



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS
QUÍMICAS

**DESARROLLO Y EVALUACIÓN DE SISTEMAS DE LIBERACIÓN
DE FÁRMACOS POR INFILTRACIÓN DE NANOPARTÍCULAS**

TESIS

PARA OPTAR POR EL GRADO DE

DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA

Q.F.B. ISABEL MARLEN RODRÍGUEZ CRUZ



TUTOR: DR. DAVID QUINTANAR GUERRERO

AÑO: 2010



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.



JURADO ASIGNADO

Presidente: Dr. Rogelio Gregorio Pereda Miranda

Primer Vocal: Dra. Susana Elisa Mendoza Elvira

Segundo Vocal: Dr. José Guillermo Penieres Carrillo

Tercer Vocal: Dra. Luz María Melgoza Contreras

Secretario: Dra. Helgi Jung Cook

Tutor: Dr. David Quintanar Guerrero

El desarrollo de la tesis se llevó a cabo en:

Laboratorio de Posgrado en Farmacia, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Universidad Nacional Autónoma de México.

Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica, Facultad de Farmacia, Universidad de Valencia, España.

AGRADECIMIENTOS

A mi asesor el Dr. David Quintanar Guerrero y a la Dra. Adriana Ganem Rondero por todo su apoyo brindado.

A la Dra. Virginia Merino Sanjuán por su asesoramiento durante la estancia de investigación en la Universidad de Valencia, España.

A la Dra. Luz María Melgoza Contreras y a la Dra. María Josefa Bernad Bernad por sus aportaciones durante el desarrollo del presente trabajo.

A mis compañeros del laboratorio por su gran ayuda y amistad durante ésta etapa de mi vida.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca que se me otorgó.

Al técnico Rodolfo Robles por su asistencia en los estudios de Microscopía Electrónica de Barrido.

Al técnico José Ignacio García por la revisión de formato del presente escrito.

Al técnico Draucin Jiménez por la manufactura del material de vidrio requerido.

Con todo mi amor y agradecimiento dedico este trabajo a Dios; a mis padres Graciela y Fernando; a mis hermanos Nallely, Fernando y Oscar; y muy especialmente a Julio, mi gran amigo, compañero y esposo.

Congresos:

1. "Development of a drug delivery system by infiltration of nanoparticles into biodegradable porous membranes"; 10th Canadian Society Pharmaceutical Sciences (CSPS) Annual Meeting; Mayo, 2007 (Montreal, Canadá).
2. "Desarrollo de un nuevo sistema de liberación controlada para fármacos sensibles mediante el tamponamiento con nanopartículas en sistemas biodegradables porosos"; XL Congreso Nacional de Ciencias Farmacéuticas. Noviembre, 2007 (Mérida, Yucatán). Obtención del premio "*QFB Santiago Maza*" al mejor poster en desarrollo farmacéutico.
3. "Film formation by infiltration of nanoparticles into biodegradable porous membranes: A novel way to obtain free solvent controlled release systems"; 6th World Meeting on Pharmaceutics, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology; Abril, 2008 (Barcelona, España).
4. "Penetración de triclosan a través de piel humana: uso de un sistema nanoparticulado e iontoforesis"; XLI Congreso Nacional de Ciencias Farmacéuticas, Octubre, 2008 (Ixtapa Zihuatanejo, Guerrero). Obtención del premio "*QFB Santiago Maza*" al mejor poster en desarrollo farmacéutico.
5. "Penetración percutánea in vitro de nanopartículas de triclosán a través de piel humana: Difusión pasiva vs. iontoforesis"; Symposium de Micología, UAM-Xochimilco.

Estancia doctoral en la Universidad de Valencia, España (Febrero-Julio, 2008).

A. ÍNDICE GENERAL

A. Índice general	i
B. Lista de abreviaturas	iv
C. Índice de figuras	v
D. Índice de tablas	vii
E. Resumen	viii
F. Abstract	x
1. Introducción	1
2. Marco teórico	4
2.1 Sistemas de liberación de fármacos	4
2.1.1 Liberación convencional	4
2.1.2 Liberación modificada	4
2.1.3 Tipos de liberación modificada	5
2.1.3.1 Liberación acelerada	5
2.1.3.2 Liberación diferida o retardada	6
2.1.3.3 Liberación prolongada o extendida	6
2.1.3.4 Liberación controlada	6
2.1.4 Materiales para sistemas de liberación modificada	8
2.1.4.1 Polímeros sintéticos	9
2.1.4.1.1 Polímeros biodegradables	9
2.1.4.1.2 Polímeros no biodegradables	13
2.1.4.2 Polímeros naturales	14
2.2 Sistemas acarreadores de fármacos	15
2.2.1 Nanopartículas	15
2.2.1.1 Definición	15
2.2.1.2 Métodos de preparación	16
2.2.1.2.1 Emulsificación-difusión	17
2.2.1.2.2 Emulsificación-difusión por desplazamiento del disolvente	19
2.2.2 Sistemas porosos	22
2.3 Sistemas por vía tópica	23

2.3.1 Estructura de la piel	24
2.3.1.1 Epidermis	24
2.3.1.2 Dermis	26
2.3.1.3 Hipodermis	26
2.3.1.4 Apéndices de la piel	27
2.3.2 Difusión pasiva a través de la piel	27
2.3.3 Vías de penetración a través de la piel	28
2.3.4 Mecanismos para incrementar la absorción percutánea	30
2.3.4.1 Promotores químicos de penetración	30
2.3.4.2 Promotores físicos de penetración	31
2.3.4.2.1 Iontoforesis	31
3. Justificación del trabajo	37
4. Hipótesis	37
5. Objetivos	38
5.1 Objetivo general	38
5.2 Objetivos particulares	38
6. Metodología experimental	40
6.1 Reactivos, material y equipos	40
6.2 Metodología	42
6.2.1 Nanopartículas infiltradas en un soporte polimérico biodegradable (membrana biodegradable porosa)	42
6.2.1.1 Determinaciones previas	42
6.2.1.2 Preparación de membranas biodegradables porosas	43
6.2.1.3 Caracterización de membranas biodegradables porosas	44
6.2.1.4 Preparación de nanopartículas por el método de emulsificación-difusión	45
6.2.1.5 Caracterización de nanopartículas	45
6.2.1.6 Infiltración del fármaco y nanopartículas dentro de los sistemas porosos	46

6.2.1.7 Caracterización de membranas biodegradables porosas con infiltración de nanopartículas	47
6.2.1.8 Perfiles de liberación <i>in vitro</i>	47
6.2.2 Nanopartículas e iontoforesis en piel humana	48
6.2.2.1 Determinaciones previas	48
6.2.2.2 Preparación de nanopartículas por el método de emulsificación-difusión por desplazamiento del disolvente	49
6.2.2.3 Caracterización de nanopartículas	49
6.2.2.4 Permeaciones <i>in vitro</i>	51
6.2.2.4.1 Permeaciones <i>in vitro</i> por difusión pasiva	52
6.2.2.4.2 Permeaciones <i>in vitro</i> con iontoforesis	53
6.2.2.5 Cromatografía de líquidos de alta resolución	55
7. Resultados y discusión	56
7.1 Nanopartículas infiltradas en un soporte polimérico biodegradable	56
7.1.1 Determinaciones previas	56
7.1.2 Membranas biodegradables porosas	56
7.1.3 Nanopartículas biodegradables	59
7.1.4 Infiltración del fármaco y nanopartículas en los sistemas porosos	62
7.1.5 Perfiles de liberación	69
7.2 Nanopartículas e iontoforesis en piel humana	75
7.2.1 Determinaciones previas	75
7.2.2 Caracterización de nanopartículas de Eudragit® RL 100 cargadas con triclosan	75
7.2.3 Permeaciones por difusión pasiva	79
7.2.4 Permeaciones iontoforéticas	87
8. Conclusiones	91
9. Referencias	93
10. Anexos	100
ARTÍCULOS	109

B. LISTA DE ABREVIATURAS

Abreviatura	Significado
PLA	Ácido poliláctico
PGA	Ácido poliglicólico
PLGA	Ácido poliláctico-co-glicólico
cm	Centímetro
M_t	Cantidad del fármaco liberada al tiempo t
M_α	Cantidad de fármaco liberada al equilibrio
r^2	Coefficiente de determinación
C.V.	Coefficiente de variación
C_p	Concentración plasmática
K_H	Constante de Higuchi
d.e.	Desviación estándar
°C	Grados centígrados
I.P.	Índice de polidispersión
μg	Microgramos
μm	Micrómetros
MEB	Microscopía electrónica de barrido
ml	Mililitros
mm	Milímetros
min	Minutos
ng	Nanogramos
nm	Nanómetros
rpm	Revoluciones por minuto
T°	Temperatura
T_g	Temperatura de transición vítrea
t	Tiempo
T_{lag}	Tiempo de latencia
UV	Ultravioleta

C. ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Concentración plasmática (C_p) del fármaco en función del tiempo.	7
Figura 2.	Unidades químicas estructurales de la poli- ϵ -caprolactona, el ácido poliláctico (PLA), el ácido poliglicólico (PGA) y el ácido poli(D,L-láctico-co-glicólico) (PLGA).	10
Figura 3.	Degradación del ácido poliláctico-co-glicólico por hidrólisis.	11
Figura 4.	Unidad química estructural del polímero Eudragit® RL 100.	14
Figura 5.	Mecanismo de formación de nanopartículas por el método de emulsificación-difusión.	18
Figura 6.	Formación de nanopartículas por el método de emulsificación-difusión por desplazamiento del disolvente.	21
Figura 7.	Componentes de la piel.	26
Figura 8.	Diferentes vías de penetración de fármacos a través de la piel.	29
Figura 9.	Transporte molecular durante la iontoforesis.	32
Figura 10.	Diferentes vías de penetración de fármacos a través de la piel de acuerdo al sitio donde se desea que actúen.	34
Figura 11.	Permeación por difusión pasiva mediante una celda de difusión tipo Franz.	53
Figura 12.	Dispositivo iontoforético mediante una celda de difusión tipo Franz.	54
Figura 13.	Fotografía de membrana biodegradable porosa.	57
Figura 14.	Microfotografías de membranas biodegradables porosas de PLGA 1:1 tomadas por microscopía electrónica de barrido.	58
Figura 15.	Microfotografía de nanopartículas de PLGA 1:1 tomada por microscopía electrónica de barrido.	60
Figura 16.	Distribución del tamaño de partícula de nanopartículas de PLGA 1:1.	61
Figura 17.	Microfotografía de cristales de carbamazepina tomada por microscopía electrónica de barrido.	63

Figura 18.	Microfotografías de cortes transversales de membranas biodegradables porosas con infiltración de nanopartículas tomada por microscopía electrónica de barrido.	65
Figura 19.	Termogramas de carbamazepina, PLGA 1:1 y los sistemas del 1 al 5.	67
Figura 20.	Perfiles de liberación de carbamazepina en las membranas biodegradables porosas con y sin infiltración de nanopartículas.	70
Figura 21.	Modelo de Higuchi aplicado a la liberación de carbamazepina a partir de membranas biodegradables porosas con infiltración de nanopartículas.	73
Figura 22.	Microfotografía de nanopartículas de Eudragit® RL 100 cargadas con triclosán.	76
Figura 23.	Distribución del tamaño de partícula de nanopartículas de Eudragit® RL 100 cargadas con triclosán.	77
Figura 24.	Cantidades acumuladas de triclosán permeadas a través de piel humana por difusión pasiva.	80
Figura 25.	Nivel de penetración de partículas de acuerdo a su tamaño a través de los folículos pilosos de la piel.	84
Figura 26.	Vías dominantes de penetración a través de la piel en función del tiempo.	86
Figura 27.	Cantidades acumuladas permeadas de triclosán a través de piel humana por iontoforesis empleando diferentes concentraciones de triclosán.	87

D. ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Propiedades y aplicaciones del PGA, PLA y PLGA.	12
Tabla 2.	Resultados de la prueba de resuspendibilidad de nanopartículas de PLGA 1:1.	61
Tabla 3.	Cantidad de carbamazepina adsorbida dentro de los diferentes sistemas.	68
Tabla 4.	Mecanismo de transporte y tipo de liberación de un principio activo en base al exponente de difusión " n " de acuerdo al modelo de Peppas.	71
Tabla 5.	Resultados de los exponentes de difusión " n " de acuerdo al modelo de Peppas.	72
Tabla 6.	Constantes de velocidad de la carbamazepina de acuerdo al modelo de Higuchi.	73
Tabla 7.	Resultados de la prueba de resuspendibilidad de nanopartículas de Eudragit® RL 100.	77
Tabla 8.	Datos obtenidos de permeaciones de triclosán por difusión pasiva a través de piel humana.	80
Tabla 9.	Datos obtenidos de permeaciones de triclosán con iontoforesis a través de piel humana.	88

RESUMEN

El objetivo del presente trabajo fue proponer sistemas de liberación de fármacos a partir de dispersiones nanoparticuladas: i) soporte polimérico biodegradable y, ii) nanopartículas e iontoforesis en piel humana.

i) El *soporte polimérico* consistió de una membrana biodegradable porosa, en donde la superficie de los poros de ésta fue cubierta por una película de nanopartículas ocluyendo el fármaco (carbamazepina), y de esta manera, controlando su velocidad de liberación. El ensamblaje fue desarrollado en un medio acuoso, evitando el contacto del fármaco con disolventes orgánicos. El método fue desarrollado en dos pasos: a) preparación de las membranas biodegradables porosas por la técnica de vaciamiento de soluciones poliméricas orgánicas, y posteriormente, las nanopartículas biodegradables, preparadas por el método de emulsificación-difusión; b) la infiltración de las nanopartículas dentro de las membranas consistió de una solución acuosa de carbamazepina y la dispersión de nanopartículas. En ambos casos (membranas y nanopartículas), el ácido poli(D,L-láctico-co-glicólico) fue usado como polímero biodegradable. La carbamazepina adsorbida sobre los poros de la membrana biodegradable mostró un comportamiento de liberación inmediato (95 % liberado en < 15 min.). La infiltración de diferentes cantidades de nanopartículas (50, 100, 400 y 600 mg) dentro de las membranas biodegradables porosas mostraron una difusión Fickiana de acuerdo al modelo de Peppas y siguiendo el modelo de Higuchi. Este comportamiento fue atribuido a la barrera difusional constituida por la película de nanopartículas. La velocidad de liberación de la carbamazepina fue dependiente de la cantidad de nanopartículas infiltradas/adsorbidas dentro de la membrana porosa. Los estudios de calorimetría diferencial de barrido (DSC) sugirieron una dispersión molecular del fármaco en la membrana.

La infiltración de nanopartículas sobre la superficie de las membranas biodegradables porosas, permitió controlar la velocidad de liberación del fármaco modelo. Esto debido a la formación de una película oclusiva cuyas propiedades son dependientes de la cantidad de nanopartículas adsorbidas. Además, la formulación a partir del sistema biodegradable propuesto, evita el contacto directo del fármaco con disolventes orgánicos, lo cual lo hace un sistema noble para moléculas sensibles.

ii) El sistema *nanopartículas e iontoforesis en piel humana* consistió de piel abdominal humana, empleada con la finalidad de evaluar la permeación pasiva e iontoforética del triclosán a través de una solución de triclosán y formulado en nanopartículas catiónicas, para determinar cuál es la mejor estrategia para

incrementar la acumulación del fármaco en la piel. Las nanopartículas fueron preparadas por el método de emulsificación-difusión por desplazamiento del disolvente, usando como polímero metacrilato de aminoalquilo (Eudragit RL® 100). Los resultados demostraron que la acumulación de triclosán en la piel fue significativamente mayor (8.5 veces) usando el triclosán incorporado en nanopartículas catiónicas por difusión pasiva que usando solución de triclosán. La cantidad de triclosán retenida en la piel administrando nanopartículas catiónicas por iontoforesis fue 3.1 veces más con respecto al uso de solución de triclosán por difusión pasiva.

De acuerdo a los resultados obtenidos, la iontoforesis mostró ser efectiva para mejorar el pasaje de triclosán como solución a través de la piel, mientras que el triclosán formulado en nanopartículas catiónicas por difusión pasiva representa una interesante alternativa para lograr un efecto local, debido a la capacidad de formar un depósito del fármaco dentro de la piel.

ABSTRACT

The goal of this work was to propose drug delivery systems based on nanoparticle dispersion: i) polymeric system and, ii) nanoparticles and iontophoresis through human skin.

i) *Polymeric system* consisted of a biodegradable porous membrane, whose surface was covered by a nanoparticle film occluding the drug (carbamazepine), thus achieving a controlled drug release rate. Furthermore, due to the fact that the assembly of the system was performed in aqueous medium, contact with organic solvents was avoided. The method was performed in two steps: a) preparation of biodegradable porous membranes (by a solvent casting and particulate leaching technique) and biodegradable nanoparticles (by the emulsification-diffusion method); b) infiltration into membranes consisted of an aqueous solution of carbamazepine and a nanoparticle dispersion. In both cases, poly(DL-lactic-co-glycolic acid) was used as a biodegradable polymer. Carbamazepine adsorbed onto biodegradable porous membranes showed an immediate release behavior (95% released in < 15 min). Infiltration of different amounts of nanoparticles (50, 100, 400 and 600 mg) into biodegradable porous membranes showed a Fickian diffusion according to Peppas model, and fitted Higuchi's model. This behavior was attributed to the diffusional barrier constituted by the nanoparticle film. As expected, the carbamazepine release rate was dependent on the amount of infiltrated/adsorbed nanoparticles into biodegradable porous membrane. DSC studies showed molecular dispersion of the drug throughout the membrane. ii) *Nanoparticles and iontophoresis through human skin* consisted of human abdominal skin in order to evaluate the passive and iontophoretic permeation of triclosan through this using triclosan solution and triclosan-loaded cationic nanoparticles in order to determine which strategy is better to improve the accumulation of triclosan in the skin. Triclosan-loaded nanoparticles were prepared by the emulsification-diffusion solvent displacement method using as polymer aminoalkyl methacrylate. The results demonstrated that the accumulation of triclosan in the skin was significantly greater (8.5 times) using triclosan-loaded cationic nanoparticles by passive diffusion than using triclosan solution. The amount of triclosan retained within the skin administering these cationic nanoparticles by iontophoresis was 3.1 folds greater with respect to the use of triclosan solution by passive diffusion. According to the results, iontophoresis showed to be effective in enhancing the passage of triclosan as solution throughout the skin, whereas triclosan included in nanoparticles represents an interesting alternative to achieve a local effect, due to the capability of forming a depot within the skin.

1. INTRODUCCIÓN

Existen pocas opciones tecnológicas para formular sistemas de liberación de fármacos controlando su velocidad de liberación en el sitio de acción y sin ponerlos en contacto directo con disolventes orgánicos, los cuales en la mayoría de los casos provocan degradación del principio activo. Actualmente, entre los sistemas de liberación de fármacos más exitosos, se encuentran los sistemas porosos y las nanopartículas poliméricas. Los sistemas biodegradables porosos últimamente han llamado mucho la atención en la industria farmacéutica, ya que han mostrado ser excelentes acarreadores de fármacos; sin embargo, su principal limitante es presentar una liberación inmediata del fármaco al momento de ser administrados (Lemaire et al., 2003; Kim et al., 2006). Las nanopartículas poliméricas son definidas como partículas coloidales sólidas con tamaño submicrónico entre 10 y 1000 nm. Éstas han sido ampliamente estudiadas como acarreadores de fármacos durante las últimas décadas, ya que comparadas con otros acarreadores coloidales, las nanopartículas presentan una mayor estabilidad cuando están en contacto con fluidos biológicos y su naturaleza polimérica las hace susceptibles de convertirse en sistemas de liberación controlada; sin embargo, durante su manufactura, una diversidad de disolventes orgánicos están involucrados.

Otra problemática que aún sigue enfrentando la industria farmacéutica, es la baja biodisponibilidad de fármacos administrados por vía tópica, ya que el estrato córneo es una fuerte barrera de permeabilidad a la que se enfrentan la mayoría de los principios activos. Sin embargo, la permeación de diversos fármacos se ha mejorado gracias al surgimiento de nuevas tecnologías, ya sea por medios físicos (iontoforesis, sonoforesis, electroporación) o químicos (agentes promotores de penetración), dado que sin la ayuda de éstos, sería casi imposible el paso de la mayoría de los fármacos a través de la piel. En particular, la iontoforesis consiste en aplicar corriente eléctrica fisiológicamente tolerable para favorecer el paso de sustancias activas a través de la piel (Guy et al., 2000). Además, para tratamientos

tópicos, es importante contar con una liberación dérmica del fármaco, la cual consiste en localizar a éste dentro de la piel con la finalidad de obtener un efecto local y, de esta manera, reducir los niveles sistémicos y, por lo tanto, los efectos colaterales (Carafa et al., 2002).

De acuerdo a lo mencionado anteriormente, surge la necesidad de crear nuevos sistemas de liberación de fármacos, con la finalidad de mejorar las expectativas de las formas farmacéuticas ya existentes. En el presente estudio se desarrollaron y evaluaron nuevos sistemas de liberación de fármacos mediante dispersiones nanoparticuladas en diferentes soportes (biológico y no biológico) con la finalidad de controlar la velocidad de liberación del principio activo. La infiltración se define como la introducción de líquidos o sólidos en un soporte sólido poroso. En el *soporte no biológico*, se infiltraron nanopartículas dentro de membranas biodegradables porosas, evitando por un lado el contacto del fármaco con disolventes orgánicos y, por otro, logrando un sistema de liberación controlada del fármaco dependiente de la cantidad de nanopartículas infiltradas. Estos sistemas ofrecen la posibilidad de ser administrados por diferentes vías. En el soporte *biológico*, se administraron nanopartículas catiónicas cargadas de fármaco en piel humana, considerando que la piel presenta una carga negativa al pH fisiológico. Posteriormente, se evaluó *in vitro* el pasaje y la estancia del fármaco por difusión pasiva e iontoforesis con la finalidad de encontrar la mejor estrategia para incrementar la cantidad de principio activo localizada dentro de la piel, pensando en tratamientos en los cuales se requiere un efecto local.

Es importante mencionar que la tecnología propuesta en el presente trabajo, la cual consiste en ensamblar nanopartículas dentro de un sistema poroso, es pionera en la formulación de sistemas de liberación controlada de fármacos. Los resultados obtenidos en el presente estudio fueron significativos en cuanto al control de la velocidad de liberación del principio activo, además, de ser un proceso noble para el fármaco.

Por otro lado, la cantidad de fármaco retenida en piel humana, usando nanopartículas catiónicas como acarreadores del principio activo, fue significativamente mayor en el presente estudio en comparación con investigaciones reportadas previamente empleando nanopartículas poliméricas aniónicas. Cabe mencionar que la utilización de nanopartículas catiónicas como acarreadores de fármacos a través de piel humana, aún no había sido estudiada por difusión pasiva e iontoforética para tratamientos dérmicos.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 SISTEMAS DE LIBERACIÓN DE FÁRMACOS

2.1.1 Liberación convencional

Una forma farmacéutica de *liberación convencional* es aquella donde la dosis del principio activo está totalmente disponible para ser absorbida después de su administración. De esta manera, las formas farmacéuticas convencionales liberan el principio activo de manera inmediata implicando que en la mayoría de los casos, la liberación del principio activo sea mayor que su absorción (Bernad et al., 2003).

Por otro lado, es evidente que por muy perfecto que sea el diseño de un régimen posológico de un sistema de liberación convencional, éste no conseguirá mantener concentraciones terapéuticas del fármaco en el lugar de acción si el paciente no sigue adecuadamente la toma del medicamento. De esta manera, las principales desventajas de una liberación convencional de fármacos son las fluctuaciones de las concentraciones del fármaco en el estado de equilibrio en el plasma, lo que pueden ocasionar que el paciente este submedicado o sobremedicado en algunos momentos; además, los fármacos pueden alcanzar gran variedad de sitios en los cuales puede ser que se encuentren fuera de su rango terapéutico, que se inactive, o que su acción sea indeseada o nociva y, por lo tanto, con efectos adversos. Estas limitaciones y exigencias han estimulado la investigación de sistemas de liberación modificada.

2.1.2 Liberación modificada

Una forma farmacéutica de *liberación modificada* es aquella preparación farmacéutica cuya velocidad de liberación del principio activo es diferente a aquella de una forma farmacéutica convencional administrada por la misma vía.

En los últimos años se ha incrementado el número de nuevos sistemas de liberación modificada de fármacos, por lo que las formas farmacéuticas convencionales están siendo sustituidas por nuevas formas de liberación con la finalidad de controlar la velocidad de liberación del principio activo (liberación temporal) y/o liberar el principio activo en el sitio específico (ubicación espacial) y de esta manera, obtener mejores efectos terapéuticos. *La liberación temporal* se refiere a la velocidad con la que el sistema de liberación del principio activo es suficiente para alcanzar y mantener el efecto terapéutico deseado en un tiempo determinado. *La ubicación espacial o vectorización* se refiere a la localización del principio activo en la región óptima, es decir, localizar en el organismo el sistema donde el efecto es requerido o podría tener mayores efectos terapéuticos (Li y Jasti, 2006).

