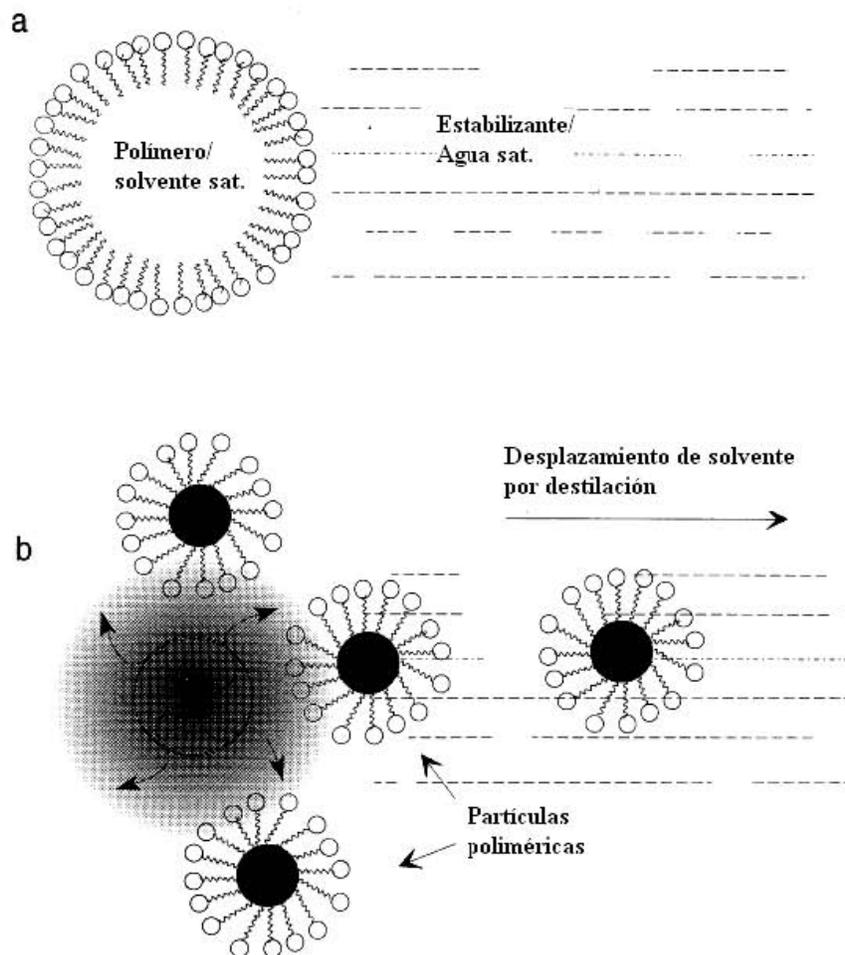


Figura 12. Descripción esquemática del mecanismo propuesto para la formación de nanopartículas por el método de emulsificación-difusión basado en el desplazamiento de solvente por destilación. a) paso de emulsificación; b) paso de evaporación.⁶¹

Ésta técnica tiene la ventaja de obtener una concentración alta de partículas poliméricas, ya que el mecanismo de formación de partículas coloidales por éste método es debido a la difusión sola, basada en el desplazamiento de solventes parcialmente solubles con agua de la fase interna a la fase externa, por destilación y/o

vacío directo de vapor, de la emulsión aceite/agua.⁶¹

La figura 13 muestra la preparación de nanopartículas por ésta técnica.

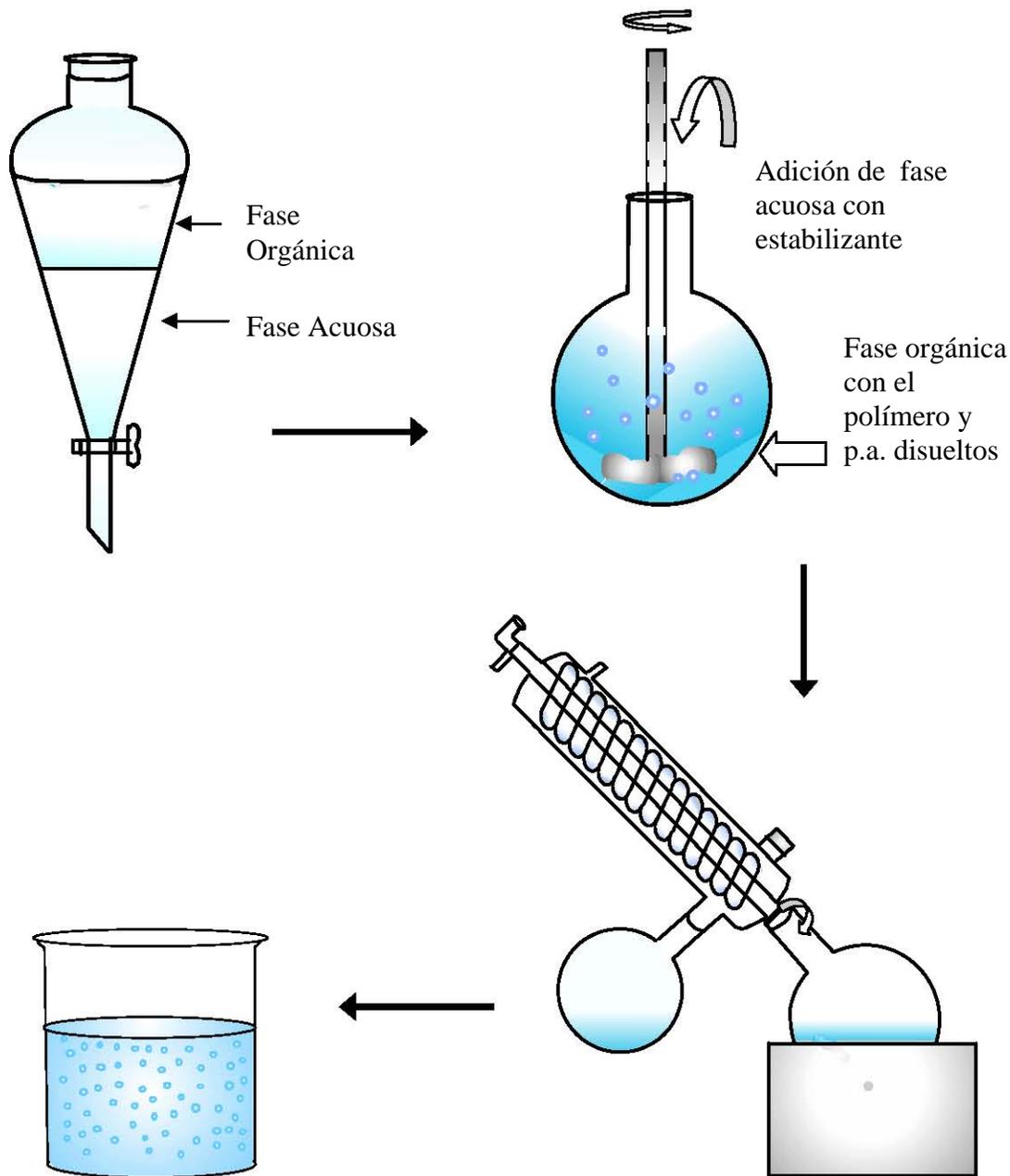


Figura 13. Representación esquemática de la preparación de nanopartículas por el proceso de emulsificación-difusión involucrando el desplazamiento directo de solventes parcialmente miscibles con agua, por destilación.

1.6.3 CARACTERIZACIÓN DE NANOPARTÍCULAS

1.6.3.1 *Caracterización fisicoquímica*

1.6.3.1.1 *Tamaño de partícula:* Se puede realizar por diferentes técnicas como las que se mencionan a continuación.

- Microscopía electrónica de transmisión (TEM)
- Microscopía electrónica de barrido (SEM)
- Espectroscopia de correlación fotónica (PCS)

1.6.3.1.2 *Peso molecular:* Se puede realizar por la técnica de filtración en gel (cromatografía de exclusión molecular).

1.6.3.1.3 *Densidad:* Se realiza mediante la centrifugación por gradiente de densidad

1.6.3.1.4 *Carga superficial:* Se puede realizar mediante dos técnicas:

- Determinación del potencial zeta
- Electroforesis

1.6.3.1.5 *Hidrofobicidad:* Se puede realizar mediante:

- Medida de ángulo de contacto
- Cromatografía de interacción hidrofóbica

1.6.3.2 *Análisis de la cantidad de fármaco encapsulado*

El principal objetivo de la encapsulación de fármacos es la vectorización de éstos hacia un órgano o tejido específico, con esto se incrementa su biodisponibilidad;

además se disminuyen los efectos adversos que pudieran provocar, por ello es importante la carga útil del fármaco en las nanopartículas.

1.6.3.3 Cinética de liberación y permeación del fármaco

Una característica física de los sistemas dispersos (liposomas, micropartículas, nanopartículas, y emulsiones submicrónicas) es el perfil de liberación *in vitro* del fármaco que contienen *in vitro* que puede ser diferente a la liberación *in vivo*, sin embargo nos ayudan a diseñar nuevas formulaciones con las propiedades que sean requeridas, y puede ocurrir por los siguientes mecanismos:

- Deserción del activo adherido a la superficie de la partícula
- Difusión a través de la matriz de la nanopartícula
- Difusión a través de la pared polimérica (en el caso de las nanocápsulas)
- Erosión de la matriz de la nanopartícula
- Combinación de los procesos de erosión y difusión⁶⁰

1.6.4 RELACIÓN DE LAS NANOPARTÍCULAS CON LA PIEL

Al igual que las micropartículas y los liposomas, las nanopartículas pueden ser utilizadas como sistemas de liberación dérmicos o transdérmicos. Estos sistemas pueden modular la penetración de activos cosméticos a través del estrato córneo y controlar la liberación a diferentes sitios de la piel y sus anexos, actuando como microreservorios. Sin embargo, las nanopartículas presentan varias ventajas potenciales en relación a otros sistemas. Comparadas con los liposomas, las nanopartículas son menos sensibles a la degradación dérmica (y pronta liberación del activo), debido a su constitución rígida y además de que su patrón de penetración y localización en la piel puede ser determinado. Debido a su talla submicrónica, las

nanopartículas son capaces de penetrar a regiones más profundas tanto del estrato córneo como de sus apéndices. En éste sentido, varios trabajos han mostrado que la penetrabilidad de micro y nanopartículas depende de su talla. Micropartículas con diámetro mayor a $10\ \mu\text{m}$ permanecen en la superficie de la piel, en tanto que aquellas de diámetro entre $3\text{-}10\ \mu\text{m}$ son capaces de penetrar los folículos pilosos, como se muestra en la figura 14.

Diámetro de las partículas:

$>10\ \mu\text{m}$: Permanecen en la superficie de la piel

$3\text{-}10\ \mu\text{m}$: Penetran los folículos pilosos

$<3\ \mu\text{m}$: Distribuidas dentro de los folículos pilosos y en los intersticios dérmicos.⁵⁸

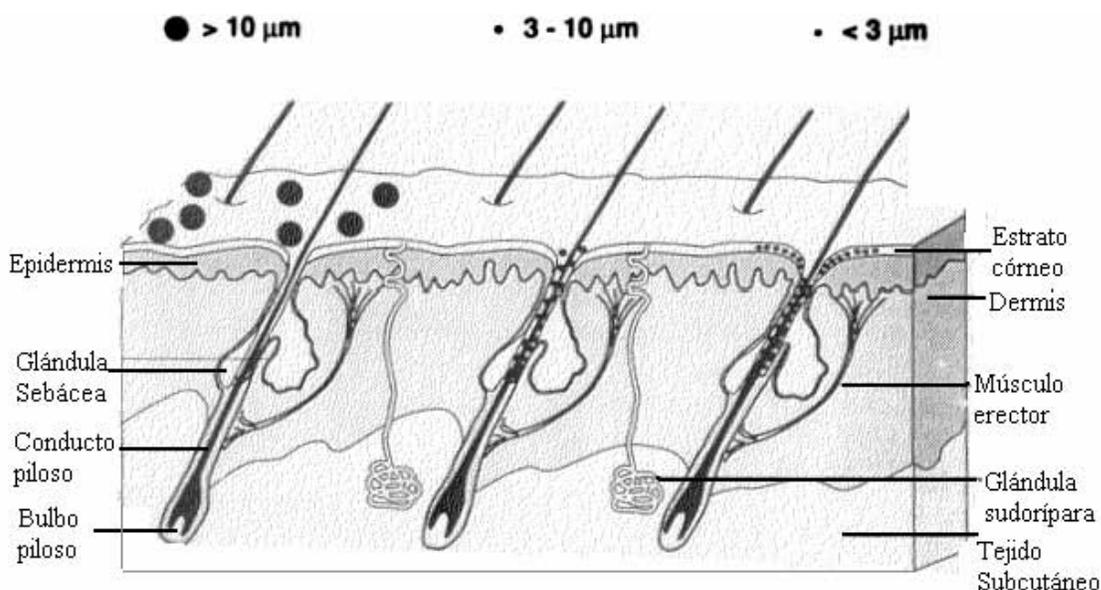


Figura 14. Representación esquemática de la penetración de partículas de diferente tamaño sobre la piel.⁵⁸

1.7 PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DEL POLÍMERO EUDRAGIT[®] E 100

El uso de diferentes tipos de Eudragits[®] para la liberación controlada de fármacos ha sido bien conocido por varios años. Desde que los Eudragits[®] puede actuar como el polielectrolitos, ellos pueden ser usados para muchos propósitos tales como la formulación de fármacos entéricas, o a partir matrices poliméricas para la liberación controlada de fármacos, regulado por el porcentaje de carga y los grupos no ionizados (el éter) en la estructura molecular de los copolímeros del metacrilato de metil etil. Algunos de ellos pueden ser considerados como policationes (tipos de Eudragit[®] E, RL, RS, NE) y otros como los polianiones (tipos Eudragit[®] L, S). Los primeros tiene grupos cargados positivamente: el Eudragit[®] E tiene grupos de dimetilamino, los Eudragits[®] RL, RS y NE tienen grupos amino cuaternarios. Los segundos tienen grupos cargados negativamente: grupos carboxilo en Eudragit[®] tipo L y S. El número de grupos amino (cargados positivamente) decrementa cuando se incrementa el pH del medio. En particular el Eudragit[®] E 100, es soluble a pHs por debajo de 5.0 y permeable por encima de éste valor, debido a la hidratación de los grupos dimetilamino protonados.⁶²

Es un copolímero de carácter catiónico, basado en ésteres neutros de metacrilato de dimetilaminoetil y ácido metacrílico.

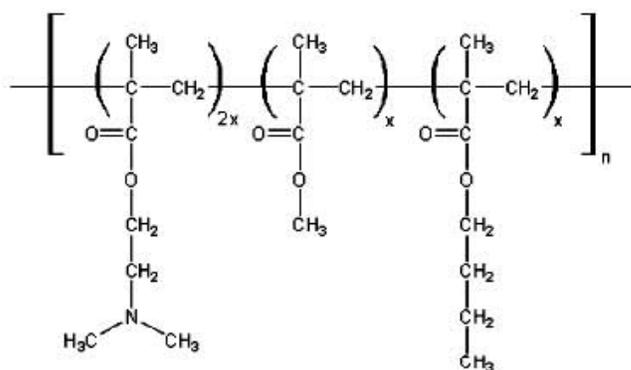


Figura 15. Estructura molecular del polímero Eudragit[®] E 100.⁶²

- Gránulos amarillos, con característico olor a aminas.
- Pureza 98% en sustancia seca.
- PM- 150 000
- Soluble en fluido gástrico
- Soluble en soluciones de Buffer de 2 a 5 y arriba de 5.0 de pH (forma sales con ácidos), a pHs neutros se hace permeable al agua y en soluciones buffer. Es soluble en alcohol isopropílico, acetona, alcohol etílico, cloruro de metileno y otros solventes orgánicos, así como metil etil cetona (15min). La siguiente tabla proporciona detalles de otros solventes en los cuales se disuelve Eudragit® E 100, con sus respectivos tiempos de disolución.

Tabla 2. Solubilidad del polímero Eudragit® E 100

(15g en 100 g de solvente a 20°C con un agitador magnético)

Solvente	Tiempo de disolución	Viscosidad mPa.s/20°C
Alcohol metílico	30 min	5-10
Alcohol etílico	70 min	10- 20
Alcohol etílico/Agua 6:4	15min	-----
Alcohol isopropílico	3h	10- 20
Alcohol n-butílico	3h	20- 30
Propilenglicol	1 h	20- 30
Etilenglicol de éter monobutílico	2h	40- 50
Acetona	15 min	2-5
Metil etil cetona	15 min	<2
Ciclohexanona	1.5 h	20- 30
Cloruro de metileno	10min	20- 30
Cloroformo	10min	20- 30
Tetracloruro de carbono	1 h	50- 75
Tricloretileno	10 min	5- 10
Tetracloroetileno	45 min	150-200
Acetato de etilo	15min	5- 10
Acetato de n-Butilo	40min	5- 10
Acetato de Propilenglicol	1 h	10- 20
Tolueno	20min	5- 10

- Posibles aplicaciones: recubrimiento de comprimidos, cápsulas, gránulos, píldoras.
- Índice de acidez: 180mg de KOH/g de sustancia seca.
- Índice de refracción : 1.380-1.385
- P. de transición vítrea: 46 °C.⁶³

1.8 PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DEL TRICLOSAN

- **Sinónimo:** Cloxifenol
- **Nombre propio:** Adasept; Gamophen; Irgasan DP 300; Ster Zac; Tersaseptico; Zalclense, Irgasan CH 3635
- **Nombre Químico:** 5-Cloro-2-(2,4-diclorofenoxi) fenol ó 2, 4, 4'-tricloro-2'-hidroxifenil eter.
- **Fórmula:** C₁₂ H₇ Cl₃ O₂: C 49.78%, H 2.44%, Cl 36.73%, O 11.05%.
-

Estructura química

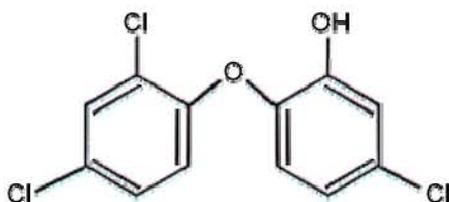


Figura 16. Estructura química del triclosán. Es parecido al hexaclorofenol en cuanto a su estructura.

- **Actividad cuando es encapsulado junto con algunos fármacos:** plastificante⁶⁴
- **Actividad Farmacológica:** Agente antimicrobiano no catiónico
- **Peso Molecular:** 289.53
- **Apariencia:** Poder cristalino blanco o suaves aglomerados

- **Solubilidad:** en NaOH 1M, soluble en soluciones alcalinas; soluble en solventes orgánicos, prácticamente insoluble en agua. Soluble en muchos surfactantes. Solubilidad en etanol 1gm/1ml.
- **Solución:** clara a turbia
- **Espectro Ultravioleta:** Con un solvente como lo es el etanol se produce un pico a 283nm con un coeficiente de extinción de $A=1,1 = 179$ b; con etanol alcalino se produce un pico a 295nm.
- **Espectro de Masas:** Picos principales a m/z 288, 290, 218, 146, 114, 63, 51, 148.
- **Punto de Fusión:** 55 °C a 57 °C
- **Presión de Vapor:** (20°C) 4×10^{-6} mm Hg
- **Pka:** 7.9
- **Cuantificación.** La cuantificación puede hacerse por cromatografía de gases. En plasma u orina la sensibilidad es de 2ng /ml.
- Compatibilidad con la piel⁶⁵
- **Estabilidad:** Estable a la hidrólisis
- **Usos:** Altamente un efectivo antimicrobiano de amplio espectro. Poco eficaz contra P. auruginosa y hongos. Este es usado en pastas dentales y soluciones para lavados bucales, detergentes. Usado como desinfectante, bacteriostático y como conservador para preparaciones cosméticas. Es usado en concentraciones de 0.05 a 2%.

Mecanismo de Acción: El triclosán es un activo contra las bacterias Gram negativas (su eficacia contra bacterias Gram negativas y levaduras puede incrementarse al unirse con EDTA, ya que aumenta la permeabilidad de la membrana externa) y Gram positivas, interfiriendo con la enzima necesaria para la síntesis de ácidos grasos. Con ello el triclosán induce a una alteración de la permeabilidad de la membrana citoplasmática, lo que produce una progresiva salida de constituyentes intracelulares y si aumenta la concentración se provoca la lisis y la destrucción microbiana.⁶⁶

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GENERAL

- Estudiar y comparar la absorción percutánea *in vitro* de triclosán, formulado en nanopartículas poliméricas y en dos formulaciones comerciales, con el fin de proponer un nuevo sistema de aplicación tópica para el tratamiento de esta afección.

2.2 OBJETIVOS PARTICULARES

- Preparar nanoesferas mediante el proceso de emulsificación–difusión por desplazamiento de solvente, empleando como polímero Eudragit® E 100.
- Caracterizar las nanoesferas por su forma, tamaño y eficiencia de encapsulamiento.
- Analizar las variables que influyen en la producción de nanopartículas por el proceso de emulsificación–difusión por desplazamiento de solvente.
- Evaluar la cinética de permeación *in vitro* del triclosán en el sistema nanoparticulado y en las dos formulaciones comerciales (crema y solución).

3. PARTE EXPERIMENTAL

3.1 MATERIAL Y REACTIVOS

- Agua destilada (Obtenida del equipo Milli-Q, Millipore)
- Fosfato monobásico de potasio (Fermont, Productos Químicos Monterrey, S.A. México)
- Hidróxido de sodio en hojuelas grado reactivo (J. T. Baker, México)
- Ácido clorhídrico (grado reactivo, J.T. Baker, México)
- Triclosan (Multiquim, México)
- Brij 58 (Canamex, S.A. México)
- Polímero Eudragit[®] E100 grado USP (Helm)
- Alcohol polivinílico, Mowiol[®] 4-88 (Glomarza, México).
- Etanol (grado analítico Fermont, Productos Químicos Monterrey, México)
- Metanol (grado analítico Fermont, Productos Químicos Monterrey, México)
- Metil etil cetona (grado analítico Fermont, Productos Químicos Monterrey, México)

3.2 MATERIAL BIOLÓGICO

- Piel de oreja de cerdo, obtenida directamente del rastro San Lorenzo de Cuautitlan Izcalli, Edo. de Méx., después de que los animales son sacrificados y antes de ser tratados con agua caliente o vapor.