2.1.3 Tipos de liberación modificada

La liberación modificada se clasifica en los siguientes tipos:

2.1.3.1 Liberación acelerada

Es aquella preparación farmacéutica cuya velocidad de liberación del principio activo es mucho más rápida que la de una forma de liberación convencional destinada a la misma vía. Un ejemplo son las formas farmacéuticas sólidas, las cuales se disuelven instantáneamente en la cavidad bucal sin necesidad de administración de líquidos (ej. comprimidos). Generalmente este tipo de liberación es requerida para fármacos tales como analgésicos, antipiréticos y vasodilatadores coronarios (Bernad et al., 2003; Singh y Kim., 2002).

2.1.3.2 Liberación diferida o retardada

Es aquella preparación farmacéutica cuya velocidad de liberación del principio activo es retardada en el organismo gracias a su fabricación; es decir, el principio activo se libera de la formulación después de un tiempo transcurrido de su administración. Un ejemplo de estos sistemas son aquellos que cuentan con un recubrimiento entérico para evitar el contacto del principio activo con los jugos gástricos y, de esta manera, prevenir su inactivación o liberación en el estómago y favorecer su liberación hasta alcanzar un punto en el tracto gastrointestinal (Bernad et al., 2003).

2.1.3.3 Liberación prolongada o extendida

Es aquella preparación farmacéutica que permite una reducción de al menos dos veces la frecuencia de administración en comparación con una forma de liberación convencional; sin embargo, aunque el efecto de una dosis ha sido extendido, no existe un control real de la liberación del principio activo. Un ejemplo son los sistemas matriciales que permiten la difusión o liberación del principio activo de manera uniforme y prolongada (Bernad et al., 2003; Chien, 1991).

2.1.3.4 Liberación controlada

Es aquella preparación farmacéutica capaz de proveer un control de la concentración del principio activo en el organismo, o bien, en el sitio específico. El concepto de sistemas de liberación controlada surgió en la década de los 70 y tiene por objeto mejorar las propiedades terapéuticas de los fármacos incorporándolos en un sistema que permita su liberación a la velocidad adecuada y en el entorno adecuado del organismo. Su principal ventaja en relación a las formas farmacéuticas convencionales es mantener concentraciones plasmáticas constantes por periodos extensos. Con estos sistemas se pretende evitar algunos de los inconvenientes que tienen las formas de dosificación convencionales

existentes actualmente en el mercado, como presentar una liberación inmediata y una distribución muy extensa por todo el organismo, alcanzando así, no sólo los lugares específicos de acción donde producirán el efecto terapéutico deseado, sino que también pueden acceder a otras zonas muy diversas del organismo, en las que pueden provocar efectos adversos. Sin embargo, los sistemas de liberación controlada también pueden presentar algunas desventajas, las cuales podrían ser los efectos de toxicidad provocados por el mal funcionamiento de éstos, ya que pueden causar una pronta liberación de toda la carga del principio activo (cantidades pensadas para periodos largos).

En la figura 1 se muestran los perfiles de concentración del fármaco en el plasma para cada uno de los diferentes tipos de liberación modificada en comparación con una forma farmacéutica convencional por administración oral.

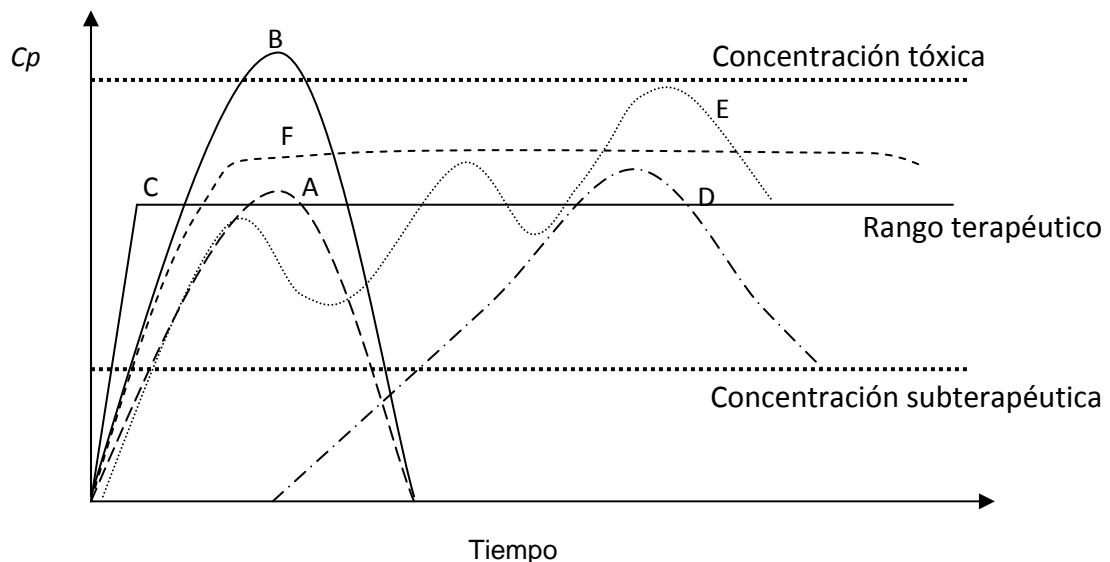


Figura 1. Concentración plasmática (C_p) del fármaco en función del tiempo. A) Liberación convencional; B) liberación acelerada; C) liberación controlada; D) liberación retardada; E) liberación repetida; F) liberación prolongada.

De acuerdo a lo mencionado anteriormente, la velocidad de liberación del principio activo adecuada en el sitio específico (vectorización), podría aumentar la eficacia del fármaco y reducir notablemente la presencia de efectos secundarios adversos,

mejorando de una manera significativa el efecto terapéutico. Hoy resulta indiscutible que para conseguir una adecuada eficacia en el tratamiento de alguna enfermedad, no sólo es necesario disponer de moléculas con elevada actividad farmacológica, sino que el vehículo, sistema o soporte en el que dichas moléculas van incorporadas, desarrollan un papel fundamental en el éxito final del medicamento.

Desde el punto de vista tecnológico, un sistema de liberación controlada está constituido por una plataforma o soporte que contiene la o las sustancias y que modula la liberación del activo. Dicha plataforma puede tomar infinidad de formas y tamaños, desde una diminuta partícula hasta estructuras grandes como dispositivos. Todas las formulaciones de liberación modificada utilizan una “barrera” química o física para hacer más lenta la liberación de la dosis del medicamento. De esta forma, el grado de precisión del control de la velocidad de liberación del fármaco varía según la técnica y el material utilizado en función del grado de control sobre la liberación deseada (Bernad et al., 2003; Li et al., 2006).

2.1.4 Materiales para sistemas de liberación modificada

Para diseñar nuevas formas de liberación modificada de fármacos, se deben utilizar materiales adecuados con los cuales ni el organismo, ni el principio activo se vea afectado de manera negativa.

La utilización de polímeros en sistemas de liberación modificada como soporte de fármacos para regular y dosificar su liberación, continúa siendo muy estudiada por la industria farmacéutica debido a la gran habilidad que presentan para controlar la velocidad de liberación de diversos principios activos. Además, las formas farmacéuticas de liberación controlada formadas a partir de materiales poliméricos, permiten administrar fármacos por diferentes vías (oral, parenteral, dérmica, transdermal, nasal, ocular, etc.) (Sáez et al., 2002).

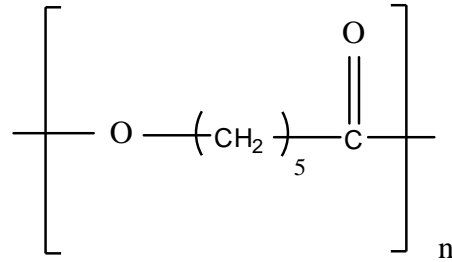
2.1.4.1 Polímeros sintéticos

Entre los diferentes materiales empleados para la elaboración de sistemas de liberación modificada, se encuentran los polímeros sintéticos hidrofóbicos, entre éstos se encuentran los polímeros biodegradables, tales como los poliésteres. Éstos, los poliésteres, han sido extensamente estudiados para una amplia variedad de aplicaciones farmacéuticas y biomédicas.

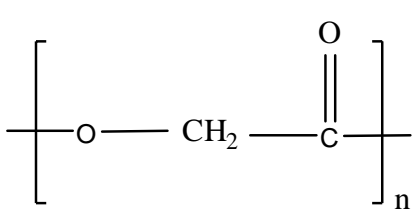
2.1.4.1.1 Polímeros biodegradables

Un polímero biodegradable es aquel que se degrada o divide químicamente en moléculas que son susceptibles de ser excretadas por las vías habituales, como la respiratoria, la urinaria y la fecal.

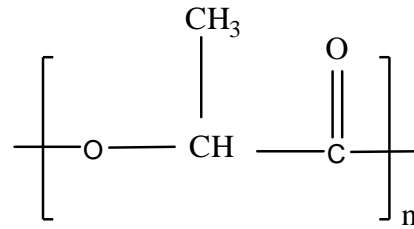
Los poliésteres son el sistema biodegradable mejor caracterizado. En particular, los poliésteres derivados de los monómeros (láctico, glicólico y caprolactona), tales como el ácido poliláctico (PLA), el ácido poliglicólico (PGA), el ácido poliláctico-co-glicólico (PLGA) y la poli- ϵ -caprolactona son los más comúnmente empleados en el área biomédica y farmacéutica, ya que han presentado tener buena histocompatibilidad, biodegradabilidad y generación de subproductos no tóxicos. Estos polímeros son derivados de monómeros que son metabolitos naturales del cuerpo, convirtiéndolos en sistemas seguros para su uso *in vivo*. En la figura 2 se muestran las unidades químicas estructurales del ácido poliláctico (PLA), el ácido poliglicólico (PGA) y el ácido poliláctico-co-glicólico (PLGA).



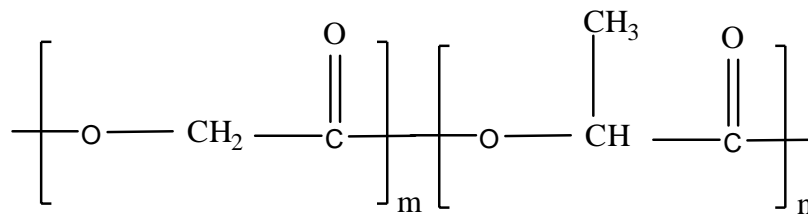
Poli-ε-caprolactona



PGA



PLA



PLGA

Figura 2. Unidades químicas estructurales de la poli-ε-caprolactona, el ácido poliláctico (PLA), el ácido poliglicólico (PGA) y el ácido poliláctico-co-glicólico (PLGA).

Es importante mencionar que el ácido láctico es una molécula quiral que presenta los isómeros L y D; por lo que las formas activas son el ácido poli-L-láctico (L-PLA) y el ácido-D-láctico (D-PLA), siendo la mezcla racémica inactiva el poli-D,L-láctico. El homopolímero L-PLA es el más empleado, debido a que ésta es la forma en la que se encuentra en la naturaleza, por lo que se considera que el L-PLA es más biocompatible.

El PLA es más hidrofóbico que el PGA, por lo que copolímeros de PLGA con alta proporción de monómeros de ácido láctico son menos hidrofílicos, absorben menos agua y como consecuencia se degradan más lentamente. Las propiedades de degradación son afectadas por la cristalinidad, el peso molecular, la temperatura de transición vítrea (T_g) y la hidrofobicidad del monómero.

El PLGA con una relación 1:1 de ácido láctico y ácido glicólico son hidrolizados mucho más rápido que aquellos que contienen una mayor proporción de cualquiera de los dos monómeros. Los polímeros de esta familia son insolubles en agua pero se degradan por ataque hidrolítico del enlace éster, mediado por el agua que es tomada de los tejidos (ver figura 3). Los productos finales son ácido láctico y ácido glicólico, los cuales entran al ciclo de Krebs, son metabolizados y posteriormente son eliminados del cuerpo como bióxido de carbono y agua. La solubilidad de los polímeros en disolventes orgánicos es un factor importante que debe ser considerado en la fabricación de sistemas de liberación de fármacos.

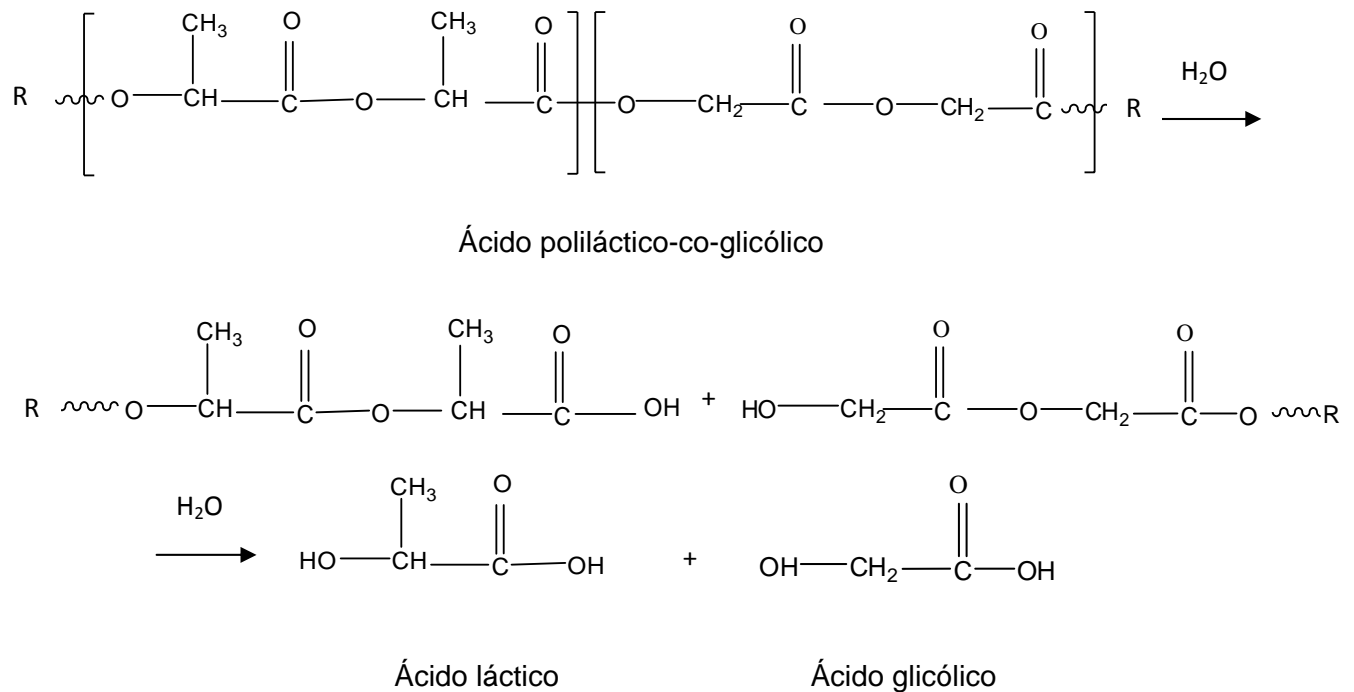


Figura 3. Degradación del ácido poliláctico-co-glicólico por hidrólisis.

En la tabla 1 se muestran las principales aplicaciones y propiedades de los polímeros PGA, L-PLA, D,L-PLA y PLGA.

Tabla 1. Propiedades y aplicaciones del PGA, PLA y PLGA.

Polímero	Cristalinidad	T _g (°C)	Velocidad de degradación ^a	Principales aplicaciones
PGA	Altamente cristalino (temp. fusión = 225-230 °C)	35-40	2-3 meses	Suturas, anaplerosis
L-PLA	Semicristalino (temp. fusión = 173-178 °C)	60-65	>2 años	Fijación de fracturas, incremento de ligamentos
D,L-PLA	Amorfo	55-60	12-16 meses	Sistemas de liberación de fármacos
PLGA	Amorfo	45-55	1-6 meses ^b	Sistemas de liberación de fármacos, suturas, fijación de fracturas, implantes orales

a. La velocidad depende del peso molecular del polímero.

b. La velocidad puede cambiar de acuerdo a la proporción de ácido láctico y glicólico.

La fuerza mecánica, la capacidad para resistir a la hidrólisis y la velocidad de degradación están directamente relacionadas con la cristalinidad del polímero. El grado de cristalinidad y el punto de fusión están relacionados directamente con el peso molecular del polímero.

2.1.4.2.2 Polímeros no biodegradables

Otros materiales utilizados en sistemas de liberación modificada son los polimetacrilatos (Eudragits®) que están disponibles en diferentes formas iónicas. Los Eudragits® para objetivos farmacéuticos pueden ser empleados para recubrimiento de todas las formas sólidas convencionales (comprimidos y cápsulas). Estos polímeros pueden también ser usados para la fabricación de polvos, gránulos, microesferas y tabletas de liberación controlada, por lo que han llegado a ser de gran interés en sistemas de liberación controlada. Los polímeros Eudragits® están incluidos en farmacopeas de diferentes países, además de ser aceptados por la FDA, sin embargo, éstos no son biodegradables.

Los Eudragits® RL y RS son insolubles en medios acuosos, sin embargo, son permeables a los medios acuosos y tienden a expandirse al contacto con estos medios. Las letras RL indican “libremente permeable” y RS “moderadamente permeable”. La permeabilidad de estos Eudragits® en medio acuoso es debido a la presencia de grupos amonio en su estructura. En particular, el Eudragit® RL tiene una mayor proporción de estos grupos y como tales son más permeables que los Eudragits® RS; además, los perfiles de liberación del principio activo son no dependientes del pH. Por otro lado, los Eudragits® E, RL, RS y NE son considerados policationes, ya que tienen varios grupos cargados positivamente.

El Eudragit® RL 100 es un copolímero amorfo sintetizado del éster de los ácidos acrílico y metacrílico, el cual es usado principalmente en preparaciones farmacéuticas como recubrimiento de tabletas, gránulos, polvos, fármacos cristalinos, además de producir recubrimientos con la finalidad de retardar la velocidad de liberación de fármacos debido a la permeabilidad que presentan por la presencia de los grupos amonio. El Eudragit® RL 100 tiende a hincharse al contacto con el agua en fluidos digestivos naturales y sintéticos y en soluciones amortiguadoras. Una característica importante de este tipo de Eudragit® es que no depende del pH. El Eudragit® RL 100 se caracteriza por formar películas y actuar como un plastificante. En la figura 4 se muestra la unidad química estructural del Eudragit RL 100.

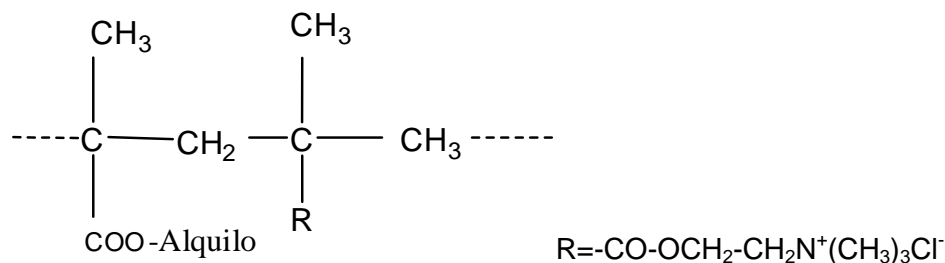


Figura 4. Unidad química estructural del polímero Eudragit® RL 100.

2.1.4.2 Polímeros naturales

Entre los polímeros naturales se encuentran las proteínas y polipéptidos (*v. gr.* gelatina, albúmina, colágeno) y los polisacáridos (*v. gr.* alginato, dextrán, quitosán, almidón y ácido hialurónico). Sin embargo, el uso de polímeros naturales presenta algunas desventajas como la incertidumbre de su origen, el potencial antigenicidad y como consecuencia, problemas de reproducibilidad lote a lote; de esta manera, la seguridad de emplear este tipo de polímeros en la industria farmacéutica es limitada.

A pesar de los diferentes sistemas de liberación de fármacos mencionados anteriormente, existen pocas opciones tecnológicas de formular sistemas de liberación controlada de fármacos sin poner éstos en contacto directo con disolventes orgánicos durante su formulación, ya que la mayoría de los polímeros empleados, en particular los polímeros biodegradables, son únicamente solubles en disolventes orgánicos, los cuales en la mayoría de los casos provocan degradación del principio activo.

Como es sabido, los disolventes orgánicos son frecuentemente muy empleados durante la manufactura de productos farmacéuticos; sin embargo, un inconveniente importante del uso de disolventes orgánicos es su efecto sobre las propiedades fisicoquímicas del fármaco, así como del riesgo para la salud humana debido a su toxicidad (Witschi y Doelker, 1997). Por lo tanto, los fármacos

necesitan ser protegidos durante su formulación de ataques químicos mediante el uso de procesos de manufactura más nobles (Cui et al., 2005). Considerando que estos factores pueden afectar la estabilidad de los fármacos y que además requieren de sistemas que controlen su velocidad de liberación, como también ser dirigidos al sitio específico de acción, se siguen estudiando los acarreadores de fármacos.

2.2 SISTEMAS ACARREADORES DE FÁRMACOS

La idea de usar acarreadores farmacéuticos para liberar el principio activo en el sitio blanco surgió en 1906 por Paul Ehrlich, quien imaginó que podrían desarrollarse sistemas refiriéndose a su concepto de “bala mágica”, y que únicamente actuarían éstas sobre un sitio específico, depositando en él la sustancia activa. Dentro de los diferentes sistemas acarreadores farmacéuticos se encuentran los sistemas coloidales, que por su pequeño tamaño de partícula (menor a 1 μm) facilitarían el transporte de fármacos. Los sistemas coloidales incluyen los liposomas, niosomas, sistemas micelares, microemulsiones, micropartículas y nanopartículas. Otros acarreadores farmacéuticos de menor uso son los moleculares, como las ciclodextrinas, dendrímeros y otras macromoléculas.

2.2.1 NANOPARTÍCULAS

2.2.1.1 Definición

Las nanopartículas se definen como partículas coloidales sólidas, que tienen un tamaño entre 10 y 1000 nm. El término nanopartícula puede referirse tanto a las nanoesferas como a las nanocápsulas. La diferencia entre estas dos formas se refiere a la morfología y a la arquitectura del sistema. Las nanoesferas están formadas por una densa matriz polimérica donde el principio activo puede ser dispersado y/o adsorbido en la superficie de la partícula. Las nanocápsulas están

compuestas de un núcleo aceitoso envuelto por una membrana polimérica, en donde el o los principios activos pueden ser adsorbidos en la superficie, estar disueltos en un aceite en el centro de la nanocápsula o bien, el mismo aceite puede ser la sustancia terapéutica (Quintanar-Guerrero et al., 1996). Las nanopartículas comparadas con otros acarreadores coloidales, presentan una mayor estabilidad al contacto con los fluidos biológicos. En particular, las nanopartículas poliméricas debido a su naturaleza, son susceptibles de convertirse en sistemas de liberación prolongada y controlada, además son estables durante el almacenamiento y ofrecen una posibilidad de escalamiento; sin embargo, durante su manufactura, una diversidad de disolventes orgánicos son involucrados.

2.2.1.2 Métodos de preparación

Existen diferentes métodos de preparar nanopartículas y se pueden dividir en aquellos que parten del polímero previamente sintetizado, o los que parten de monómeros. La preparación de nanopartículas a partir de la polimerización de monómeros presenta diversos inconvenientes debido a que los productos de la reacción pueden ser no compatibles entre sí o con el principio activo, además de dejar residuos tóxicos (*v. gr.* monómeros, oligómeros, catalizadores, iniciadores). Por lo anterior, se prefieren emplear las técnicas que utilizan polímeros preformados, en particular si éstos son biodegradables.

Los métodos a partir de polímeros preformados pueden ser clasificados en los siguientes grupos: 1) emulsificación-evaporación, 2) salting-out, 3) desplazamiento del disolvente, 4) emulsificación-difusión y 5) emulsificación-difusión por desplazamiento del disolvente. Estas técnicas son muy similares ya que involucran disolventes orgánicos (fase interna), en los cuales se encuentra disuelto el polímero y el fármaco, y una fase externa que consta de una solución acuosa generalmente en presencia de un estabilizante y en la cual finalmente se encuentran resuspendidas las nanopartículas durante su formación.

A continuación se describen las técnicas empleadas en el presente trabajo para la obtención de nanopartículas (emulsificación-difusión y emulsificación-difusión por desplazamiento del disolvente).

2.2.1.2.1 Emulsificación-difusión

En esta técnica se involucra el uso de disolventes parcialmente miscibles en agua que son previamente saturados con agua con el objeto de asegurar un equilibrio termodinámico entre ambos líquidos (figura 5-a). Se disuelve el polímero en el disolvente orgánico saturado previamente con agua, y esta fase orgánica se emulsifica con agitación vigorosa con una solución acuosa que contiene un estabilizante, el cual permanece en la interfase líquido-líquido (figura 5-b). Posteriormente, se adiciona más agua, la cual desestabiliza el equilibrio del sistema provocando que haya un proceso de difusión del disolvente orgánico hacia la fase externa (figura 5-c); durante este transporte, nuevos glóbulos de tamaño nanométrico son formados (figura 5-d) dando como resultado la formación de nanopartículas (figura 5-e). Finalmente, el disolvente orgánico se elimina bajo presión reducida.

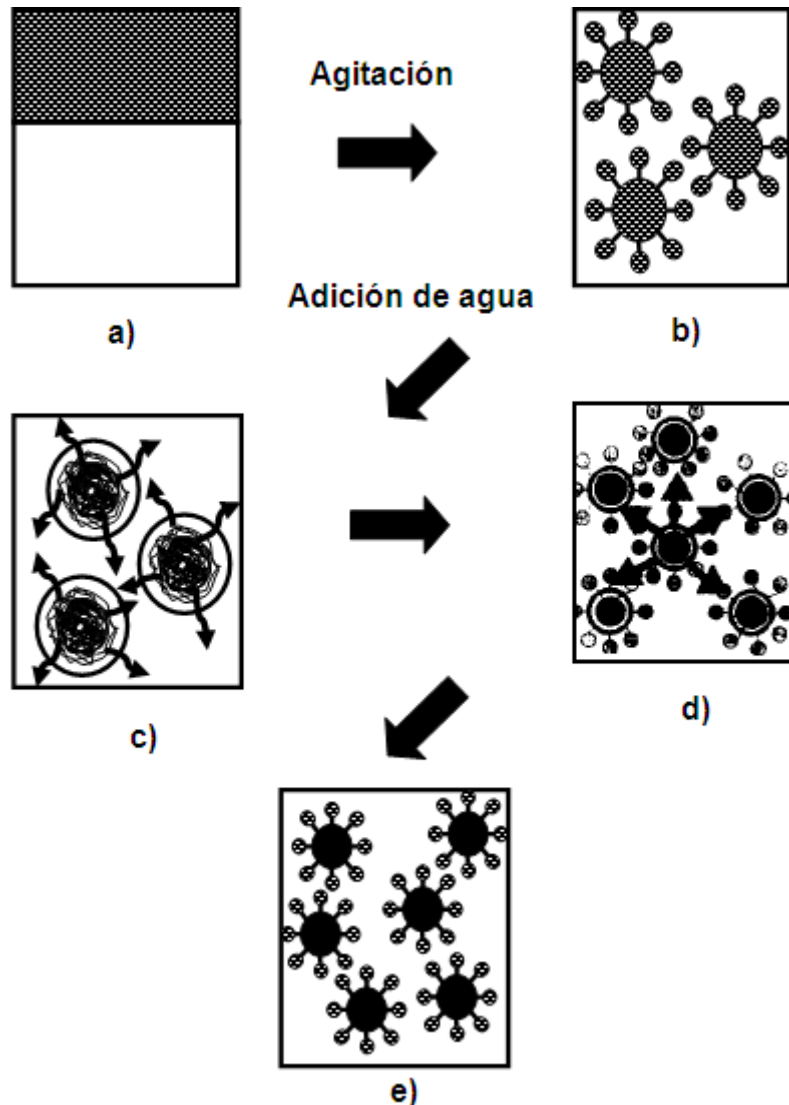


Figura 5. Mecanismo de formación de nanopartículas por el método emulsificación-difusión (Quintanar-Guerrero et al., 1996).

El mecanismo de formación de nanopartículas por esta técnica indica que cada gota de la emulsión produce varias nanopartículas, y éstas se forman por fenómenos interfaciales durante la difusión del disolvente orgánico hacia la fase externa; sin embargo, estos fenómenos no pueden ser explicados completamente por los efectos de convección causados por la turbulencia interfacial, por lo tanto, se sugiere que las nanopartículas se forman debido a una inestabilidad fisicoquímica producida por el transporte del disolvente por un mecanismo similar

al usado para explicar los procesos de emulsificación espontánea (diffusion-stranding mechanism). De esta manera, el mecanismo indica que la difusión del disolvente desde los glóbulos, acarrea moléculas hacia la fase acuosa (externa o continua), formando regiones locales de supersaturación, desde las cuales son formados nuevos glóbulos o agregados de polímero (no totalmente desolvatados). Las protonanopartículas deben ser estabilizadas con la presencia de un estabilizante para evitar su coalescencia y la formación de aglomerados. Si el estabilizante permanece en la interfase líquido-líquido durante el proceso de difusión y su efecto protector es adecuado, se formarán nanopartículas después de que se ha completado la difusión del disolvente (Quintanar-Guerrero et al., 1996).

Las ventajas que presenta esta técnica, en comparación con las técnicas anteriormente mencionadas, son las siguientes: a) se emplean disolventes orgánicos aceptados farmacéuticamente, b) no se requiere de etapas de homogeneización, c) se obtienen altos rendimientos, d) se tiene un alto grado de reproducibilidad, e) es susceptible al escalamiento industrial, f) es posible reciclar los disolventes.

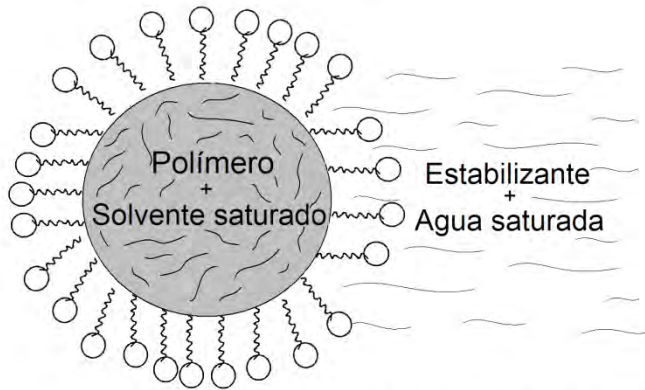
Sin embargo, también presenta algunas desventajas como eliminar grandes cantidades de agua y la pérdida de activos parcialmente solubles en agua hacia la fase externa durante la etapa de emulsificación. Por otro lado, esta técnica es eficiente para encapsular fármacos lipofílicos en comparación con las técnicas mencionadas anteriormente.

2.2.1.2.2 Emulsificación-difusión por desplazamiento del disolvente

En esta técnica, el polímero y el fármaco se disuelven en un disolvente orgánico parcialmente miscible al agua; la solución se emulsifica con agitación vigorosa en una solución acuosa que contiene un estabilizante, formando una emulsión aceite en agua (o/w). Posteriormente, se elimina el disolvente orgánico mediante presión reducida, dando como resultado la formación de las nanopartículas. En esta

técnica, el mecanismo de formación de nanopartículas es atribuido a una inestabilidad fisicoquímica del sistema. Como el disolvente es parcialmente miscible en agua, y las fases interna y externa son saturadas mutuamente, la difusión del disolvente orgánico desde la fase interna hacia 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. En la figura 6 se muestra una representación esquemática del mecanismo de formación de las nanopartículas por esta técnica.

1) Emulsificación (o/w)



2) Destilación del disolvente

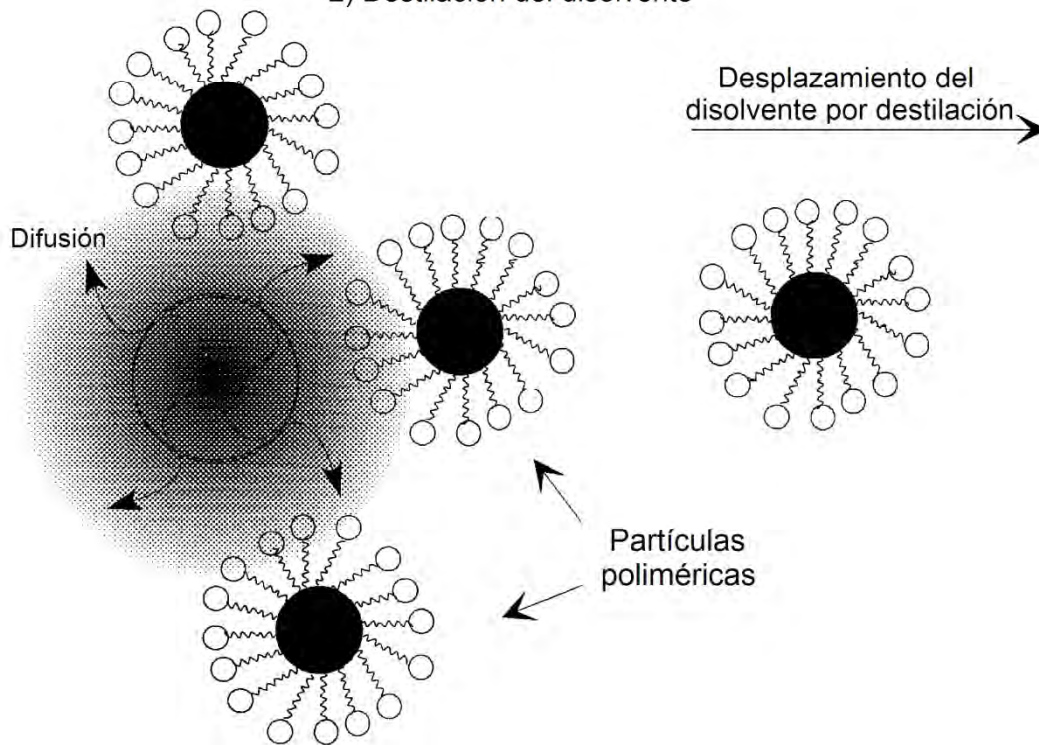


Figura 6. Formación de nanopartículas por el método emulsificación-difusión por desplazamiento del disolvente. 1) Emulsificación; 2) destilación del disolvente y formación de nanopartículas (Modificado de Quintanar-Guerrero et al., 1999).

Esta técnica, en comparación con las mencionadas anteriormente, tiene la ventaja de alcanzar altos rendimientos obteniendo concentraciones altas de nanopartículas poliméricas.

2.2.2 SISTEMAS POROSOS

Los sistemas biodegradables porosos han sido extensamente usados en medicina como soportes para la regeneración de tejidos, debido a que éstas estructuras altamente porosas con canales interconectados son ideales para lograr la densidad suficiente para la producción celular, facilitando el transporte de nutrientes y oxígeno para su proliferación (Kim et al., 2006). Estos soportes deben contar con ciertas características tales como una alta porosidad, una gran área de superficie específica, tamaños de poros grandes y una estructura de poros interconectados a través de la matriz. El material más empleado para este tipo de sistemas es el copolímero ácido poliláctico-co-glicólico, debido a su alta biodegradabilidad y biocompatibilidad. Últimamente, los sistemas biodegradables porosos han llamado mucho la atención en la industria farmacéutica ya que han mostrado ser excelentes acarreadores de fármacos (Sato et al., 1988; Mikos et al., 1993; Kim et al., 2006); sin embargo, su principal limitante es presentar una liberación inmediata del fármaco (efecto “*Burst*”) al momento de ser administrados. Este efecto se debe a la alta porosidad y tortuosidad que presentan los sistemas porosos, por lo que el principio activo tiene un alto contacto con el medio de disolución (fluidos biológicos), permitiendo una rápida desorción de éste (Kim et al., 2006; Lemaire et al., 2003). Existen diferentes formas o soportes de sistemas porosos que pueden llegar a ser desde plataformas hasta micropartículas porosas, en los cuales los fármacos son incluidos con la finalidad de ser liberados en el organismo.

La *porosidad* de un sistema se define como la fracción del sistema que existe como poros o canales dentro del sistema, y por los cuales penetra el líquido circundante. La *tortuosidad* se define como la longitud del camino o poro que

atraviesa un sistema. El espacio vacío dentro de los sólidos porosos consiste en laberintos de trayectorias interconectadas con secciones representativas irregulares.

2.3 SISTEMAS POR VÍA TÓPICA

La administración de fármacos por vía tópica es una alternativa viable no invasiva para lograr efectos sistémicos o locales de un fármaco, evitando así el efecto del primer paso (Honeywell-Nguyen et al., 2005). La liberación dérmica consiste en localizar un fármaco dentro de la piel para obtener un efecto local. La liberación transdérmica consiste en incrementar la penetración de un fármaco a través de la piel para lograr un efecto sistémico. De acuerdo a lo mencionado, las formas farmacéuticas por administración tópica, deberían ser diseñadas para que el fármaco actúe en el sitio blanco (vectorización) y por un tiempo prolongado. En el caso de tratamientos dérmicos (*v. gr.* acné, alopecia, inflamación en la piel, infecciones virales, etc.), una liberación dérmica es deseada para lograr un efecto local con las siguientes ventajas: 1) incrementar la concentración del principio activo en el sitio específico (piel), 2) reducir los niveles sistémicos, 3) reducir los efectos secundarios y, 4) evitar el efecto de primer paso (Carafa et al., 2002).

En particular, el acné se debe a la inflamación de las glándulas sebáceas; esta inflamación puede ser inducida por varios factores tales como desórdenes hormonales, infección bacteriana, estrés, aplicación de cosméticos no adecuados, alimentación no adecuada, etc. (Park et al., 2004). En el caso de la infección bacteriana, *Propionibacterium acnes* es uno de los microorganismos aislados más frecuentemente de la superficie de la piel, el cual es el causante del acné (Marples, 1974). Este microorganismo es sensible al triclosán, 5-cloro-(2,4-diclorofenoxi) fenol que es un agente antibacteriano de amplio espectro no catiónico y es usualmente empleado para el tratamiento del acné (Bhargava et al., 1996).

Sin embargo, la mayoría de los fármacos presentan dificultad para penetrar a través de la piel debido a que se enfrentan a la principal barrera de permeabilidad, el estrato córneo, por lo que una minoría de principios activos cuenta con las características necesarias para permear suficientemente a través de la piel y lograr una concentración terapéutica. Por esta razón, se eligió emplear como soporte biológico piel humana para evaluar el comportamiento del pasaje de nanopartículas catiónicas como acarreadores de triclosán por difusión pasiva e iontoforética, con el objetivo de incrementar la cantidad de triclosán retenida en la piel, además de mejorar la penetración de estas nanopartículas debido a la atracción entre la piel (carga negativa) y las nanopartículas (carga positiva).

2.3.1 ESTRUCTURA DE LA PIEL

La piel es el órgano más grande del cuerpo (1.8 a 2 m²), el cual cumple con diversas funciones, entre las más importantes son las siguientes: a) servir como barrera entre el medio ambiente, b) evitar la penetración de sustancias extrañas, c) regular la pérdida de calor, d) controlar la pérdida de fluidos internos, e) reflejar la presencia de enfermedades sistémicas.

La piel consta de tres capas: la epidermis, la dermis y la hipodermis.

2.3.1.1 Epidermis

La epidermis es la capa más externa y está constituida por dos capas: el estrato córneo (epidermis no viable) y la epidermis viable. Sin embargo, la composición y arquitectura del estrato córneo lo convierten en la primera barrera de permeabilidad, ya que a pesar de ser la capa más delgada de la piel, ofrece la mayor resistencia al transporte de sustancias, ya sea con fines cosméticos o farmacológicos. Además, a pH ~7.0, la piel está cargada negativamente debido a los residuos de proteínas con carga negativa, por lo que se considera que la piel es permeoselectiva a cationes (Burnette et al., 1987).

El *estrato córneo* tiene aproximadamente de 10-25 μm de grosor, y está compuesto de células queratinizadas (corneocitos) que son ricas en proteínas fibrosas y son de forma aplanada, éstas se encuentran embebidas en una matriz lipídica ordenada y continua (Walters, 2002). Los lípidos intercelulares son principalmente ceramidas, colesterol, ésteres de colesterol, ácidos grasos y pequeñas fracciones de sulfato de colesterol. El estrato córneo contiene solamente un 20% de agua en condiciones normales, que es un valor muy bajo comparado con el valor fisiológico normal que es aproximadamente del 70%. Por esta razón, el estrato córneo es considerado como una barrera predominantemente lipofílica. De esta manera, los fármacos que son altamente polares o cargados al pH del vehículo (generalmente pH 7.4), son frecuentemente incapaces de penetrar a través de la piel en cantidades terapéuticas.

La *epidermis viable* está formada por el estrato lúcido, estrato granuloso, estrato espinoso y estrato germinativo. En el estrato germinativo nacen las células epidérmicas, que inicialmente son de forma cúbica o cilíndrica. Posteriormente, estas células migran del estrato espinoso, donde se tornan más alargadas al estrato lúcido. En esta capa de la epidermis viable es donde ocurre la queratinización y pérdida del núcleo, para finalmente completarse el proceso de queratinización en el estrato córneo. En la epidermis viable se encuentran los apéndices de la piel, como los folículos pilosos, glándulas sebáceas y glándulas sudoríparas (ver figura 7). El folículo piloso es una invaginación de la dermis y es continua con la epidermis, ofreciendo menos resistencia al transporte de fármacos que el estrato córneo. Las glándulas sebáceas secretan sebo dentro del canal folicular. El porcentaje de hidratación de la epidermis viable es del 70%.

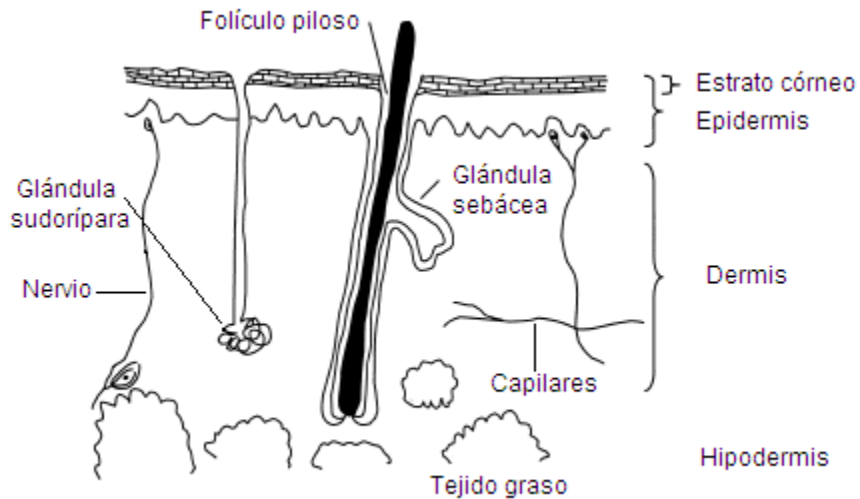


Figura 7. Componentes de la piel.

2.3.1.2 Dermis

La *dermis* tiene un espesor que varía entre 0.2-0.3 cm y está constituida por fibras protéicas (colágeno, elastina y reticulina), insertadas en una matriz semisólida compuesta de polisacáridos. En esta capa se encuentran los vasos sanguíneos, linfáticos y terminaciones nerviosas. Los apéndices cutáneos se encuentran igualmente en la dermis y comprenden a las glándulas sudoríparas apócrinas y écrinas, los folículos pilosos y las uñas (Woolfson et al., 1993; Pruniéras, 1981; Singh y Kim., 1993).

2.3.1.3. Hipodermis

El tejido subcutáneo también llamado *hipodermis* es en donde se producen y almacenan los compuestos lipídicos. Este tejido subcutáneo no participa en la absorción percutánea y tiene la función de amortiguar los golpes externos y de regular la temperatura corporal.

2.3.1.4. Apéndices de la piel

Existen 4 apéndices de la piel: folículos pilosos con sus glándulas sebáceas asociadas, glándulas sudoríparas écrinas, glándulas sudoríparas apócrinas y las uñas. Los folículos pilosos son invaginaciones tubulares de la dermis y son continuos con la epidermis. El canal folicular es amplio en toda su longitud y está relleno de queratina, sebo y flora bacteriana micótica: *Propionibacterium acnes* y *Pityrosporum ovale*. Cada folículo piloso está asociado con una glándula sebácea, que varía en tamaño de 200 a 2000 μm de diámetro. El sebo secretado por la glándula sebácea en el folículo piloso consiste de triglicéridos, ácidos grasos y lubricantes de la piel, además de mantener un pH de 5.

Las glándulas écrinas son estructuras epidermales que se encuentran en la parte inferior de la dermis (figura 7); estas glándulas secretan una solución salina con un pH alrededor de 5. Esta secreción es estimulada con la finalidad de mantener la temperatura del cuerpo y no se vea afectada por temperaturas superiores, ya sea por ejercicio, alta temperatura ambiental, o bien, por estrés emocional a través del sistema nervioso.

Las glándulas apócrinas están limitadas para regiones específicas del cuerpo y son también tubos espirales como las glándulas écrinas. Estas glándulas son aproximadamente diez veces el tamaño de los ductos écrinos, extendiéndose desde la parte más inferior de los tejidos subcutáneos, hasta terminar junto con los folículos pilosos.

Las uñas son células queratinizadas; su principal función es de protección.

2.3.2 DIFUSIÓN PASIVA A TRAVÉS DE LA PIEL

El proceso de transporte de sustancias a través de la piel está dado por simple difusión pasiva. La velocidad de absorción a través de la piel no es constante desde el inicio, puesto que siempre se observa un periodo de latencia. El periodo 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. Cuando se alcanza el equilibrio, la cantidad de la sustancia que atraviesa la piel es determinada por las leyes de Fick (1° y 2°), que pueden aplicarse para analizar datos de permeación:

$$J = \frac{DK\Delta C}{h}$$

J es el flujo, es decir, representa la velocidad con la que el fármaco atraviesa la membrana por unidad de tiempo, D es el coeficiente de difusión a través de la piel, sus dimensiones son área/tiempo; K es el coeficiente de partición piel/vehículo; ΔC es el gradiente de concentración expresado en unidades de concentración/longitud; h es el espesor de la membrana.

Las leyes de Fick muestran que el flujo se incrementa linealmente con la concentración hasta que ésta alcanza el valor de la solubilidad. La primera ley de Fick describe una difusión en un estado estacionario. El flujo en el estado estacionario se calcula a partir de la pendiente del perfil de permeación lineal, mientras que el intercepto provee el tiempo de latencia de difusión.

La constante de permeabilidad se expresa como:

$$Kp = \frac{KD}{h}$$

La constante de permeabilidad (Kp) caracteriza el poder de penetración de una sustancia a través de una membrana; de esta manera, el Kp será más elevado cuanto mayor sea el poder de penetración.

2.3.3 VÍAS DE PENETRACIÓN A TRAVÉS DE LA PIEL

La penetración de fármacos puede ser por difusión pasiva a través de la piel intacta, ya sea por la vía transcelular (a través de los corneocitos), vía intercelular (a través de la matriz lipídica en la cual se encuentran embebidos los corneocitos),

o bien, a través de los apéndices de la piel (folículos pilosos y glándulas sebáceas) también llamada vía folicular. Estudios recientes han demostrado que los folículos pilosos sirven como caminos para la penetración de fármacos. En la figura 8, se esquematizan las diferentes vías de penetración de los fármacos a través de la piel.

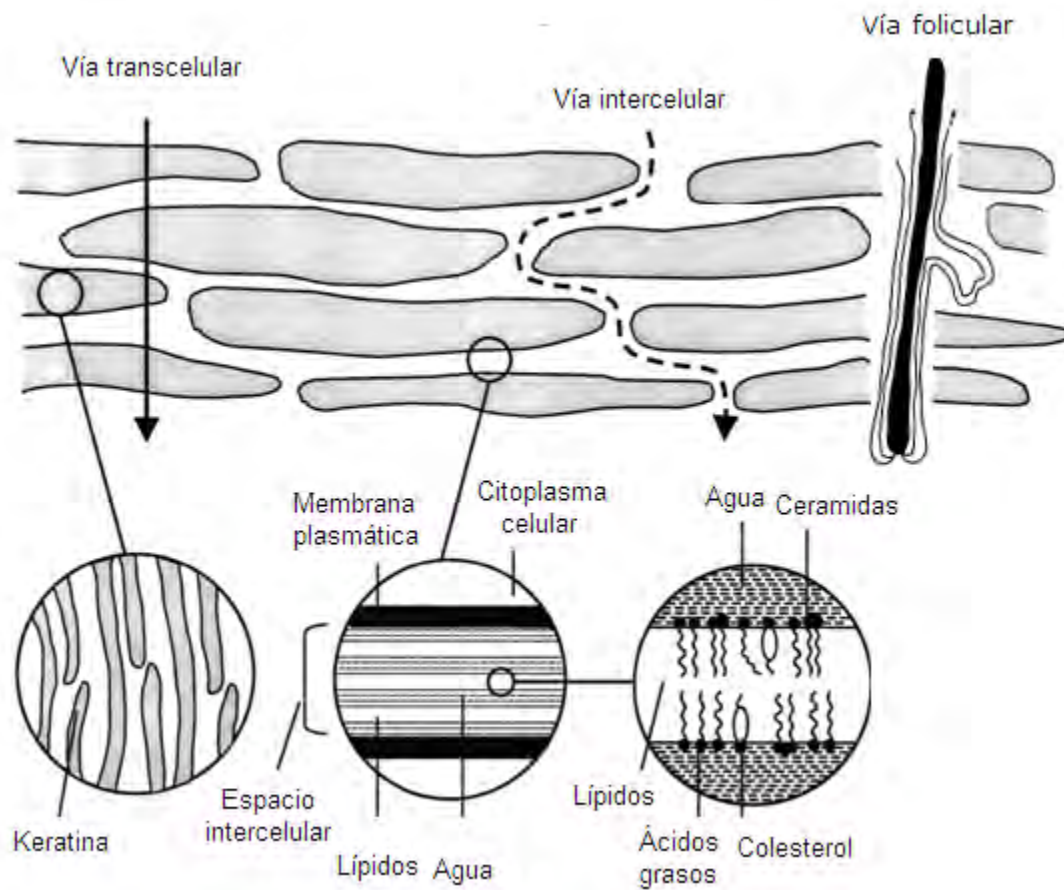


Figura 8. Diferentes vías de penetración de fármacos a través de la piel.