3.3 APARATOS Y EQUIPOS

- Filtros (Millex[®]- GV de 2.5cm de diámetro y poro de 0.22 μ m, 0.1 μ m, y 0.45 μ m (Millipore[®], USA)
- Termómetro digital
- Balanza analítica (BBC 32, Boeco, Alemania)
- Parrilla eléctrica con agitación (Cimarec[®], Thermoline, USA)
- Agitador magnético Magnestir[®] (Lab-Line instruments, USA)
- Agitador de velocidad variable (RZR-1; Caframo[®], Alemania)
- Rotavapor (Laborota[®] 4000, Heidolph, Alemania)
- Liofilizadora de mesa (Labconco[®], Estados Unidos de América)
- Ultracentrífuga Óptima[®] LE-80K (Beckman, USA)
- Ultrasonificador Branson[®] (3200, USA)
- Nanosizer[®] Coulter N4 Plus (Beckman, USA)
- Celdas de difusión tipo Franz (Taller de Soplado de Vidrio, FES-Cuautitlán)
- Recirculador de líquidos con termostato (termostato VWR Scientific, USA)
- Vortex (Mixer, modelo M 16715, USA)
- Vernier (Digitix[®] Fowler y NSK, Japón)
- Espectrofotómetro UV- Vis (Varian, Cary IE95031003, Australia)
- Dermatoma (Zimmer, Mod. 901, USA)
- pH metro (Modelo 430)
- Micrómetro electrónico digital (Digitrix II, Japón)
- Calorímetro diferencial de barrido DSC (Q 10, TA Instruments, USA)
- Microscopio electrónico de barrido (JSM-25SII; JEOL, Japón)
- Campana para recubrimiento con oro (JFC-1100; JEOL, Japón)
- Material de cristalería

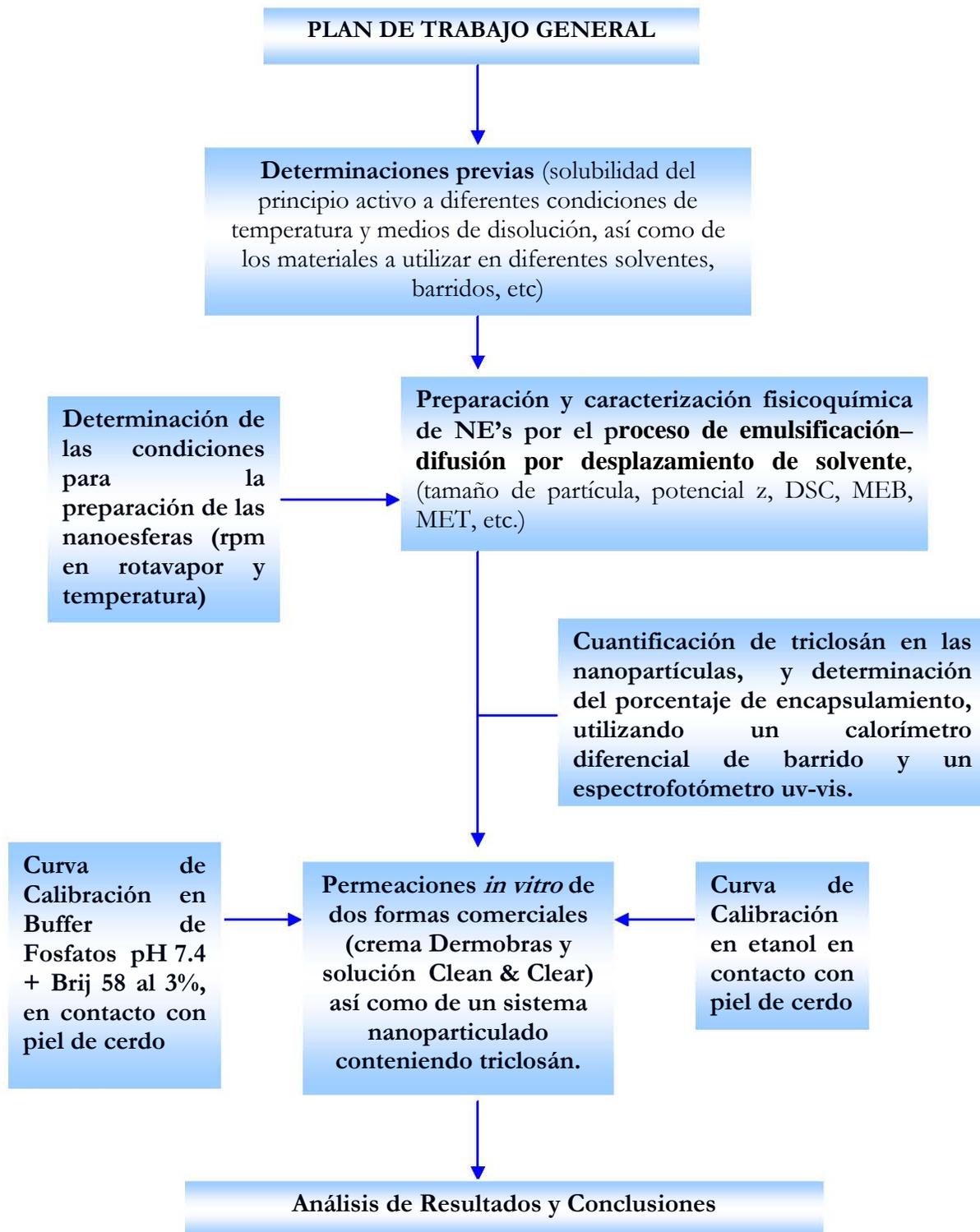
3.4 FORMULACIONES COMERCIALES UTILIZADAS EN EL PRESENTE ESTUDIO

Las siguientes formulaciones fueron utilizadas para realizar permeaciones *in vitro* y así poder estudiarlas y compararlas con el sistema nanoparticulado propuesto en este proyecto.

Tabla 3. Contenido de las formulaciones comerciales

Nombre del producto	Presentación	Ingredientes (100g)
Dermobras®	Crema Representaciones Méx-América	Oxido de Aluminio (25g), Triclosan (1g) Glicerina, Microesferas de polietileno, Agua desionizada, Propilenglicol, Estearat-20, Extracto de bacopa monniera, Laurilsulfato de sodio, Miristato de isopropilo, Sorbitol al 70%, Cera, Emulsificante, Cera blanca de Abeja y cloruro de benzalconio.
Clean & Clear®	Loción Johnson&Johnson	Triclosán (2.5mg/g), Agua, Lauril éter sulfato de sodio, Lauril poliglucosa, condensado de ácido graso y Colágeno, Monoetanolamida de coco, Cocoato de glicerilo, Polietilenglicol, Cloruro de sodio, Fragancia, EDTA, Quaternium-15, Ácido cítrico y Colorantes (CI 17200 y 16035).

3.5 METODOLOGÍA



3.5.1 DETERMINACIONES PREVIAS

3.5.1.1 *Espectros de Absorción*

Se determinaron las longitudes de onda (λ) de máxima absorción para el triclosán en etanol solo y con eudragit E100, en buffer de fosfatos pH 7.4 con Brij[®] 58 al 3% y 1 % p/v. Los barridos se hicieron de 200 a 400nm.

3.5.1.2 *Determinación de la solubilidad de triclosán*

Se saturaron con triclosán sistemas de 6 ml de buffer de fosfatos pH 7.4 (Preparado de acuerdo a la Farmacopea de los Estados Unidos USP 2004), buffer de fosfatos pH 7.4 con Brij[®] 58 al 1% y buffer de fosfatos pH 7.4 con Brij[®] 58 al 3%. La prueba de solubilidad se realizó por triplicado para cada sistema y para cada temperatura, dando un total de 18 sistemas. Los tres diferentes medios de disolución por triplicado se mantuvieron a 37°C en baño María y los otros nueve viales se mantuvieron a temperatura ambiente, todos los sistemas se dejaron en agitación constante por 24 horas. Las suspensiones se centrifugaron a 6000 rpm por 20min. Se tomó el sobrenadante para filtrarlo con membrana de 0.22 μ m y con éste se hicieron las diluciones necesarias, para leerlas a la longitud de onda máxima para el triclosán, utilizando un espectrofotómetro UV-visible. La concentración se obtuvo con base a estándares para cada sistema de disolución.

3.5.1.3 *Preparación de curvas de calibración en contacto con piel para la cuantificación de triclosán*

Se prepararon dos curvas de calibración por triplicado para el triclosán en presencia de pequeñas porciones de piel utilizando como medios de disolución;

solución buffer de fosfatos a pH 7.4 con Brij[®] 58 al 3% y para la otra curva etanol. Esto se llevó a cabo de la siguiente manera:

Las porciones de piel de oreja de cerdo obtenidas se colocaron en solución de buffer de fosfatos pH 7.4 con Brij[®] 58 durante 1 hora, en baño de agua a 37 °C, con agitación constante, para la otra curva la piel se colocó en etanol como medio de disolución, y éste sistema a su vez en baño de agua a 37 °C durante 21 horas. Se procedió a filtrar por gravedad las soluciones obtenidas, y después se filtraron con membrana de 0.45 µm a vacío, hasta obtener una solución translúcida, la cual se utilizó como medio para preparar las curvas de calibración del principio activo.

Se prepararon soluciones stock de triclosán con concentraciones de 80 y de 40 mcg/ml para el medio de disolución de buffer de fosfatos pH 7.4 con Brij[®] 58 al 3% y etanol respectivamente y a partir de éstas se tomaron alícuotas para tener una gama de concentraciones adecuada. Cada experiencia se realizó por triplicado. Los sistemas se leyeron a la longitud de onda de máxima absorción para el triclosán por espectrofotometría uv-visible. Se procedió a hacer el análisis de los datos de las curvas de calibración.

3.5.1.4 Determinación de las condiciones para la preparación de las nanopartículas

Se prepararon nanopartículas por el proceso de emulsificación–difusión por desplazamiento de solvente, como se desglosa a continuación:

Se saturó agua con metil etil cetona y se separaron las fases. Con la fase acuosa obtenida se preparó una solución estabilizante de alcohol polivinílico al 5%. Se disolvió el principio activo (triclosán) y el polímero (Eudragit E100) en 20mL de metil etil cetona saturada con agua y se mezclaron con 40ml de la solución de alcohol polivinílico al 5%

previamente preparado, a una velocidad de 2000rpm, durante 10 min (Ver Figura 13). Se procedió a evaporar el solvente hasta su eliminación, en un rotavapor. Con el fin de optimizar las condiciones de evaporación del solvente en el rotavapor, se prepararon nueve lotes placebo (sin principio activo). La tabla siguiente muestra dichas condiciones:

Tabla 4. Condiciones que se evaluaron en el rotavapor para la preparación de nanopartículas

No. de lote	Temperatura (°C)	Velocidad (rpm)
1	30	30
2	30	45
3	30	60
4	50	30
5	50	45
6	50	60
7	90	30
8	90	45
9	90	60

Una vez evaporado el solvente se procedió a centrifugar cada lote a 40 000rpm, durante 1 hora. Se resuspendió la pastilla con agua destilada y con agitación constante por 20 horas, después de ese período se sonicó el sistema nanoparticulado durante 1 hora para después volver a ser centrifugado a las mismas condiciones. Este proceso de lavado centrifugado se realizó 3 veces. Posteriormente se determinó el tamaño de partícula en el Nanosizer® Coulter N4 Plus. Los datos se analizaron estadísticamente para elegir las condiciones para la preparación de nanopartículas.

3.5.2 PREPARACIÓN DE NANOPARTÍCULAS POR EL PROCESO DE EMULSIFICACIÓN–DIFUSIÓN POR DESPLAZAMIENTO DE SOLVENTE.

En un embudo de separación se colocaron el solvente orgánico (metil etil cetona) y agua destilada. Se procedió a saturar ambos líquidos con agitación, y después se separaron ambas fases (la orgánica y la acuosa). El principio activo (en éste caso el triclosán) se disolvió en la fase orgánica saturada así como también el polímero eudragit E100. Ésta mezcla se agitó mecánicamente a 2 000 rpm, añadiéndole la fase acuosa previamente disuelta con polivinil alcohol al 5 %, la agitación del sistema se realizó durante 10 minutos.

Se procedió a eliminar el solvente orgánico de la emulsión, lo cual se llevó a cabo bajo presión reducida con un rotavapor a 30rpm y 45°C. La suspensión se concentro hasta llegar a un volumen aproximado de 40 ml. Posteriormente dicha suspensión fue centrifugada a 40 000 rpm durante 1 hora, la pastilla obtenida se resuspendió en agua destilada, con agitación durante 20 horas, después de ese período se sonicó el sistema nanoparticulado durante 1 hora para después volver a ser centrifugado. Éste proceso de lavado centrifugado se realizó 3 veces.

La pastilla del último centrifugado, se resuspendió en agua destilada como se mencionó anteriormente, parte de esta suspensión se congeló y liofilizó y otra parte de la suspensión se utilizó para realizar otras determinaciones para las nanoesferas.

Cabe señalar que el sobrenadante obtenido en la primera centrifugación fue refrigerado para su posterior análisis. Se prepararon 9 lotes placebo para la determinación de las condiciones de preparación de las nanopartículas (tabla 4), así como 17 lotes de nanopartículas con cantidades crecientes de principio activo (tabla 12).

3.5.3 CARACTERIZACIÓN DE NANOPARTÍCULAS

3.5.3.1 *Tamaño de partícula*

La determinación de la talla de partícula, la distribución del tamaño de partícula, la desviación estándar así como el índice de polidispersión, fueron obtenidos con ayuda de un contador electrónico Nanosizer[®] N4 Plus. Para todos los lotes de nanopartículas analizados se utilizó como medio de dispersión agua destilada, todas las lecturas se realizaron a 25 °C y con un ángulo de incidencia del rayo láser de 90°. Las determinaciones se hicieron por triplicado preparando diluciones de una suspensión acuosa de nanopartículas.

3.5.3.2 *Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC)*

Una vez que las nanopartículas de cada uno de los lotes preparados fueron liofilizadas éstas se analizaron por calorimetría diferencial de barrido a una velocidad de calentamiento de 10 °C/min y flujo de nitrógeno de 50ml/min. El rango de temperatura utilizado para el análisis de cada lote de nanopartículas fue de 0 °C a 300 °C. También el polímero eudragit E100, el principio activo, así como una mezcla física de éstos se analizaron por calorimetría diferencial de barrido a las mismas condiciones ya señaladas.

3.5.3.3 *Carga superficial*

Se determinó el potencial z de cada lote de nanopartículas que fueron cargados con cantidades variables de triclosán, con ayuda de un Zetasizer Malvern Systems ZEN 3600 a la viscosidad y constante dieléctrica del agua, 150 v de corriente eléctrica, a

una temperatura de 25°C y utilizando una celda de capilar doblado, el medio de dispersión fue agua desionizada. El potencial Z de una partícula se obtiene a partir de la ecuación de Henry:

$$U_E = \frac{2 \xi z f(ka)}{3\eta}$$

Donde:

z = potencial z

U_E = movilidad electroforética

ξ = constante dieléctrica

η = viscosidad

$f(ka)$ = función de Henry. Se utilizan dos valores: 1.5 (aproximación de Smolochowski que para partículas grandes y medio acuoso) ó 0 (aproximación de Huckel es para partículas pequeñas en medio no acuoso, medio con constante dieléctrica baja).⁶⁷

3.5.3.4 Determinación de triclosán en las nanopartículas

Se preparó un lote de nanopartículas y un placebo (lote de nanopartículas sin triclosán) por el proceso de emulsificación–difusión por desplazamiento de solvente, a los lotes se les realizó el proceso de lavado centrifugado tres veces y posteriormente se liofilizaron. Se pesó una cantidad conocida de nanopartículas la cual se disolvió en etanol durante dos horas a 40 °C.

Se procedió a filtrar (el papel filtro se peso antes de utilizarlo) la solución para retirar de ésta los residuos de polivinil alcohol que pudieran haberse quedado en exceso en las nanopartículas. Después de utilizar el papel filtro, éste se llevo a sequedad, para posteriormente pesarlo. La solución filtrada se diluyó, y se leyó contra un blanco de nanopartículas (al cual se le realizaron las mismas diluciones que al problema) a la longitud apropiada para el triclosán, con ayuda de un espectrofotómetro

UV-visible. La experiencia se realizó por triplicado. La concentración se obtuvo con base a un estándar.

Después de determinar espectrofotométricamente la cantidad de triclosán presente en las nanopartículas, se procedió a calcular el porcentaje de fármaco contenido en las nanoesferas y la eficiencia de encapsulamiento.

3.5.3.5 Morfología

Las nanopartículas se observaron por microscopía electrónica de barrido (SEM), recubriéndolas previamente con oro (1 200 V, 5mAmp y 0.15 Torr durante 6 minutos). También se observaron por microscopía electrónica de transmisión (TEM) utilizando como medio de dispersión agua destilada, a 40 000 aumentos.

3.5.4 OBTENCIÓN DE LA PIEL

Se utilizó piel de oreja de cerdo recuperada del rastro después del sacrificio de los animales y antes de tratarla con vapor o agua caliente. Se aislaron porciones de piel utilizando un bisturí (quitando todo el músculo y tejido adiposo), se cortaron cuidadosamente los pelos que recubren la piel del cerdo y posteriormente se cortó con un dermatoma para obtener un grosor de piel superficial de aproximadamente 650-700 μm . La piel obtenida se guardó en bolsas herméticas y se congelaron a $-35\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta ser utilizadas.

3.5.5 CINÉTICA DE PERMEACIÓN PARA LAS TRES FORMULACIONES

Se descongelaron las porciones de piel y se montaron en las celdas de permeación tipo Franz colocando en el compartimento donador 500 μL de las tres

diferentes formulaciones y en el compartimento receptor 2 mL de solución buffer de fosfatos pH 7.4 con Brij[®] 58 al 3 %. Las celdas se incorporaron en un baño María a 37 °C con agitación constante, se tomaron muestras del compartimento receptor a la ½, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 y 8 horas reponiendo el volumen con medio de disolución fresco.

Cada muestra que se recolectó se analizó por espectrofotometría uv-visible a la longitud de onda apropiada para el triclosán. La experiencia de permeación para cada formulación, se llevó a cabo por sextuplicado corriendo un blanco para cada permeación (sin formulación en el compartimento donador). La cuantificación de las muestras, se obtuvieron con base en la curva de calibración de triclosán en buffer de fosfatos pH 7.4 con Brij[®] 58 al 3% en contacto con piel de cerdo (Sección 3.4.4). Posteriormente se analizaron los resultados.

3.5.6 MÉTODO DE EXTRACCIÓN DEL TRICLOSÁN RETENIDO EN LA PIEL PERMEADA

Se retiró la piel de cada una de las celdas después de las permeaciones, se lavaron y posteriormente se cortaron en finas porciones las cuales se colocaron en un vial, se agregaron 5 mL de etanol en cada vial, se taparon, y cada uno de los sistemas se mantuvo en agitación constante durante 21 horas.

Posteriormente las soluciones en los viales se filtraron por gravedad y se procedieron a leer a la longitud máxima del triclosán, con ayuda de un espectrofotómetro de uv-visible.

La experiencia se realizó por sextuplicado. La concentración se obtuvo con base a la curva de calibración de etanol en contacto con piel, preparada como se explicó anteriormente (Sección 3.4.4). Por último se analizaron los resultados.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Como se mencionó anteriormente uno de los factores patogénicos responsable para el desarrollo del acné es la colonización microbiana. Se reportado que agentes terapéuticos como los antibióticos que son comúnmente usados para inhibir la inflamación en la piel por causa de la bacteria *P. acnes*, por ejemplo peróxido de benzoilo, ácido azaleico, retinoides, tetraciclinas, eritromicina, macrólidos y clindamicina, generan reacciones adversas después de su administración. El peróxido de benzoilo y los retinoides traen como consecuencias xerosis cutánea e irritación en la piel si son usados excesivamente como tratamientos, y hay muchos experimentos que reportan para el caso de la tetraciclina, eritromicina y macrólidos que generan una alta resistencia a la bacteria, daño en la piel y una inmunohipersensibilidad si son administrados por un período prolongado. Así el triclosán, un agente antibacterial que ha sido usado para el tratamiento de acné en diferentes formulaciones (parches de hidrogeles, vesículas, etc) es una alternativa de ingrediente activo efectivo para tratar el acné, y éste fue elegido para nuestro estudio (al cual se le realizaron las pruebas correspondientes), debido a que no se ha reportado resistencia de *P. acnes* a éste principio activo.^{68, 69, 70.}

Espectros de absorción

Los espectros de absorción obtenidos para el triclosán en Buffer de fosfatos pH 7.4 con Brij[®] 58 al 3%, triclosán en etanol, Eudragit E100 en etanol, y triclosán para las tres formulaciones en estudio (crema Dermobras[®], solución Clean & Clear[®] y en nanopartículas) se incluyen en el anexo 1.

Con lo que respecta al espectrograma de triclosán en solución buffer de fosfatos pH 7.4 con Brij[®] 58 al 3%, que fue utilizado para determinar la solubilidad del triclosán en dicho medio, la longitud de onda elegida fue de 285 nm ya que a esta longitud se

presentan menos interferencias por parte del surfactante (ya que el buffer de fosfatos no presenta absorción en el rango de 200-400nm) y por lo tanto son más confiables las lecturas.

El etanol fue utilizado como medio para cuantificar el triclosán de las nanopartículas, debido a que en ese medio tanto el triclosán como el polímero son solubles y a 285 nm no interfiere con la lectura del triclosán. Lo anterior se puede observar en el espectrograma correspondiente. Por otro lado, el PVAL no es soluble en etanol, lo que ayudó a eliminarlo del medio por filtración.

Observando el espectrograma para el polímero se puede decir que éste tampoco interfiere de forma considerable para la cuantificación de triclosán en las nanopartículas. Los espectrogramas correspondientes de triclosán para las tres formulaciones fueron similares.

Solubilidad del triclosán

A partir de ésta prueba se determinó la solubilidad del triclosán en solución buffer de fosfatos pH 7.4 (ya que este valor se acerca a las condiciones fisiológicas corporales, considerando que este será el medio a utilizar en las permeaciones como solución receptora). No obstante, debido a la baja solubilidad del triclosán en soluciones acuosas, se determinó la solubilidad del mismo en buffer de fosfatos pH 7.4 con Brij[®] 58 al 1% y buffer de fosfatos pH 7.4 con Brij[®] 58 al 3%. La adición del surfactante tiene como finalidad el incrementar la solubilidad del triclosán de modo que se aseguren las condiciones *sink* durante los estudios de permeación. Las determinaciones de solubilidad se realizaron a temperatura ambiente y a 37 °C, temperatura que corresponde a la corporal. Los resultados se muestran en el anexo 1. Con los datos obtenidos se realizó un análisis de varianza con ayuda del programa Stat graphics v 5.0, para saber que efectos son estadísticamente significantes.

Tabla 5. Análisis de varianza para la variable de respuesta solubilidad de triclosán

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
MAIN EFFECTS					
A: Temperatura	0,000295424	1	0,000295424	0,00	0,9826
B: Sistema	45,202	2	22,601	37,72	0,0000
INTERACTIONS					
AB	0,230723	2	0,115361	0,19	0,8274
RESIDUAL	7,18941	12	0,599117		
TOTAL (CORRECTED)	52,6224	17			

All F-ratios are based on the residual mean square error.

La tabla de ANOVA descompone la variabilidad de la respuesta en las contribuciones debido a los factores (sistemas y temperatura). Desde que la suma de cuadrados tipo III ha sido elegida, la contribución de cada factor es medida habiendo quitado los efectos de los otros factores. Los valores de P prueban la significancia estadística de cada uno de los factores. Así desde que un valor de p, es menor que 0,05 (como es el caso para los sistemas (BF, BF+B 1% y BF+B al 3%), este factor (sistemas) tiene un efecto estadísticamente significativo en la solubilidad del triclosán al 95,0% de nivel de confianza.

Es importante mencionar que para el sistema de buffer de fosfatos pH 7.4 y buffer de fosfatos pH 7.4 con Brij[®] 58 al 1%, la solubilidad a temperatura de 37 °C fue ligeramente menor a la solubilidad a temperatura ambiente, lo cual pudo haberse debido a la variación en la agitación de los sistemas, pues el principio activo se encontraba frecuentemente en el fondo de los viales interrumpiendo el libre movimiento del agitador magnético, esto se presentó con mayor frecuencia en los sistemas a 37 °C, sin embargo estas diferencias no son estadísticamente significativas, por lo que éste factor no influyó de manera considerable en la solubilidad. Esto se observa en la figura 17. Con lo anterior se puede decir que la temperatura no fue un factor considerablemente significativo en la solubilidad, pero si la composición de cada sistema.

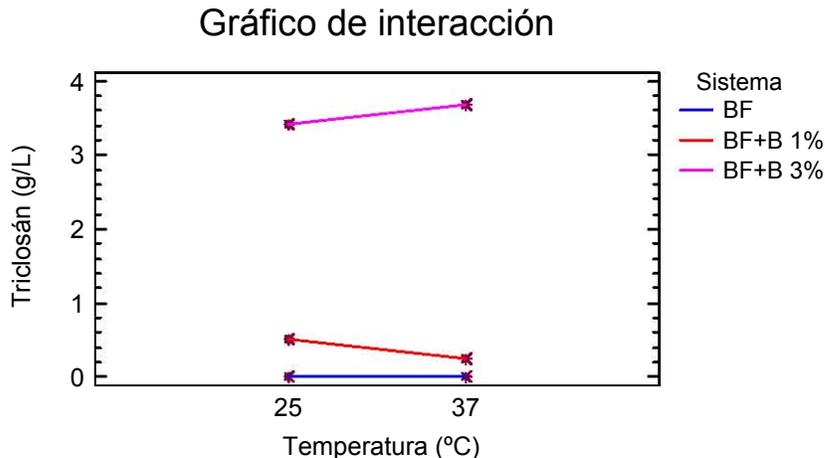


Figura 17. Solubilidad del triclosán a diferentes condiciones (composición del medio de disolución y temperatura).