Tras la administración de algún fármaco a través de la piel, se establece en primer lugar, un gradiente de concentración del fármaco desde las distintas vías de entrada del mismo. En segundo lugar, el fármaco pasa a través de la piel por difusión pasiva, consiguiéndose un flujo constante a lo largo de todo el espesor de la piel. Sin embargo, como se mencionó anteriormente, la permeación de los fármacos a través de la piel esta principalmente limitada por el estrato córneo,

debido a que es altamente lipofílico y además presenta una carga negativa bajo condiciones fisiológicas, por lo que, para fármacos hidrosolubles o ionizados, es imposible su paso a través del estrato córneo; por otra parte, se ha demostrado que fármacos que también son lipofílicos, tienen dificultad de penetrar el estrato córneo.

En diversas formas farmacéuticas en las que el fármaco es aplicado por vía tópica, éste queda retenido en la superficie de la piel sin penetrar en el interior del sistema, por lo que el fármaco queda únicamente adsorbido sobre la piel. De esta forma, el fármaco no alcanza a llegar al sitio en donde se desea el efecto terapéutico.

2.3.4 MECANISMOS PARA INCREMENTAR LA ABSORCIÓN PERCUTÁNEA

Se ha mejorado la penetración de diversos fármacos a través de la piel gracias al surgimiento de nuevas tecnologías llamadas *promotores de penetración*, ya sea por medios físicos o químicos, ya que sin la ayuda de éstos, sería casi imposible el paso de la mayoría de los fármacos a través de la piel, ya sea para tratamientos dérmicos o transdérmicos (Guy et al., 2003).

2.3.4.1 Promotores químicos de penetración

Son aquellas sustancias químicas incluidas en el vehículo de formulaciones tópicas o transdérmicas con la finalidad de incrementar la partición y difusión de sustancias lipofílicas o hidrofílicas hacia y a través de la barrera de permeabilidad de la piel.

2.3.4.2 Promotores físicos de penetración

Son aquellas tecnologías que mediante el uso de energía promueven el paso de los fármacos a través de la piel. Existen diferentes técnicas como la iontoforesis, la sonoforesis y la electroporación. La *sonoforesis* se refiere al uso de ultrasonido para mejorar el transporte de fármacos a través de la piel. La *electroporación* consiste en la aplicación de altos voltajes (0.5 - 1 V) en tiempos cortos (10 μ s - 10 ms) a través de la piel con la finalidad de crear una región transitoria de permeabilidad formando canales en la estructura de los lípidos intercelulares y que sirvan como caminos de transporte para los fármacos.

2.3.4.2.1 Iontoforesis

La *iontoforesis* es un método eléctrico que mejora el transporte de fármacos a través de la piel mediante la aplicación de una corriente eléctrica fisiológicamente tolerable ($\leq 0.5 \text{ mA/cm}^2$) por medio de un electrodo que contiene el fármaco en contacto con la piel y un electrodo conectado a tierra, el cual completa el circuito eléctrico en otra parte del cuerpo (Kalia et al., 2004). Existen diferentes tipos de electrodos, sin embargo, los más empleados para estudios iontoforéticos son los electrodos Ag/AgCl, los cuales evitan los cambios drásticos de pH.

La electroquímica iontoforética consiste de un dispositivo que comprende una fuente de poder y dos electrodos con sus respectivos compartimentos. La formulación conteniendo un fármaco ionizado es puesta en el electrodo de la misma carga, es decir, si el fármaco tiene una carga positiva, éste va a ser puesto en el compartimento del ánodo. El electrodo correspondiente al cátodo es colocado a cierta distancia del compartimento del ánodo, de igual manera sobre la piel (figura 9). La electroquímica utilizando electrodos Ag/AgCl como en el presente trabajo, ocurre de la siguiente manera:

El ánodo (Ag) necesita la presencia de iones Cl^- en el compartimento anodal ; este requerimiento usualmente llega a disminuir la eficiencia del transporte del fármaco

ya que el NaCl comúnmente usado para proveer Cl^- también introduce concentraciones significantes de iones Na^+ , los cuales compiten muy efectivamente con el fármaco. Los iones Cl^- reaccionan con la plata metálica para formar cloruro de plata que es depositado sobre la superficie del electrodo liberando un electrón. Para mantener la electroneutralidad en el compartimento anodal, un catión debe ser liberado del compartimento y entrar en la piel, o bien, un anión debe salir de la piel y entrar en la cámara anodal. En el compartimento catodal, el AgCl es reducido por la llegada de electrones. En otras palabras, la electroquímica de un circuito iontoforético consiste de una oxidación en el ánodo y una reducción en el cátodo.

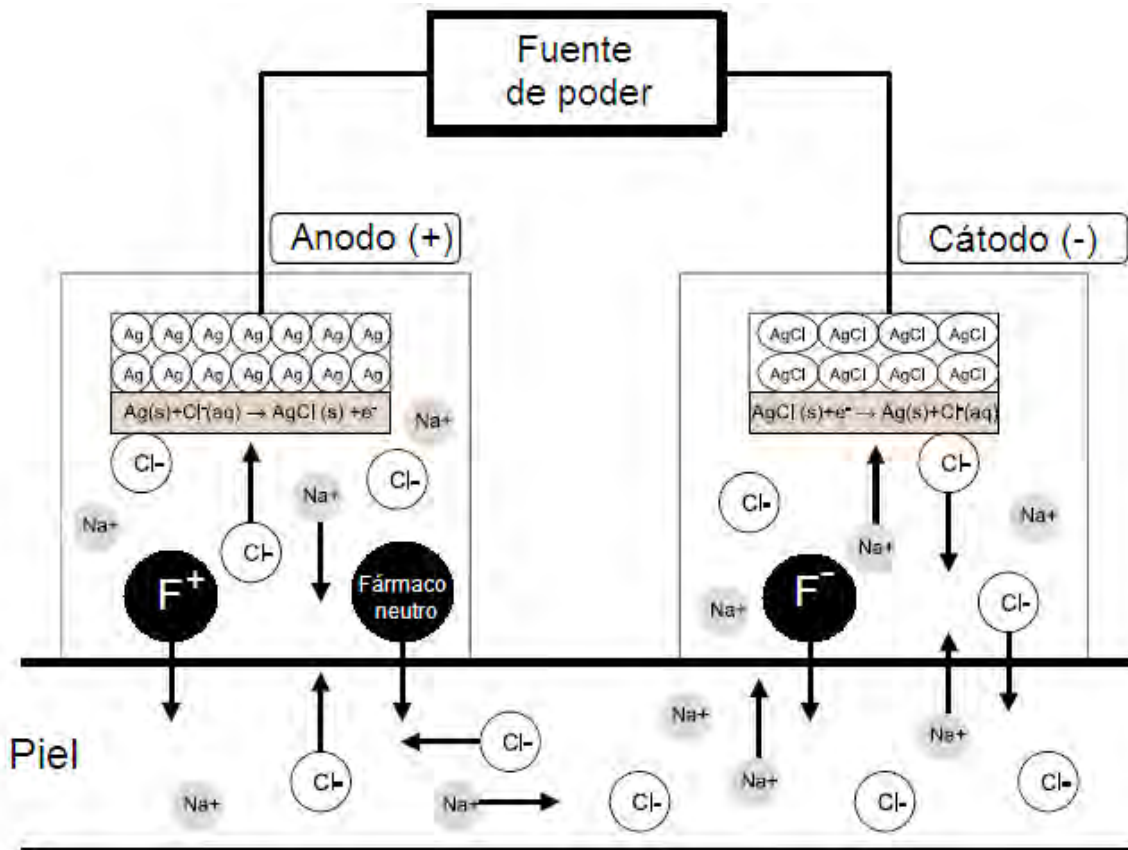


Figura 9. Transporte molecular durante la iontoforesis. Los cationes presentes en la cámara anodal son transportados hacia el interior de la piel; el ánodo atrae iones cargados negativamente. Los aniones presentes en el cátodo migran hacia la piel. F^+ , fármaco con carga positiva; F^- , fármaco con carga negativa, según sea el caso.

Los mecanismos por los cuales la iontoforesis mejora el transporte de fármacos a través de la piel son los siguientes:

- a) *Repulsión eléctrica*; se genera una repulsión entre el fármaco y un electrodo al presentar la misma carga entre ellos.
- b) *Electroósmosis*; se refiere al flujo convectivo de un solvente a través de un poro cargado que ocurre en respuesta al pasaje preferencial de iones cuando el campo eléctrico es aplicado. La dirección de este tipo de transporte es del ánodo hacia el cátodo, facilitando el transporte de cationes, así también como de solutos polares y neutros.
- c) *Flujo de corriente eléctrica* a través de la piel para incrementar la permeabilidad.

Actualmente, la industria farmacéutica sigue enfrentando la problemática de los fármacos que son administrados por vía tópica, ya que el estrato córneo es la primera barrera de permeabilidad a la que se enfrentan la mayoría de los principios activos administrados por esta vía. Por esta razón, se siguen estudiando nuevas tecnologías con la finalidad de que los fármacos logren penetrar a través de la piel con una concentración terapéutica, además de dirigir el principio activo en el sitio de acción.

En la figura 10 se muestran las diferentes vías de penetración de fármacos de acuerdo al sitio en donde se desea que actúen.

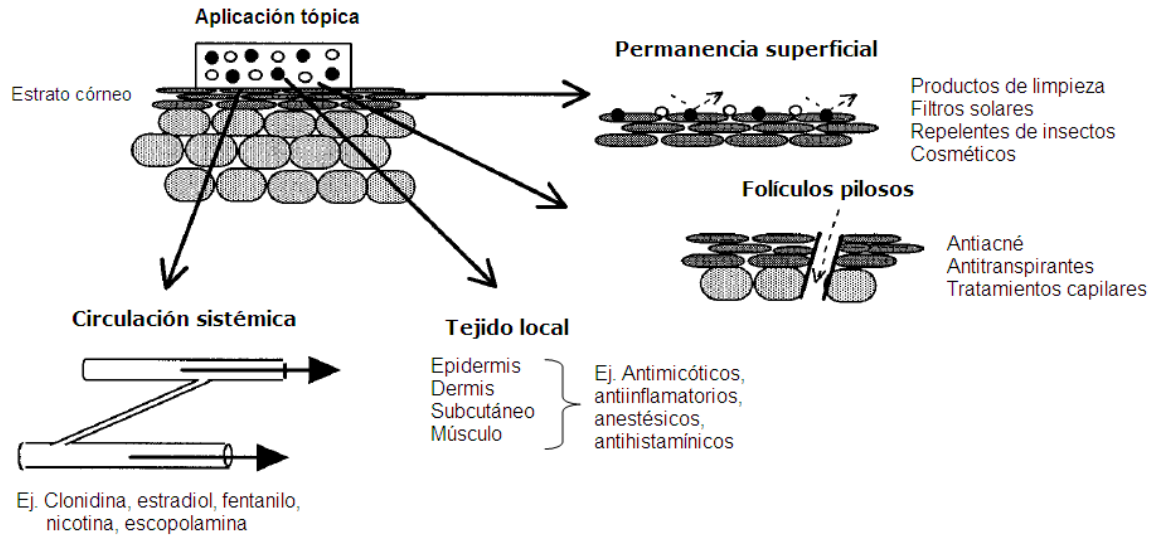


Figura 10. Diferentes vías de penetración de fármacos a través de la piel de acuerdo al sitio donde se desea que actúen (Modificado de Walters, 2002).

Hoy en día, la nanotecnología juega un papel importante en el desarrollo de nuevos sistemas acarreadores de fármacos destinados a diferentes vías de administración. En particular, las nanopartículas poliméricas han mostrado un buen potencial como acarreadores de fármacos para la administración por vía tópica, principalmente debido a su posible vectorización y control de la liberación del principio activo en la piel (Puglia et al., 2008). Rolland y cols. (1993) demostraron que las partículas poliméricas de PLGA con un diámetro menor a 3 μm pueden penetrar dentro de los apéndices de la piel (glándulas sebáceas y folículos pilosos). De igual forma se ha estudiado el uso de nanopartículas de poliestireno como acarreadores de fármacos, las cuales mejoraron la residencia del fármaco en la piel disminuyendo el transporte transdermal (Alvarez-Román et al., 2004b). Estos datos resultan interesantes para tratamientos dérmicos, en donde se desea concentrar la mayor cantidad de fármaco en la piel para que actúen a nivel local y no sistémico, o bien, para el caso de aquellos tratamientos que se relacionan con las glándulas pilosebáceas y que se requiere que el activo se encuentre en los folículos. De esta manera, los sistemas coloidales administrados por vía tópica pueden vectorizar los folículos debido a su tamaño

(menor a $1\mu\text{m}$) (Barry, 2001). Se han logrado vectorizar algunas sustancias en las capas más externas de la piel como la vitamina A (Jenning et al., 2000). Por otro lado, las nanopartículas también han sido propuestas como vehículos tópicos para prolongar la residencia de formulaciones en el estrato córneo tales como los filtros solares (Alvarez-Román et al., 2001). También, se han estudiado las nanopartículas lipídicas principalmente para tratamientos transdérmicos (Jenning et al., 2000, Chen et al., 2006, Liu et al., 2007, Fang et al., 2008, Puglia et al., 2008). Sin embargo, las nanopartículas poliméricas han sido menos estudiadas en comparación con las nanopartículas lipídicas. Tanto las nanopartículas lipídicas como las poliméricas, han mostrado la peculiaridad de reducir la permeación (liberación transdérmica) de activos a través de la piel, logrando formar un reservorio dentro de ésta, incrementando la residencia de los activos en la piel y disminuyendo con ello su paso a nivel sistémico (Rolland et al., 1993, Jennings et al., 2000, De Jalon et al., 2001, Santoyo et al., 2002, Shim et al., 2004, Alvarez-Roman et al., 2004a,b, Chen et al., 2006, Liu et al., 2007, Fang et al., 2008, Puglia et al., 2008, Sheihet et al., 2008).

A pesar de que la piel presenta una carga negativa, las nanopartículas poliméricas que se han estudiado hasta el momento, también presentan carga negativa, lo cual puede anticipar una atracción no favorable entre la piel y las nanopartículas. Tradicionalmente, la aplicación de nanopartículas poliméricas con iontoforesis ha sido investigada separadamente; sin embargo, la aplicación combinada de nanopartículas cargadas positivamente usando iontoforesis no ha sido evaluada para tratamientos dérmicos. Las partículas cargadas positivamente son más susceptibles para mejorar el transporte iontoforético, siendo forzadas para cruzar la piel por electrorepulsión, además de que la piel presenta carga negativa, por lo que la atracción entre la piel y las partículas se ve favorecida. El uso de iontoforesis incrementa la penetración y acumulación de nanopartículas en la piel (Turner y Guy, 1998), ya que los folículos pilosos y los ductos sudoríparos pueden actuar como caminos para moléculas iónicas mediante un transporte iontoforético. De acuerdo a lo mencionado, surge la necesidad de crear nuevos sistemas de liberación de fármacos, con la finalidad de mejorar las expectativas de las formas

farmacéuticas ya existentes. De esta manera, la administración no invasiva de principios activos se ha hecho posible, por un lado, gracias al empleo de vías alternas para la administración de los fármacos y, por otro lado, debido al desarrollo de nuevas formas farmacéuticas que permitan lograr una liberación controlada del principio activo.

3. JUSTIFICACIÓN DEL TRABAJO

Existen pocas opciones tecnológicas para formular sistemas de liberación controlada de fármacos sin someter a éstos a un estrés químico y/o mecánico (los cuales en la mayoría de los casos provocan degradación de sustancias activas sensibles o de los componentes de la formulación), además de requerir que el fármaco actúe en el sitio de acción. Por estas razones, surge la necesidad de estudiar y crear nuevos sistemas de liberación controlada de fármacos, evitando su degradación y, por otro lado, controlar su velocidad de liberación.

El uso de la nanotecnología, particularmente nanopartículas poliméricas, son estudiadas en el presente trabajo para desarrollar sistemas de liberación de fármacos, infiltrando éstas dentro de soportes biológicos y no biológicos, actuando las nanopartículas como acarreadores de fármacos y/o controladores de la liberación del principio activo.

4. HIPÓTESIS

Si es tecnológicamente factible infiltrar nanopartículas dentro de un soporte no biológico (membranas biodegradables porosas) y biológico (piel humana), entonces será posible, desarrollar sistemas de liberación controlada de principios activos a partir de nanopartículas que actúen como acarreadores de fármacos y/o controladores de la liberación del principio activo.

5. OBJETIVOS

5.1 OBJETIVO GENERAL

Desarrollar y evaluar nuevos sistemas de liberación de fármacos a partir de dispersiones nanoparticuladas: (i) nanopartículas infiltradas en un soporte polimérico biodegradable y, (ii) nanopartículas e iontoforesis en piel humana.

5.2 OBJETIVOS PARTICULARES

i) Nanopartículas infiltradas en un soporte polimérico (membrana biodegradable porosa)

1. Encontrar las condiciones óptimas para elaborar membranas biodegradables porosas, empleando ácido poliláctico-co-glicólico (PLGA) como polímero, mediante el método de “vaciamiento de soluciones poliméricas orgánicas” para emplearlas como soporte no biológico.
2. Encontrar las condiciones óptimas para preparar nanopartículas biodegradables de PLGA, de un tamaño ≤ 300 nm, por el método emulsificación-difusión para infiltrarlas en el soporte no biológico.
3. Caracterizar las membranas porosas con y sin infiltración de nanopartículas por microscopía electrónica de barrido y calorimetría diferencial de barrido.
4. Caracterizar las nanopartículas por su morfología y tamaño de partícula mediante microscopía electrónica de barrido y dispersión dinámica de luz.
5. Adsorber carbamazepina como fármaco modelo sobre las superficies expuestas de las membranas porosas con y sin infiltración de nanopartículas.

6. Realizar perfiles de liberación de la carbamazepina a partir de las membranas biodegradables porosas con y sin infiltración de nanopartículas.

ii) Nanopartículas e iontoforesis en piel humana

1. Preparar nanopartículas empleando Eudragit® RL 100 como polímero y triclosán como principio activo, de un tamaño ≤ 300 nm, por el método emulsificación-difusión por desplazamiento del disolvente para emplearlas como acarreadores y/o controladores de la liberación de un fármaco (triclosán) a través de la piel.

2. Caracterizar las nanopartículas por su morfología, tamaño y potencial Z mediante el uso de técnicas como: microscopía electrónica de barrido, dispersión dinámica de luz y movilidad electroforética y, determinar la eficiencia de encapsulamiento.

3. Desarrollar y validar un método analítico para cuantificar el triclosán por HPLC-UV.

4. Evaluar la cinética de permeación *in vitro* de triclosán formulado en nanopartículas por difusión pasiva e iontoforesis a través de piel humana.

6. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

6.1 REACTIVOS, MATERIAL Y EQUIPOS

Polímeros

- Alcohol polivinílico (PVA) (Mowiol® 4-88), PM: 26,000 g/mol (Glomarza, México).
- Metacrilato de aminoalquilo (Eudragit® RL 100), PM: 150,000 g/mol. Donado por Helm de México, S.A. de C.V.
- Poli(D,L-láctico-co-glicólico) 1:1, PM: 31 kDa. Medisorb® (Lakeshore Biomaterials, E.U.A.).

Principios activos

- Carbamazepina (Sigma-Aldrich, China).
- Triclosán (Multiquim, México).

Reactivos

- Acetato de etilo grado analítico (Fermont, México).
- Cloruro de metileno grado analítico (JT Baker, México).
- Ácido 2-[4-(2-hidroxietil)-1-piperazinil] etanosulfónico (HEPES) (Sigma-Aldrich, España).
- Metanol grado HPLC (Sharlau, España).
- Metiletilcetona grado analítico (Fermont, México).
- 1,2-propanodiol (Prolabo, España).

Material y equipos

- Agitador de velocidad variable (Caframo® RZR-1, Canadá).
- Balanza analítica (Boeco® BBC32, Alemania).
- Calorímetro diferencial de barrido DSC Q10 (TA Instruments, E.U.A.).
- Campana de recubrimiento con oro (JEOL® JFC-1100, Japón).
- Celdas de difusión tipo Franz con área superficial de 0.6 cm².
- Contador submicrónico de partículas (Coulter® N4 Plus, E.U.A.).
- Cromatógrafo de líquidos de alta resolución UV-Visible (Waters®, Barcelona España).
- Columna Supelcosil C-18 (150 mm x 4.6 mm, 5 µm de tamaño de partícula) (Supelco®, Francia).
- Electrodermatoma; Aesculap-Wagner C. GA 176 (B. Braun Surgical S.A., España).
- Electroodos de plata metálica y cloruro de plata.
- Espectrofotómetro (Varian® Cary IE 9531003, Australia).
- Fuente de poder Kepco BHK-MG 0-2000V (Kepco, Inc. Flushing, NY, E.U.A.).
- Medidor de potencial Z (Malvern Instruments® NS ZEN 3600, Reino Unido).
- Microscopio electrónico de barrido (JEOL® JMS-25 S II, Japón).
- Rotaevaporador (Laborota® Heidolph 4000, Alemania).
- Sonicador (Branson® Branson 5210, E.U.A.).
- Ultracentrífuga (Beckman® Optimal LE-80K, E.U.A.).

6.2 METODOLOGÍA

En la primera etapa, el trabajo de investigación se dirigió hacia el estudio de la infiltración de nanopartículas empleando como soporte no biológico membranas biodegradables porosas. Posteriormente, la investigación se concluyó con la infiltración de nanopartículas en un soporte biológico empleando como substrato biológico piel humana.

6.2.1 NANOPARTÍCULAS INFILTRADAS EN UN SOPORTE POLIMÉRICO (MEMBRANA BIODEGRADABLE POROSA)

6.2.1.1 DETERMINACIONES PREVIAS

a) Espectros de absorción

Se determinaron las longitudes de onda de máxima absorción para la carbamazepina en medio acuoso (fluido intestinal simulado de acuerdo a la U.S. Pharmacopeia NF, 2008). La solubilidad de la carbamazepina en medio acuoso reportada en la bibliografía es de ~180 µg/ml. Se realizaron soluciones con una concentración conocida de carbamazepina por debajo de su máxima solubilidad. Los barridos se hicieron de 200 a 400 nm.

b) Determinación de la solubilidad de carbamazepina

Para determinar la solubilidad experimental de la carbamazepina, se preparó una solución saturada de carbamazepina en fluido intestinal simulado; posteriormente, se filtró el fármaco no disuelto empleando una membrana de nylon (Millipore® con un diámetro de poro de 100 nm). El sobrenadante se leyó por espectrofotometría UV a la máxima longitud de onda de absorción determinada previamente.

c) Curva de calibración de carbamazepina por espectrofotometría UV

Se construyó una curva de calibración de carbamazepina partiendo de una solución madre a una concentración de 50 µg/ml. A partir de esta solución, se tomaron diferentes alícuotas para preparar por triplicado ocho concentraciones conocidas desde 5 hasta 40 µg/ml, utilizando como medio fluido intestinal simulado. Los sistemas se leyeron a la longitud de onda de máxima absorción (285 nm) por espectrofotometría UV. Se validó el método analítico determinándose la linealidad del sistema, el coeficiente de variación (C.V.), así como también la repetibilidad (n = 3) y reproducibilidad (3 diferentes días) (ver anexo II).

d) Análisis de malla del cloruro de sodio

Se granuló el cloruro de sodio en un mortero. Posteriormente, se pasó el granulado de cloruro de sodio por tamices con mallas del No. 120, 150, 200 y 270. El granulado que se retuvo en la malla No. 270 (53 µm de apertura) con un diámetro de gránulo de 63 µm, fue el empleado para la preparación de las membranas biodegradables porosas.

6.2.1.2 PREPARACIÓN DE MEMBRANAS BIODEGRADABLES POROSAS

Las membranas biodegradables porosas fueron preparadas por la técnica “vaciamiento de soluciones poliméricas orgánicas” basada en el trabajo de Mikos y cols. (1994). Aproximadamente, 0.625 g de PLGA 1:1 fueron disueltos en cloruro de metileno. Posteriormente, ~0.625 g de cloruro de sodio fueron resuspendidos en esta solución. El cloruro de sodio fue utilizado con el objetivo de crear la porosidad dentro de la membrana. La suspensión fue vaciada en moldes de teflón con un diámetro de 3 cm. El disolvente fue eliminado de los moldes a temperatura ambiente por 48 horas; la cantidad residual de disolvente fue removida a vacío. Una vez secas las membranas, éstas fueron sumergidas en 250 ml de agua

destilada durante 72 horas a temperatura ambiente y con agitación constante, con la finalidad de eliminar el cloruro de sodio; el agua destilada fue cambiada cada 6 horas. Las membranas libres de cloruro de sodio se dejaron secar a temperatura ambiente en un desecador con una humedad relativa de 56 %.

6.2.1.3 CARACTERIZACIÓN DE LAS MEMBRANAS BIODEGRADABLES POROSAS

a) Área de superficie específica (BET)

El área de superficie específica de las membranas fue determinada por el método de BET (Brunnauer-Emmet-Teller), mediante el uso de un analizador Autosorb 1MP con una presión de 1 mTorr. La muestra fue degasificada a una temperatura de 22° C durante 8 horas (de acuerdo al protocolo de *Autosorb 1-series*). Las isotermas de adsorción fueron construidas utilizando nitrógeno como adsorbato.

b) Morfología

Secciones transversales de las membranas secas fueron cubiertas con una película fina de oro (~ 20 nm) en una campana de recubrimiento a vacío (JFC-1100) por tres minutos a 1.2 kV con una intensidad de corriente de 10 mA y una presión de 0.15 Torr, para posteriormente ser observadas por microscopía electrónica de barrido (JMS-25 S II) a 12.5 kV, antes y después de la infiltración de nanopartículas.

6.2.1.4 PREPARACIÓN DE NANOPARTÍCULAS POR EL MÉTODO DE EMULSIFICACIÓN-DIFUSIÓN

Se saturó previamente el disolvente orgánico (acetato de etilo) con agua destilada en un embudo de separación con agitación vigorosa y después se separaron ambas fases. En 20 ml de la fase orgánica se disolvieron 400 mg de polímero (PLGA 1:1) y se emulsificó con 40 ml de la fase acuosa conteniendo alcohol polivinílico al 5 % p/v; la agitación del sistema se realizó durante 10 minutos a una velocidad de 2,200 rpm. Posteriormente, se adicionaron 160 ml de agua destilada al sistema con agitación continua durante 10 minutos más. El disolvente orgánico se eliminó de la emulsión bajo presión reducida con un rotavapor a 30 rpm y 35° C.

La suspensión fue centrifugada a 20,000 rpm durante 20 minutos. La pastilla obtenida se resuspendió en agua destilada para ser centrifugada nuevamente. Este proceso de lavado-centrifugado se realizó tres veces. La pastilla de la última centrifugación se resuspendió en agua destilada y se congeló para posteriormente ser liofilizada. Cabe señalar que el tamaño de las nanopartículas fue determinado antes de someterse al proceso de centrifugación, durante la última resuspensión en agua destilada posterior a los tres procesos de lavado-centrifugado y después de ser liofilizadas.

6.2.1.5 CARACTERIZACIÓN DE NANOPARTÍCULAS

a) Morfología

La morfología de las nanopartículas fue observada por microscopía electrónica de barrido. Una dispersión acuosa de nanopartículas (~0.2 mg/ml) fue colocada en un cubreobjetos y se dejó secar; posteriormente, se recubrió con una película fina de oro con las condiciones previamente mencionadas (sección 6.2.1.3, b) para ser observadas por microscopía electrónica de barrido (JMS-25 S II) a 12.5 kV.

b) Tamaño de partícula

El tamaño promedio de las nanopartículas y su índice de polidispersión se determinó por la técnica dispersión dinámica de la luz mediante el uso de un contador submicrónico de dispersión de rayos láser a un ángulo de 90° por 180 segundos y a una temperatura de 25° C (Nanosizer® N4 Plus). Las dispersiones nanoparticuladas fueron diluidas con agua destilada. Las determinaciones se realizaron por triplicado para cada lote preparado.

6.2.1.6 INFILTRACIÓN DEL FÁRMACO Y NANOPARTÍCULAS DENTRO DE LOS SISTEMAS POROSOS

Las membranas biodegradables porosas fueron sumergidas dentro de 10 ml de una solución acuosa saturada de carbamazepina (~180 µg/ml) por 12 horas, con la finalidad de que el fármaco fuera adsorbido dentro de la membrana biodegradable porosa; este sistema es el control (sistema 1). Posteriormente, las membranas fueron secadas a vacío a temperatura ambiente.

Las membranas con infiltración de nanopartículas fueron preparadas sumergiendo las membranas por 12 horas dentro de 10 ml de una solución saturada de carbamazepina conteniendo diferentes cantidades de nanopartículas liofilizadas de PLGA: 50, 100, 400 ó 600 mg, nombrados como sistema 2, 3, 4 y 5, respectivamente. Finalmente, las membranas fueron secadas a vacío a temperatura ambiente.

6.2.1.7 CARACTERIZACIÓN DE LAS MEMBRANAS BIODEGRADABLES POROSAS CON INFILTRACIÓN DE NANOPARTÍCULAS

Las membranas con infiltración de nanopartículas fueron caracterizadas por microscopía electrónica de barrido con la finalidad de observar su morfología y las nanopartículas adsorbidas dentro del sistema; también se caracterizaron por calorimetría diferencial de barrido.

Los análisis de calorimetría diferencial de barrido fueron realizados para el PLGA y la carbamazepina, así como a los diferentes sistemas (1-5). De cada una de las muestras, se pesaron entre 4-6 mg y se colocaron directamente en soportes de aluminio no herméticos. En seguida, se sometieron a una rampa de calentamiento de 25 - 230° C, con una velocidad de calentamiento de 10° C/min y un flujo de nitrógeno de 50 ml/min (DSC Q10, TA Instruments).

6.2.1.8 PERFILES DE LIBERACIÓN *IN VITRO*

Los perfiles de liberación de carbamazepina de las membranas biodegradables porosas fueron realizados en 10 ml de fluido intestinal simulado, de acuerdo a la U.S. Pharmacopeia NF, 2008. Se mantuvieron condiciones “sink” (concentración de carbamazepina $\leq 60 \mu\text{g/ml}$) durante el estudio para todos los sistemas preparados. Los sistemas se mantuvieron en agitación a 25 rpm a $37 \pm 0.5^\circ \text{C}$ en un baño de agua oscilante. Se tomaron muestras de 2 ml, reponiendo el mismo volumen con medio de disolución fresco a un intervalo de tiempo determinado.

Las muestras se analizaron por espectrofotometría UV a una longitud de onda de 285 nm y se interpolaron en la curva de calibración realizada previamente. La cantidad de fármaco liberada en cada punto de tiempo determinado fue corregida por el efecto de dilución. Cada experimento fue realizado por triplicado.

6.2.2 NANOPARTÍCULAS E IONTOFORESIS EN PIEL HUMANA

6.2.2.1 DETERMINACIONES PREVIAS

a) Estudios de solubilidad

En viales de 25 ml, una solución acuosa de HEPES 25 mM y cloruro de sodio 30 mM pH 7.4, fue mezclada con diferentes proporciones de propilenglicol. El triclosán fue gradualmente adicionado en estas mezclas hasta que las soluciones indicaron la presencia de fármaco no disuelto. La solución donde el triclosán tuvo máxima solubilidad fue seleccionada para preparar las soluciones y dispersiones en los ensayos de difusión.

b) Curva de calibración de triclosán por HPLC UV

Se construyó una curva de calibración de triclosán, partiendo de una solución madre con una concentración de ~0.2 mg/ml. A partir de esta solución, se tomaron diferentes alícuotas para preparar por triplicado cinco concentraciones conocidas desde 0.0002 hasta 0.02 µg/ml, utilizando como medio una solución 50:50 de HEPES 25 mM, cloruro de sodio 30 mM pH 7.4 y propilenglicol. Los sistemas se cuantificaron a la longitud de onda de máxima absorción (285 nm) por cromatografía de líquidos de alta resolución UV. Se validó el método analítico determinándose el límite de detección (LD) y de cuantificación (LC). Se evaluó la linealidad del sistema y el coeficiente de variación (C.V.) (ver anexo II). También se determinó repetibilidad (n = 3) y reproducibilidad (3 diferentes días).

6.2.2.2 PREPARACIÓN DE NANOPARTÍCULAS POR EL MÉTODO DE EMULSIFICACIÓN-DIFUSIÓN POR DESPLAZAMIENTO DEL DISOLVENTE

Se saturó previamente el disolvente orgánico (metiletilcetona) con agua destilada en un embudo de separación con agitación vigorosa, y después se separaron ambas fases. En 20 ml de la fase orgánica, se disolvieron 400 mg de polímero (Eudragit® RL 100) y 180 mg de triclosán; posteriormente, esta fase se emulsificó con 40 ml de la fase acuosa conteniendo alcohol polivinílico al 5 % p/v. La agitación del sistema se realizó durante 10 minutos a una velocidad de 2,000 rpm. Posteriormente, el disolvente orgánico se eliminó de la emulsión bajo presión reducida con un rotavapor a 30 rpm y 40° C.

La suspensión fue centrifugada a 27,000 rpm durante 40 minutos. La pastilla obtenida se resuspendió en agua destilada para ser centrifugada nuevamente. Este proceso de lavado-centrifugado se repitió dos veces. La pastilla de la última centrifugación se resuspendió en agua destilada y se congeló para posteriormente ser liofilizada. Cabe señalar que el tamaño de las nanopartículas fue determinado antes de someterse al proceso de centrifugación, durante la última resuspensión en agua destilada posterior a los tres procesos de lavado-centrifugado, y después de ser liofilizadas.

6.2.2.3 CARACTERIZACIÓN DE NANOPARTÍCULAS

a) Tamaño de partícula

El tamaño promedio de las nanopartículas y su índice de polidispersión se determinó por la técnica dispersión dinámica de la luz, mediante el uso de un contador submicrónico de dispersión de rayos láser a un ángulo de 90° por 180 segundos a una temperatura de 25° C (Nanosizer® N4 Plus). Las dispersiones

fueron diluidas con agua destilada. Las determinaciones se realizaron por triplicado para cada lote preparado.

b) Eficiencia y porcentaje de encapsulamiento

Aproximadamente, 20 mg de nanopartículas de triclosán liofilizadas se resuspendieron en 5 ml de etanol por 15 minutos, en el cual el Eudragit® RL 100 y el triclosán son solubles, mientras que el alcohol polivinílico es insoluble. Después, esta suspensión fue filtrada con la finalidad de eliminar el alcohol polivinílico y evitar una sobreestimación del principio activo. La solución obtenida fue analizada por HPLC para conocer su concentración.

El porcentaje de fármaco encapsulado en las nanopartículas y la eficiencia de encapsulamiento fueron determinados de acuerdo a Leroux y cols. (1995) utilizando las siguientes ecuaciones:

$$\text{Triclosan encapsulado (\%)} = \frac{\text{cantidad de triclosan en nanopartículas}}{\text{cantidad de nanopartículas}} \times 100$$

$$\text{Eficiencia de encapsulamiento (\%)} = \frac{\% \text{ de triclosan encapsulado}}{\% \text{ de contenido de triclosan inicial}} \times 100$$

Leroux y cols. (1995) introducen un factor de corrección para evitar una sobreestimación, debido a que cierta cantidad de alcohol polivinílico se adsorbe sobre la superficie de las partículas durante el proceso de su obtención; sin embargo, en este trabajo no se introduce este factor de corrección debido a que el alcohol polivinílico fue eliminado.

La cantidad inicial de triclosán utilizada para la preparación de las nanopartículas fue del 31.03 %, con respecto a la cantidad total de polímero y carbamazepina por lote. De acuerdo a estudios previos de calorimetría diferencial de barrido

realizados por Domínguez-Delgado (2006), se reporta que éste es el porcentaje idóneo para que el fármaco quede encapsulado dentro de las nanopartículas y no adsorbido también sobre éstas o en solución.

Las determinaciones de eficiencia y porcentaje de encapsulamiento se realizaron por triplicado.

c) Potencial Z (Ψ_z)

El potencial zeta de las nanopartículas de Eudragit® RL 100 cargadas de triclosán, fue determinado por el método de movilidad electroforética. Las mediciones se realizaron a una longitud de onda del rayo láser (He/Ne 4.0 mW) de 633 nm con un ángulo de 17° por 180 segundos y, a una temperatura de 20° C. Las nanopartículas fueron diluidas (1:10) en agua desionizada previamente filtrada en una membrana de nylon (Millipore®) con un diámetro de poro de 0.22 μm . Las mediciones se realizaron por triplicado para cada lote preparado.

6.2.2.4 PERMEACIONES *IN VITRO*

Para los estudios de permeación, se empleó como substrato biológico piel abdominal humana, la cual fue obtenida de abdominoplastías realizadas en el Hospital General Universitario (Valencia, España). La piel fue cortada con un electro-dermatoma (500 μm de grosor); posteriormente, las piezas obtenidas fueron cubiertas con papel aluminio y almacenadas en un congelador a -20° C, por un periodo máximo de 15 días. Para los ensayos, las piezas de piel fueron sumergidas en solución isotónica y después colocadas como barrera entre el compartimento donador y receptor de las celdas de difusión.

6.2.2.4.1 PERMEACIONES *IN VITRO* POR DIFUSIÓN PASIVA

Los estudios *in vitro* de permeación pasiva e iontoforética fueron realizados usando celdas de vidrio verticales de difusión tipo Franz, con un área disponible para difusión de 0.6 cm². La solución utilizada como medio receptor y empleada para preparar el medio donador consistió de una solución 50:50 de HEPES 25 mM, cloruro de sodio 30 mM a pH 7.4 y propilenglicol. El medio receptor (4 ml) se mantuvo en agitación constante con una barra magnética de teflón a una temperatura de 37 ± 0.5° C en baño maría durante el experimento. En el compartimento receptor, se colocó 1 ml de solución de triclosán (~2.5 mg/ml) o 1 ml de dispersión de nanopartículas (~2.5 mg de triclosán/ml). Durante el estudio de permeación (32 horas), se tomaron muestras del medio receptor (400 µl) cada dos horas, y se repusieron con el mismo volumen de medio fresco para mantener condiciones “sink”. En la figura 11 se representa esquemáticamente una permeación por difusión pasiva, utilizando una celda de difusión tipo Franz. El contenido de las muestras fue analizado por cromatografía de líquidos de alta resolución.

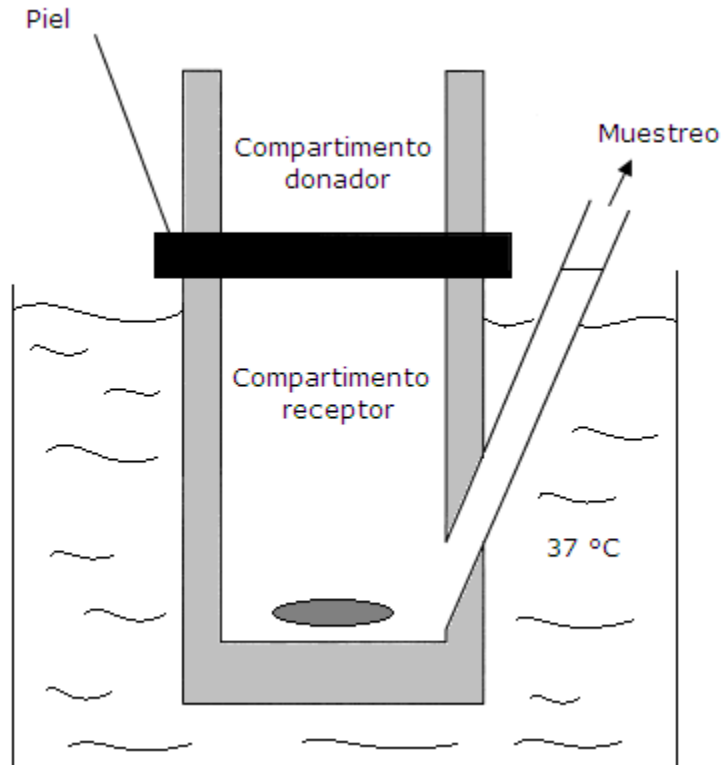


Figura 11. Permeación por difusión pasiva mediante una celda de difusión tipo Franz.

6.2.2.4.2 PERMEACIONES *IN VITRO* CON IONTOFORESIS

Para los estudios iontoforéticos, las mismas celdas mencionadas anteriormente fueron usadas. La solución empleada como medio receptor y donador fue la misma que la utilizada en los sistemas por difusión pasiva. El medio donador conteniendo solución de triclosán (~2.5 mg/ml), o bien, suspensión de nanopartículas (1.5, 2.5 o 4.0 mg de triclosán/ml), se mantuvieron en contacto con el electrodo con carga positiva (ánodo) mediante un puente salino (3 % de agar en solución de cloruro de sodio 50 mM), con la finalidad de minimizar la competición de iones. El electrodo se mantuvo sumergido en una solución de cloruro de sodio 150 mM. En el compartimento receptor se colocó el electrodo con carga negativa (cátodo). El medio receptor se mantuvo en agitación constante con una barra

magnética de teflón a $37 \pm 0.5^\circ \text{C}$ en baño maría durante el experimento. Se mantuvo una densidad de corriente eléctrica de 0.5 mA/cm^2 durante 8 horas mediante los electrodos Ag/AgCl conectados a una fuente de corriente. En la figura 12 se representa esquemáticamente una permeación iontoforética usando una celda de difusión tipo Franz. Después de las primeras 8 horas con iontoforesis, el estudio se continuó por difusión pasiva hasta completar las 32 horas. Se tomaron muestras del medio receptor ($400 \mu\text{l}$) cada hora durante las primeras 8 horas del estudio y, posteriormente, cada dos horas, reponiéndose con el mismo volumen de medio fresco para mantener condiciones “sink” por difusión pasiva. El contenido de las muestras fue analizado por HPLC (ver anexo IV).

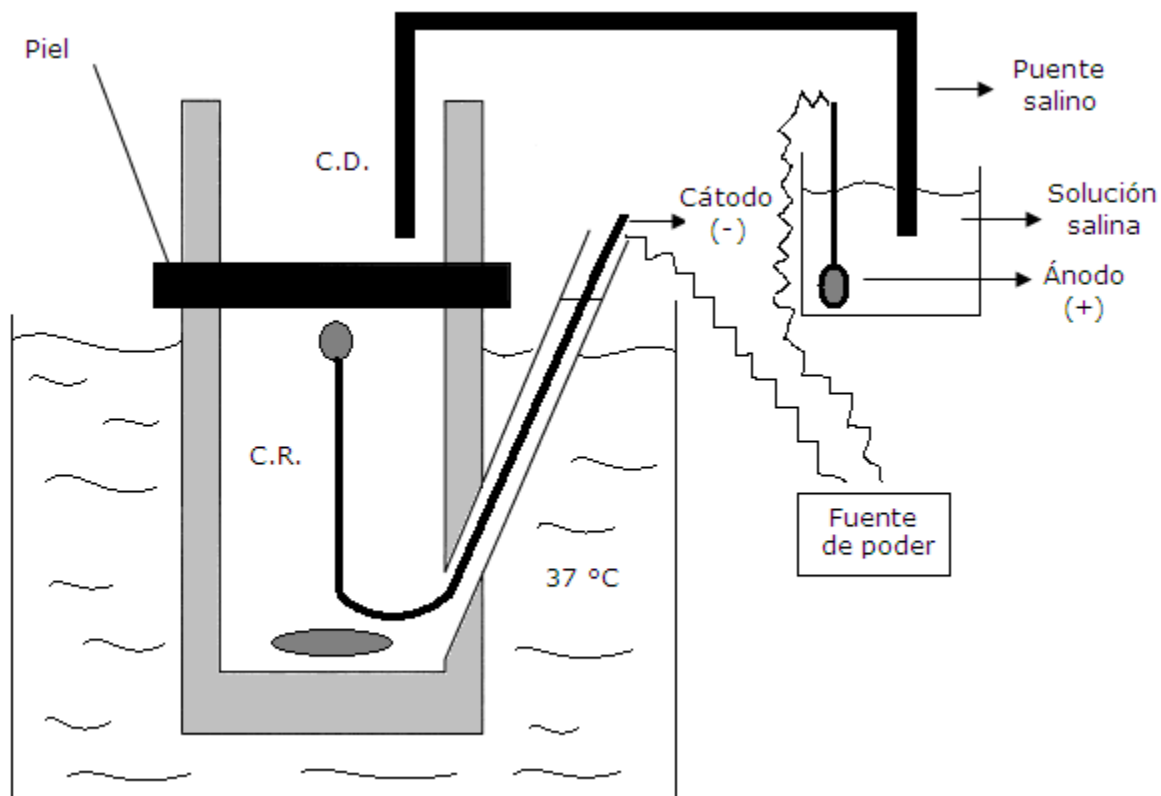


Figura 12. Dispositivo iontoforético mediante una celda de difusión tipo Franz. C.D.: Compartimento donador; C.R.: Compartimento receptor.

Todos los estudios de permeación por difusión pasiva e iontoforéticos se realizaron por cuadruplicado. Al final de los experimentos por difusión pasiva e iontoforesis, la cantidad de triclosán retenida en la piel fue extraída empleando la misma fase móvil como medio de extracción usada para analizar las diferentes muestras obtenidas durante los estudios de permeación. Las muestras de piel fueron cortadas y sumergidas en la fase móvil por 7 horas con agitación constante a temperatura ambiente. Las muestras fueron analizadas por HPLC (ver anexo V).

6.2.2.5 Cromatografía de líquidos de alta resolución UV (HPLC)

Las muestras obtenidas fueron analizadas por HPLC mediante una separación isocrática por fase reversa. Las determinaciones se realizaron a una longitud de onda de 280 nm. La velocidad de flujo y el volumen de inyección fueron de 1 ml/min y 150 µl, respectivamente. La fase móvil consistió de 90 % de fase orgánica (metanol) y 10 % de fase acuosa (buffer de fosfatos 25 mM, pH 6.0). Todos los disolventes fueron filtrados con una membrana de nylon (Millipore ®, diámetro de poro de 0.45 µm) y degasificados previamente al análisis. La columna fue equilibrada por 50 minutos con la fase móvil.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 NANOPARTÍCULAS INFILTRADAS EN UN SOPORTE POLIMÉRICO BIODEGRADABLE

7.1.1 Determinaciones previas

Se determinó la solubilidad de la carbamazepina en medio acuoso siendo ésta de ~170 µg/ml. Posteriormente, se realizaron los espectros de absorción para la carbamazepina en medio acuoso. La longitud de onda (λ) seleccionada para cuantificar la carbamazepina fue de 285 nm, ya que a esta longitud no se presentaron interferencias, además de ser la longitud de onda de máxima absorbancia por parte del analito (ver anexo II).

Se preparó la curva de calibración y se cuantificó la carbamazepina por espectrofotometría UV a la longitud de onda de 285 nm. Se validó la curva de calibración, obteniéndose un coeficiente de determinación (r^2) de 0.999 y un coeficiente de variación (C.V.) de 1.85 %. Se demostró reproducibilidad y repetibilidad (ver anexo II).

7.1.2 Membranas biodegradables porosas

Se prepararon membranas biodegradables porosas de PLGA 1:1 por la técnica de “vaciamiento de soluciones poliméricas orgánicas”, tomando como condiciones iniciales las propuestas por A. Mikos y cols. (1994). En la figura 13 se observa una fotografía de una membrana biodegradable porosa.



Figura 13. Fotografía de membrana biodegradable porosa.

Las membranas fueron analizadas por microscopía electrónica de barrido (MEB) para observar su morfología. En la figura 14 se muestran microfotografías tomadas de cortes transversales de membranas; éstas mostraron tener una alta porosidad con canales interconectados dentro del sistema. El diámetro promedio de los poros de las membranas fue de $44.5 \pm 8.8 \mu\text{m}$ y se obtuvo realizando mediciones longitudinales y transversales de éstos en un campo de 100 poros (ver anexo III). Estas membranas son muy semejantes a los sistemas porosos preparados por Mikos y cols. (1993) por la técnica de “vaciamiento de soluciones poliméricas orgánicas”, los cuales también presentan porosidad con canales interconectados dentro de los sistemas. Cabe mencionar que Mikos y cols. prepararon sistemas porosos de ácido poliláctico (PLA) con la finalidad de ser empleados como sustratos para la reproducción celular en la regeneración o implantación de órganos en el cuerpo humano debido a la biodegradabilidad y compatibilidad que presentan estos polímeros.

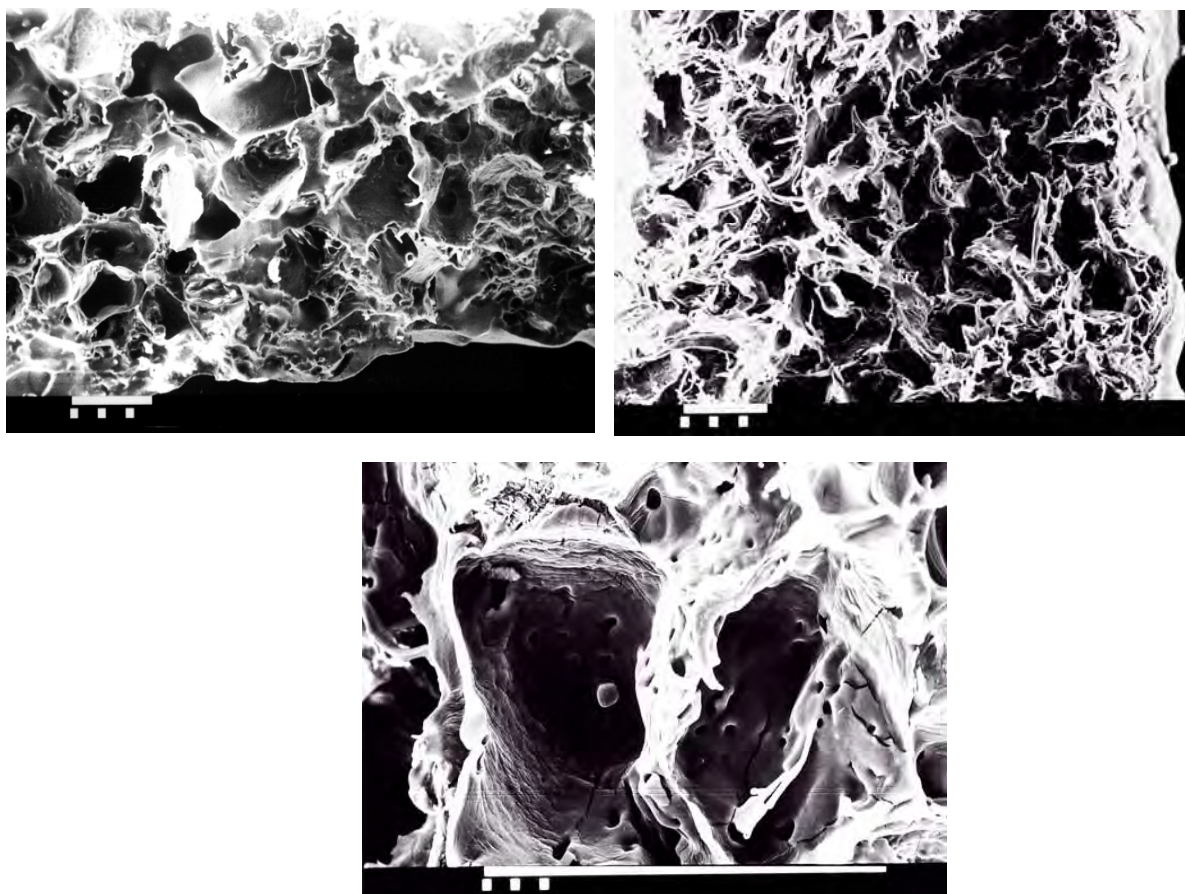


Figura 14. Microfotografías de membranas biodegradables porosas de PLGA (1:1). Microscopía electrónica de barrido; barra = 100 μm (fotografías tomadas por el técnico Rodolfo Robles).