En la figura 17 se muestra que la solubilidad del triclosán en el buffer de fosfatos pH 7.4 con Brij[®] 58 al 3% fue mayor para ambas temperaturas (3,4057 y 3,6778 g/l, respectivamente) que en los dos sistemas restantes, esto se debió a que la cantidad de surfactante es mayor y ésta ayudó a disolver una mayor cantidad de principio activo, ya que el triclosán es insoluble en agua. Como ya se mencionó anteriormente, esta prueba se realizó para determinar el medio que sería utilizado como receptor en las permeaciones *in vitro*, por lo que de acuerdo a los resultados, se eligió el medio BF+B al 3%.

Curvas de calibración en contacto con piel para la cuantificación de triclosán

-Curva de calibración de triclosán en solución buffer de fosfatos pH 7.4 con Brij[®] 58 al 3%, en contacto con membrana (piel de oreja de cerdo).

Debido a que el medio receptor está en contacto con la membrana durante los estudios de permeación, se preparó una curva de calibración para el triclosán en dicho

medio. Para evaluar la linealidad del sistema se determinó la respuesta analítica, absorbancia (Abs), para cada concentración de principio activo ($\mu\text{g/ml}$) analizada en buffer de fosfatos pH 7.4 con Brij[®] 58 al 3%, en contacto con membrana (ver figura 18) y se realizó un análisis de varianza.

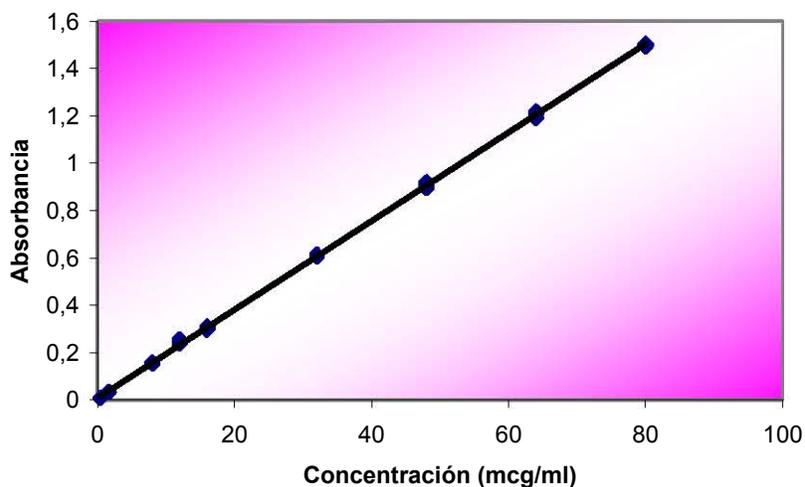


Figura 18. Curva de calibración de triclosán en buffer de fosfatos pH 7.4 con Brij 58 al 3% en contacto con piel de cerdo.

En el análisis de varianza (ver Anexo 1) F calculada es mayor que F crítica por lo que de acuerdo al criterio de aceptación se rechaza H_0 , lo cual quiere decir que hay una relación lineal entre la concentración de triclosán y su absorbancia. Esto también se puede corroborar con el coeficiente de correlación múltiple el cual es cercano a 1, indicativo de una buena linealidad de la curva. De acuerdo a la curva de calibración de triclosán en buffer de fosfatos pH 7.4 con Brij[®] 58 al 3% (Figura 18), los parámetros estadísticos son los siguientes:

$$m = 0.0187$$

$$b = 0.0075$$

$$r^2 = 0.9997$$

D.E. = (+/-) 0,0008

Promedio = 0,0194

c.v. (%) = 4,2312

Como se puede apreciar el valor de la ordenada al origen es distinto de cero, por lo que se realizó un análisis estadístico para determinar si es significativamente diferente de cero con un nivel de significancia del 95%. En el anexo 1 se muestran los resultados de la prueba de t de Student. Con los datos obtenidos se puede decir que la ordenada al origen es diferente de cero. Esto puede atribuirse a la presencia de material biológico (piel) que pudiera estar causando alguna interferencia. No obstante, se considera que la curva obtenida puede ser empleada sin problema para los cálculos, pues la ordenada al origen es muy cercana a cero. El porcentaje del coeficiente de variación (c.v.), es aceptable ya que es menor a 5, valor máximo designado por la farmacopea 2004 para curvas de calibración en medios biológicos (ya que en éstos es frecuente que sustancias biológicas interfieran en la respuesta analítica). El coeficiente de variación indica que la dispersión del conjunto de los datos obtenidos en la curva es baja, y por tanto se puede confiar en los datos obtenidos.

Límites de detección y cuantificación

Como se ha visto una de las ventajas de utilizar métodos instrumentales de análisis como en éste caso, es que son capaces de detectar y determinar cantidades muy pequeñas del analito. Es evidente que los métodos estadísticos resultan importantes para la evaluación y comparación de límites de detección. En términos generales, el límite de detección de un analito se puede describir como aquella concentración que proporciona una señal en el instrumento significativamente diferente de la señal del blanco o ruido de fondo. La definición de límite de detección es muy arbitraria, y está totalmente abierta a cualquier analista para que proponga una definición alternativa para un propósito concreto.⁷¹

Por lo anterior se determinaron el límite de cuantificación y de detección del método a partir de los datos de la curva de calibración anterior.¹

La ecuación obtenida a partir del análisis de regresión lineal de la respuesta analítica en función de la concentración de triclosán es la siguiente:

$$\text{Abs} = [\text{Concentración de triclosán } (\mu\text{g/ml})] * 0.0187 + 0.0075$$

Tabla 6. Límites de confianza del intercepto

Concentración ($\mu\text{g/ml}$)	Respuesta analítica estimada (Abs)	LCI al 95% de la respuesta analítica	LCS al 95% de la respuesta analítica
0.0	0,007460	0,002528	0,012392

En la tabla 6 se muestran los intervalos de confianza para la respuesta analítica a una concentración de cero. El valor de la respuesta analítica de 0.012392 correspondiente al límite de confianza superior de la concentración 0.0 mcg/ml, se interpoló en la curva de regresión anterior. Como se sabe, el límite de detección, en éste caso, es la cantidad estimada del límite confianza superior del intercepto en la recta de regresión. El límite de detección obtenido fue 0,2616 $\mu\text{g/ml}$.

Para evaluar el límite de cuantificación, el cual es considerado como el límite inferior para medidas cuantitativas precisas, se propusieron cinco concentraciones cercanas al límite de detección y se determinaron sus respuestas analíticas a partir de la recta de regresión; posteriormente se calcularon los límites de confianza inferiores para cada una de las respuestas analíticas.

Tabla 7. Límites de confianza inferiores de las respuestas analíticas propuestas

Concentración (µg/ml)	Respuesta analítica estimada (Abs)	LCI al 95% de la respuesta analítica
0,3200	0,013484	0,008581
0,4200	0,015354	0,010460
0,5250	0,017318	0,012433
0,6200	0,019094	0,014218
0,7200	0,020964	0,016097

El límite de cuantificación es aquella concentración estimada de principio activo del límite de confianza inferior de la respuesta analítica semejante al intervalo de confianza superior del intercepto, en este caso se eligió el de 0.012433 de la tabla 7. El límite de cuantificación obtenido fue de 0,2638 µg/ml.

-Curva de calibración de triclosán en etanol, en contacto con membrana (piel de oreja de cerdo).

Se construyó una curva de calibración de triclosán en etanol, pues es la curva que se empleo para realizar los cálculos para la determinación de la cantidad retenida en la piel al final de la permeación.

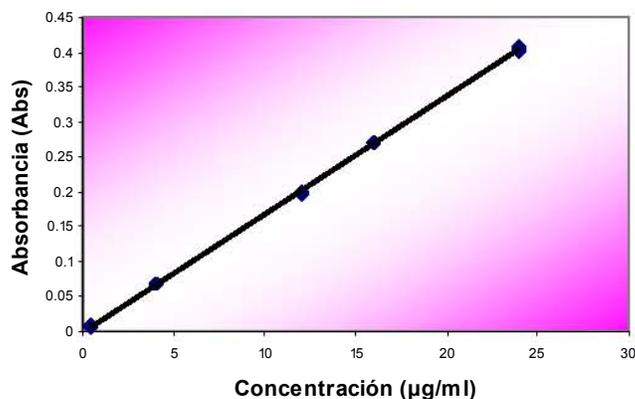


Figura 19. Curva de calibración de triclosán en etanol, en contacto con piel de cerdo.

Para evaluar la linealidad del sistema se determinó la respuesta analítica, absorbancia (Abs), para cada concentración de principio activo ($\mu\text{g/ml}$) analizada en etanol en contacto con membrana (ver figura 19) y se realizó un análisis de varianza.

En el Anexo 1 se puede ver el análisis de varianza, en donde se encontró que F calculada es mayor que F crítica, por tanto se rechaza H_0 , lo que quiere decir que hay una relación lineal entre la concentración de triclosán y su absorbancia. Como en el caso anterior, esto también se puede corroborar con el coeficiente de correlación múltiple (r^2) el cual es cercano a 1, indicando así una buena linealidad de la curva. De acuerdo con la curva de calibración anterior los parámetros estadísticos son los siguientes:

$$m = 0.0168$$

$$b = -0.0002$$

$$r^2 = 0.9998$$

$$\text{D.E.} = (+/-) 0,0005$$

$$\text{Promedio} = 0,0169$$

$$\text{c.v. (\%)} = 3,0485$$

Como se puede observar, el valor de la ordenada al origen es negativo y es distinto de cero, por lo que se realizó un análisis estadístico para determinar si es significativamente diferente de cero con un nivel de significancia del 95%. Los resultados de esta prueba se muestran en el anexo 1. De acuerdo a la hipótesis establecida y los resultados obtenidos se acepta H_0 lo que indica que la ordenada al origen es igual a cero. El porcentaje del coeficiente de variación (c.v.), en esta curva también es aceptable pues el valor para dicho coeficiente es menor a 5. Este valor es más pequeño que el obtenido en la curva de calibración en medio de buffer de fosfatos pH 7.4 con brij[®] 58 al 3%, por ello se puede decir que entre mas pequeño sea dicho coeficiente más confiables serán los datos obtenidos, pues la dispersión de éstos en su conjunto será más pequeña.

Límites de detección y cuantificación

Se determinaron el límite de cuantificación y de detección del método a partir de los datos de la curva de calibración anterior. La ecuación obtenida a partir del análisis de regresión lineal de la respuesta analítica en función de la concentración de triclosán es la siguiente:

$$\text{Abs} = [\text{Concentración de triclosán } (\mu\text{g/ml})] * 0.0168 - 0.0002$$

Tabla 8. Límites de confianza para el intercepto

Concentración ($\mu\text{g/ml}$)	Respuesta analítica estimada (Abs)	LCI al 95% de la respuesta analítica	LCS al 95% de la respuesta analítica
0.0	-0,000157	-0,002071	0,001756

En la tabla 8 se muestran los intervalos de confianza para la respuesta analítica a una concentración de cero. El valor de la respuesta analítica de 0.001756 correspondiente al límite de confianza superior de la concentración 0.0 $\mu\text{g/ml}$, se interpoló en la curva de regresión anterior. Como se sabe, el límite de detección, en éste caso, es la cantidad estimada del límite confianza superior del intercepto en la recta de regresión. El límite de detección obtenido fue de 0,1138 $\mu\text{g/ml}$.

Al igual que en el caso anterior se propusieron cinco concentraciones cercanas al límite de detección y se determinaron sus respuestas analíticas a partir de la recta de regresión; posteriormente se calcularon los límites de confianza inferiores para cada una de las respuestas analíticas para determinar el límite de cuantificación.

Tabla 9. Límites de confianza inferiores de las respuestas analíticas propuestas

Concentración (µg/ml)	Respuesta analítica estimada (Abs)	LCI al 95% de la respuesta analítica
0,1500	0,002366	0,000469
0,1900	0,003039	0,001146
0,2300	0,003712	0,001823
0,2700	0,004385	0,002501
0,3100	0,005058	0,003178

Como ya se mencionó anteriormente, el límite de cuantificación es aquella concentración estimada de principio activo del límite de confianza inferior de la respuesta analítica semejante al intervalo de confianza superior del intercepto, en este caso se eligió el de 0.001823 de la tabla 9. El límite de cuantificación obtenido fue de 0,1177 µg/ml.

Resultados del tamaño de partícula (nm) en lotes antes y después de someterlos a centrifugación, a diferentes condiciones en el rotavapor

Para la determinación de la talla de partícula, se utilizó un contador de partículas submicrónicas Nanosizer® N4 Plus, equipo que se basa en la medición y las fluctuaciones de la luz dispersada después de que un rayo láser incide sobre una celda conteniendo la dispersión en estudio. Es importante señalar que todas las mediciones de las nanopartículas se obtuvieron a las mismas condiciones (a 25°C y con un ángulo de incidencia del rayo láser de 90 °), ya que de éstas, de la viscosidad del medio y del tamaño, depende la velocidad de difusión de las partículas. Esta prueba se realizó ya que algunos de los primeros lotes obtenidos por la técnica de emulsificación–difusión por desplazamiento de solvente, variaron su tamaño considerablemente ya que fueron preparados a diferentes temperaturas y velocidades en el rotavapor, por ello se propuso ésta prueba, para saber si realmente las condiciones en el rotavapor afectaban el

tamaño de las nanopartículas. De acuerdo a la literatura la técnica por la cual se prepararon las nanoesferas, es posible obtener una alta concentración de éstas en un volumen pequeño, además de tener buenos rendimientos y una talla de partícula mucho menor a media micra.⁶¹

Con los resultados de tamaño de partícula (nm) obtenidos de lotes antes de someterlos a centrifugación, bajo diferentes condiciones de temperatura y velocidad en el rotavapor (Ver Anexo I), se procedió a realizar un análisis de varianza con ayuda del programa Stat graphisc v 5.0, para conocer la significancia de dichas condiciones.

Tabla 10. Análisis de Varianza para el tamaño de nanopartículas (nm) de lotes antes de someterlos a centrifugación

Analysis of Variance for nm - Type III Sums of Squares

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
MAIN EFFECTS					
A:Temperatura	663,21	2	331,605	1,43	0,2661
B:Velocidad	1380,15	2	690,074	2,97	0,0769
INTERACTIONS					
AB	1686,14	4	421,535	1,81	0,1703
RESIDUAL	4185,23	18	232,513		

TOTAL (CORRECTED)	7914,73	26			

All F-ratios are based on the residual mean square error.

La tabla 10 de análisis de varianza descompone la variabilidad de tamaño en las contribuciones debido los factores de velocidad y temperatura. La contribución de cada factor es medida habiendo quitado los efectos de todos los otros factores. El valor de P prueba la significancia estadística de cada uno de los factores. Desde que ningún valor de P es menor a 0.05, ninguno de los factores o interacciones (en este caso temperatura y velocidad) tienen un efecto estadísticamente significativo en el tamaño de las nanopartículas en el nivel de confianza al 95%.

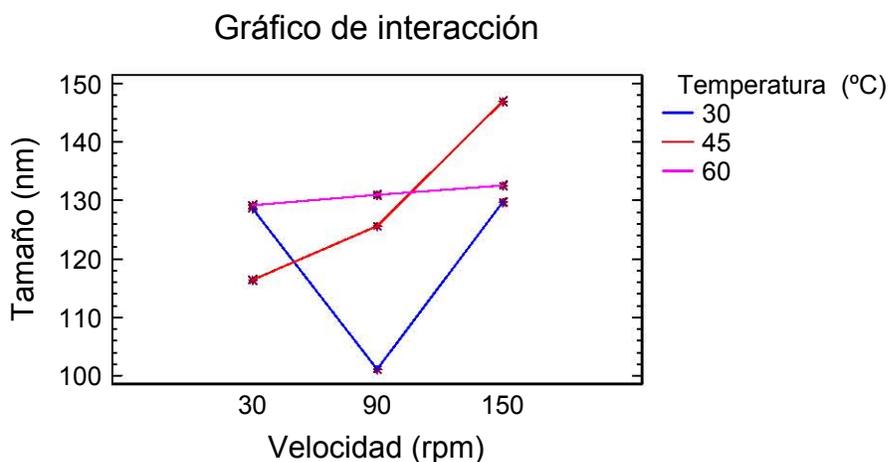


Figura 20. Tamaño de nanopartícula a diferentes condiciones de preparación en el rotavapor de lotes antes de someterlos a centrifugación.

En la figura 20 se puede observar que la variación del tamaño de nanopartículas conforme se modifican las condiciones de preparación no es significativa en los lotes antes de ser centrifugados, es decir que no se afecta el tamaño de las nanopartículas con dichas condiciones. De hecho, con el rango en el que oscila la talla a las diferentes condiciones (de ~ 100 a 145 nm) no es posible decir que hubo un efecto en la misma. A los lotes ocupados para la medición del tamaño, se les realizó el proceso de lavado-centrifugado tres veces, y se les midió el tamaño de partícula nuevamente, ya que se observó que la resuspendibilidad de la pastilla era muy lenta y podría afectar el tamaño de partícula.

Los resultados numéricos obtenidos para dicha prueba se muestran en el Anexo I. Se realizó un análisis de varianza para saber si el tamaño era considerablemente diferente a los tamaños de partícula antes de centrifugar los lotes.

Tabla 11. Análisis de Varianza para el tamaño de nanopartículas (nm) de lotes antes y después de someterlos a centrifugación

Analysis of Variance for Tamaño - Type III Sums of Squares

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
MAIN EFFECTS					
A:Condición	856,815	1	856,815	4,00	0,0508
RESIDUAL	11140,8	52	214,245		
TOTAL (CORRECTED)	11997,6	53			

All F-ratios are based on the residual mean square error.

En la tabla 11 se muestra el valor de P, el cual prueba la significancia estadística de cada uno de los factores. Como el valor de P de la prueba de F no es menor a 0.05, los lotes no centrifugados y los centrifugados no tienen un efecto estadísticamente significativo en el tamaño de las nanopartículas en el nivel de confianza al 95%.

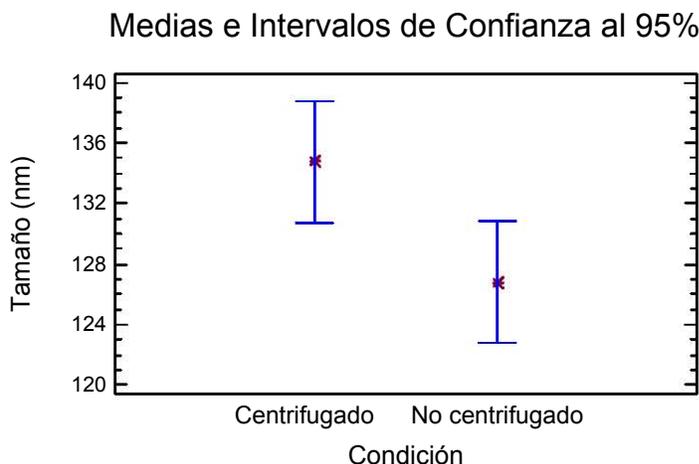


Figura 21. Tamaño de nanopartículas de lotes con y sin proceso de lavado centrifugado.

En la figura 21 se muestra que los tamaños de las nanopartículas aumentaron una vez que se les realizó el proceso de lavado-centrifugado, esto pudo deberse a que

la resuspendibilidad de las nanopartículas es un proceso muy largo y no es total aún cuando se resuspende por mas de 24 h. Sin embargo las diferencias en los tamaños no son significativas estadísticamente como lo muestra el análisis de varianza.

Caracterización de nanopartículas

Se prepararon lotes en los cuales se aumentó la cantidad de triclosán, para saber cuál era la cantidad máxima de triclosán que se podía encapsular en las nanopartículas.

Los lotes preparados anteriormente fueron liofilizados y posteriormente se les practicó una calorimetría diferencial de barrido, de la cual se obtienen termogramas que aportan la información de los puntos de fusión o bien cualquier evento térmico de las sustancias en estudio. A dichos lotes se les midió el tamaño de partícula para saber si había relación entre la cantidad de triclosán y el tamaño de partícula. Otra determinación que se hizo a los lotes fue el potencial zeta, esto con el fin de evaluar la estabilidad de la dispersión de nanopartículas.

Los datos obtenidos a partir de las mediciones en el Nanosizer Coulter[®] N4 Plus (USA) son: el diámetro promedio, la desviación estándar (D.E.) y el índice de polidispersión (IP), éste último indica que tan homogénea es la dispersión. Para considerar que una población es monodispersa su índice de polidispersión debe encontrarse en un rango de 0 a 0.5.

A continuación se muestran los resultados en las determinaciones de talla de partícula para los primeros seis lotes de nanopartículas (Tabla 12, Figuras 22-25).

Tabla 12. Resultados del tamaño de partícula (nm) en lotes con cantidades crecientes de triclosán

Lote	Cantidad de triclosán (mg)	Talla	D.E.	I.P.
1	0	122,2	44,8	0,291
		124,2	46,5	0,319
		130,4	46,9	0,268
	Promedio	125,6	46,1	0,2927
2	20	128,4	48,6	0,336
		148,3	54,1	0,285
		136,5	45,1	0,1947
	Promedio	137,7	49,3	0,2719
3	40	198,9	78,9	0,424
		201,8	77,7	0,365
		194,2	39,5	-0,05
	Promedio	198,3	65,4	0,2463
4	60	183,7	74,2	0,469
		206,9	87,3	0,619
		197,8	77,7	0,403
	Promedio	196,1	79,7	0,4970
5	80	229,8	89,2	0,379
		217,4	28,1	-0,018
		196,8	82,8	0,606
	Promedio	214,7	66,7	0,3223
6	100	223,5	92,6	0,548
		210,1	86,7	0,535
		231,9	97,8	0,615
	Promedio	221,8	92,4	0,5660
7	140	249,9	105	0,602
		254,1	102	0,454
		251	108,4	0,735
	Promedio	251,7	105,1	0,5970
8	180	149,5	22,4	-0,025
		148,2	44,2	0,138
		144,6	45,2	0,16
	Promedio	147,4	37,3	0,0910

Tabla 12. (Continuación) Resultados del tamaño de partícula en lotes con cantidades crecientes de triclosán

Lote	Cantidad de triclosán (mg)	Talla (nm)	D.E	I.P
9	220	149,2	62,5	-0,587
		131,9	55,8	0,628
		137,8	52,9	0,36
	Promedio	139,6	57,1	0,1337
10	260	138,7	43,2	0,158
		140,5	43,6	0,156
		139,3	25,4	0,038
	Promedio	139,5	37,4	0,1173
11	300	134,6	46,2	0,223
		135,6	46,5	0,222
		129,8	52,4	0,469
	Promedio	133,3	48,4	0,3047
12	340	176,6	65,2	0,299
		192,4	90,5	-1,917
		183,6	41,9	0,066
	Promedio	184,2	65,9	-0,5173
13	380	164	62,6	0,35
		174,3	59,4	0,217
		185,9	67,5	-0,279
	Promedio	174,7	63,2	0,0960
14	420	177,9	71,5	0,454
		182,9	61,2	0,203
		180	45	0,084
	Promedio	180,3	59,2	0,2470
15	460	153,4	65,7	0,688
		202,4	29,9	0,024
		192,9	67,2	0,236
	Promedio	182,9	54,3	0,3160
16	500	208,5	76,9	0,299
		195	75,8	0,383
		200,1	83,5	0,575
	Promedio	201,2	78,7	0,4190

Tabla 12. (Continuación) Resultados del tamaño de partícula (nm) en lotes con cantidades crecientes de triclosán

Lote	Cantidad de triclosán (mg)	Talla	D.E	I.P
17	600	159,3	70,1	0,862
		177,8	48,5	0,106
		172,8	27	0,027
	Promedio	170,0	48,5	0,3317

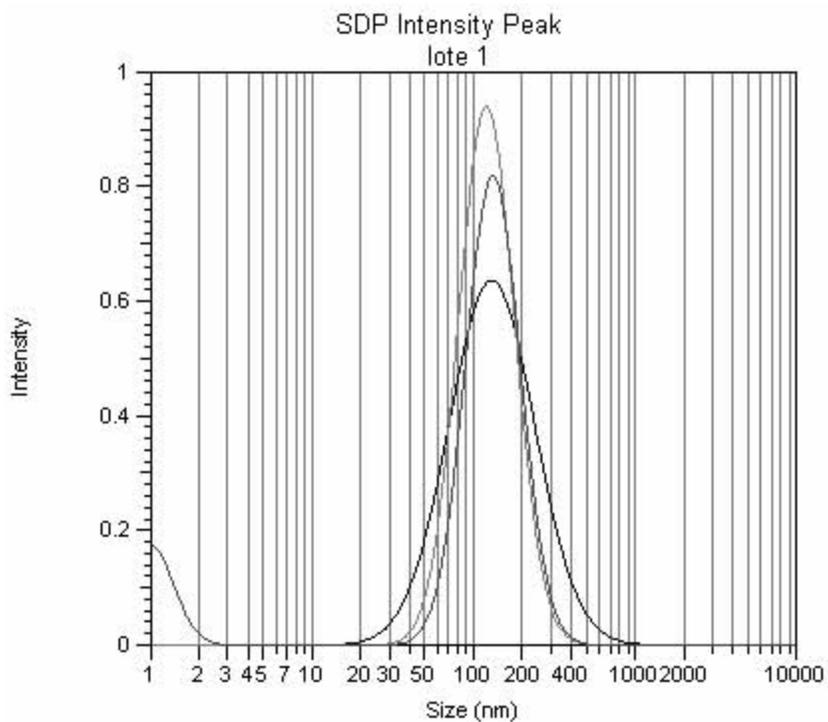


Figura 22. Distribución del tamaño de partícula para tres muestras del lote 1 (Sin triclosán).

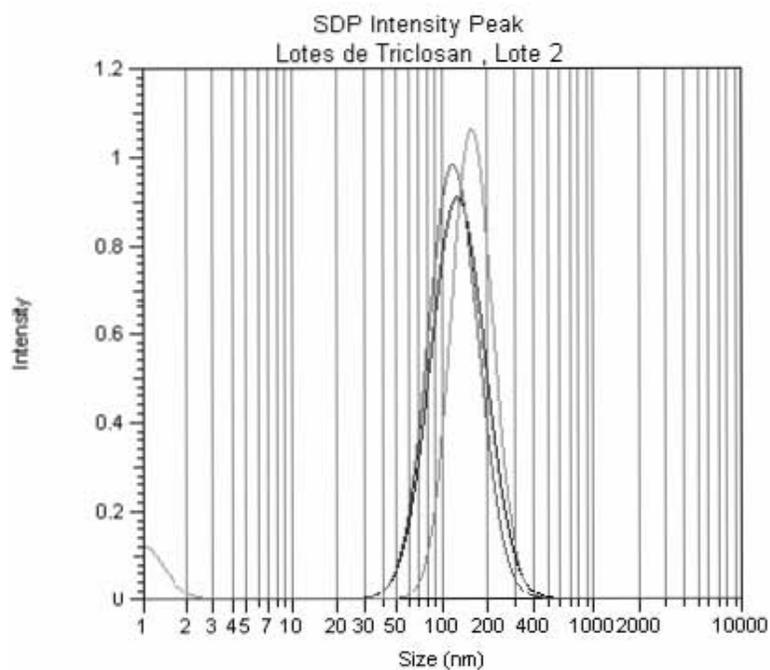


Figura 23. Distribución del tamaño de partícula para tres muestras del lote 2 (20mg de triclosán).

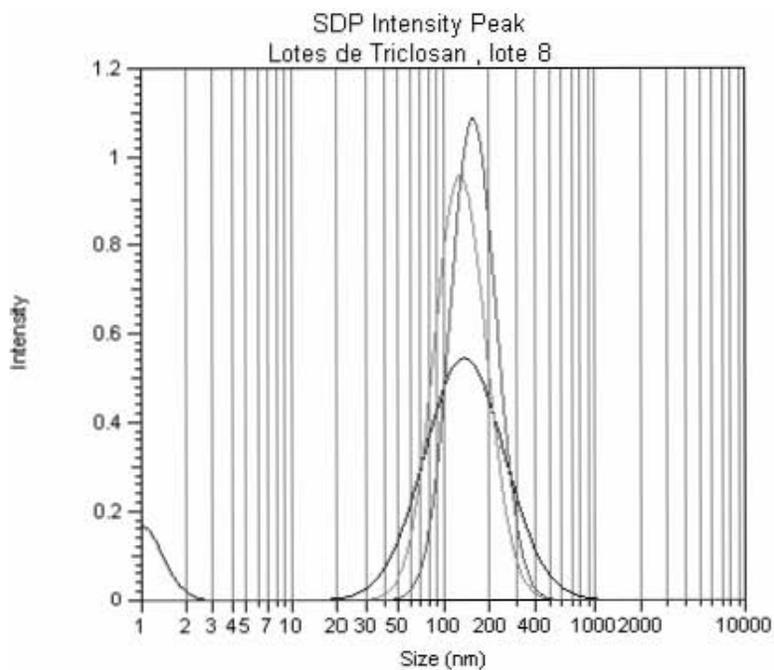


Figura 24. Distribución del tamaño de partícula para tres muestras del lote 8 (180mg de triclosán).

En la figura 24 se muestra el lote con el cual se logró encapsular la mayor cantidad de triclosán, esto se discutirá más adelante.

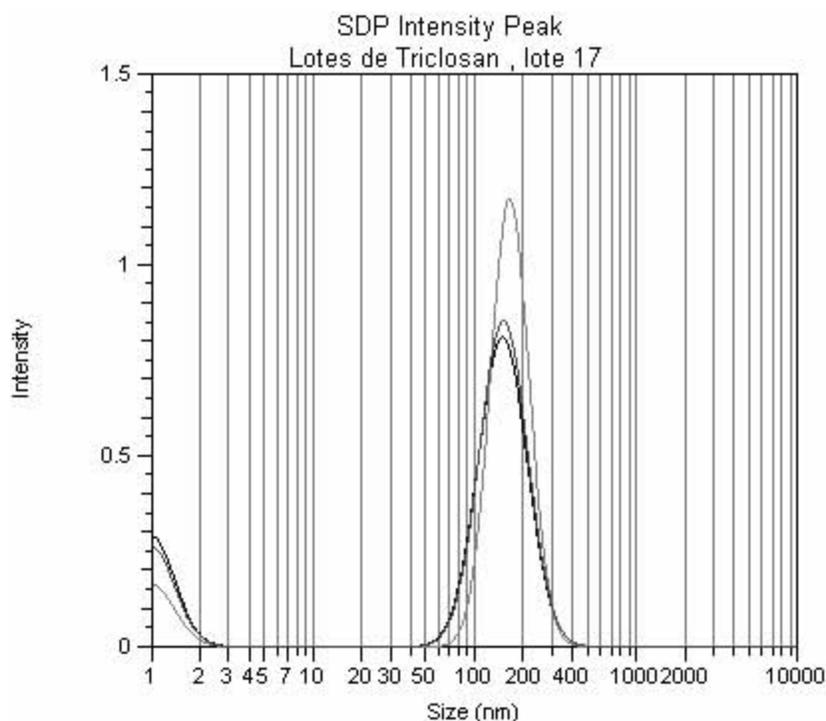


Figura 25. Distribución del tamaño de partícula para tres muestras del lote 17 (600mg de triclosán).

La tabla 12 muestra que en todos los lotes se obtuvo un tamaño promedio de partícula menor a los 300 nm aún los lotes preparados con cantidades muy grandes de triclosán. Los lotes del 1 al 6, se prepararon aumentando la cantidad de triclosán cada 20mg, los resultados de dichos lotes muestran que la diferencia en el tamaño de partícula no es muy grande por lo que se decidió aumentar la cantidad de triclosán cada 40mg (lotes 7-17), los resultados del tamaño de partícula de éstos últimos arrojan diferencias en cuanto al tamaño, por lo cual se realizó un análisis de varianza para conocer si realmente afecta la cantidad de triclosán en el tamaño de las nanopartículas.

Tabla 13. Análisis de Varianza para el tamaño de nanopartículas (nm)

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	60968,4	16	3810,53	36,60	0,0000
Within groups	3539,67	34	104,108		
Total (Corr.)	64508,1	50			

Como el valor de P en la prueba de F (tabla 13) es menor a 0.05, hay una diferencia estadísticamente significativa entre las medias del tamaño de partícula para cada lote con un 95% de nivel de confianza. Con los resultados anteriores se puede decir que la diferencia que existe entre el tamaño de partícula en los lotes (1-17) varía de un lote a otro, esto se muestra en la figura 26.

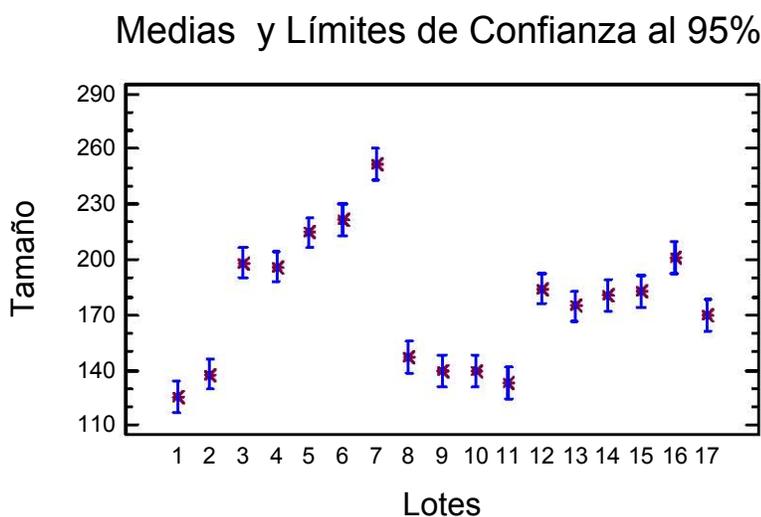


Figura 26. Comportamiento del tamaño de partícula en los lotes 1-17.

Como se observa en la figura 26, no existe una tendencia (en el conjunto de puntos) que indique una relación entre la cantidad de triclosán adicionada a los lotes y el tamaño de nanopartículas como se hubiera esperado. Sin embargo la variabilidad que se observa puede haberse debido a que los lotes no estaban completamente resuspendidos, pues las nanopartículas una vez que se les realizó por triplicado el

proceso de lavado-centrifugado (a 40000 rpm durante 1 h) no fueron fácilmente resuspendibles (aún dejando los lotes con agitación constante durante 20 h), ya que las partículas llegan a agregarse unas con otras y por tanto aumentar su tamaño. Es importante señalar que los resultados de talla en general mostraron que se tuvieron dos poblaciones en los lotes de nanopartículas, una de éstas se puede apreciar en las figuras 22-25, que corresponde a 1 nm, sin embargo el porcentaje es muy bajo, y es debido quizá al método de preparación utilizado o sus condiciones no controlables en el rotavapor como el vacío, pues es en el rotavapor donde ocurre la formación de las nanopartículas por medio de la difusión del solvente, dado que dicha variación poblacional resultó tanto en lotes que fueron cargados con triclosán como en los que no. Los datos obtenidos muestran que el valor de índice de polidispersión aumenta conforme se aumenta la cantidad de triclosán en los lotes preparados, así como el valor de la desviación estándar, por lo anterior se puede decir que los lotes con mayor cantidad de triclosán aumentaron su heterogeneidad, esto se muestra con mayor claridad en la figura 25, correspondiente al lote preparado con mayor cantidad de triclosán. A los lotes anteriores (1-17) se les determinó el potencial Z para estudiar la estabilidad de las suspensiones y se realizó un análisis de varianza para evaluar las diferencias (Tabla 14).

Tabla 14. Análisis de varianza para el Potencial Z de lotes de nanopartículas (1 a 17)

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	5596,35	16	349,772	211,37	0,0000
Within groups	56,2623	34	1,65477		
Total (Corr.)	5652,61	50			

Como el valor de P de la prueba de F es menor que 0.05 hay una diferencia estadísticamente significativa entre el potencial Z para cada nivel en los lotes con un 95% de confianza. Todos los valores de potencial Z obtenidos (ver Anexo II) fueron positivos pues el principio activo fue encapsulado con Eudragit® E 100 polímero que es

catiónico. Así, como se puede observar en la figura 27, los lotes a los que se les adicionó mayor cantidad de triclosán, dieron valores más bajos de potencial Z, lo cual se debió a que el principio activo no estaba completamente encapsulado pues éste es no catiónico. Cabe señalar que el potencial Z no depende del tamaño de partícula. La estabilidad de las nanopartículas por la presencia de un estabilizante (PVAL) es muy importante pues evita la coalescencia y la formación de aglomerados.

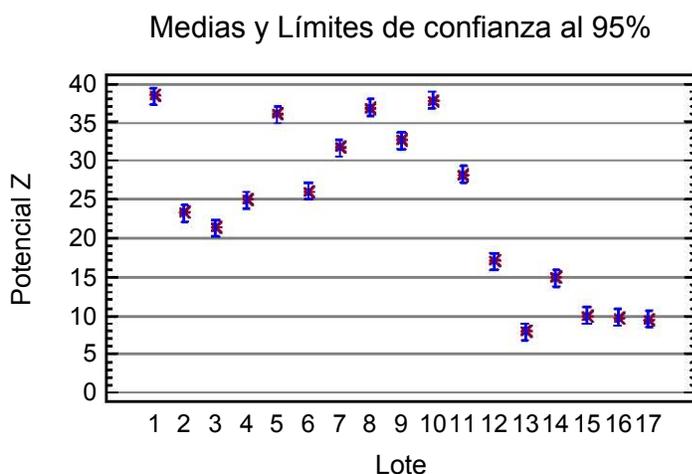


Figura 27. Comportamiento del potencial Z de lotes de nanopartículas 1-17.

El potencial Z cambia entre (+/-) 100mV dependiendo de la cantidad y tipo de iones adsorbidos. Como se muestra en la figura 27, hay variabilidad en el potencial Z, sin embargo se puede apreciar que éste disminuye en los lotes preparados con mayor cantidad de principio activo, así se puede decir que los lotes 1-11, presentan una mayor estabilidad pues normalmente se requiere un potencial $|Z| > 30-50$ para tener una suspensión de partículas estable. Por tanto los lotes 12-17 no son deseables para una buena administración tópica, ya que la falta de repulsión electrostática o $Z = 0$ quita la barrera cinética y la condensación espontánea de las partículas da como resultado una disminución en la energía de la superficie de partículas, y la formación de agregados de partículas. Dependiendo de la energía de interacción de las partículas, el agregado puede ser débil (dispersión floculada) la cual es fácil de redispersar o fuerte (“cake”) el

cual es difícil de redispersar. La energía de enlace interparticular es inversamente proporcional al potencial Z a una distancia fija entre partículas.⁷²

Todos los lotes fueron liofilizados y posteriormente analizados por la técnica de calorimetría diferencial de barrido. La figura 28 muestra los termogramas obtenidos para los lotes de nanopartículas preparados con diferente cantidad de triclosán, así como también se muestra un termograma del polímero (Eudragit E 100) y del principio activo (triclosán).

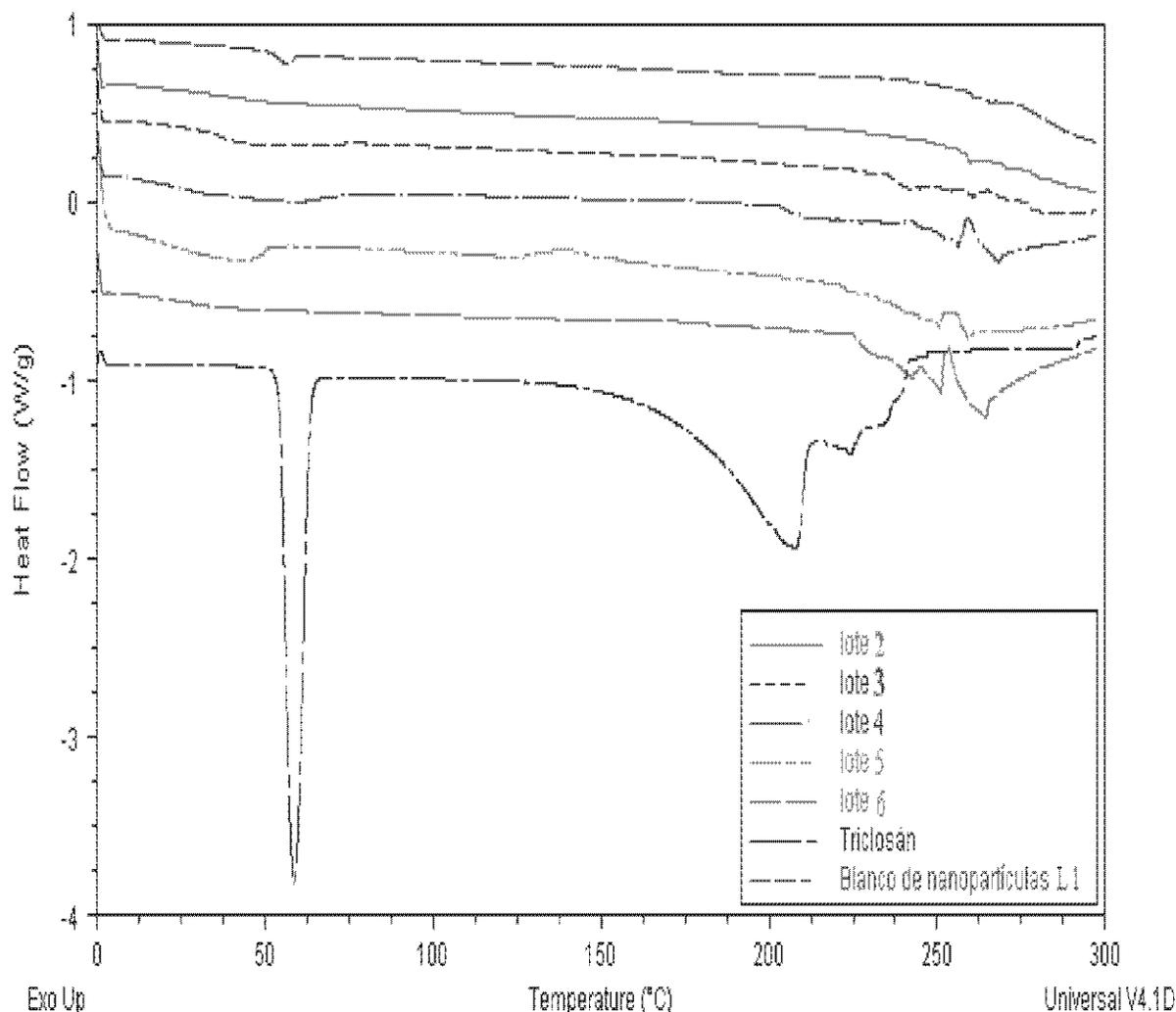


Figura 28. Termograma para triclosán y para lotes de nanoesferas (1-6). Porcentaje de triclosán: lote 1, 0%; lote 2, 4.76%; lote 3, 9.09%; lote 4, 13.04%; lote 5, 16.67%; lote 6, 20%.

Una de las principales aplicaciones de la calorimetría diferencial de barrido para el análisis de nanopartículas es la determinación de la forma en la que se encuentra el principio activo en la matriz polimérica, pues si se detectan picos de fusión del principio activo, éste se encuentra en forma de cristales y si no se detectan picos correspondientes a la fusión del mismo en los termogramas de las nanopartículas cargadas, es que se encuentra disperso molecularmente en la matriz polimérica. Una vez comprobada la dispersión molecular del activo en la matriz polimérica se puede determinar si existen interacciones químicas entre el fármaco y el polímero utilizando rayos X o espectros de infrarrojo.⁵⁹

En la figura 28 se aprecia el punto de fusión del triclosán, a una temperatura de 53 °C. El lote 1 presenta una endoterma a la misma temperatura del triclosán, sin embargo éste pico no está relacionado con el activo pues el lote no lo contiene, por tanto se le puede atribuir al polímero pues el pico de éste es similar al del lote placebo. Los termogramas de los lotes 2 a 6 no presentan endotermas a la misma temperatura que el triclosán por lo que se puede decir que el activo, en este caso el triclosán, se encuentra molecularmente disperso en la matriz polimérica. El termograma para el lote 5 muestra una ligera endoterma en 50 °C, el cual se puede atribuir al punto de transición vítrea del polímero.

En la figura 29 se puede apreciar claramente que el lote 1 correspondiente a un lote que no contiene triclosán presenta un pico relacionado con el punto de transición vítrea (Tg) del polímero Eudragit E 100 pues presenta un pico similar en forma y magnitud. En esta figura también se aprecia que las endotermas para el polímero Eudragit E100, para el triclosán, y para el estabilizante PVAL se presentan a temperaturas casi idénticas, por ello fue necesario preparar lotes con cantidades mayores de triclosán (lotes 7-17) para obtener una diferencia más notable en los comportamientos térmicos.

En la figura 30 se muestran los termogramas de los lotes 7 a 16, en los cuales se aprecia que al aumentar la cantidad de triclosán en las nanoesferas, la endoterma que está relacionado con la temperatura de transición vítrea del polímero Eudragit E 100, se va desplazando hacia temperaturas menores. Los datos sugieren que el activo interactúa con el polímero, actuando como un plastificante no convencional que favorece la unión entre las nanoesferas.⁵⁹

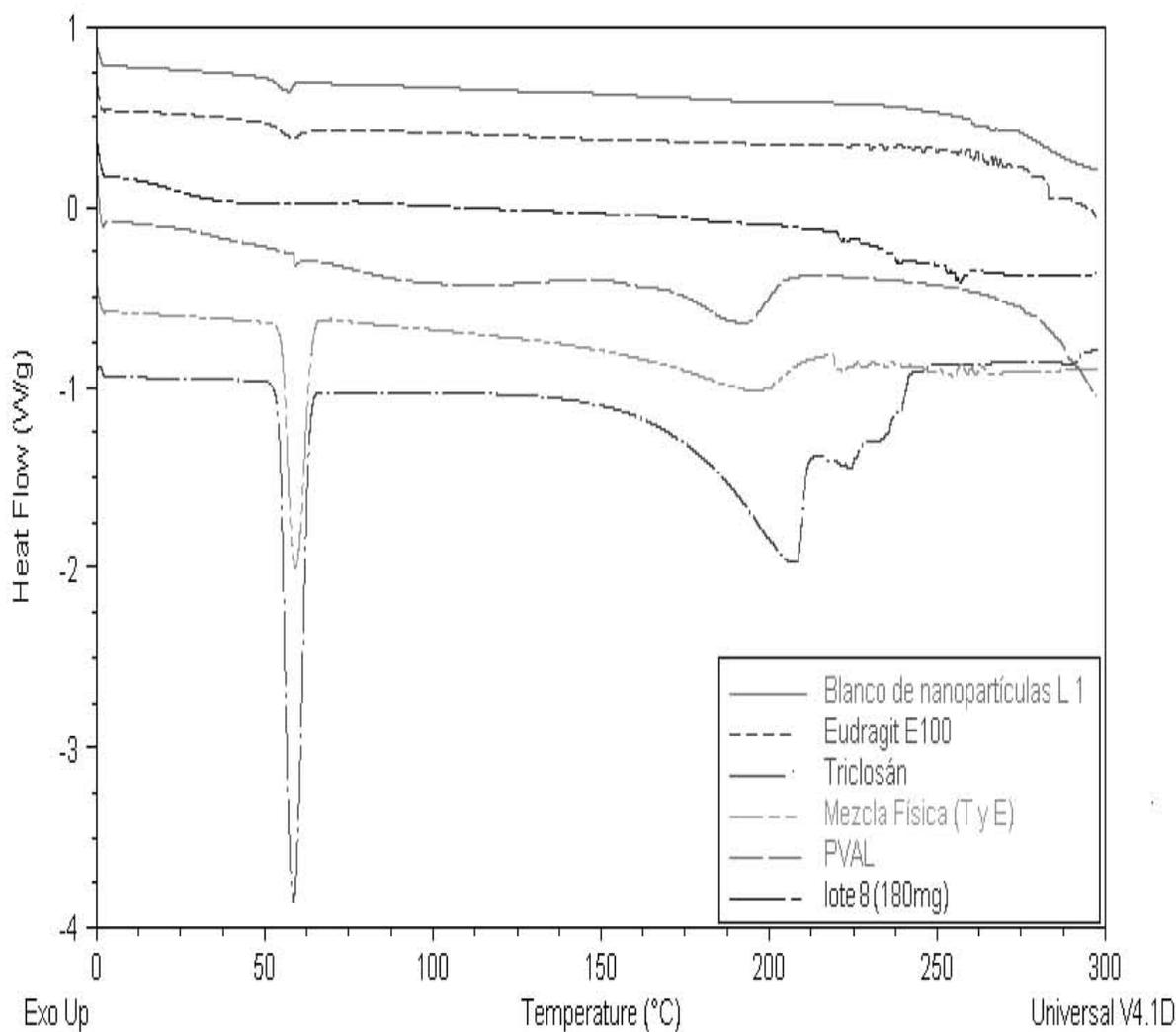


Figura 29. Termogramas del lote 1 (0% de triclosán), del polímero Eudragit E 100 (E), del triclosán (T), de una mezcla física de triclosán y Eudragit E 100 (50:50), del estabilizante PVAL y del lote 8 (31.03% de triclosán).