Las membranas presentaron un área de superficie específica de $10.07 \pm 0.21 \text{ m}^2/\text{g}$ y un volumen de poro total de $0.03 \text{ cm}^3/\text{g}$, determinado por el método de BET (Brunnauer-Emmet-Teller). El área de superficie específica obtenida indica que existe una superficie muy extensa dentro de las membranas, la cual es suficiente para que las nanopartículas puedan penetrar y adsorberse dentro de la membrana. Existe una relación entre el área de superficie específica y el volumen total del poro, obteniendo en este último un valor pequeño ($0.03 \text{ cm}^3/\text{g}$), lo que indica que cuanto menor es el tamaño de poro, mayor es el área de superficie específica del material.

Mikos y cols. (1994) emplearon diferentes proporciones de NaCl y PLA para crear la porosidad en los sistemas (50 - 90% de NaCl). En el presente estudio se prepararon las membranas porosas utilizando una proporción de NaCl y de PLGA del 50 %. Las membranas que incluyeron un porcentaje arriba del 60 % de NaCl mostraron ser muy frágiles por su alta porosidad (0.89), ya que a mayor cantidad de NaCl mayor porosidad (Lu et al., 2000). Por otra parte, empleando una proporción del 50 % de NaCl en las membranas, se tuvo un área de superficie específica suficiente para adsorber las nanopartículas dentro de las membranas porosas (ver sección 7.1.4: figura 18). Lu y cols. (2000) prepararon sistemas poliméricos porosos basados también en la técnica de “vaciamiento de soluciones poliméricas orgánicas”, usando como polímero PLA. Ellos reportan que la porosidad de los sistemas determinada por intrusión de mercurio es aproximadamente la misma a la fracción del peso inicial correspondiente al NaCl.

7.1.3 Nanopartículas biodegradables

Se prepararon nanopartículas de PLGA (1:1) por la técnica de emulsificación-difusión. Las nanopartículas se analizaron por microscopía electrónica de barrido con la finalidad de observar su morfología; éstas mostraron tener una estructura sólida de forma semejante a una esfera. En la figura 15 se muestra una microfotografía representativa de los lotes preparados de nanopartículas de PLGA.

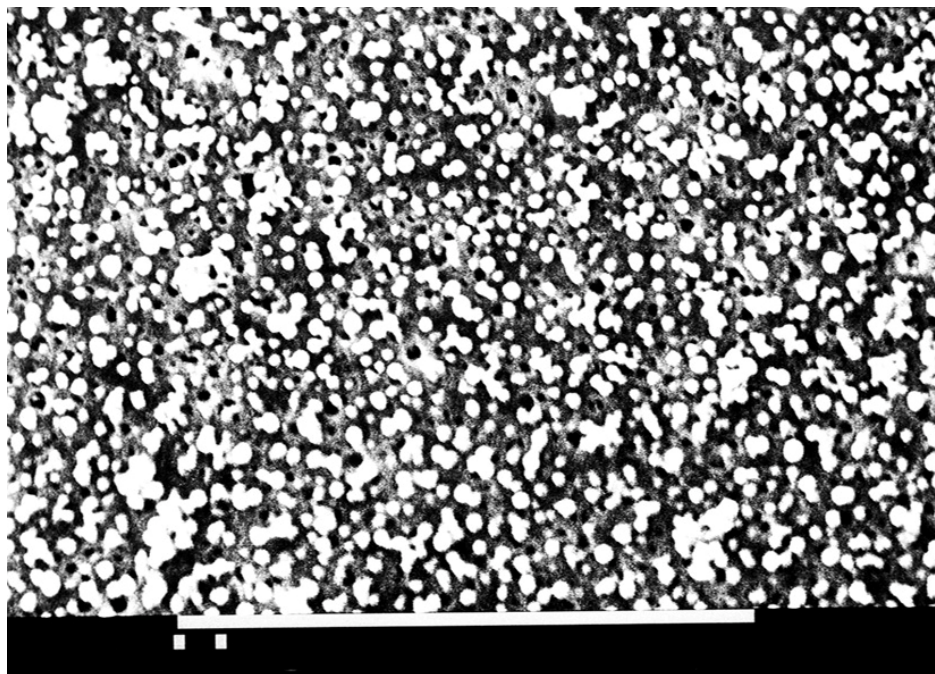


Figura 15. Microfotografía de nanopartículas de PLGA (1:1). Microscopía electrónica de barrido; barra = 10 μm (fotografía tomada por el técnico Rodolfo Robles).

Se determinó el tamaño de las nanopartículas por el método de dispersión dinámica de la luz mediante un contador submicrónico (NanoSizer® N4 Plus). Esta prueba se realizó por triplicado para cada lote preparado. El tamaño promedio de las nanopartículas de PLGA obtenidas después de ser liofilizadas fue de 295 ± 3.2 nm, con un índice de polidispersión de 0.027. El tamaño de las nanopartículas antes y después de ser liofilizadas fue muy semejante (ver tabla 2). Esto fue debido a que el alcohol polivinílico actuó como un coloide protector para los glóbulos de la emulsión formada durante la preparación de las nanopartículas, creando una capa estable sobre la superficie de las partículas y, de esta manera, previniendo su coalescencia, ya que después de ser liofilizadas fueron resuspendidas en agua de manera casi instantánea. El alcohol polivinílico fue seleccionado como agente estabilizador para la emulsificación y para estabilizar la dispersión final debido a su solubilidad en agua, baja toxicidad y compatibilidad con el sistema. Además, estudios previos han reportado la capacidad que tiene el alcohol polivinílico de mantener las propiedades físicas y tamaño de partícula de

dispersiones por periodos largos (Quintanar-Guerrero et al., 1998, 1999; Müller y Willis, 1989, 1993).

Tabla 2. Resultados de la prueba de resuspendibilidad de nanopartículas de PLGA (1:1).

Sistema	Talla promedio (nm)	I.P.
Antes de liofilizar	291.7 ± 2.7 nm	0.033
Después de liofilizar	295 ± 3.2 nm	0.027

En la figura 16 se muestra la distribución del tamaño de las nanopartículas de PLGA (1:1) que proporciona una indicación cualitativa de la polidispersión de la muestra.

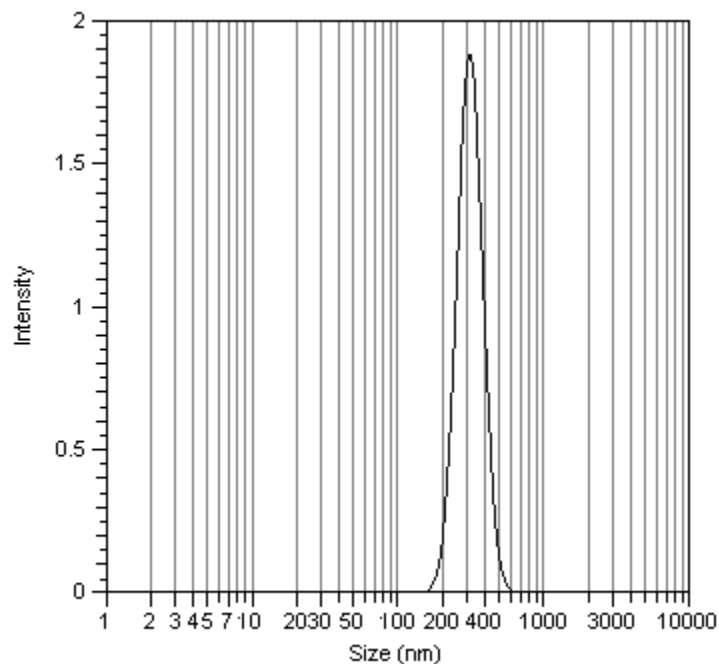


Figura 16. Distribución del tamaño de partícula de nanopartículas de PLGA (1:1).

Del gráfico anterior, se observa una distribución monodispersa de las nanopartículas, que puede corroborarse con el índice de polidispersión, el cual es un parámetro que indica la homogeneidad de la muestra. Para considerar que una población es monodispersa, su índice de polidispersión debe encontrarse en un rango de 0 a 0.5.

7.1.4 INFILTRACIÓN DEL FÁRMACO Y NANOPARTÍCULAS DENTRO DE LOS SISTEMAS POROSOS

Se infiltró la carbamazepina dentro de las membranas biodegradables porosas (sistema 1) en medio acuoso, con la finalidad de adsorber el fármaco sobre la superficie de los poros y canales interconectados dentro del sistema. En la parte superior de la figura 17 (i, ii), se muestran microfotografías del sistema 1 en las que se puede observar que no hay cristales de carbamazepina. Es importante mencionar que los diferentes sistemas preparados fueron observados por microscopía electrónica de barrido desde diferentes campos. En la parte inferior de la figura 17 (iii), se muestra una fotografía de cristales de carbamazepina previamente caracterizados a la preparación de los sistemas.

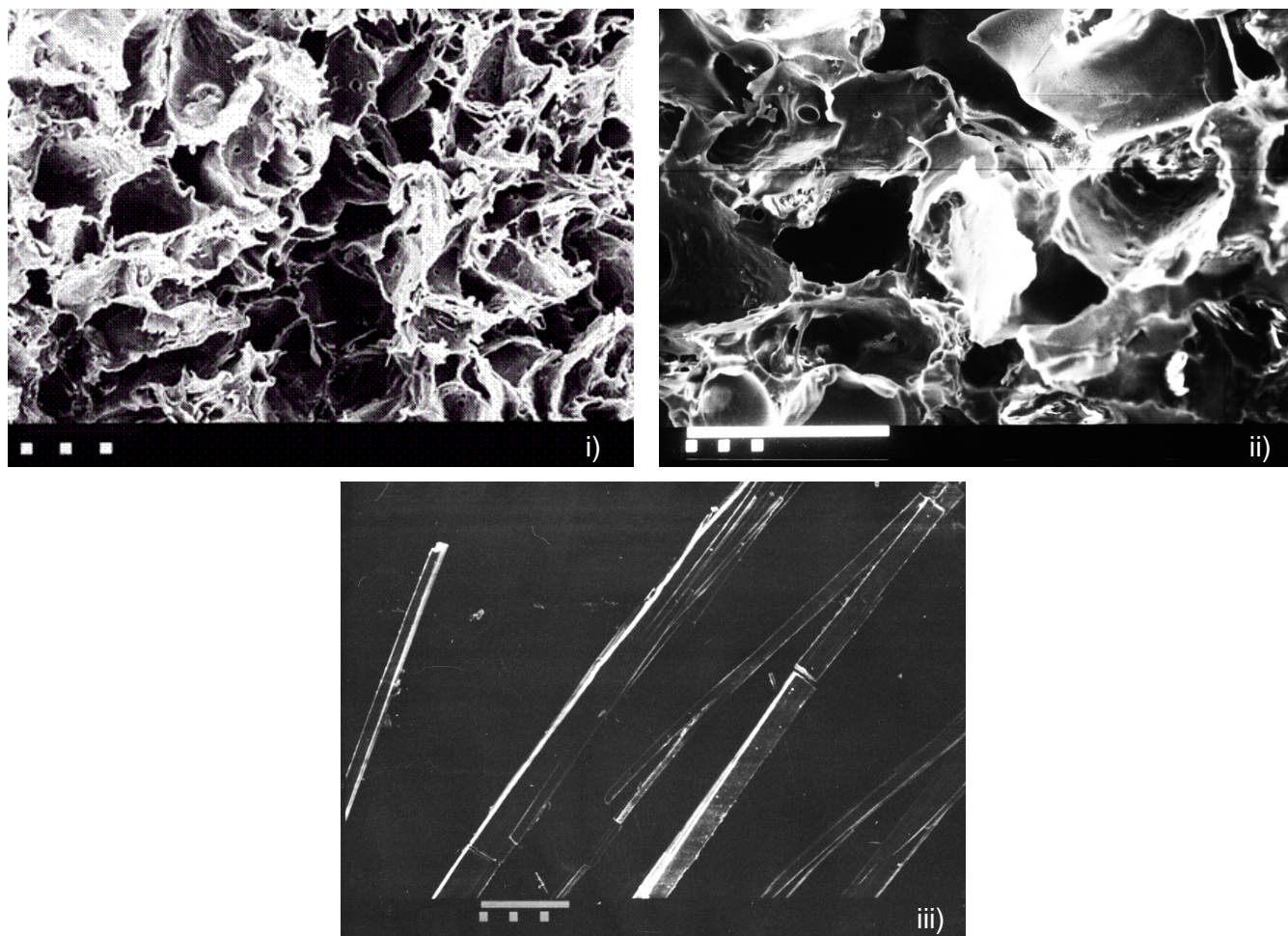


Figura 17. i y ii) Microfotografías del sistema 1; iii) cristales de carbamazepina. Microscopía electrónica de barrido; barra=100 μm (fotografías tomadas por el técnico Rodolfo Robles).

Se resuspendieron 50, 100, 400 y 600 mg de nanopartículas de PLGA en 10 ml de solución saturada de carbamazepina en medio acuoso, las cuales fueron infiltradas en los sistemas 2, 3, 4 y 5, respectivamente. De esta manera, se infiltró simultáneamente la carbamazepina y las nanopartículas dentro de los diferentes sistemas.

La infiltración de las nanopartículas dentro de los sistemas se realizó con el objetivo de formar una película de nanopartículas sobre la superficie de los poros y canales interconectados dentro de las membranas, ocluyendo de esta forma la

carbamazepina sobre la superficie de los poros de la membrana y de las nanopartículas, y de esta forma, controlar la velocidad de liberación del principio activo sirviendo esta película como una barrera de difusión para el fármaco.

En la figura 18 se muestran microfotografías por microscopía electrónica de barrido de los sistemas 2, 3, 4 y 5. En la figura 18-A se muestra el sistema 2, en el que se infiltró la menor cantidad de nanopartículas (50 mg) y se puede observar una pequeña cantidad de éstas adsorbidas sobre la superficie de los poros. En la figura 18-B se muestra el sistema 3, en el cual se infiltraron 100 mg de nanopartículas y se observa una mayor cantidad de la dispersión adsorbida sobre la superficie de los poros del sistema. La figura 18-C muestra el sistema 4, en donde se puede apreciar una película de nanopartículas sobre la superficie de los poros de la membrana, mientras que en el sistema 5 (figura 18-D) se observa la formación de una película continua de nanopartículas sobre la superficie de los poros de la membrana. Las fotografías permiten ver que la continuidad de la película de nanopartículas sobre la superficie de los poros de las membranas fue dependiente de la cantidad de nanopartículas infiltradas; por lo que conforme se va incrementando la cantidad de nanopartículas infiltradas hasta llegar al sistema 5, se observa una película de nanopartículas continua sobre la superficie de los poros de la membrana.

Este efecto se puede explicar debido a que los sistemas coloidales, en este caso las nanopartículas, se caracterizan por formar películas al estar en contacto con una superficie, ya que éstas son sistemas termodinámicamente inestables, por lo que buscan mayor estabilidad adhiriéndose sobre una superficie. Además, las nanopartículas pueden formar películas sobre la superficie de las membranas debido a una atracción entre la superficie de las nanopartículas y la superficie de las membranas ya que son de la misma naturaleza química (Israelachvili, 1995).

Por otra parte, es importante señalar que durante la preparación de los sistemas, el fármaco no tuvo contacto con disolventes orgánicos, debido a que la infiltración del fármaco en las membranas en presencia o ausencia de nanopartículas fue en medio acuoso.

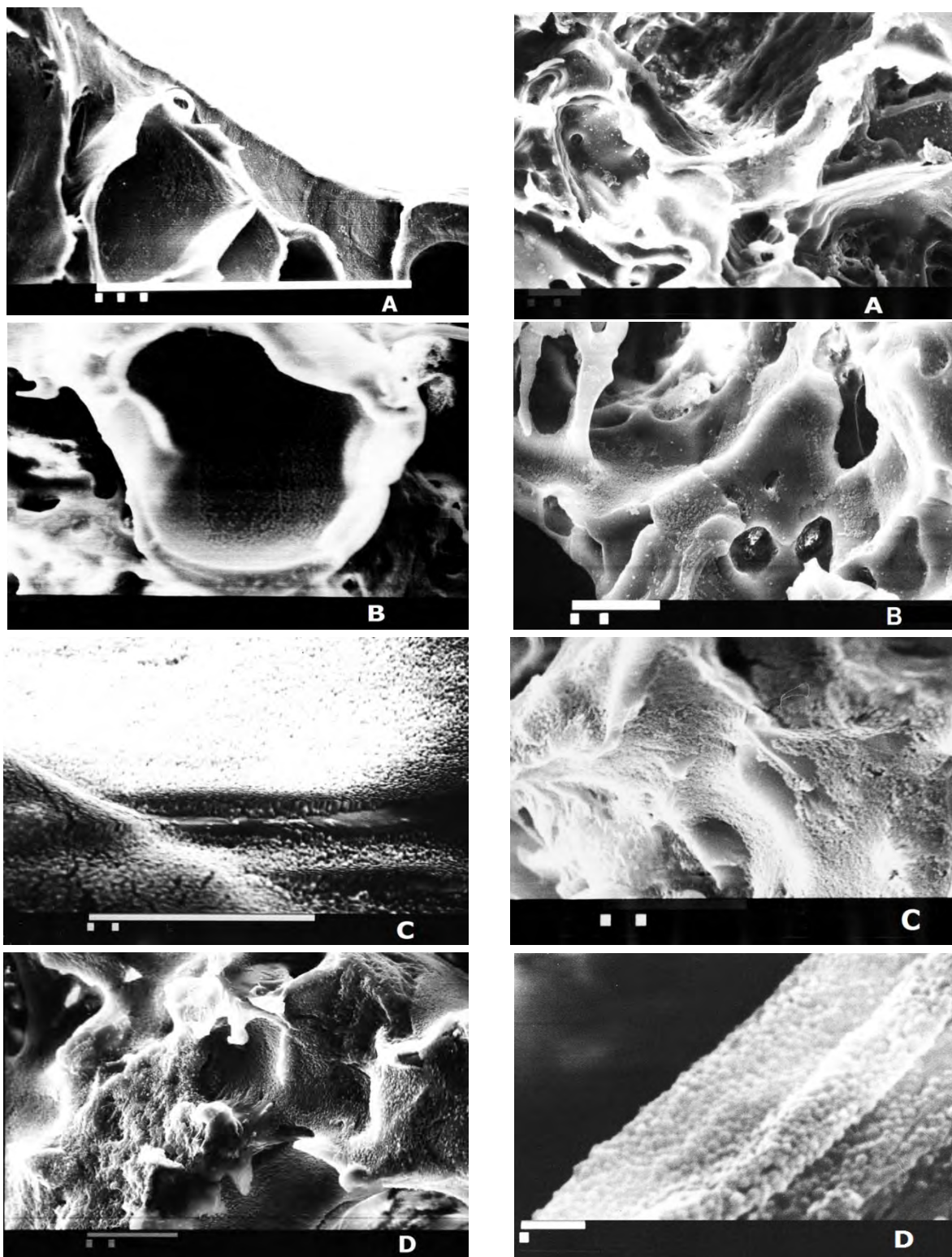


Figura 18. Microfotografías de cortes transversales de membranas biodegradables porosas con infiltración de nanopartículas. (A) Sistema 2; (B) sistema 3; (C) sistema 4; (D) sistema 5. Microscopía electrónica de barrido; barra = ■ 1 μm , ■■ 10 μm , ■■■ 100 μm (fotografías tomadas por el técnico Rodolfo Robles).

Una de las principales aplicaciones de los estudios por calorimetría diferencial de barrido es la determinación de la forma en la que se encuentra un principio activo en un sistema y, de esta manera, saber si se encuentra disperso molecularmente o en forma de cristales. Cuando existe una dispersión molecular del principio activo en el sistema, no se detecta el pico endotérmico característico de la fusión del activo en el termograma correspondiente.

En la figura 19 se muestran los estudios realizados por calorimetría diferencial de barrido de la carbamazepina pura, PLGA (1:1) y de las membranas biodegradables porosas con y sin infiltración de nanopartículas. El termograma de la carbamazepina pura presentó un pequeño pico endotérmico a 170° C, el cual es característico de la transición de la forma β a la forma α (Katzhendler et al., 1998), y un pico endotérmico de fusión a 192° C. El pico teórico de la carbamazepina es de 189 a 193° C (Moffat, 2005). El termograma del PLGA (1:1) mostró una temperatura de transición vítrea (T_g) a 47° C. La T_g del PLGA (1:1) reportado en la literatura es de 43 - 48° C. En los termogramas de los sistemas del 1 al 5, la T_g del polímero presentó un incremento en la temperatura de 53, 54, 54, 53, y 53° C, respectivamente. Okada y cols. (1994) reportaron que la T_g de una matriz de PLGA se incrementa conforme la carga de un fármaco base se incrementa dentro del sistema. Considerando los datos reportados por Okada y cols., se puede proponer que el incremento de la temperatura en la T_g del polímero de los sistemas fue debido a una interacción electrostática entre la carbamazepina, que es un fármaco base, y los ácidos carboxílicos terminales del PLGA.

Por otro lado, los termogramas de los sistemas del 1 al 5 no mostraron picos de fusión de la carbamazepina (192° C), por lo que el fármaco no se encontró en su forma cristalina; de acuerdo a lo mencionado anteriormente, se sugiere que el fármaco se encontró disperso molecularmente en todos los sistemas preparados. Además, en los estudios realizados por microscopía electrónica de barrido en donde se analizaron todos los sistemas desde diferentes campos, no se evidenciaron cristales de carbamazepina.

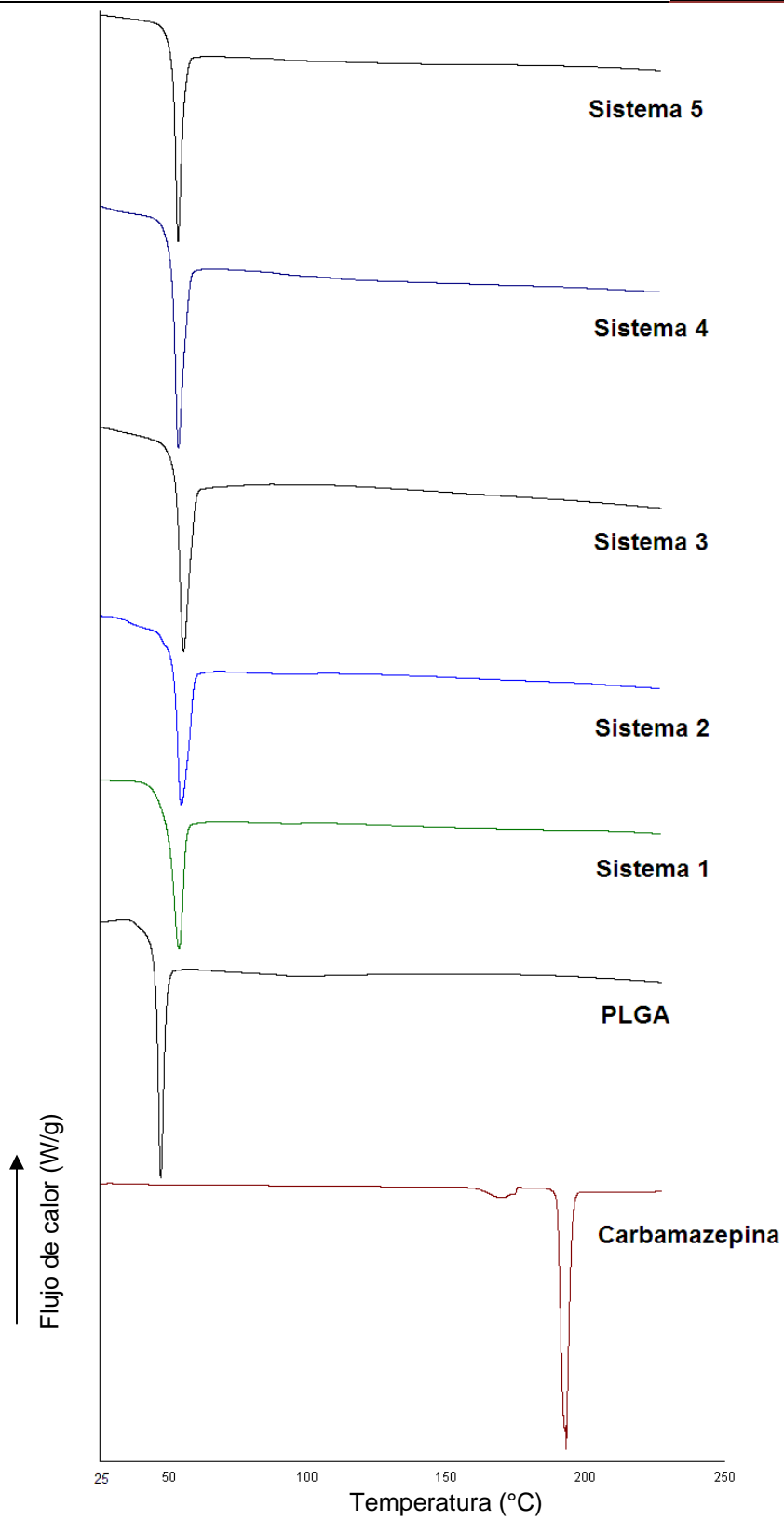


Figura 19. Termogramas de carbamazepina pura, PLGA 1:1 y los sistemas del 1 al 5.

En la tabla 3 se muestran las cantidades de carbamazepina adsorbida dentro de los diferentes sistemas. De acuerdo a los resultados, se puede observar claramente que conforme se incrementó la cantidad de nanopartículas infiltradas dentro de la membrana, se incrementó la cantidad de fármaco adsorbido. Este efecto es atribuido a que a mayor área de superficie expuesta mayor cantidad de fármaco se puede adsorber, tanto en la superficie de los poros de la membrana como en la superficie de las nanopartículas; por lo que el sistema 5, en donde hay una mayor cantidad de nanopartículas infiltradas y adsorbidas de acuerdo con los estudios realizados por microscopía electrónica de barrido, existe una mayor cantidad de fármaco adsorbido (625 μg) en comparación con el resto de los sistemas. Cabe mencionar que en el sistema 1 no se infiltraron nanopartículas, por lo que el fármaco se adsorbió sobre la superficie de los poros de la membrana, siendo la cantidad de éste menor (139 μg) que los sistemas en presencia de nanopartículas. De esta manera, se puede sugerir que el fármaco en presencia de nanopartículas, quedó adsorbido sobre la superficie de las nanopartículas y sobre la superficie de los poros de la membrana, quedando atrapado entre las dos superficies, lo cual es favorable para controlar su velocidad de liberación.

Tabla 3. Cantidad de carbamazepina adsorbida dentro de los diferentes sistemas.

Sistema	Carbamazepina adsorbida (μg)
1	139
2	172
3	292
4	493
5	625

7.1.5 Perfiles de liberación

Los perfiles de liberación de la carbamazepina *in vitro* a partir de las membranas biodegradables porosas con y sin infiltración de nanopartículas se muestran en la figura 20, en éstos se presenta el porcentaje de la carbamazepina liberada en función del tiempo. Se consideró el 100 % como la cantidad máxima de fármaco liberada al equilibrio. Los estudios de liberación se llevaron a cabo bajo condiciones “sink”, es decir, manteniendo una concentración por debajo del 33 % de la solubilidad del fármaco (U.S. Pharmacopeia NF, 2008). De acuerdo con la figura 20, se observa que el sistema 1 (sin infiltración de nanopartículas) mostró un comportamiento de liberación inmediato de la carbamazepina (95 % liberado en < 15 minutos). Este efecto “*burst*” es atribuido a que el fármaco adsorbido sobre la superficie de los poros de la membrana tuvo un alto contacto con el medio de disolución debido a la alta porosidad con canales interconectados que presentó el sistema, por lo que esto permitió una rápida desorción del principio activo, causando un efecto de liberación inmediato. Es bien sabido, que los fármacos que se encuentran cerca de la superficie van a difundir rápidamente hacia el exterior causando una liberación inmediata (Sato et al., 1998; Mao et al., 2008); es por esta razón, que en la industria farmacéutica, los sistemas porosos presentan esta limitante al mostrar una liberación inmediata del fármaco a pesar de las ventajas de estos sistemas como acarreadores de fármacos (Chung et al., 2001; Lemaire et al., 2003; Kim et al., 2006).

Cuando la carbamazepina fue adsorbida dentro de los sistemas en presencia de nanopartículas (sistema del 2 al 5), se observó un comportamiento de liberación prolongado. Conforme se incrementó la cantidad de nanopartículas infiltradas dentro del sistema, la liberación de la carbamazepina fue más lenta que el sistema 1, permitiendo de esta manera controlar la velocidad de liberación del principio activo. De esta forma, el sistema 5 liberó el 100 % del fármaco en un tiempo de 12 horas. Como se esperaba, la velocidad de liberación de la carbamazepina fue dependiente de la cantidad de nanopartículas infiltradas dentro del sistema. Este comportamiento puede ser explicado debido a que el fármaco quedó atrapado

sobre la superficie de los poros de la membrana por las nanopartículas depositadas, formando una película sobre la superficie y actuando esta película como una barrera de difusión adicional para el fármaco.

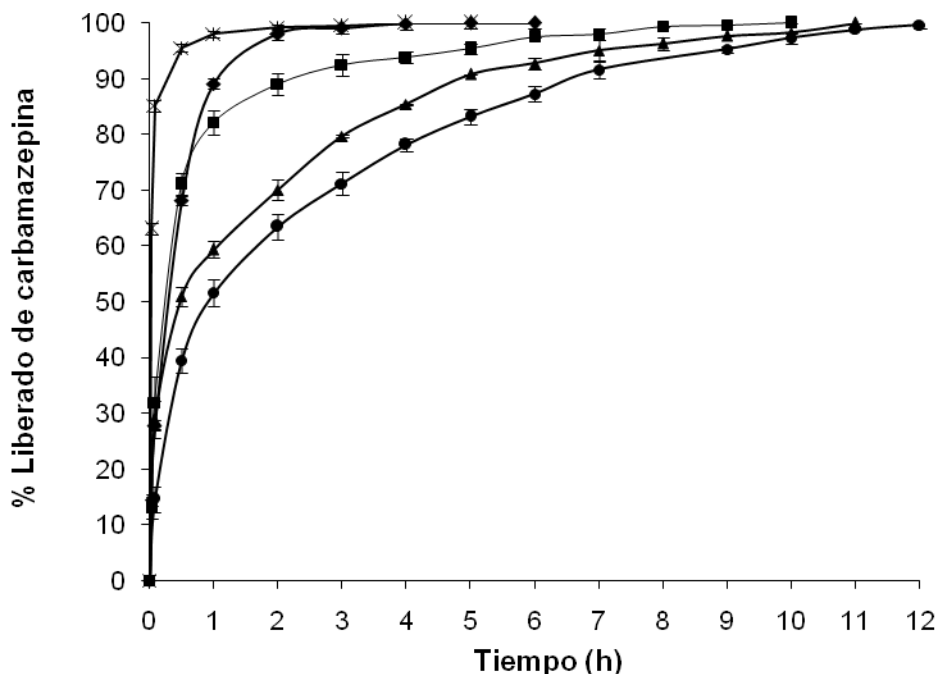


Figura 20. Perfiles de liberación de carbamazepina en las membranas biodegradables porosas con y sin infiltración de nanopartículas. Sistema 1 (*); sistema 2 (◆); sistema 3 (■); sistema 4 (▲); sistema 5 (●).

Con respecto a la cinética de liberación del principio activo, los perfiles de liberación de la carbamazepina a partir de los sistemas biodegradables porosos, se analizaron de acuerdo al modelo semi-empírico propuesto por Rigter y Peppas (Peppas et al., 2000):

$$\ln \frac{M_t}{M_\alpha} = \ln K + n \ln t$$

en donde M_t es la cantidad de fármaco liberada a un tiempo t , M_α es la cantidad máxima liberada, k es una constante, y el exponente de difusión “ n ” es la

pendiente. El exponente de difusión “ n ” indica el probable mecanismo de transporte y el tipo de liberación (ver tabla 4); es importante mencionar que en este modelo se toman en cuenta los datos hasta el 60 % de la cantidad total liberada.

Tabla 4. Mecanismo de transporte y tipo de liberación de un principio activo en base al exponente de difusión “ n ” de acuerdo al modelo de Peppas.

Exponente de difusión “ n ”	Mecanismo de transporte	Tipo de liberación
0.5	Difusión Fickiana	Dependiente del tiempo $f(t^{0.5})$
$0.5 < n < 1$	No Fickiano (Anómalo)	Dependiente del tiempo $f(t^{n-1})$
1	Transporte caso II	Independiente del tiempo (orden cero)
$n > 1$	Super caso II	Dependiente del tiempo $f(t^{n-1})$

De acuerdo a los exponentes de difusión estipulados por el modelo que se muestra en la tabla 4 y de acuerdo a los resultados obtenidos en el presente trabajo (tabla 5), los perfiles de liberación de la carbamazepina *in vitro* a partir de las membranas biodegradables porosas con formación de película de nanopartículas (sistemas 2-5), mostraron un mecanismo de liberación Fickiano y un tipo de liberación dependiente del tiempo ($t^{0.5}$), en donde el valor del exponente de difusión “ n ” fue muy cercano a 0.5. Los mecanismos de liberación Fickiano se caracterizan por presentar una liberación inicial rápida pero no inmediata, seguida por una disminución en su velocidad de liberación conforme pasa el tiempo. En este tipo de liberación el mecanismo dominante es por difusión.

Tabla 5. Resultados de los exponentes de difusión “*n*” de acuerdo al modelo de Peppas.

Sistema	Exponente de difusión “ <i>n</i> ”	Coefficiente de correlación
2	0.59	0.998
3	0.59	0.950
4	0.52	0.998
5	0.44	0.987

Los perfiles de liberación de la carbamazepina *in vitro* a partir de las membranas biodegradables porosas con formación de película de nanopartículas también se analizaron de acuerdo al modelo de Higuchi:

$$\frac{M_t}{M_\alpha} = kt^2$$

en donde M_t es la cantidad de fármaco liberada a un tiempo t , M_α es la cantidad máxima liberada, k es una constante y t el tiempo. Este modelo se basa en estudiar la velocidad de liberación de fármacos a partir de sistemas matriciales (Washington, 1990). Los valores de los coeficientes de correlación obtenidos en este trabajo (tabla 6) son cercanos a la unidad, lo que indica que los datos se ajustaron al modelo propuesto por Higuchi y, de esta manera, se puede inferir que las membranas biodegradables porosas con formación de película de nanopartículas son sistemas matriciales en donde el fármaco se encuentra disperso homogéneamente en todo el sistema matricial.

Tabla 6. Constantes de velocidad de liberación de la carbamazepina de acuerdo al modelo de Higuchi.

Sistema	K_H ($\mu\text{g}/\text{min}$) ^{1/2}	Coefficiente de correlación
2	0.0879	0.9955
3	62.908	0.9650
4	3.1792	0.9738
5	1.27	0.968

En la figura 21 se muestra el gráfico de acuerdo al modelo de Higuchi en el que se grafica la cantidad de carbamazepina liberada de los diferentes sistemas en función de la raíz cuadrada del tiempo.

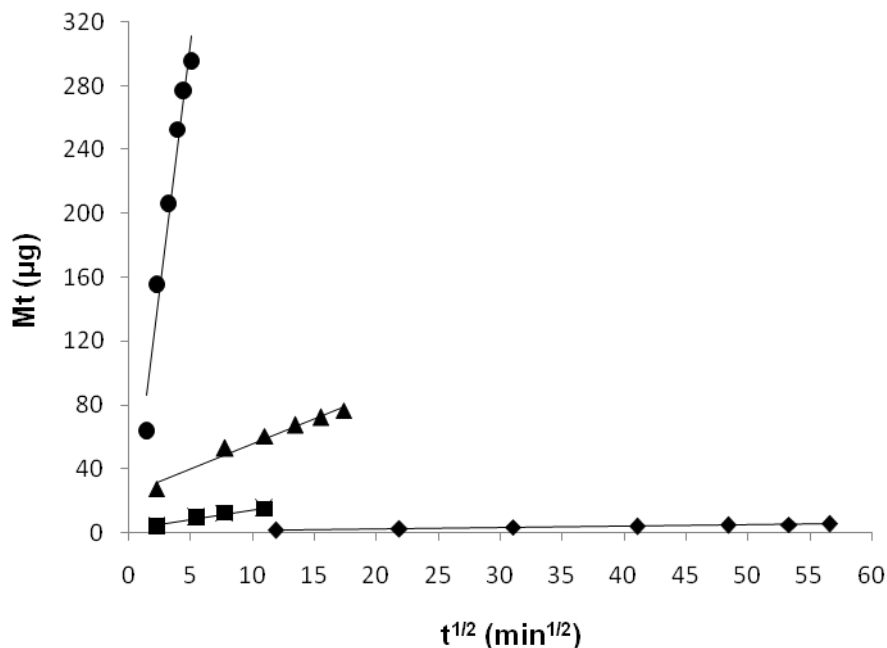


Figura 21. Modelo de Higuchi aplicado a la liberación de carbamazepina a partir de membranas biodegradables porosas con infiltración de nanopartículas. Sistema 2 (\blacklozenge); sistema 3 (\blacksquare); sistema 4 (\blacktriangle); sistema 5 (\bullet).

Es importante destacar, que la tecnología propuesta en el presente estudio de ensamblar nanopartículas dentro de un sistema poroso, es pionera en la formulación de sistemas de liberación controlada de fármacos, además de ser un proceso noble para éstos, ya que se evita el contacto directo de fármacos con disolventes orgánicos. Por otro lado, estos sistemas ofrecen la posibilidad de ser administrados por diferentes vías.

7.2 NANOPARTÍCULAS E IONTOFORESIS EN PIEL HUMANA

7.2.1 Determinaciones previas

Se validó el método analítico por cromatografía de líquidos de alta resolución. Los resultados mostraron que el límite de detección (LD) y de cuantificación (LC) fue de 140 ng/ml y 432 ng/ml, respectivamente a 285 nm. EL coeficiente de determinación (r^2) y variación (C.V.) fue de 0.999 y 2.8 %, respectivamente (ver anexo II). También se demostró repetibilidad ($n = 3$) y reproducibilidad (3 diferentes días).

7.2.2 Caracterización de nanopartículas de Eudragit® RL 100 cargadas con triclosán

Se prepararon nanopartículas de Eudragit® RL 100 (metacrilato de aminoalquilo) cargadas con triclosán por la técnica de emulsificación-difusión por desplazamiento del disolvente. Se analizó la morfología de las nanopartículas por microscopía electrónica de barrido, las cuales mostraron ser sólidas y de forma esférica. En la figura 22 se muestra una microfotografía representativa de las nanopartículas de Eudragit® RL 100.

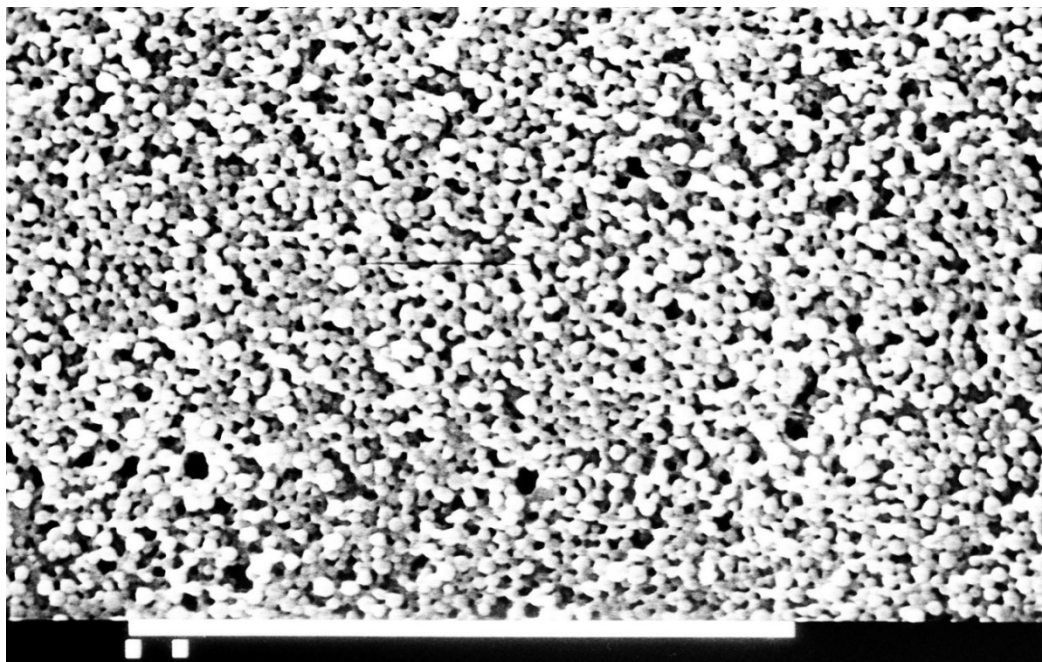


Figura 22. Microfotografía de nanopartículas de Eudragit® RL 100 cargadas con triclosán. Microscopía electrónica de barrido; barra = 10 μm (fotografía tomada por el técnico Rodolfo Robles).

El tamaño promedio de las nanopartículas de Eudragit® RL 100 obtenidas después de ser liofilizadas fue de 275.0 ± 18.7 nm para todos los lotes preparados, con un índice promedio de polidispersión de 0.32 ± 0.07 . El tamaño de estas nanopartículas al igual que las de PLGA (1:1), fueron antes y después de ser liofilizadas muy semejantes de tamaño (ver tabla 7), lo que indica que el efecto protector del alcohol polivinílico fue adecuado. De manera general, tanto las nanopartículas de PLGA (1:1) como las de Eudragit® RL 100, tuvieron un tamaño promedio por debajo de los 300 nm.

Tabla 7. Resultados de la prueba de resuspendibilidad de nanopartículas de Eudragit® RL 100.

Sistema	Talla promedio (nm)	I.P.
Antes de liofilizar	261.0 ± 15.1	0.21 ± 0.03
Después de liofilizar	275 ± 18.7 nm	0.32 ± 0.07

En la figura 23 se muestra la distribución del tamaño de las nanopartículas de Eudragit® RL 100 cargadas con triclosán, la cual proporciona una indicación cualitativa de la polidispersión la muestra.

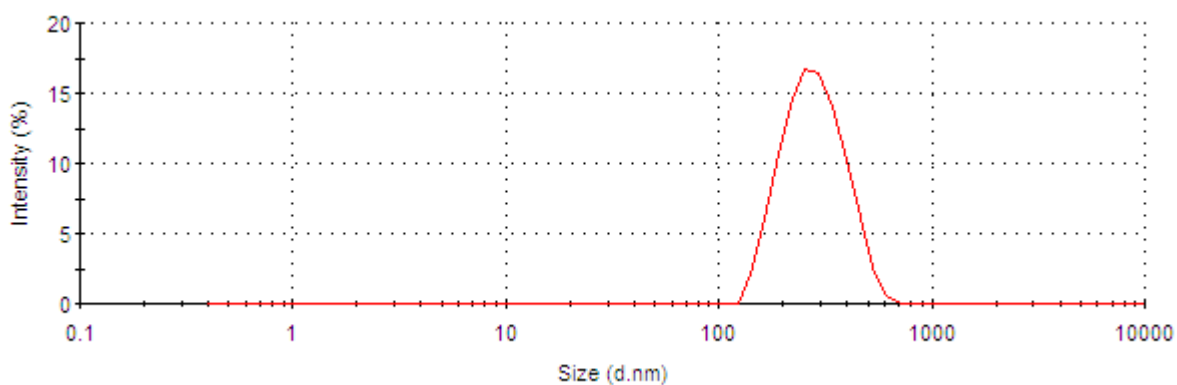


Figura 23. Distribución del tamaño de partícula de nanopartículas de Eudragit® RL 100 cargadas con triclosán.

Del gráfico anterior, se observa una distribución monodispersa de las nanopartículas de Eudragit® RL 100, lo que puede corroborarse con el índice de polidispersión siendo este menor a 0.5, y sugiriendo que la mayor cantidad de nanopartículas tiene un tamaño promedio de 275 ± 18.7 nm después de ser liofilizadas.

El porcentaje de contenido de triclosán inicial fue del 31.03 % durante la preparación de las nanopartículas. Cabe destacar que el porcentaje de triclosán inicial fue elegido de acuerdo a estudios previos de calorimetría diferencial de

barrido elaborados en el laboratorio por Domínguez-Delgado (2006), con los cuales se sugirió que con este porcentaje, el triclosán se encontraba totalmente encapsulado dentro de las nanopartículas.

El porcentaje de triclosán encapsulado en las nanopartículas de Eudragit® RL 100 y la eficiencia de encapsulamiento fueron de 62.0 ± 1.7 y 68.0 ± 2.1 %, respectivamente. Estos resultados demuestran que se está encapsulando la mayor parte del contenido de triclosán inicial, además de que es difícil tener eficiencias mayores al 80 % en nanopartículas poliméricas.

En lo que respecta al potencial zeta (Ψ_z), éste se utiliza como un parámetro importante para caracterizar la interacción electrostática entre las partículas en un sistema disperso, por lo que la estabilidad física del sistema es determinada por el balance entre las fuerzas repulsivas y atractivas dentro del sistema. De esta manera, el potencial zeta es un buen indicador de la magnitud de la interacción repulsiva entre partículas coloidales y por lo tanto, un indicador de la estabilidad de la suspensión. El potencial zeta promedio determinado para todos los lotes preparados de nanopartículas de Eudragit® RL 100 después de la ultracentrifugación fue de 26 ± 3.2 mV. Esta prueba se realizó por triplicado para cada lote preparado. Esta medición se realizó con la finalidad de conocer la estabilidad de la suspensión y conocer la carga de la superficie de las nanopartículas. El resultado del potencial zeta obtenido indica que la suspensión es estable, ya que valores absolutos de potenciales entre 30 y 60 son requeridos para suspensiones estables, y valores absolutos de 60 a 100 se consideran suspensiones con excelente estabilidad (Riddick, 1968). Por otra parte, el valor del potencial zeta obtenido es un valor positivo, lo que indica que las nanopartículas presentan una carga positiva sobre su superficie. El catión amonio presente en el polímero metacrilato de aminoalquilo (Eudragit® RL 100), es el responsable de conferir la carga positiva a la superficie de la nanopartícula. Estos resultados están de acuerdo con los reportados previamente por Zobel y cols. (1999), quienes estudiaron el potencial zeta mediante el método de movilidad electroforética de nanopartículas a partir del polímero metacrilato de aminoalquilo. Por otro lado, no

hubo diferencia significativa entre el potencial zeta del lote blanco y de las nanopartículas cargadas con triclosán, lo que se sugiere que el fármaco no fue localizado sobre la superficie de las nanopartículas, de lo contrario, el potencial zeta podría haber disminuido ya que el triclosán es un fármaco no iónico.

De acuerdo a estos resultados, la carga positiva sobre la superficie de las nanopartículas es un factor interesante, ya que favorece la atracción de éstas sobre la piel, la cual presenta una carga negativa al pH fisiológico (~7.4).

7.2.3 Permeaciones por difusión pasiva

Los primeros estudios de permeación por difusión pasiva e iontoforética se realizaron empleando solución de triclosán en el medio donador; posteriormente, se realizaron las permeaciones por ambos métodos, empleando en el medio donador la suspensión de nanopartículas de Eudragit® RL 100 cargadas con triclosán. Como ya se había mencionado anteriormente, el uso de nanopartículas catiónicas se hizo con el objetivo de favorecer la atracción entre la piel y las nanopartículas y, de esta manera, incrementar la penetración y acumulación del principio activo dentro de la piel.

En la figura 24 se muestran las cantidades acumuladas de triclosán en la solución receptora en función del tiempo.

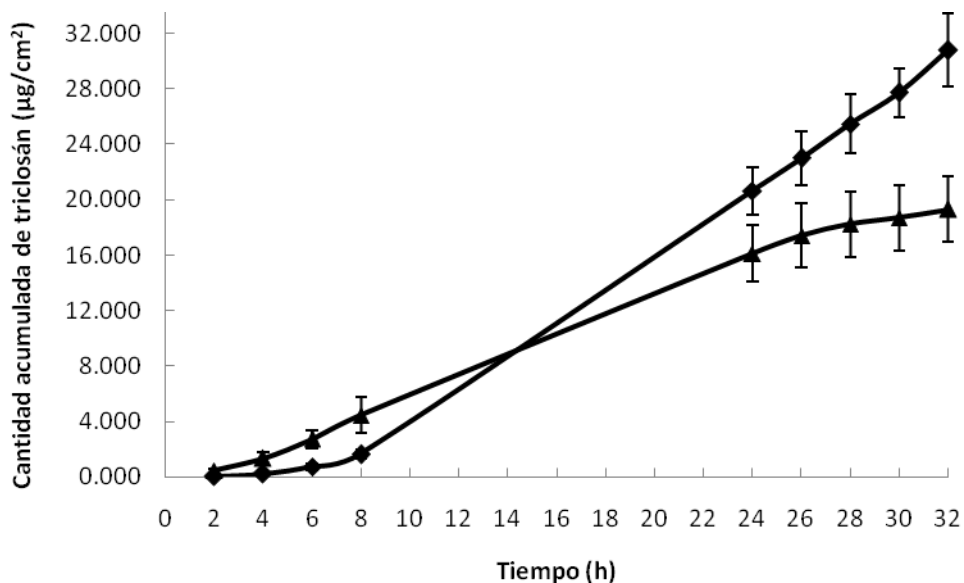


Figura 24. Cantidades acumuladas de triclosán permeadas a través de piel humana por difusión pasiva. (♦) solución de triclosán en el compartimento donador (2,500 µg/ml); (▲) suspensión de nanopartículas en el compartimento donador (2,500 µg/ml).