Esto se puede confirmar con los estudios de microscopía electrónica de barrido, pues hubo muchos problemas al tratar de observar las nanoesferas ya que se formaba una película transparente, difícil de distinguir de la membrana en la que se encontraba, esto se observa en la figura 32, micrografía tomada por la técnica de microscopía electrónica de barrido, en donde sólo se aprecian dos nanopartículas de forma esférica y sólida, en el centro y al costado de éste, que corresponden al tamaño promedio de nanopartículas.

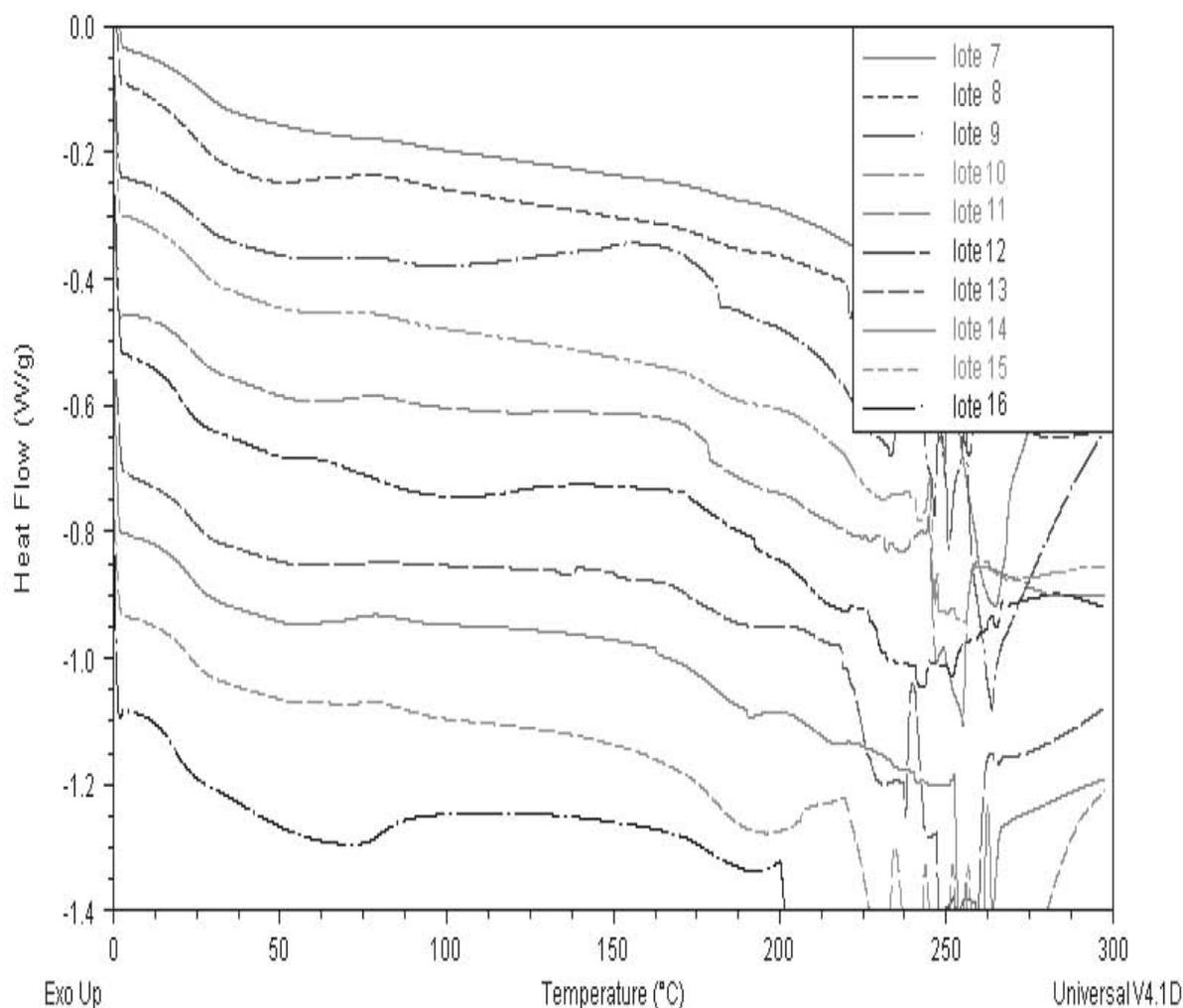


Figura 30. Termogramas de lotes de nanoesferas (7 a 16). Porcentaje de triclosán: lote 7, 25.93%; lote 8, 31.03%; lote 9, 35.48%; lote 10, 39.39%; lote 11, 42.86%; lote 12, 45.95%; lote 13, 48.72%; lote 14, 51.22%; lote 15, 53.49%; lote 16, 55.56%.

La forma de las nanopartículas y tamaño así como el efecto plastificante del activo con el polímero también se puede observar en la figura 33, fotografías tomadas por la técnica de microscopía electrónica de transmisión. Particularmente en la figura 33 C y D, se muestra que las nanoesferas coalescen para dar lugar a una partícula más grande para después formar una película.

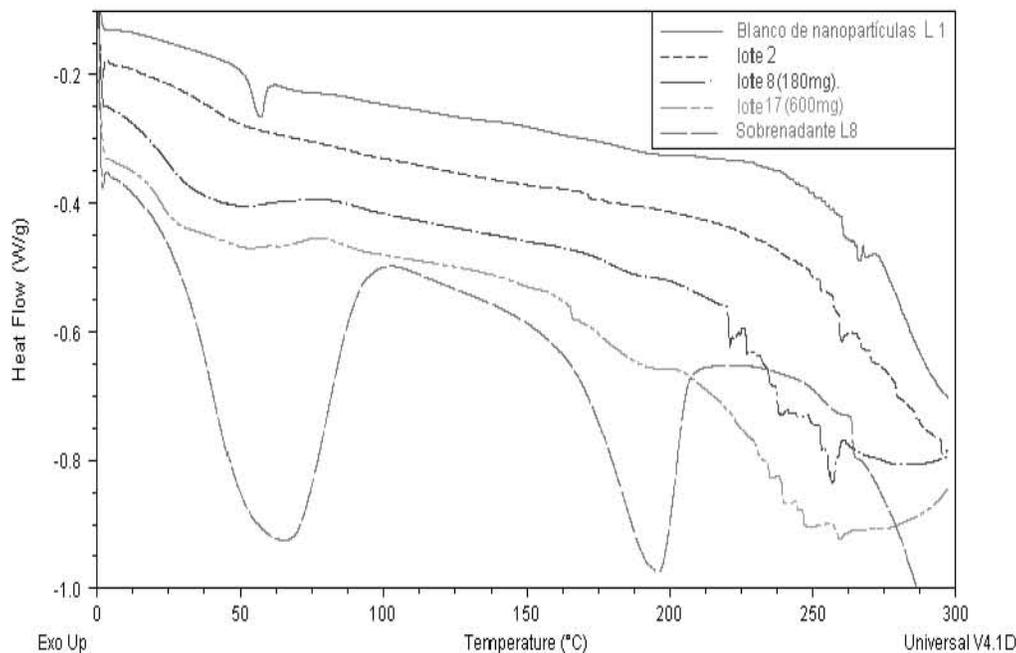


Figura 31. Termogramas del sobrenadante del lote 8 y de lotes de nanoesferas. Porcentaje de triclosán en lotes de nanoesferas: lote 1, 0%; lote 2, 4.76%; lote 8, 31.03%; lote 17, 60%.

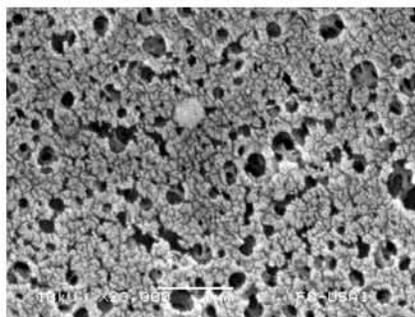


Figura 32. Micrografía de nanoesferas (SEM), lote 8 (31.03% de triclosán). La barra representa 1 micra.

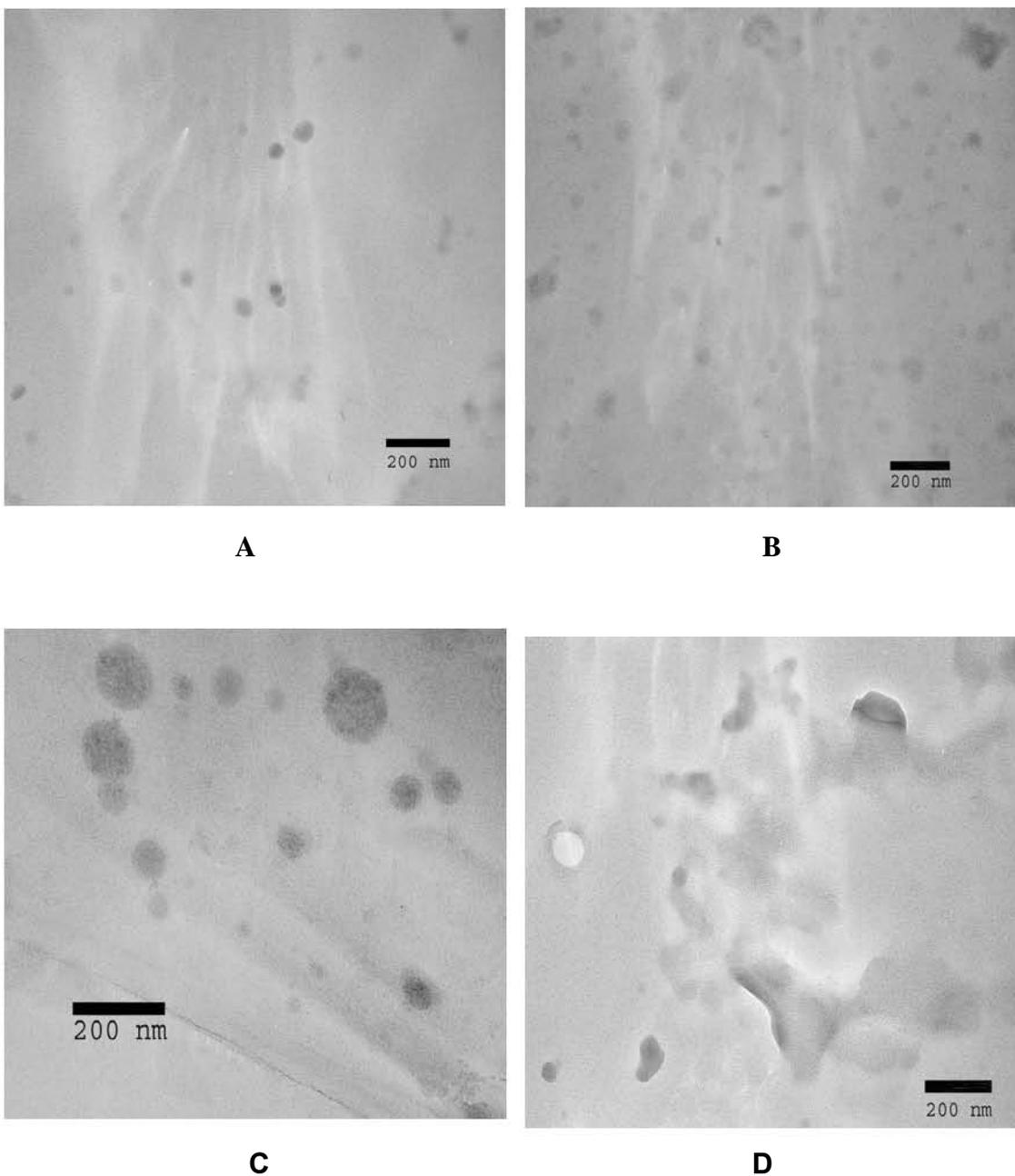


Figura 33. Micrografías de nanoesferas, lote 8 (31.03% de triclosán). Microscopía electrónica de transmisión. Aumento de 40 000 X. La barra representa 200 nm.

Si se observa el comportamiento térmico del triclosán en la figura 29, se puede distinguir una exoterma en 220 °C, este exoterma es incrementado conforme se

aumenta la cantidad de triclosán en los lotes de nanopartículas (figura 30), hasta llegar a una temperatura de 200 °C, lo que sugiere que los exotermas pueden ser debidas a algunas reacciones químicas que toman lugar a altas temperaturas entre el triclosán y el Eudragit E 100. La endoterma relacionada con la fusión del triclosán se observó con mayor claridad en el lote 8 a la misma temperatura, como lo muestran las figuras 30 y 31, es por ello que se eligió dicho lote para determinarle la eficiencia de encapsulamiento, pues a partir de lote 8 en adelante se observa que la endoterma se va definiendo, indicativa que el triclosán se encuentra en forma de cristales y por ende fuera de la nanoesfera. Es importante destacar que el lote 17 (ver figura 31), que contiene la mayor cantidad de triclosán (60%) concuerda con la mayor definición correspondiente para la fusión del triclosán, pero no con la cantidad de triclosán que contiene pues dicha cantidad es superior a la del polímero.

Es así que se procedió a liofilizar el sobrenadante obtenido del primer proceso de lavado-centrifugado y se evaluó su termograma (ver figura 31). El comportamiento térmico muestra dos eventos endotérmicos a dos temperaturas que coinciden con la fusión del triclosán y del PVAL, el primer pico se puede atribuir al triclosán en mayor medida pues se sugiere que al estar éste en exceso (no disperso molecularmente) se formaron nanocristales de triclosán que quedaron en el sobrenadante (por ser menos densos que las nanopartículas no se lograban quedar del todo en el fondo del tubo al centrifugar), y como éste se eliminaba (pues el proceso de lavado-centrifugado se realizaba tres veces remplazando con agua), también se eliminaba el exceso de triclosán en las nanopartículas, por lo cual en los lotes de nanopartículas no aparecía una endoterma de mayor magnitud relacionada con la fusión del triclosán. Además el PVAL es un surfactante que ayudó a disolver una pequeña parte del exceso de triclosán en las nanopartículas en el sobrenadante.

Como se mencionó anteriormente se calculó la cantidad de triclosán presente en las nanoesferas del lote 8 cuyo porcentaje de triclosán con el cual fue preparado es de 31.03% como se muestra en la tabla 15. Leroux y colaboradores introducen un factor de

corrección para evitar una sobreestimación de la eficiencia de encapsulamiento pues cierta cantidad de PVAL se adsorbe en la superficie de las nanopartículas durante el proceso de obtención de las mismas. Diversos colaboradores no consideran el factor de corrección antes señalado. En el presente trabajo no se realizó ninguna corrección considerando la cantidad presente de estabilizante, pues este fue separado por filtración, al disolver las nanopartículas en etanol (solvente en donde el polivinil alcohol es insoluble). Las fórmulas empleadas para calcular la cantidad de triclosán cargado y la eficiencia de encapsulamiento se muestran a continuación:⁷³

$$\text{Triclosán cargado (\%)} = \frac{\text{Cantidad de triclosán en nanoesferas}}{\text{Cantidad de nanoesferas}} \times 100$$

$$\text{E.E. (\%)} = (\% \text{ de triclosán cargado} / \% \text{ triclosán inicial}) \times 100$$

Tabla 15. Porcentajes de triclosán y Eudragit E100 de cada lote preparado

Lote	Polímero Eudragit E100 (mg)	Polímero %	Triclosán (mg)	Triclosán %
1	400	100,00	0	0,00
2	400	95,24	20	4,76
3	400	90,91	40	9,09
4	400	86,96	60	13,04
5	400	83,33	80	16,67
6	400	80,00	100	20,00
7	400	74,07	140	25,93
8	400	68,97	180	31,03
9	400	64,52	220	35,48
10	400	60,61	260	39,39
11	400	57,14	300	42,86
12	400	54,05	340	45,95
13	400	51,28	380	48,72
14	400	48,78	420	51,22
15	400	46,51	460	53,49
16	400	44,44	500	55,56
17	400	40,00	600	60,00

Los resultados obtenidos del lote 8 para las tres determinaciones se muestran a continuación (Tabla 16).

Tabla 16. Porcentajes de triclosán y Eudragit E 100 de cada lote

%Triclosán cargado	Promedio	E.E. (%)	Promedio
29,32	29,46	94,43	95,86
29,60		97,83	
30,38		95,33	

El porcentaje de eficiencia de encapsulamiento es aceptable, lo que indica que la técnica de emulsificación–difusión por desplazamiento solvente, no solo da buenos rendimientos en los lotes, sino que también se logra encapsular prácticamente todo el fármaco colocado.

Permeaciones in vitro de triclosán en las dos formulaciones comerciales y el sistema nanoparticulado propuesto.

Una vez que las nanoesferas se caracterizaron, se realizaron las permeaciones *in vitro* de las nanopartículas y las dos formulaciones comerciales. Se utilizó como modelo animal piel de cerdo ya que en estudios previos realizados *in vitro* se ha visto que tiene propiedades histológicas y fisiológicas similares a la piel humana.

Los promedios de los resultados obtenidos se muestran en la tabla 17. Los resultados numéricos obtenidos de las permeaciones se muestran en el anexo III para más detalle.

Tabla 17. Promedios de los resultados obtenidos en las permeaciones de las tres formulaciones estudiadas.

		Clean & Clear®	Dermobras®	Nanopartículas
Flujo (mcg/cm ² h)	2 primeras horas	6.276487 ± 3.2887	6.345663 ± 1.3652	10.667516 ± 5.1327
	6 últimas horas	4.837057 ± 1,5926	4.094150 ± 1.1712	2.061117 ± 0.9245
Cp (ml h cm ²)	2 primeras horas	0.002408 ± 0.0012	0.000607 ± 0.0001	0.000593 ± 0.0003
	6 últimas horas	0.001856 ± 0.0006	0.000392 ± 0.0001	0.000115 ± 0.0001
Q acum / C (ml)		0.013725 ± 0.0040	0.003580 ± 0.0009	0.002062 ± 0.0010
Q retenida / C (ml)		0.002315 ± 0.0015	0.006557 ± 0.0010	0.001592 ± 0.0004
Q acum (mcg)		35.7683 ± 10.3431	37.4225 ± 9.0596	37.1209 ± 17.1931
Q retenida (mcg)		6.0317 ± 3.7864	68.5491 ± 10.0113	28.6607 ± 7.1353

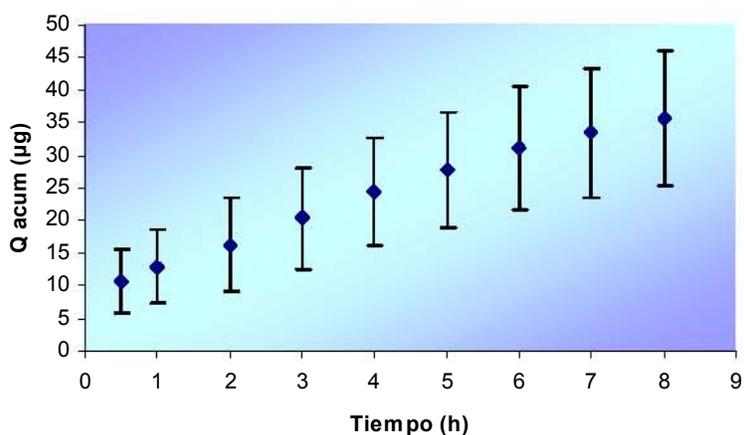


Figura 34. Cinética de permeación de triclosán en la formulación Clean & Clear® a través de piel de cerdo (n=9).

La figura 34 muestra las cantidades de triclosán acumuladas durante ocho horas para la solución Clean & Clear[®], como se puede observar a pesar de que dichas cantidades son muy bajas, fue posible determinarlas, pues se encontraban por arriba del límite de cuantificación determinado.

Es importante destacar que aunque se homogenizó el grosor de la piel de la oreja de cerdo con un dermatoma y el estudio se realizó doce veces, los resultados de la cinética de permeación de triclosán en la solución muestran que las variaciones de celda a celda fueron muy grandes y que éstas aumentan conforme se incrementa el tiempo de permeación. Estas variaciones pueden ser debidas a que el grosor de la piel no era exactamente el mismo (el rango de espesor de las membranas utilizadas fue de 650-700 μm , medidas tomadas por un micrómetro digital), pues éste depende de la fuerza y superficie que se le suministre al dermatoma, además las porciones utilizadas de piel no fueron de la misma zona de la oreja y quizá la composición y el grosor del estrato córneo era diferente. Además, hay que considerar que no se tiene control sobre la edad y raza de los cerdos, lo cual puede influir de manera importante.

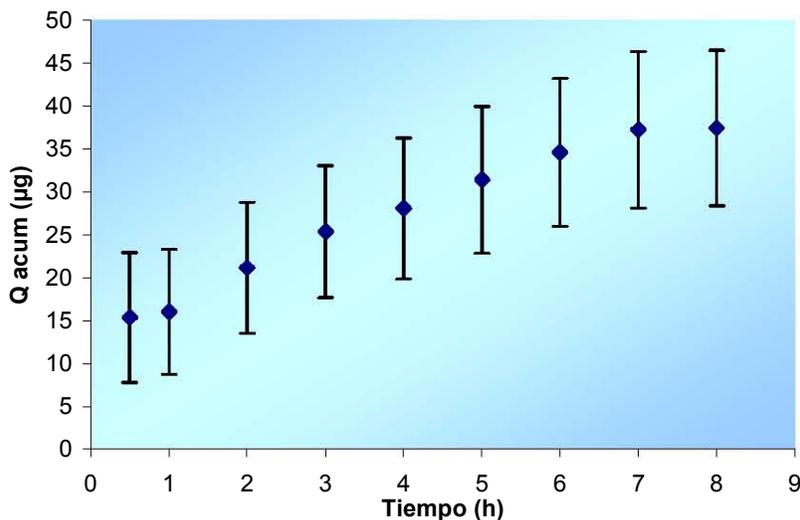


Figura 35. Cinética de permeación de triclosán en la formulación Dermobras[®] a través de piel de cerdo (n=6).

La figura 35, muestra los resultados obtenidos para la cinética de permeación de triclosán en la crema Dermobras. Podemos observar que esta cinética muestra las desviaciones estándar más bajas y por ende las variaciones más bajas, que las de la solución Clean and Clear® y las de las nanopartículas, éstas últimas son las más altas (Ver figura 36, y Anexo III). Como se mencionó anteriormente éstas variaciones pueden ser atribuibles a los diferentes grosores de la piel de cerdo utilizada y a la variación interindividual, por proceder la piel de diferentes cerdos.

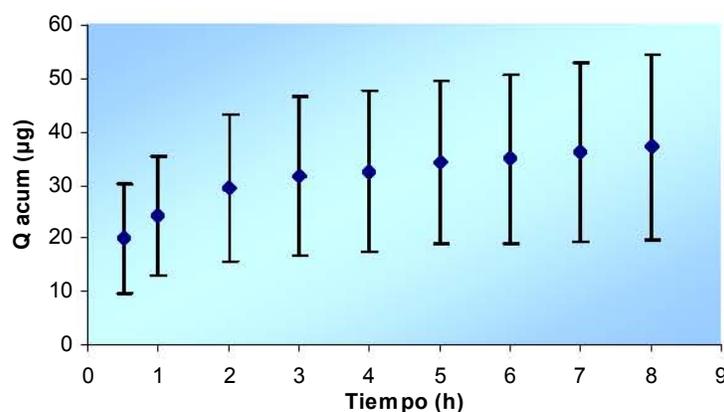


Figura 36. Cinética de permeación de triclosán en nanopartículas a través de piel de cerdo (n=5).

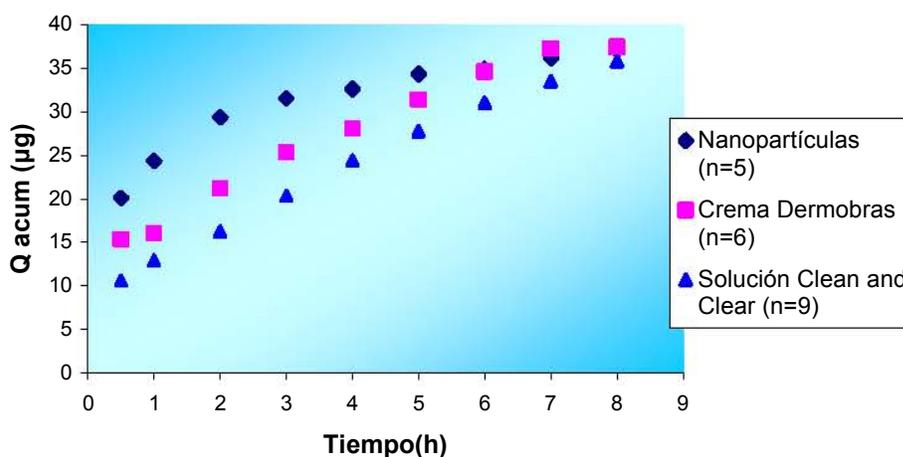


Figura 37. Cinética de permeación de triclosán a partir de tres formulaciones a través de piel de cerdo.

En la figura 37, se puede observar el comportamiento de las cinéticas de permeación de triclosán de las tres formulaciones estudiadas, las tres cinéticas tienen un comportamiento similar y las tres tienen un promedio de cantidad de triclosán total permeado casi idéntico, sin embargo se esperaba que el triclosán contenido en las nanopartículas permeara en mayor proporción, ya que por su tamaño éstas penetran a través de los folículos pilosos y en los intersticios dérmicos, donde se localiza el sitio blanco para combatir a la bacteria *P. acnes* responsable de las lesiones del acné. Sin embargo, las diferencias en el triclosán total permeado a partir de las tres formulaciones son mínimas y debe relacionarse con la concentración de triclosán para cada formulación, debido a que la concentración del fármaco influye en la cantidad que pueda penetrar a través del estrato corneo.

El coeficiente de permeabilidad (Cp) es el cociente del flujo de triclosán que pasa al compartimento receptor por unidad de tiempo entre la concentración de triclosán en cada formulación, éste parámetro fue obtenido de las dos primeras y de las seis últimas horas para las tres formulaciones. En la figura 37, las pendientes de cada cinética son un tanto diferentes, y no se observa ningún período de latencia (tiempo necesario para la penetración de la sustancia al interior de las estructuras córneas y para el establecimiento de un gradiente de difusión), sino que el fármaco de inmediato empieza a permear en la piel. Es por ello que se realizó un análisis de varianza de los coeficientes de permeabilidad (pues éstos se determinaron a partir de las pendientes de las dos primeras horas y de las seis últimas horas) para saber si eran significativamente diferentes en las tres formulaciones (Tabla 18 y 19).

Tabla 18. Análisis de varianza para el Coeficiente de Permeabilidad (ml h cm²) de las tres formulaciones estudiadas. (Dos primeras horas)

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	0,0000145161	2	0,00000725807	9,47	0,0022
Within groups	0,0000114943	15	7,66284E-7		
Total (Corr.)	0,0000260104	17			

Con ayuda del programa Stat graphics v 5.0 se realizaron la mayoría de los análisis estadísticos, el resto se obtuvo mediante la hoja de cálculo Excel. De acuerdo a los resultados del análisis de varianza para el Cp para las dos primeras horas (Tabla 18), desde que el valor de P de la prueba de F es menor que 0.05, hay una diferencia estadísticamente significativa entre las medias del coeficiente de permeabilidad de una formulación a otra en el 95% del nivel de confianza.

Tabla 19. Análisis de varianza para el Coeficiente de Permeabilidad (ml h cm²) de las tres formulaciones estudiadas. (Seis últimas horas)

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	0,0000119396	2	0,00000596982	31,23	0,0000
Within groups	0,00000305838	16	1,91149E-7		
Total (Corr.)	0,000014998	18			

En la tabla 19 se muestra el análisis de varianza para el Cp de las seis últimas horas, como el valor de P de la prueba de F es menor que 0.05, hay una diferencia estadísticamente significativa entre las medias del coeficiente de permeabilidad de una formulación a otra con un 95% de confianza.

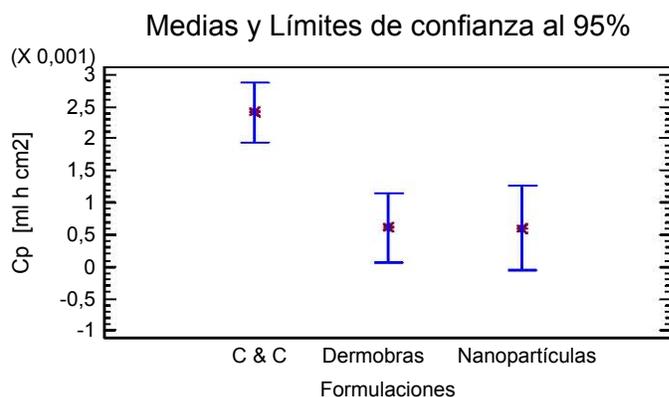


Figura 38. Comportamiento de los coeficientes de permeabilidad de las dos primeras horas para cada formulación.

La constante de permeabilidad caracteriza el poder de penetración de una sustancia a través de una membrana dada; será tanto más elevada cuanto mayor sea dicho poder.

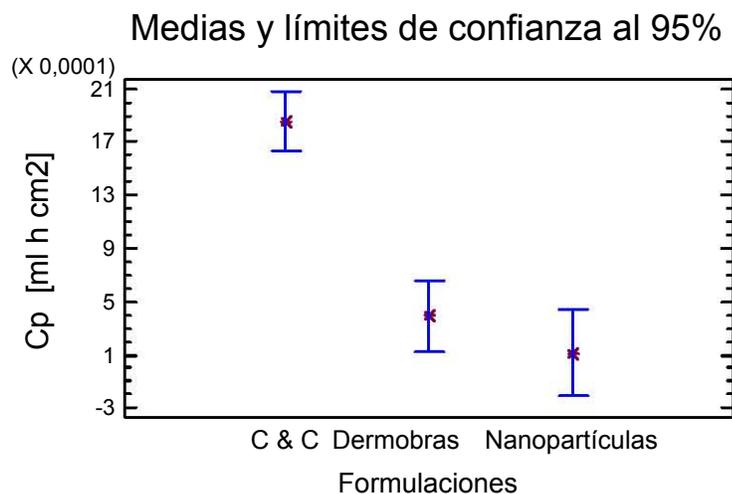


Figura 39. Comportamiento de los coeficientes de permeabilidad de las seis últimas horas para cada formulación.

Como se observa en las figuras 38 y 39, el coeficiente de permeabilidad para la solución Clean & Clear[®] es mayor que el de la crema Dermobras[®] y el del sistema nanoparticulado para las dos primeras horas y para las seis últimas horas, es decir que la capacidad de penetración del triclosán en la solución fue mayor que en las dos formulaciones restantes, esto pudo deberse probablemente a la composición de cada formulación, pues la solución Clean & Clear[®] contiene mayor cantidad de surfactantes que la crema Dermobras[®], como lauril éter sulfato de sodio (tensoactivo aniónico), lauril poliglucosa (tensoactivo aniónico), cocoato de glicerilo (tensoactivo no iónico), monoetanolamida de coco (tensoactivo no iónico).

Los promotores de absorción tal como los surfactantes actúan directamente en los espacios intercelulares del estrato córneo, que es la mayor ruta de difusión para los fármacos de naturaleza lipofílica.

Los surfactantes aniónicos contienen generalmente uno de cuatro grupos polares solubles: carboxilato, sulfonato, sulfato o fosfato; combinado con una cadena hidrocarbonada hidrófoba. Si esa cadena es corta son muy hidrosolubles, y en caso contrario tendrán baja hidrosolubilidad y actuarán en sistemas no acuosos como aceites lubricantes. Por lo tanto el lauril éter sulfato de sodio y el lauril poliglucosa contenidos en la solución Clean & Clear[®], proporcionaron probablemente un incremento del paso del principio activo, ya que dichos surfactantes pudieron haber interactuado en la región hidrófoba de la bicapa lipídica. No obstante, a pesar de la eficiencia de penetración del triclosán en la solución Clean & Clear[®], no hay que olvidar que los surfactantes iónicos pueden tener un efecto irritante. De hecho, suele haber una relación directa entre el efecto promotor y el efecto irritante de un surfactante.^{1, 74, 75.}

En estudios realizados con ácidos grasos se ha encontrado que la magnitud de la promoción de penetración está relacionada con la estructura del compuesto (con la posición de los dobles enlaces, los tipos de isómeros, el grado de ionización y la longitud de la cadena). Se ha visto que la cadena linear alquílica de 12 átomos de carbono (C₁₂) maximiza el efecto de un surfactante sobre la permeabilidad de la membrana. La cadena C₁₂ tiene una solubilidad intermedia entre aceite/agua y por lo tanto, puede penetrar en la bicapa lipídica. Para una serie de éteres de polioxietileno, el éter laurico demostró ser un promotor más efectivo para el ibuprofeno que el éter oleico.¹

El mecanismo de acción de los surfactantes no iónicos se relaciona con la partición dentro de los lípidos intercelulares del estrato córneo, lo cual resulta en un incremento de la fluidez de fármaco en ésta región, en este caso el triclosán, disminuyendo la resistencia de la membrana y por tanto penetrando en mayor proporción como sucedió con la solución Clean & Clear[®].¹

Tabla 20. Prueba de Duncan para el Coeficiente de Permeabilidad (ml h cm²) de las tres formulaciones estudiadas. (Dos primeras horas)

Multiple Range Tests for Cp [ml h cm2] by Formulaciones

Method: 95,0 percent Duncan

Formulaciones	Count	Mean	Homogeneous Groups
Nanopartículas	4	0,00059264	X
Dermobras	6	0,000606972	X
Clean and C	8	0,00240845	X

Contrast	Difference
Clean and C - Dermobras	*0,00180148
Clean and C - Nanopartículas	*0,00181581
Dermobras - Nanopartículas	0,0000143326

* denotes a statistically significant difference.

Para determinar qué medias de Cp de las tres formulaciones para las dos primeras y seis últimas horas, son significativamente diferentes se realizó la prueba de Duncan la cual se muestra en las Tablas 20 y 21 respectivamente. La tabla 20, aplica un procedimiento de comparación múltiple para determinar qué medias son significativamente diferentes entre ellas. El contraste muestra las diferencias estimadas entre cada par de medias, un asterisco indica que esos pares son estadísticamente significantes con un nivel de confianza del 95%. El método generalmente usado para diferenciar las medias es el procedimiento de comparación múltiple de Duncan.

Tabla 21. Prueba de Duncan para el Coeficiente de Permeabilidad (ml h cm²) de las tres formulaciones estudiadas. (Seis últimas horas)

Method: 95,0 percent Duncan

Formulaciones	Count	Mean	Homogeneous Groups
Nanopartículas	4	0,000114506	X
Dermobras	6	0,000391612	X
Clean and C	9	0,00185611	X

Contrast	Difference
Clean and C - Dermobras	*0,00146449
Clean and C - Nanopartículas	*0,0017416
Dermobras - Nanopartículas	0,000277105

* denotes a statistically significant difference.

En la tabla 21, también aplica un procedimiento de comparación múltiple para determinar que medias son significativamente diferentes entre ellas. Un asterisco indica que esos pares son estadísticamente significantes con un nivel de confianza del 95%.

Observando las figuras 38 y 39 así como y las tablas 20 y 21, se puede decir que no hay diferencia estadísticamente significativa entre el coeficiente de permeabilidad de la crema Dermobras® y el sistema nanoparticulado, lo cual no se esperaba pues las nanopartículas tuvieron la mayor concentración de triclosán (18,000µg/ml), y como se mencionó anteriormente la concentración del fármaco influye en la cantidad que pueda penetrar a través del estrato corneó, sin embargo el sistema nanoparticulado además de ser propuesto como un nuevo sistema de aplicación tópica tiene la ventaja de no causar más irritaciones en pieles acneicas, pues en la mayoría de las formulaciones se adicionan agentes promotores (surfactantes, alcoholes, o queratolíticos) que promueve la penetración del fármaco pero que además son agentes irritantes que podrían dejar severas cicatrices, por ello se propuso que el sistema nanoparticulado no contuviera ningún agente que fungiera como promotor irritante, y que las nanopartículas penetraran por su tamaño nanométrico en los intersticios dérmicos y en los folículos pilosos y una vez ahí liberaran de forma controlada el triclosán.

Es importante señalar que aunque al final la cantidad permeada es muy similar para las tres formulaciones, en el caso de la formulación de nanopartículas, la cantidad promedio de triclosán que pasa en las dos primeras horas es superior que en las seis últimas horas (aunque hay que considerar la alta variabilidad que se observó con esta formulación). Así, se piensa que la razón por la que el coeficiente de permeabilidad en las nanopartículas no es mayor que en la crema es porque la formulación de la crema también contiene surfactantes como el lauril sulfato de sodio (tensoactivo aniónico), éste promotor actúa a nivel proteico interactuando con la queratina, cambiando la configuración proteica y abriendo canales de agua dentro del corneocito. Algunos de los promotores al interactuar con proteínas intracelulares solvatan el contenido celular,

desplazan la unión del agua, expanden la estructura y compiten con el fármaco por sitios de unión con el hidrógeno. Estearat-20 (emulsificante primario) también está contenido en la crema, además ésta formulación es un limpiador dermoabrasivo con partículas de óxido de aluminio y agentes limpiadores especiales para disolver los tapones de sebo, permitiendo que el triclosán pudiera penetrar en el estrato corneo con la misma capacidad que en el sistema nanoparticulado.^{1, 76}

Es importante señalar que la piel irritada o lacerada favorece la penetración de los fármacos, pues el estrato córneo constituye la verdadera barrera que se opone al paso a través de la piel de los xenobióticos, en general, y de los fármacos, en particular. Cuando se elimina el estrato córneo, el resto de la epidermis se comporta como cualquier otra capa mucosa. En el caso de la epidermis, se trata de una estructura constituida por estratos pluricelulares, mientras que las mucosas son, en general, estratos unicelulares. Esta diferenciación se traduce en el hecho de que el paso de los fármacos a través de la epidermis es más lento que en otras mucosas, al ser mayor el espesor que debe atravesar el principio activo.⁸

Como se mencionó con anterioridad la irritación favorece la penetración de fármaco y las formulaciones comerciales además de contener tensoactivos, queratolíticos y alcoholes, también contienen agentes humectantes como el polietilenglicol, propilenglicol, colágeno (la hidratación de la piel mejora su permeabilidad) y conservadores irritantes como EDTA, ácido cítrico, los cuales coadyuvieron a la penetración del triclosán.^{76, 77}

Como se observa en la figura 37, la cantidad de triclosán total permeada es similar en las tres formulaciones, dichas cantidades fueron divididas entre la concentración de cada formulación por que ésta era diferente para cada una, pues es así como se conoce realmente que formulación obtuvo más cantidad de triclosán total permeada. Para saber si había diferencias significativas entre el cociente de la cantidad

de triclosán total permeada y la concentración para cada formulación se realizó un análisis de varianza, el cual se muestra a continuación:

Tabla 22. Análisis de varianza para la cantidad de triclosán total permeada /concentración de las tres formulaciones estudiadas.

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	0,000587434	2	0,000293717	37,42	0,0000
Within groups	0,000133422	17	0,00000784838		
Total (Corr.)	0,000720856	19			

El análisis de varianza para CTPP/ concentración mostrado en la tabla 22, indica que como un valor de P de la prueba de F es menor que 0.05, hay una diferencia estadísticamente significativa entre las medias para cada cociente de CTPP/concentración para cada formulación en el 95% de confianza de cada nivel.

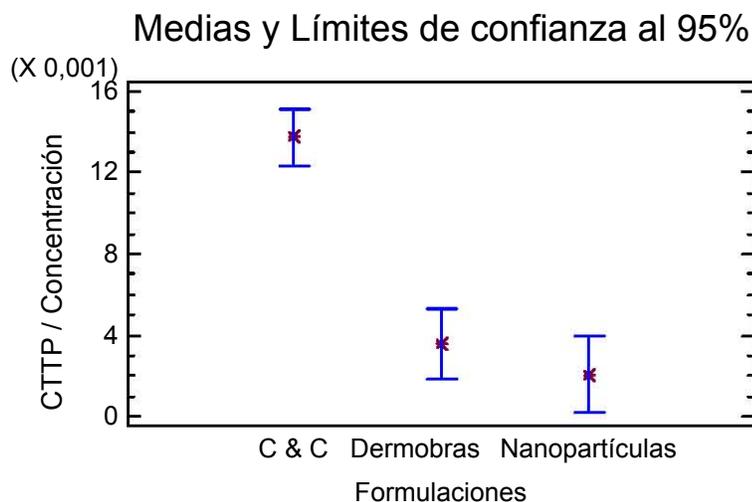


Figura 40. Comportamiento de la cantidad de triclosán total permeado entre la concentración para cada formulación.

La figura 40, muestra las medias y los límites de confianza de los cocientes de la cantidad de triclosán permeada y la concentración, al igual que el coeficiente de permeabilidad la formulación de Clean & Clear® presenta los valores más altos, indicando por tanto que fue la formulación que permitió el paso de mayor cantidad de triclosán al final de la permeación (a las ocho horas del estudio de permeación), lo cual es atribuible a los surfactantes contenidos en dicha solución, pues estos interfieren con los lípidos intracelulares del estrato córneo, produciendo una mayor fluidez del fármaco y así un mayor incremento de éste en el final de la permeación.

Para determinar qué medias de cocientes de CTPC/concentración, son significativamente diferentes se realizó la prueba de Duncan la cual se muestra en la tabla 23.

Tabla 23. Prueba de Duncan para la cantidad de triclosán total permeado entre la concentración de cada una de las formulaciones estudiadas.

Multiple Range Tests for CTPC by Formulaciones

Method: 95,0 percent Duncan

Formulaciones	Count	Mean	Homogeneous Groups
Nanopartículas	5	0,00206227	X
Dermobras	6	0,00357952	X
Clean and C	9	0,0137252	X

Contrast	Difference
Clean and C - Dermobras	*0,0101457
Clean and C - Nanopartículas	*0,011663
Dermobras - Nanopartículas	0,00151725

* denotes a statistically significant difference.

La tabla 23, Muestra las diferencias estimadas entre cada par de medias. Un asterisco ha sido colocado junto a dos pares de medias, indicando que esos pares son estadísticamente significantes con un nivel de confianza del 95%. En la parte superior de la tabla se muestran dos grupos homogéneos correspondientes a las nanopartículas

y a la crema Dermobras identificados por una X, los cuales no son significativamente diferentes. El método generalmente usado para diferenciar las medias es el procedimiento de comparación múltiple de Duncan.

En la figura 40 y en las tablas 20, 21 y 23, se aprecia que no hay diferencia significativa de la CTTP/concentración y C_p , entre la crema y el sistema nanoparticulado, pues se esperaría que el triclosán penetrara en mayor proporción en la crema por contener agentes promotores, por tanto se puede decir que las nanopartículas son una formulación que además de proporcionar una cantidad aceptable de fármaco en el sitio blanco, evita la irritación en la piel acneica.

Lo anterior nos permite suponer que la cantidad de triclosán obtenido al finalizar la permeación en la crema fue menor que en la solución debido probablemente a la presentación de la formulación en el caso de la crema, pues el triclosán por su naturaleza lipofílica favorecería su permanencia en la crema por ser más viscosa y de carácter lipofílica como el triclosán. Por tanto se sugiere que en el caso de la solución C & C, el triclosán pasó en mayor cantidad por que la solución no era tan viscosa como la crema (además el activo ya estaba disuelto en la solución lo que mejoro su permeabilidad en la piel) y la cantidad y/o tipo de emolientes no era mayor que en la crema. Sin embargo no es posible afirmar que la solución C & C[®] contiene una mayor cantidad de cada surfactante, pues esto no se puede saber porque está patentada la solución, al igual que la crema Dermobras[®].

En cuanto a la cantidad de triclosán retenida en el tejido utilizado en las permeaciones de cada formulación, ésta se relacionó con la concentración al igual que en caso anterior. Se realizó un análisis de varianza para conocer las diferencias estadísticamente significativas. En éste análisis se utilizó etanol como medio de disolución, pues el principio activo presenta una solubilidad de 1 mg/1mL de acuerdo a la literatura.⁶⁶

Tabla 24. Análisis de varianza para la cantidad de triclosán retenida en piel de cerdo/concentración de las tres formulaciones estudiadas.

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	0,0000651397	2	0,0000325698	30,05	0,0000
Within groups	0,000014092	13	0,000001084		
Total (Corr.)	0,0000792316	15			

La tabla 24, indica que como el valor de P de la prueba de F es menor que 0.05, hay una diferencia estadísticamente significativa entre las medias de los cocientes de las cantidades de triclosán retenidas en piel y la concentración para cada formulación estudiada con un 95% de confianza.

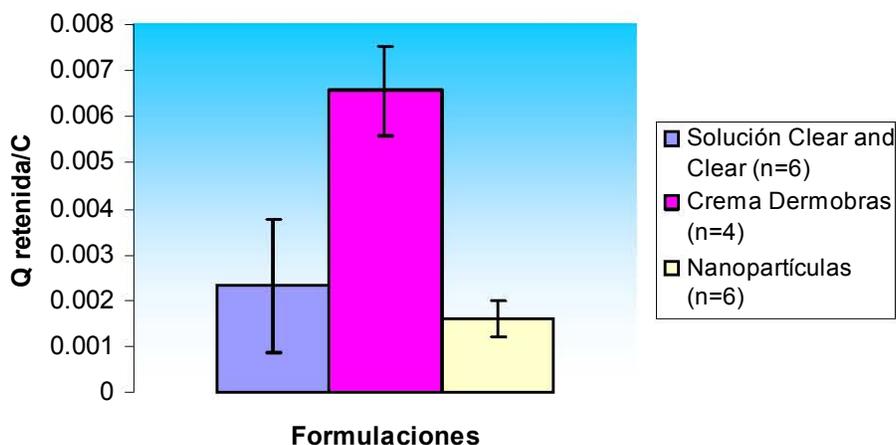


Figura 41. Triclosán retenido en piel de cerdo/concentración de las formulaciones.

En la figura 41, se aprecia que el cociente de la cantidad de triclosán retenida en piel y la concentración de las formulaciones fue mayor en la crema Dermobras que en las formas restantes, por lo cual puede suponerse que los componentes de la crema, en

particular los emolientes como las ceras o el miristato de isopropilo (utilizados como espesantes y estabilizantes en emulsiones) favorecieron la permanencia del triclosán en la piel, ya que al lavar la piel una vez que se finalizaron las cinéticas de permeación, la piel que había sido utilizada en la crema se percibió al tacto un tanto grasosa. Por lo que se piensa que el triclosán quedo retenido en la piel (en los componentes de la formulación que quedaron), una vez que fue lavada. Para determinar que medias de cocientes de Q retenida/C, son significativamente diferentes se realizó la prueba de Duncan la cual se muestra en la tabla 25.

Tabla 25. Prueba de Duncan para la cantidad de triclosán retenido en piel de cerdo entre la concentración de cada una de las formulaciones estudiadas.

Method: 95,0 percent Duncan			
Formulaciones	Count	Mean	Homogeneous Groups
Nanopartículas	6	0,00159226	X
Clean and C.	6	0,00231454	X
Dermobras	4	0,00655683	X
Contrast			Difference
Clean and C. - Dermobras			*-0,00424229
Clean and C. - Nanopartículas			0,000722277
Dermobras - Nanopartículas			*0,00496456

* denotes a statistically significant difference.

La tabla 25, aplica un procedimiento de comparación múltiple. El contraste muestra las diferencias estimadas entre cada par de medias. Un asterisco ha sido colocado junto a dos pares de medias, indicando que esos pares son estadísticamente significantes con un nivel de confianza del 95%. En la parte superior de la tabla se muestran dos grupos homogéneos correspondientes a las nanopartículas y a la solución Clean & Clear® identificados por una X, los cuales no son significativamente diferentes.

Con lo que respecta el cociente de la cantidad de triclosan retenida y la concentración de la solución, este no presenta una diferencia significativa con el cociente para las nanopartículas (Fig. 41 y Tabla 25). Retomando lo anterior para el caso de la crema, se sugiere que la razón por la que el triclosán contenido en la solución C & C no quedó retenido en la piel como en el caso de la crema, fue por que la solución C & C no contiene componentes tan grasos ni viscosos, por el contrario cuando se lavó la piel utilizada para dicha cinética de permeación, esta tenía una textura lisa, y jabonosa, por lo que la piel quedo más limpia. El triclosán retenido en piel utilizada para las permeaciones con nanopartículas fue similar a la de la solución. De éste modo podemos decir que el triclosán obtenido de la extracción en piel del sistema nanoparticulado se debió a las nanopartículas incrustadas en la piel y su compatibilidad en el tejido, pues tal sistema no contiene ningún otro componente más que agua destilada y nanopartículas poliméricas.⁷⁷

Se puede decir que el sistema nanoparticulado puede ser un tratamiento adecuado que para el tratamiento de acné, ya que no contiene promotores que pudieran dañar la piel.

5. CONCLUSIONES

Mediante el método de emulsificación-difusión por desplazamiento de solvente, se lograron obtener nanoesferas con el polímero Eudragit E 100 y el principio activo triclosán.

A partir de los resultados se deduce que las condiciones en el rotavapor (velocidad y temperatura) para la preparación de nanopartículas, no afecta el tamaño de éstas, siendo en promedio de 131 nm, con alta tasa de encapsulamiento así como altos rendimientos en la eficiencia del proceso. Los estudios de microscopía electrónica de transmisión confirman la forma esférica y el tamaño de las nanoesferas.

En cuanto al tamaño, no hay una relación entre la cantidad de triclosán adicionada a los lotes y el tamaño de las nanopartículas. Se confirmó mediante los estudios de calorimetría diferencial de barrido, que el triclosán en porcentajes hasta del 31.03 %, se encontraba disperso molecularmente en la matriz polimérica.

Se visualizó una disminución en la temperatura de transición vítrea del Eudragit E 100, en lotes con alto contenido de triclosán (>31.03%), lo que indica que el triclosán está actuando como un plastificante no convencional.

Los estudios de microscopía electrónica de barrido no fueron los adecuados para visualizar las nanoesferas, pues estas tienden a coalescer, formando películas transparentes difíciles de distinguir.

Se evaluaron las cinéticas de permeación *in vitro* de triclosán para las tres formulaciones (sistema nanoparticulado y dos formas comerciales), encontrando para las tres perfiles similares.

El coeficiente de permeabilidad para la solución Clean & Clear[®] fue mayor que para la crema Dermobras[®] y para la suspensión de nanopartículas, lo cual es justificable por los tensoactivos iónicos y no iónicos que contiene y que fungen como promotores de absorción. La crema Dermobras y la suspensión de nanopartículas presentaron valores similares en el coeficiente de permeabilidad y en la cantidad total permeada de triclosán.

La suspensión de nanopartículas se presenta como una buena opción para la administración tópica de triclosán, considerando que a diferencia de las dos formulaciones comerciales, no contiene agentes promotores que pudieran provocar alguna reacción irritativa.

6. PERSPECTIVAS

Proponer nuevas estrategias para favorecer la penetración en mayor proporción de las nanopartículas a través de la piel.

Proponer formulaciones que sean menos irritantes que las que comúnmente hay, pues muchas de ellas podrían dejar cicatrices severas lejos de ayudar en el tratamiento de acné.

Realizar pruebas de irritación en la espalda aplicando el sistema nanoparticulado en un parche semioclusivo por 24 h.

Realizar pruebas de hidratación y nivel de sebo de la piel antes y después de aplicar el sistema nanoparticulado propuesto.

Para continuar los estudios realizados de permeación *in vitro*, se sugiere la evaluación *in vivo*, para tener un referente de lo que realmente sucede cuando se aplica el sistema nanoparticulado.

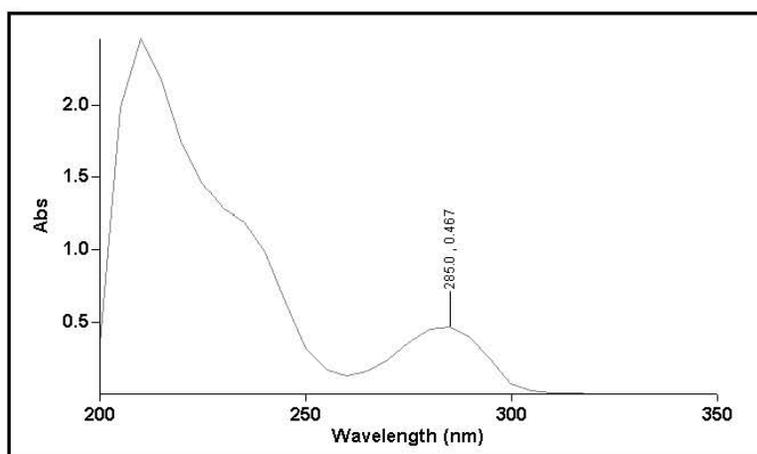
Estudiar la eficacia de las nanopartículas cargadas con triclosán contra microorganismos causantes del acné.

Por último aplicar el sistema de liberación (nanopartículas) en la piel acnéica y evaluar mediante imágenes digitales ampliadas, el tamaño y la apariencia de las lesiones (diámetro e inflamación).

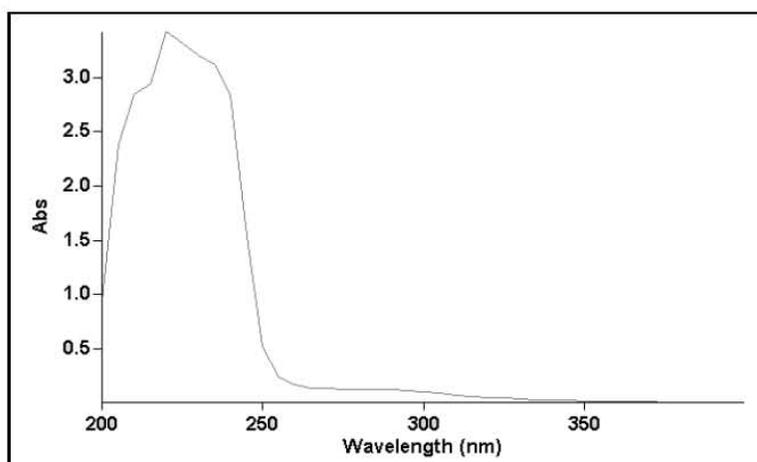
7. ANEXOS

ANEXO I. RESULTADOS DE PRUEBAS PREVIAS

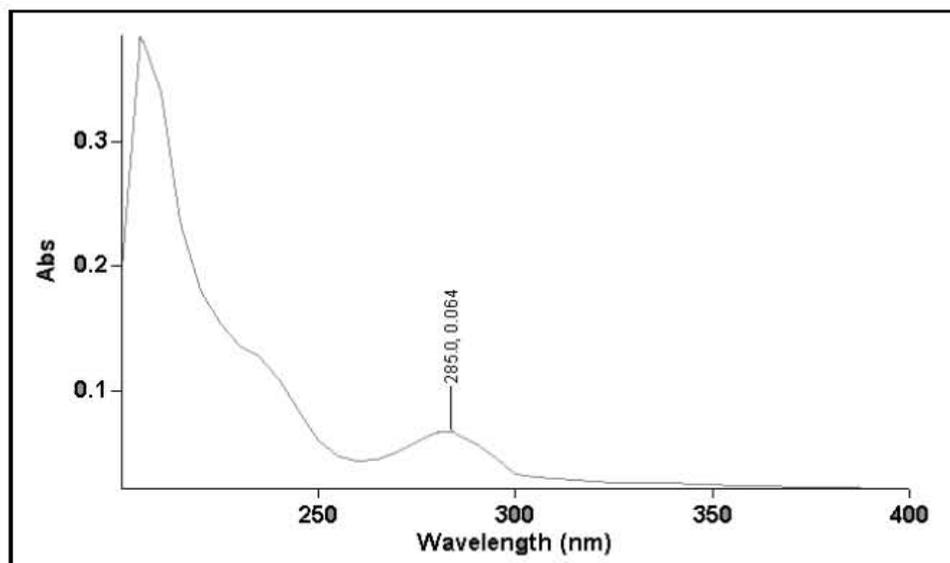
Resultados de los espectros de absorción realizados para el principio activo y para el polímero.



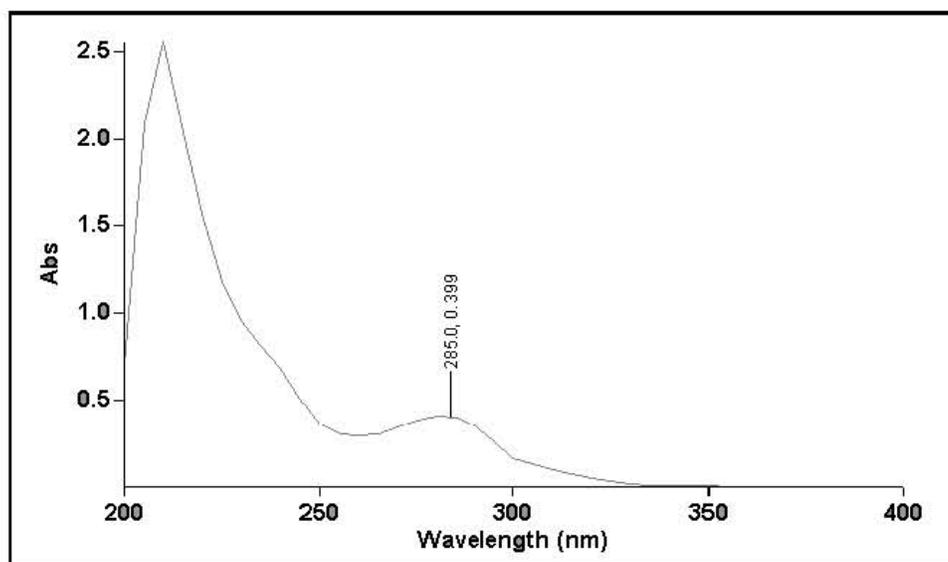
1. Barrido de Triclosán en Buffer de fosfatos pH 7.4 con Brij[®] 58 al 3% contra medio de disolución.



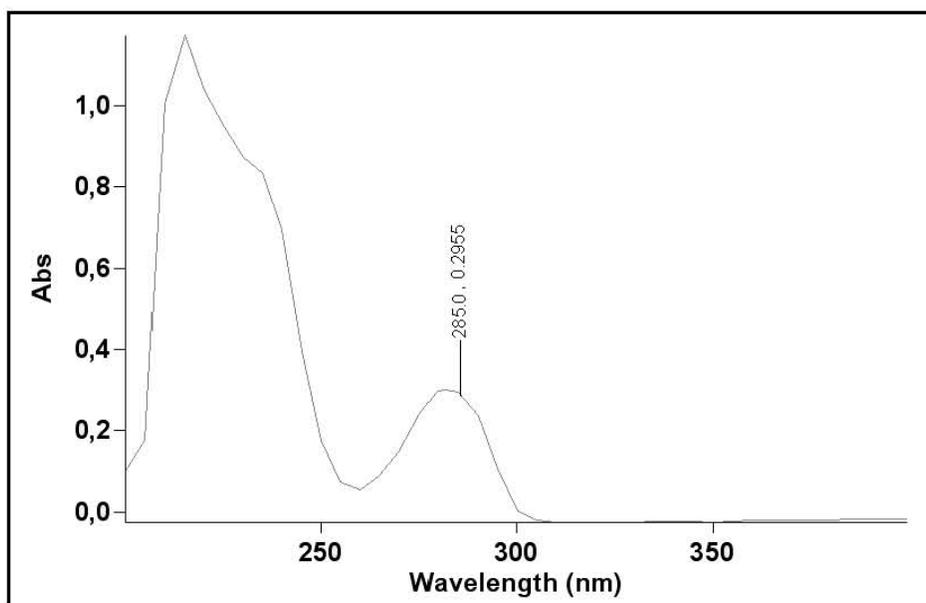
2. Barrido de Eudragit E 100 en etanol contra etanol



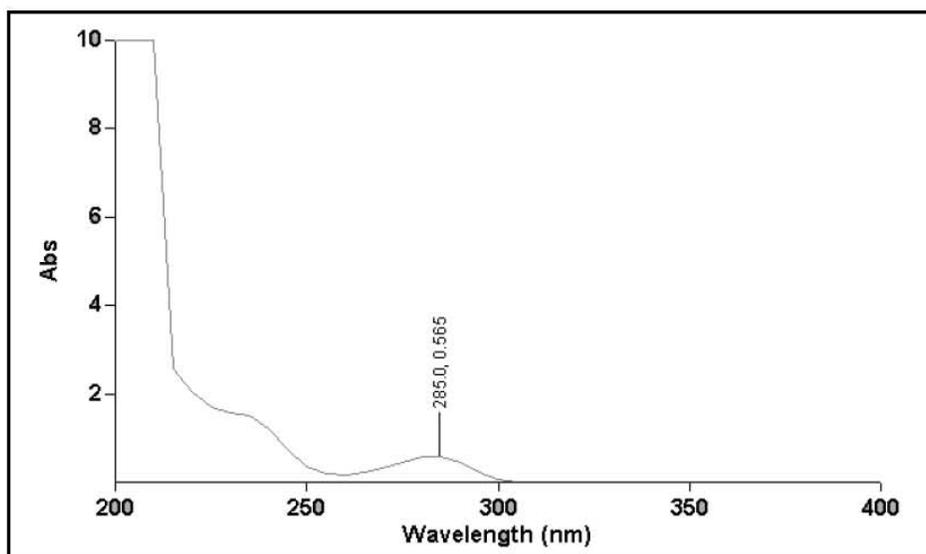
3. Barrido de triclosán contenido en la crema Dermobras[®]



4. Barrido de triclosán contenido en la formulación Clean&Clear[®]



5. Barrido de triclosán contenido en el sistema nanoparticulado..



6. Barrido de triclosán en etanol contra etanol.

Tabla 1. Solubilidad de triclosán

Temperatura (°C)	Sistema	g/L	Promedio	D.E (+/-)
25	BF pH 7,4	0,0299	0,0175	0,0109
25	BF pH 7,4	0,0136		
25	BF pH 7,4	0,0092		
25	BF pH 7,4+B 1%	0,4354	0,5214	0,5672
25	BF pH 7,4+B 1%	1,1268		
25	BF pH 7,4+B 1%	0,0022		
25	BF pH 7,4+B 3%	4,0294	3,4057	1,7876
25	BF pH 7,4+B 3%	4,7979		
25	BF pH 7,4+B 3%	1,3899		
37	BF pH 7,4	0,0039	0,0036	0,0005
37	BF pH 7,4	0,0031		
37	BF pH 7,4	0,0040		
37	BF pH 7,4+B 1%	0,0269	0,2389	0,2242
37	BF pH 7,4+B 1%	0,4736		
37	BF pH 7,4+B 1%	0,2163		
37	BF pH 7,4+B 3%	3,5403	3,67779	0,1650
37	BF pH 7,4+B 3%	3,8608		
37	BF pH 7,4+B 3%	3,6323		

Tabla 2. Resultados de la curva de calibración de triclosán en buffer de fosfatos pH 7.4 con Brij® 58 al 3%, en contacto con piel de cerdo.

Sistema	C. R mcg/ml	Abs	Promedio	D.E.	c.v (%)
1	0,4	0,0079	0,0196	0,0008	3,9001
	0,4	0,0081			
	0,4	0,0075			
2	1,6	0,0335	0,0209	0,0003	1,1940
	1,6	0,0339			
	1,6	0,0331			
3	8	0,1567	0,0194	0,0002	0,7728
	8	0,1543			
	8	0,1554			
4	12	0,2555	0,0205	0,0007	3,4439
	12	0,2442			
	12	0,2389			
5	16	0,3094	0,0190	0,0004	2,0355
	16	0,3043			
	16	0,2971			
6	32	0,6068	0,0190	0,0001	0,4850
	32	0,6125			
	32	0,6083			
7	48	0,9184	0,0189	0,0002	1,2748
	48	0,8956			
	48	0,9105			
8	64	1,1916	0,0188	0,0002	1,0462
	64	1,2165			
	64	1,2075			
9	80	1,5017	0,0188	0,0001	0,2759
	80	1,5032			
	80	1,4954			

Análisis de varianza para evaluar la linealidad del sistema

Prueba de hipótesis:

Ho: No existe una relación lineal entre la concentración de triclosán y su respectiva absorbancia.

Hi: Existe una relación lineal entre la concentración de triclosán y su respectiva absorbancia.

Criterio de aceptación

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

Tabla 3. ANÁLISIS DE VARIANZA

	<i>Grados de libertad</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Valor crítico de F</i>
Regresión	1	6,9984	6,9984	96936,2012	2,19006E-46
Residuos	25	0,0018	7,21956E-05		
Total	26	7,0002			

Como F calculada es mayor que F crítica se rechaza H_0 , lo cual quiere decir que hay una relación lineal entre la concentración de triclosán y su absorbancia. Esto también se puede corroborar con el coeficiente de correlación múltiple el cual es cercano a 1, indicativa de una buena linealidad de la curva.

Prueba del intercepto

Prueba de hipótesis:

H_0 : La ordenada al origen es igual a cero.

H_1 : La ordenada al origen es diferente de cero.

Criterio de aceptación

Si t calculada $<$ t crítica no se rechaza H_0 , por lo tanto el intercepto es igual a cero.

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

b	$t_{\text{calculada}}$	$t_{\text{crítica}}$
0,0075	3,1153	2,0595

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

Tabla 4. Resultados de la curva de calibración de triclosán en etanol, en contacto con piel de cerdo.

Sistema	C. R mcg/ml	Abs	Promedio	D.E.	c.v (%)
1	0,4	0,0074	0,01725	0,00114564	6,6414
1	0,4	0,0065			
1	0,4	0,0068			
2	4	0,0674	0,01709167	0,00029826	1,7451
2	4	0,0697			
2	4	0,068			
3	12	0,2005	0,01654167	0,0001453	0,8784
3	12	0,1977			
3	12	0,1973			
4	16	0,2696	0,01686042	2,9536E-05	0,1752
4	16	0,2694			
4	16	0,2703			
5	24	0,4028	0,01685278	6,684E-05	0,3966
5	24	0,406			
5	24	0,4046			

Análisis de varianza para evaluar la linealidad del sistema

Prueba de hipótesis:

Ho: No existe una relación lineal entre la concentración de triclosán y su respectiva absorbancia.

Hi: Existe una relación lineal entre la concentración de triclosán y su respectiva absorbancia.

Criterio de aceptación

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

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

Tabla 5. ANÁLISIS DE VARIANZA

	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F	Valor crítico de F
Regresión	1	0,3022	0,3022	71573,8466	1,0492E-25
Residuos	13	5,4891E-05	4,2224E-06		
Total	14	0,3023			

Como F calculada es mayor que F crítica se rechaza Ho, lo cual quiere decir que hay una relación lineal entre la concentración de triclosán y su absorbancia. Esto también se puede corroborar con el coeficiente de correlación múltiple el cual es cercano a 1, indicativa de una buena linealidad de la curva.

Prueba del intercepto

Prueba de hipótesis:

Ho: La ordenada al origen es igual a cero.

Hi: La ordenada al origen es diferente de cero.

Criterio de aceptación

Si t calculada $<$ t crítica no se rechaza Ho, por lo tanto el intercepto es igual a cero.

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

b	$t_{\text{calculada}}$	$t_{\text{crítica}}$
-0,00016	-0,1775	2,1604

Como la t calculada $<$ t crítica, se acepta Ho, por lo tanto el intercepto es igual a cero.

Tabla 6. Resultados del tamaño de partícula (nm) en lotes antes de someterlos a centrifugación, a diferentes condiciones en el rotavapor

Velocidad (rpm)	Temperatura		
	30°	45°	60°
30	119,3	120,6	120
	125,3	123,7	126,7
	141,4	105	140,6
Promedios	128,6666	116,4333	129,1
D.E. (+/-)	11,4281	10,0221	10,5076
90	100	121,6	146
	110,6	135,4	126,8
	92,6	120,1	120,2
Promedios	101,0666	125,7	131
D.E. (+/-)	9,0472832	8,4338	13,4029
150	132,8	147,4	117,7
	121,8	115,4	155,1
	134,6	177,9	124,9
Promedios	129,7333	146,9	132,5666
D.E. (+/-)	6,9291	31,2529	19,8437

Tabla 7. Resultados del tamaño de partícula (nm) en lotes después de someterlos a centrifugación, a diferentes condiciones en el rotavapor

rpm	Temperatura		
	30°	45°	60°
30	139,1	151,6	145,1
	125,2	122,5	131,9
	127	133,6	146,5
Promedios	130,4333	135,9000	141,1667
D.E. (+/-)	7,5593	14,6857	8,0556
90	142,8	138,2	120,1
	146,6	124,6	125,6
	136,2	129,3	139,2
Promedios	141,8667	130,7000	128,3000
D.E. (+/-)	5,2624	6,9072	9,8321
150	129,8	136,2	160,2
	110,4	144	133,1
	126,3	125,3	148,2
Promedios	122,1667	135,1667	147,1667
D.E. (+/-)	10,3394	9,3927	13,5795

ANEXO II. RESULTADOS DE CARACTERIZACIÓN DE LAS NANOPARTÍCULAS**Tabla 1. Resultados del potencial Z en lotes de nanopartículas 1-17**

Lote	Potencial Z	Promedios	D.E.(+/-)
1	39,42	38,3700	1,2078
	37,05		
	38,64		
2	24,23	23,3300	0,7886
	22,76		
	23		
3	20,41	21,4033	1,9680
	20,13		
	23,67		
4	25,2	25,0167	0,9582
	23,98		
	25,87		
5	38,75	36,00333333	2,6733
	35,85		
	33,41		
6	26,7	26,1033	0,9650
	24,99		
	26,62		
7	30,68	31,6600	1,0690
	32,8		
	31,5		
8	36,87	36,8300	1,4304
	35,38		
	38,24		
9	35,21	32,6167	2,3171
	30,75		
	31,89		
10	38,68	37,7967	0,7650
	37,36		
	37,35		
11	27,81	28,2467	1,0365
	27,5		
	29,43		
12	16,98	17,0967	0,9603
	16,2		
	18,11		
13	7,483	7,8970	0,7590
	8,773		
	7,435		
14	14,53	14,9367	0,5793
	14,68		
	15,6		
15	10,78	9,9960	0,6869
	9,708		
	9,5		
16	9,836	9,7767	0,2529
	9,5		
	9,994		
17	10,2	9,5467	0,7712
	9,744		
	8,696		

ANEXO III. RESULTADOS DE PERMEACIONES

Tabla 1. Resultados de la cinética de permeación de triclosán de la formulación Clean & Clear a través de piel de oreja de cerdo.

Cantidad de triclosán acumulada mcg (Q acum)

T (h)	Celda 1	Celda 2	Celda 3	Celda 4	Celda 5	Celda 6	Celda 7	Celda 8	Celda 9
0,5	3,6257	16,2567	12,2995	13,0053	13,6898	6,8449	9,8824	16,2139	3,5508
1	4,5027	19,6043	15,2193	16,0214	15,7433	9,0481	14,1604	17,7754	4,3102
2	6,2032	25,4759	20,9091	21,9893	16,2567	11,4011	18,5775	20,5561	5,0802
3	8,3316	29,6150	26,3529	27,2299	19,5508	14,4492	22,8770	24,8342	9,7968
4	9,1016	32,6203	29,6791	30,2246	24,6310	18,2781	30,2674	29,8396	14,8556
5	10,7380	34,8663	34,4171	34,5348	28,5668	19,4011	34,2460	32,7914	20,2674
6	13,5508	38,9198	37,3155	39,6898	31,3476	19,8717	38,5027	35,2834	24,6952
7	15,9679	41,8610	39,7219	41,7647	33,6791	20,7914	42,6738	37,3369	27,5615
8	17,9893	43,4973	42,2995	44,3743	36,9519	21,3048	46,2353	39,1337	30,1283

Anexo de tabla 1

TIEMPO(h)	Promedio de celdas	Desviación
0,5	10,5966	4,9331
1	12,9317	5,6196
2	16,2721	7,1845
3	20,3375	7,8020
4	24,3886	8,3370
5	27,7588	8,8354
6	31,0196	9,4930
7	33,4843	9,8741
8	35,7683	10,3431

Área = 0,636172 cm²

Concentración: 2606,0246 mcg/ml

- La permeaciones para la formulación Clear & Clear (solución) se hicieron por dodecaplicado y solo se eligieron las celdas que presentaban un comportamiento parecido.

Tabla 2. Flujo y Coeficientes de permeabilidad de cada celda para la formulación Clean & Clear para las dos primeras horas.

	Celda 1	Celda 2	Celda 3	Celda 4	Celda 5	Celda 6	Celda 7	Celda 8
m	1,7158	6,107	5,7326	5,9862	2,9396	5,5997	2,8785	0,984
r²	0,9999	0,9989	1	1	0,971	0,9676	0,9991	0,9658
Flujo = m/A	2,697069	9,599605	9,011085	9,409719	4,620763	8,802179	4,524720	1,546752
Coef. De Perm	0,001035	0,003684	0,003458	0,003611	0,001773	0,003378	0,001736	0,000594

- Solo se eligieron el conjunto de datos de cada una de las celdas que mostraran un comportamiento lineal con una r² aceptable (no se tomo en cuenta una celda).
- El flujo es el cociente de las pendientes de cada celda entre el área ocupada.
- El coeficiente de permeabilidad es el cociente del flujo entre la concentración de triclosán en cada formulación

Tabla 3. Flujo y Coeficientes de permeabilidad de cada celda para la formulación Clean & Clear para las seis últimas horas.

	Celda 1	Celda 2	Celda 3	Celda 4	Celda 5	Celda 6	Celda 7	Celda 8	Celda 9
m	2,0486	2,8911	3,2217	3,5856	3,3409	1,2083	4,5219	2,7566	4,1201
r²	0,9764	0,9901	0,9853	0,9832	0,981	0,8329	0,9845	0,9629	0,9786
F= m/A	3,220198	4,544526	5,064196	5,636212	5,251567	1,899329	7,107983	4,333105	6,476393
Cp	0,001236	0,001744	0,001943	0,002163	0,002015	0,000729	0,002728	0,001663	0,002485

Tabla 4. Resultados de la cinética de permeación de triclosán de la formulación Dermobras a través de piel de oreja de cerdo.

Cantidad de triclosán acumulada mcg (Q acum)

TIEMPO (h)	Celda 1	Celda 2	Celda 3	Celda 4	Celda 5	Celda 6	Promedio	Desviación
0,5	25,1230	14,5134	4,1711	22,5989	13,1230	12,5882	15,3529	7,5672
1	25,1230	14,7380	5,1551	23,2299	14,4064	13,4439	16,0160	7,2633
2	32,2032	20,1497	10,0107	26,5561	20,5668	17,3369	21,1373	7,6337
3	37,7968	23,3904	15,5187	29,7005	24,9519	20,6738	25,3387	7,6989
4	42,0535	26,1818	18,2567	31,7433	27,0695	22,9198	28,0374	8,2026
5	46,2995	30,5775	21,0481	34,0214	30,2995	26,0749	31,3868	8,5589
6	49,7112	35,7219	24,3850	36,1283	32,4920	29,1551	34,5989	8,6067
7	53,0374	39,6257	25,7647	37,6364	34,9091	32,3102	37,2139	9,1304
8	53,0374	40,4064	26,2353	37,6364	34,9091	32,3102	37,4225	9,0596

Área = 0,636172 cm²

Concentración: 10454,6163 mcg/ml

Tabla 5. Flujo y Coeficientes de permeabilidad de cada celda para la formulación Dermobras para las dos primeras horas.

	Celda 1	Celda 2	Celda 3	Celda 4	Celda 5	Celda 6
Pendientes	5,0573	3,9939	4,0306	2,7364	5,1337	3,2697
r2	0,8929	0,9136	0,9695	0,9663	0,9709	0,9735
Flujo = m/A	7,949580	6,278019	6,335708	4,301352	8,069672	5,139647
Coef. de Perm.	0,000760	0,000600	0,000606	0,000411	0,000772	0,000492

Tabla 6. Flujo y Coeficientes de permeabilidad de cada celda para la formulación Dermobras para las seis últimas horas.

	Celda 1	Celda 2	Celda 3	Celda 4	Celda 5	Celda 6
Pendientes	3,2162	3,7302	2,2698	1,699	2,1571	2,5552
r2	0,9532	0,9735	0,9529	0,9498	0,958	0,9665
Flujo = m/A =	5,055551	5,863509	3,567903	2,670661	3,390750	4,016524
Cp	0,000484	0,000561	0,000341	0,000255	0,000324	0,000384

- El flujo es el cociente de las pendientes de cada celda entre el área ocupada.
- El coeficiente de permeabilidad es el cociente del flujo entre la concentración de triclosán en cada formulación.

Tabla 7. Resultados de la cinética de permeación de triclosán en las nanopartículas a través de piel de oreja de cerdo.

Cantidad de triclosán acumulada mcg (Q acum)

TIEMPO(h)	Celda 1	Celda 2	Celda 3	Celda 4	Celda 5	Promedio	Desviación
0,5	22,0000	14,9305	24,3743	5,9786	33,2513	20,1070	10,2588
1	24,0535	16,4278	32,0963	10,8021	38,2139	24,3187	11,1647
2	26,4920	23,4332	40,9091	10,8021	44,9733	29,3219	13,8284
3	28,3529	26,2995	43,3476	11,1230	48,5882	31,5422	14,8706
4	29,8075	26,9091	44,6952	11,5829	49,9786	32,5947	15,2497
5	31,8503	29,2406	47,5936	12,7914	49,9786	34,2909	15,1390
6	31,8503	29,3476	50,2032	12,7914	50,1070	34,8599	15,7667
7	32,7059	30,5455	52,5882	12,7914	52,2460	36,1754	16,7197
8	33,2299	31,9786	53,3904	12,8877	54,1176	37,1209	17,1931

Área = 0,636172 cm²

Concentración: 18000mcg/ml

- La permeaciones para la formulación propuesta de nanopartículas se hicieron por sexuplicado y solo se eligieron las celdas que presentaban un comportamiento parecido.

Tabla 8. Flujo y Coeficientes de permeabilidad de cada celda del sistema nanoparticulado para las dos primeras horas.

	Celda 1	Celda 2	Celda 3	Celda 4
Pendientes (m)	2,9152	5,8594	10,707	7,6639
r²	0,9803	0,9721	0,9771	0,9897
Flujo = m/A	4,582409	9,210402	16,830354	12,046899
Coef. de Perm.	0,000255	0,000512	0,000935	0,000669

Tabla 9. Flujo y Coeficientes de permeabilidad de cada celda del sistema nanoparticulado para las seis últimas horas.

	Celda 1	Celda 2	Celda 3	Celda 4
m	0,9451	1,1261	2,1858	0,9879
r²	0,9079	0,9611	0,9806	0,8621
Flujo = m/A =	1,485605	1,770119	3,435863	1,552882
Coef. de Perm	0,000083	0,000098	0,000191	0,000086

- Solo se eligieron el conjunto de datos de cada una de las celdas que mostraran un comportamiento lineal con una r² aceptable (no se tomo en cuenta una celda).

Tabla 10. Cantidad de triclosán total permeada

Celdas	Nanopartículas	Crema	Clean & Clear
1	33,229947	53,037433	17,989305
2	31,978610	40,406417	43,497326
3	53,390374	26,235294	42,299465
4	12,887701	37,636364	44,374332
5	54,117647	34,909091	36,951872
6	-	32,310160	21,304813
7	-	-	46,235294
8	-	-	39,133690
9	-	-	30,128342

Tabla 11. Cantidad de triclosán total permeada /concentración de cada formulación

Celdas	Nanopartículas	Crema	Clean & Clear
1	0,001846	0,005073	0,006903
2	0,001777	0,003865	0,016691
3	0,002966	0,002509	0,016231
4	0,000716	0,003600	0,017028
5	0,003007	0,003339	0,014179
6	-	0,003091	0,008175
7	-	-	0,017742
8	-	-	0,015017
9	-	-	0,011561

Tabla 12. Triclosán retenido en piel de cerdo utilizada en permeaciones

	Clean & Clear (µg)	Dermobras (µg)	Nanopartículas (µg)
	3,8988	59,8810	35,6548
	3,3631	81,7262	36,7262
	8,9583	70,8631	27,4107
	3,9881	61,7262	29,9702
	12,4405	-	24,4940
	3,5417	-	17,7083
Promedio	6,0317	68,5491	28,6607
D. E. (+/-)	3,7864	10,0113	7,1353

Tabla 13. Triclosán retenido en piel de cerdo/concentración de las formulaciones

	Clean & Clear	Dermobras	Nanopartículas
	0,001496	0,005728	0,001981
	0,001291	0,007817	0,002040
	0,003438	0,006778	0,001523
	0,001530	0,005904	0,001665
	0,004774	-	0,001361
	0,001359	-	0,000984
Promedio	0,002315	0,006557	0,001592
D. E (+/-)	0,001453	0,000958	0,000396

8. BIBLIOGRAFÍA

1. Cazares, D. J. Estudio del efecto del pH sobre la absorción percutánea de lidocaína utilizando laureato y oleato de sacarosa como promotores de absorción. Tesis de Licenciatura. FES-C. UNAM. 2003.
2. Wilkinson J.B., Moore R. J., Cosmetología de Harry, Ed. Díaz de Santos, S.A., Madrid, España. 1990. pp 3-17.
3. Centro de Educación Médica Continua de la Facultad de Medicina de la UNAM. 2004.
4. Kenneth A. Arndt. M. D. Cutaneous Medicine and Surgery: an integrated program in dermatology., Ed. Saunders, Philadelphia, (1996).
5. Silva S., Muñoz E., Morales V. Acné Juvenil., Vol.2, No. 1 (UDA) Universidad Católica de Chile. 2004 pp 36-39.
6. Bowden PE y Cunliffe WJ : Modification of human prekeratin during epidermal differentiation. *Biochemical Journal* 71 (1988); 324-329.
7. Aïache J. M. Devissaguet J. Ph. Guyot-Herman A.M. Biofarmacia. El Manual Moderno, México, 1983. pp127-154.
8. Doménech B. J., Martínez L. J., Plá D. J., Biofarmacia y Farmacocinética, Ed. Síntesis. Madrid, España, 1998. pp 82-85, 408-412, 414.
9. Stern RS. Medication and medical service utilization for acne 1998. *J. Am. Acad. Dermatol.* 43 (2000); 1042–8.

10. Kligman A.M: Acne vulgaris: tricks and treatments. Part 1. *Cutis*. Philadelphia, U.S.A. 1995.
11. Jana H; Pavel K. The SAPHO syndrome in a 16-year-old boy: coincidence of acne conglobata and osteoarthritis. *Journal Adolescents Health*. U.S.A. 14; 2 (1993); 120-3.
12. Buseman , et al., Acne patch. US.Patent 6, 495, 158 (2002).
13. Zouboulis CC, Piquero-Martin J. Update and future of systemic acne treatment. *Dermatology*. (2003); 206: 37–53.
14. Dreno B, Poli F. Epidemiology of acne. *Dermatology*. (2003); 206: 7–10.
15. Bergfeld W. The evaluation and management of acne: Economic considerations. *J. Am. Acad. Dermatol*. 5 (1995); 52–6.
16. Toyoda M, Morohashi M. Pathogenesis of acne. *Med. Electron. Microsc.* 34; 1 (2001); 29–40.
17. Lee DJ, Van Dyke GS, Kim J. Update on pathogenesis and treatment of acne. *Curr. Opin. Pediatr*. 15 (2003); 405–10.
18. Stewart ME, Downing DT, Cook JS, Hansen JR, Strauss JS. Sebaceous gland activity and serum dehydroepiandrosterone sulfate levels in boys and girls. *Arch. Dermatol*. 128 (1992); 1345–8.

19. Knaggs HE, Holland DB, Morris C, Wood EJ, Cunliffe WJ. Quantification of cellular proliferation in acne using the monoclonal antibody Di-67. *J. Soc. Invest. Dermatol.* 102 (1994); 89–92.
20. Thiboutot D. Hormones and acne: Pathophysiology, clinical evaluation, and therapies. *Semin. Cutan. Med. Surg.* 20 (2001); 144–53.
21. Jappe U. Pathological mechanisms of acne with special emphasis on *Propionibacterium acnes* and related therapy. *Acta. Derm. Venereol.* 83 (2003) 241–8.
22. Jeremy AH, Holland DB, Roberts SG, Thomson KF, Cunliffe WJ. Inflammatory events are involved in acne lesion initiation. *J Invest Dermatol.* 63; 15 (2003) 1579–96.
23. Thiboutot D, Harris G, Iles V, Cimisi G, Gilliland K, Hagari S. Activity of the type 1 5 α -reductase exhibits regional differences in isolated sebaceous glands and whole skin. *J. Invest. Dermatol.* 105 (1995) 209–14.
24. Leyden JJ. The evolving role of *Propionibacterium acnes* in acne. *Semin Cutan. Med. Surg.* 20 (2001) 139–43.
25. Thiboutot DM. An overview of acne and its treatment. *Cutis* 57 (1996) 8–12.
26. Koreck A, Pivarcsi A, Dobozy A, Kemeny L. The role of innate immunity in the pathogenesis of acne. *Dermatology.* 206; 2 (2003) 96–105.
27. Gollnick H. Current concepts of the pathogenesis of acne. *Drugs* 63; 15 (2003) 1579–96.

-
-
28. White GM. Recent findings in the epidemiologic evidence, classification, and subtypes of acne vulgaris. *J. Am. Acad. Dermatol.* 39 (1998) 34–37.
29. Oprica C., Emtestam L., Lapins J., et. al. Antibiotic-resistant *Propionibacterium acnes* on the skin of with moderate to severe acne in Stockholm. *Anaerobe.* 10 (2004) 155 –164.
30. Caputo Ruggero, Barbareschi Mauro, Veraldi Stefano, Pulse therapy with azithromycin in acne: an open study. *J. Am. Acad. Dermatol.*, 11 (2004); 41-43.
31. Fernandez-Obregon AC. Azithromycin for the treatment of acne. *Int. J. Dermatol.* 39 (2000); 45-50.
32. Bojar, R.A., Cunliffe, W.J., Holland, K.T. Disruption of the transmembrane pH gradient-a possible mechanism for the antibacterial action of azelaic acid in *Propionibacterium acnes* and *Staphylococcus epidermidis*. *J. Antimicrob. Chemother.* 34 (1994); 321–330.
33. Jain, A., Sangal, L., Basal, E., Kaushal, G.P., Agarwal, S.K., Antiinflammatory effects of erythromycin and tetracycline on *Propionibacterium acnes* induced production of chemotactic factors and reactive oxygen species by human neutrophils. *Dermatol. Online J.* 8 (2002); 2.
34. Gollnick, H.P.M., Krautheim, A., Topical treatment in acne: current status and future aspects. *Dermatology* 206 (2003); 29–36.
35. Eady, E.A., Gloor, M., Leyden, J.J.,. *Propionibacterium acnes* resistance: a worldwide problem. *Dermatology* 206 (2003); 54–56.

-
-
36. Colin C., Bjarne B., Jo K., Evaluation of the antibacterial efficacy of diesters of azelaic acid. *Eur. J. Pharm. Sci.* 21 (2004) 589–596.
37. Gribbon, E.M., Cunliffe, W.J., Holland, K.T.,. Interaction of *Propionibacterium acnes* with skin lipids in vitro. *J. Gen. Microbiol.* 39 (1993) 1745–1751.
38. Khondker K Islam, Maywood, Moneera Haque, Rana Sokhi, Ravi Kondaveeti, Assessing views of female patients regarding oral contraceptives for treatment of acne, *J. Am. Acad. Dermatol.* 20 (2004); 74.
39. James Leyden, Wilma Bergfeld, Lynn Drake, Frank Dunlap, A systemic type I 5-reductase inhibitor is ineffective in the treatment of acne vulgaris, *J. Am. Acad. Dermatol.* 50 (2004); 443-7.
40. Alanna F Bree, Elaine Siegfried, Early-onset acne: Classification and risk of virilizing endocrinopathy in 27 children, *J. Am. Acad. Dermatol.* 20 (2004): 79.
41. Cunliffe WJ, et al. A clinical and therapeutic study of 29 patients with infantile acne. *Br. J. Dermatol.* 145 (2001);463.
42. Evans NA. Gym and tonic: A profile of 100 male steroid users. *Br. J. Sports. Med.* 31; 1 (1997); 54–8.
43. Alesci S, Bornstein SR. Neuroimmunoregulation of androgens in the adrenal gland and the skin. *Horm. Res.* 54; 5–6 (2000); 281–6.
44. Noble, W.C., Observations on the surface flora of the skin and on the skin pH. *Br. J. Dermatol.* 80, (1968) 279–281.

-
-
45. Bataille V, Snieder H, MacGregor AJ, Sasieni P, Spector TD. The influence of genetics and environmental factors in the pathogenesis of acne: A twin study of acne in women. *J. Invest. Dermatol.* 119; 6 (2002); 1317–22.
46. Dara Miller, Skillman, Geoffrey Smith, Gentle and fast-acting relief from a salicylic acid acne treatment with soothing natural extracts, *J. Am. Acad. Dermatol.* (2004)12:46
47. Kellett S, Gilbert P. Acne: A biopsychosocial and evolutionary perspective with a focus on shame. *Brit. J. Health. Psychol.* 6 (2001); 1–24.
48. Bloom D.F., Is acne really a disease?: a theory of acne as an evolutionarily significant, high-order psychoneuroimmune interaction timed to cortical development with a crucial role in mate choice. *Med. Hypotheses* 62 (2004), 462–469.
49. Fink B, Grammer K, Thornhill RJ. Human (*Homo sapiens*) facial attractiveness in relation to skin texture and color. *J. Comp. Psychol.* 115; 1 (2001); 92–9.
50. Baker, Jr., et al., Non-toxic antimicrobial compositions and methods of use. *US. Patent* 6 (2003), 635- 676.
51. Chen W, Zouboulis CC, Fritsch M, et al. Heterogeneity and quantitative differences of type 1 5 α -reductase expression in cultured skin epithelial cells. *Dermatology* 196; 1 (1998) 51–2.
52. E D Seaton, A Charakida, P E Mouser, Pulsed-dye laser treatment for inflammatory acne vulgaris: randomised controlled trial. *The lancet*, 362 (2003) 1347-1352.

53. Patel N, Clement M. Selective nonablative treatment of acne scarring with 585 nm flashpump pulsed dye laser. *Dermatol Surg* 28 (2002); 942–45.
54. Durkin, et al. Method of treating disorders associated with sebaceous follicles. US. Patent 6, 743, 222 (2004).
55. Ganem, R. A., Piñón, S. E y Quintanar, G. D. Uso de promotores de absorción percutánea, Congreso Nacional de Química Cosmética. 1998.
56. Mango D, Ricci S. Clinical and hormonal effects of ethinylestradiol combined with gestodene and desogestrel in young wome with acne vulgaris. *Contraception*, 53; 3 (1996) 163-70.
57. Berger S. R., Tang M.D., Sorba V., Evaluation of the irritancy potential of adapalene and tretinoin in volunteers of different ethnic origins. *J. Am. Acad. Dermatol.* 11 (2004); 44.
58. Quintanar, G. D., Galindo, R. S. A. Hernández V.I. Sistemas nanoparticulados aplicados a productos cosméticos. Congreso Nacional de Química Cosmética. 1998.
59. Piñón, S. E. Desarrollo tecnológico y caracterización de partículas submicrónicas poliméricas como vectores terapéuticos para el tratamiento de Enfermedades Periodontales. Tesis de Maestría, FES-C, UNAM. (2003).
60. Aguirre, P. K. Formación de películas de uso farmacéutico a partir de Nanocápsulas Tesis de Licenciatura, FES-C. UNAM. (2005).

-
-
61. Quintanar-Guerrero, Allémann E., Fessi H., et. al., Pseudolatex preparation using a novel emulsion–diffusion process involving direct displacement of partially water-miscible solvents by distillation. *Int. J. Pharm.* 188 (1999); 155-164.
62. R.I. Moustafine a, V.A. Kemenova c, G. Van den Mooter, Characteristics of interpolyelectrolyte complexes of Eudragit E 100 with sodium alginate, *Int. J. Pharm.* 294 (2005);113–120.
63. Röhm Pharma Polymers. A Company of the Hüls Group. GMBH, Weiterstad.
64. E. Piñon-Segundo, A.Ganem-Quintanar, V. Alonso-Pérez, D. Quintanar-Guerrero, Preparation and characterization of triclosan nanoparticles for periodontal treatment, *Int. J. Pharm.* 294 (2005) 217–232.
65. Barry B. W. Lipid-Protein-partitioning theory of skin penetration enhancement. *J. Cont. Rel.* 15 (1991);.237-248.
66. Clarke's., Isolation and Identification of Drugs. Second Edition, The pharmaceutical Press. London, (1986).
67. Zetasizer nanoseries., Usual Manual Malvern Instrument., Cap. Z potential theoretic., England, (2003) 15.4.
68. Junho Park, Jongsung Lee, Eunsun Jung, et.al. In vitro antibacterial and anti-inflammatory effects of honokiol and magnolol against *Propionibacterium sp.* *Eur. J. Pharm.* 496 (2004); 189– 195
69. Tae-Wan Lee, Jin-Chul Kimb, Sung-Joo Hwang. Hydrogel patches containing Triclosan for acne treatment. *Eur. J. Pharm. and Biopharma.* 56 (2003); 407–412

70. Jin-Chul Kim, Myung-Eon Song, Min-Joo Kim, et al. Preparation and characterization of Triclosan-containing vesicles. *Colloids and Surfaces B. Biointerfaces* 26 (2002); 235–241
71. Miller J. N., Miller J. C., *Estadística y quimiometría para química analítica*. 4ª ed. Prentice may. Madrid, España, 2002. pp 111-135.
72. Dispersion Technology Systems. Nanometric group, Malvern Instrument., Inc. South Borough MA, May 2005.
73. Leroux, J. C., Alléman, E., Doelker, E., et. al. New approach for the preparation of nanoparticles by an emulsification-diffusion method. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 41;1 (1995); 14-18
74. Kirk, Othmer. *Enciclopedia de tecnología química*. 4ª Edición. 1997.
75. Spitz, Luis. *Technology of Soaps and Detergents: A theoretical and practical review.*, 1996.
76. *Vademecum farmacéutico, Información Profesional Especializada S.A. de C. V.* 8ª Edición, Rezza Editores S. A. de C. V., 1999
77. *The Handbook of Pharmaceutical Excipients.*, Fourth edition, Press and American Pharmacists Association, 2004.