El flujo (J_s), el coeficiente de permeación (K_p), la cantidad acumulada al finalizar la experimentación en la solución receptora y la cantidad de triclosán retenida en la piel después de finalizar la experimentación, se muestran en la tabla 8.

Tabla 8. Datos obtenidos de permeaciones de triclosán por difusión pasiva a través de piel humana.

Sistema	J_s (µg/cm ² h)	Cantidad total permeada (µg/cm ²)	K_p (cm/h)	Cantidad retenida en la piel (µg/cm ²)
Solución de triclosán (2,500 µg/ml)	1.1 ± 0.07	31 ± 2.6	0.00033	312 ± 91
Sistema nanoparticulado (2,500 µg/ml)	0.6 ± 0.08	19 ± 2.3	0.00024	2,676 ± 312

De acuerdo con los resultados mostrados en la tabla 8, el flujo de triclosán a través de la piel y la cantidad total acumulada de éste en el medio receptor al finalizar las 32 horas de experimentación, usando como medio donador la solución de triclosán, fueron de $1.1 \pm 0.07 \mu\text{g}/\text{cm}^2\text{h}$ y $31 \pm 2.6 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, respectivamente. El flujo de triclosán a través de la piel y la cantidad acumulada del mismo en el medio receptor al finalizar las 32 horas de experimentación, usando como medio donador el sistema nanoparticulado, fueron de $0.6 \pm 0.08 \mu\text{g}/\text{cm}^2\text{h}$ y $19 \pm 2.3 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, respectivamente. Por lo tanto, los datos obtenidos indican que la cantidad acumulada de triclosán administrando solución de éste, penetró a través de la piel 1.8 veces más hacia el medio receptor que el fármaco encapsulado en las nanopartículas, lo que confirma que las nanopartículas no facilitan la penetración transdérmica a través de la piel. Estos resultados coinciden con los estudios previamente reportados por Alvarez-Román y cols. (2004b), quienes estudiaron el uso de nanopartículas de poliestireno como acarreadores de fármacos para mejorar la residencia del fármaco en la piel sin incrementar el transporte transdérmico.

Schaefer y cols. (1990) demostraron que micropartículas con un diámetro de 3 a 10 μm lograron penetrar a través de los folículos pilosos quedando distribuidas aleatoriamente dentro de éstos, mientras que partículas con un tamaño mayor a 10 μm permanecieron sobre la superficie de la piel. Además, Rolland y cols. (1993) describieron que a través del empleo de nanopartículas de PLGA (< 5 μm de diámetro) como acarreadores de fármacos, se logró vectorizar las estructuras pilosebáceas, las cuales fueron visualizadas dentro de éstas en piel de ratón y en piel humana después de 35 minutos por difusión pasiva (ver figura 25). De acuerdo a los estudios reportados previamente por otros autores, se sugiere que las nanopartículas obtenidas en el presente trabajo quedaron distribuidas dentro de los folículos pilosos (vía folicular) debido a su tamaño (~300 nm).

Por otro lado, los resultados obtenidos sobre la cantidad de triclosán retenida en la piel después de concluir la experimentación usando en el compartimento donador la solución de triclosán, fue de $312 \pm 91 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, mientras que usando el sistema

nanoparticulado, la cantidad de triclosán retenida en la piel fue de $2,676 \pm 312 \mu\text{g}/\text{cm}^2$.

Tal y como se esperaba, la cantidad de triclosán retenida en la piel usando nanopartículas poliméricas catiónicas se incrementó 8.5 veces más respecto al uso de triclosán en solución. Este comportamiento puede ser explicado debido a que el fármaco quedó encapsulado dentro de las nanopartículas actuando éstas como un reservorio. La liberación del fármaco pudo deberse a la penetración del medio de disolución dentro de las nanopartículas, debido a la alta permeabilidad que presenta el Eudragit® RL 100 por la presencia de grupos amonio en su estructura (Haznedar et al., 2004). Consecutivamente a la penetración del medio, el fármaco se disolvió y difundió hacia el exterior del sistema; cabe mencionar que el Eudragit® RL 100 pudo haber sufrido un hinchamiento al contacto con el medio de disolución, debido a que este material tiende a hincharse al contacto con medios acuosos.

De Jalón y cols. (2001) y Santoyo y cols. (2002), reportaron que micropartículas de ácido poliláctico-co-glicólico cargadas con un agente antiviral, incrementaron la retención del fármaco en la epidermis y disminuyeron su penetración a través de la piel; sin embargo, el incremento del fármaco en la epidermis no fue muy significativo.

Shim y cols. (2004) reportaron que nanopartículas poliméricas fueron absorbidas por una penetración folicular a través de los apéndices (folículos pilosos y glándulas sebáceas). Esto puede ser debido a que las nanopartículas son demasiado grandes para permear directamente a través del estrato córneo (Barry, 2002).

De manera general, los estudios reportados con nanopartículas lipídicas (Jenning et al., 2000, Chen et al., 2006, Liu et al., 2007, Fang et al., 2008, Puglia et al., 2008) o poliméricas (Rolland et al., 1993, De Jalón et al., 2001, Santoyo et al., 2002, Shim et al., 2004, Alvarez-Roman et al., 2004b, Sheihet et al., 2008), han mostrado la peculiaridad de reducir la permeación a través de la piel (liberación

transdérmica), incrementando la penetración dentro de las capas de la piel (liberación dérmica) formando un reservorio disponible para prolongar el tiempo de residencia del fármaco dentro de ésta.

Sin embargo, la penetración de nanopartículas poliméricas ha sido menos investigada que las nanopartículas lipídicas, e incluso que los liposomas. Por otra parte, los autores han reportado el efecto de las nanopartículas en general como acarreadores de fármacos a través de la piel presentando una carga negativa sobre su superficie, a pesar de que la piel presenta una carga negativa debido a la presencia de residuos de proteína cargadas negativamente; de esta manera, lo anterior pudiera dejar ver que el sistema de liberación con una carga negativa podría ser excluido de la piel resultando una pobre penetración del sistema dentro de ella. Para este fin, en el presente trabajo se mostró que el uso de nanopartículas con carga positiva, incrementó significativamente la retención del fármaco en la piel disminuyendo la permeación transdérmica del fármaco a través de ésta y así concentrar la mayor cantidad de principio activo en la piel.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo son de gran interés para tratamientos con patologías relacionadas con las estructuras pilosebáceas como el acné, en donde se desea que el fármaco actúe a nivel local (liberación dérmica).

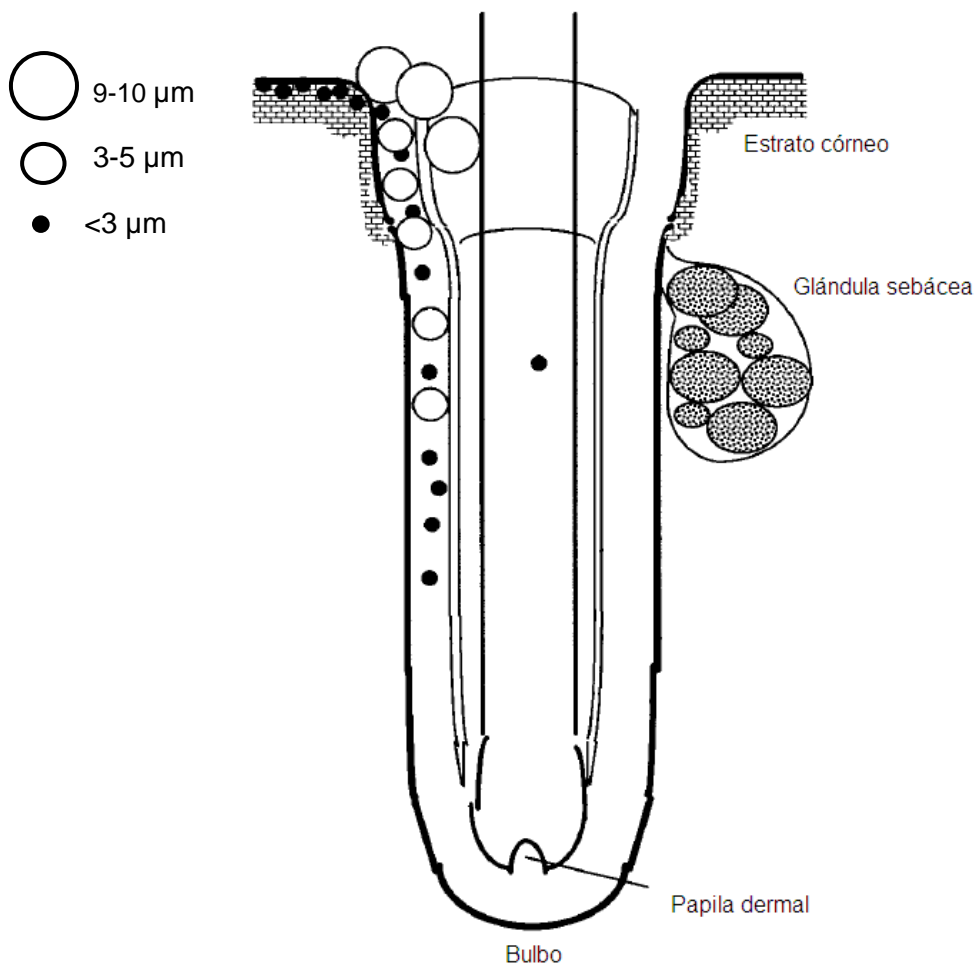


Figura 25. Nivel de penetración de partículas de acuerdo a su tamaño a través de los folículos pilosos de la piel (Lieb et al., 1997).

La concentración mínima inhibitoria (CMI) de triclosán reportada previamente por Lee y cols. (2003) para combatir la bacteria *Propionibacterium acnes* causante del acné, es de 7.8 ppm. La cantidad de triclosán retenida en la piel usando nanopartículas catiónicas por difusión pasiva en el presente trabajo, fue de 77.49 ppm, asumiendo que el triclosán es un fármaco no tóxico además de ser biocompatible con la piel. Por lo tanto, los resultados obtenidos en este trabajo acerca del uso de nanopartículas catiónicas cargadas con triclosán son una interesante alternativa para mejorar significativamente el tratamiento del acné

incrementando la penetración y residencia del fármaco dentro de la piel y, de esta manera, lograr un efecto local.

Por otro lado, es interesante notar que de acuerdo con la cantidad permeada de triclosán a través de la piel en función del tiempo por difusión pasiva, usando en el compartimento donador triclosán en solución, el tiempo de latencia (t_{lag}) fue mayor comparado con el tiempo de latencia determinado usando nanopartículas, este efecto se puede observar en la figura 24. Este comportamiento pudo deberse a que el transporte de triclosán en solución por difusión pasiva ocurrió como transporte facilitado a lo largo de un gradiente de concentración; sin embargo, las nanopartículas catiónicas debido a su alto grado de atracción con la piel, fueron depositadas dentro de los apéndices de la piel debido a su tamaño, disminuyendo el gradiente de concentración y, simultáneamente, disminuyendo el t_{lag} .

Además, Scheuplein (1972) sugirió que el transporte a través de los apéndices de la piel es más rápido que el transporte transcelular, por lo que el tiempo de latencia por vía transcelular es mayor que por vía folicular. En la figura 26 se observa el gráfico descrito por Scheuplein sobre la cantidad de material penetrado a través de la piel en función del tiempo. En el gráfico 26 se puede observar claramente que cuando la ruta del material es por vía folicular, la penetración es mucho más rápida presentando un tiempo de latencia casi nulo, sin embargo, cuando la ruta del material es por vía transcelular, el transporte es más lento presentando un tiempo de latencia mucho mayor. De lo anterior, se puede confirmar que en lo que respecta al presente trabajo, las nanopartículas poliméricas penetraron a través de la piel por vía folicular, ya que presentaron un tiempo de latencia casi nulo; sin embargo, la penetración de triclosán a través de la piel pudo ser por vía transcelular, ya que presentó un tiempo de latencia mucho mayor. Este comportamiento puede ser debido al tamaño, ya que las nanopartículas no podrían permear el estrato córneo debido a éste, por lo que penetraron a través de los apéndices de la piel (folículos pilosos y glándulas sebáceas); con respecto al triclosán en solución, éste tiene un peso molecular pequeño, por lo que puede permear el estrato córneo. También se observa en la

figura 26 que después de cierto tiempo de penetración del material, la vía dominante es la transcelular, dejando atrás la vía folicular, y observando la figura 24, se puede apreciar este mismo efecto comparando los dos sistemas por difusión pasiva en el presente estudio, por lo que se sugiere que este efecto es debido a que por vía folicular, el material se queda retenido dentro de los folículos, sin embargo, por vía transcelular, el material tiende a permear a través de la piel. Este efecto también se puede corroborar con los resultados obtenidos sobre la cantidad total permeada de triclosán (tabla 8) a través de la piel, ya que usando triclosán en solución, la cantidad total permeada es mayor en comparación con el sistema nanoparticulado, el cual pudo haber quedado retenido en los folículos de la piel.

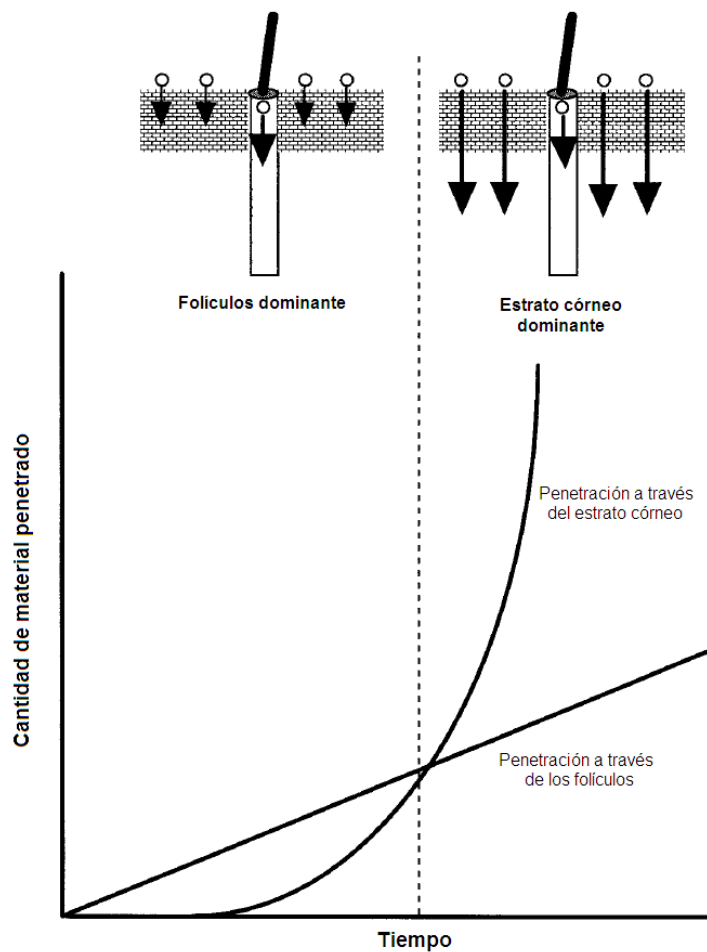


Figura 26. Vías dominantes de penetración a través de la piel en función del tiempo (Scheuplein, 1972).

7.2.4 Permeaciones iontoforéticas

Para nuestro conocimiento, todavía no se han reportado estudios sobre la combinación del uso de nanopartículas poliméricas catiónicas a través de piel mediante el uso de iontoforesis para estudiar el comportamiento de liberación dérmica y transdérmica de fármacos.

Los resultados de los estudios iontoforéticos sobre la cantidad acumulada de triclosán en la solución receptora en función del tiempo se muestran en la figura 27.

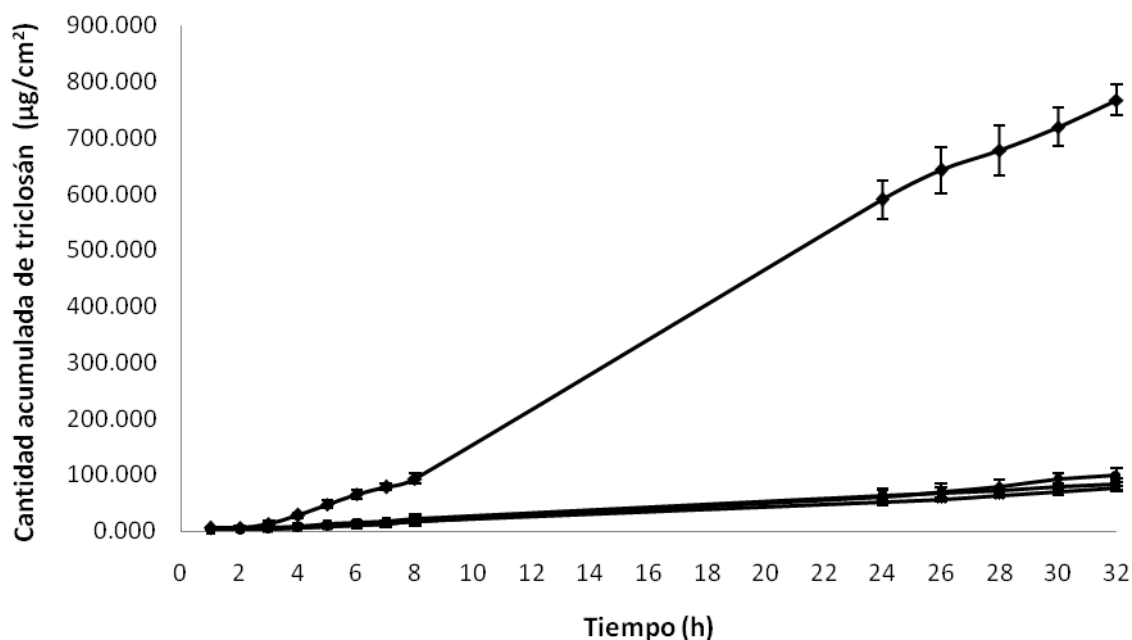


Figura 27. Cantidades acumuladas permeadas de triclosán a través de piel humana por iontoforesis empleando diferentes concentraciones de triclosán. (♦) solución de triclosán en el compartimento donador (2,500 µg/ml); suspensión de nanopartículas en el compartimento donador: (*) 1,500 µg/ml; (▲) 2,500 µg/ml; (●) 4,000 µg/ml.

El flujo (J_s), el coeficiente de permeación (K_p), la cantidad acumulada al finalizar la experimentación en la solución receptora (32 h) y la cantidad de triclosán retenida en la piel después de finalizar la experimentación, se muestran en la tabla 9.

Tabla 9. Datos obtenidos de permeaciones de triclosán con iontoforesis a través de piel humana.

Sistema	J_s ($\mu\text{g}/\text{cm}^2\text{h}$)	Cantidad total permeada ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	K_p (cm/h)	Cantidad retenida en la piel ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)
Solución de triclosán (2,500 $\mu\text{g}/\text{ml}$)	28.6 ± 2.1	767 ± 27.2	0.0114	701 ± 154
Sistema nanoparticulado (1,500 $\mu\text{g}/\text{ml}$)	2.4 ± 0.12	76 ± 5.1	0.0016	974 ± 374
Sistema nanoparticulado (2,500 $\mu\text{l}/\text{ml}$)	2.7 ± 0.17	83 ± 6.2	0.001	989 ± 15.3
Sistema nanoparticulado (4,000 $\mu\text{g}/\text{ml}$)	3.1 ± 0.7	100 ± 12.2	0.0008	$1,010 \pm 172$

Los primeros experimentos iontoforéticos fueron realizados usando solución de triclosán en el compartimento donador (2,500 $\mu\text{g}/\text{ml}$). El flujo de triclosán a través de la piel (J_s), el coeficiente de permeación (K_p) y la cantidad permeada acumulada de triclosán fueron de $28.6 \pm 2.1 \mu\text{g}/\text{cm}^2\text{h}$, $0.0114 \text{ cm}/\text{h}$ y $767 \pm 56.3 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, respectivamente. El flujo fue incrementado 26 veces más con respecto a la difusión pasiva debido a la aplicación de una corriente eléctrica. En este caso, el mecanismo de transporte del fármaco fue por electroósmosis, que es el flujo convectivo del medio con dirección del ánodo hacia el cátodo como un resultado de la carga negativa de la piel al pH fisiológico.

Para los estudios usando suspensión de nanopartículas poliméricas catiónicas, tres niveles de concentración de triclosán fueron evaluados: 1,500, 2,500 y 4,000 $\mu\text{g}/\text{ml}$. De acuerdo a los análisis estadísticos (*análisis de varianza, ANOVA*), los

resultados del flujo no fueron significativamente diferentes respecto a la concentración de triclosán. En este caso, el mecanismo de transporte del fármaco fue por electrorepulsión, en el cual las nanopartículas cargadas positivamente fueron repelidas del electrodo con la misma carga, el ánodo: Ag. Además, la piel, siendo cargada negativamente al pH fisiológico, actuó como una membrana permeoselectiva a cationes, favoreciendo el movimiento de cationes a través de la piel, en este caso las nanopartículas catiónicas. La electroósmosis constituye un mecanismo de transporte de segundo orden cuando el número de transporte del ion de interés es alto, por ejemplo, cuando domina la electrorepulsión como es el caso en el presente trabajo.

Por otro lado, la cantidad retenida de triclosán dentro de la piel usando solución de triclosán en el compartimento donador fue de $232 \pm 111 \mu\text{g}/\text{cm}^2$. Las cantidades de triclosán retenidas dentro de la piel usando suspensión de nanopartículas en el compartimento donador fueron de 974 ± 374 , 989 ± 15.3 y $1010 \pm 172 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, respectivamente, para cada nivel de concentración de triclosán (1,500, 2,500 y 4,000 $\mu\text{g}/\text{ml}$). De acuerdo a los análisis estadísticos (*análisis de varianza*, ANOVA), las cantidades de triclosán retenidas dentro de la piel no fueron significativamente diferentes. Kalia y cols. (2004) sugieren que simplemente incrementando la cantidad de fármaco en la formulación podría no incrementar el número de moléculas en la membrana.

La cantidad de triclosán retenida dentro de la piel usando en el compartimento donador nanopartículas catiónicas (2,500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de triclosán), fue 1.4 veces mayor que usando solución de triclosán a la misma concentración. Esto puede deberse a que las nanopartículas catiónicas quedaron retenidas en los folículos de la piel, actuando éstas como un reservorio para el fármaco; posteriormente, la liberación del fármaco fue precedida por la penetración del medio de disolución dentro de las nanopartículas debido a la alta permeabilidad que presenta el polímero (Eudragit® RL 100) como se mencionó anteriormente. Además, la permanencia de las nanopartículas dentro de la piel podría también deberse a la alta atracción entre las nanopartículas poliméricas (carga positiva) y la piel (carga negativa). Por otra

parte, la aplicación de la corriente eléctrica sobre el triclosán en solución, mejoró significativamente el transporte transdérmico del fármaco a través de la piel, disminuyendo su permanencia dentro ésta.

Los resultados del presente estudio mostraron que la iontoforesis incrementó significativamente (26 veces) el flujo transdérmico del triclosán comparado por difusión pasiva empleando solución de triclosán en el compartimento donador. Utilizando nanopartículas catiónicas, el flujo del triclosán se incrementó 4.5 veces en comparación por difusión pasiva usando la misma concentración de triclosán. Sin embargo, el incremento de la cantidad de triclosán retenido dentro de la piel, fue mayor aplicando nanopartículas catiónicas por difusión pasiva (8.5 veces más que usando solución de triclosán).

Estos resultados sugieren que las nanopartículas catiónicas por difusión pasiva son una interesante alternativa para mejorar tratamientos dérmicos, o bien, tratamientos relacionados con las estructuras pilosebáceas tales como el acné. Por otro lado, la iontoforesis favorece significativamente el transporte transdérmico de fármacos a través de la piel, pero no la retención de éstos en la piel.

8. CONCLUSIONES

Se lograron diseñar y evaluar nuevos sistemas de liberación de fármacos a partir de dispersiones nanoparticuladas: (i) nanopartículas infiltradas en un soporte polimérico biodegradable y, (ii) nanopartículas e iontoforesis en piel humana.

i) NANOPARTÍCULAS INFILTRADAS EN UN SOPORTE POLIMÉRICO

- a) La infiltración de nanopartículas sobre la superficie de las membranas biodegradables porosas, permitió controlar la velocidad de liberación del fármaco modelo. Esto debido a la formación de una película oclusiva cuyas propiedades son dependientes de la cantidad de nanopartículas adsorbidas.
- b) La tecnología propuesta en el presente estudio de ensamblar nanopartículas dentro de un sistema poroso, es pionera en la formulación de sistemas de liberación controlada de fármacos, además de ser un proceso noble para éstos, ya que evita el contacto directo de fármacos con disolventes orgánicos. De esta manera, esta tecnología tiene un enorme potencial para formular sistemas biodegradables de liberación controlada con moléculas sensibles como péptidos, proteínas, DNA, RNA, anticuerpos monoclonales, etc.
- c) Los sistemas propuestos en el presente estudio, ofrecen la posibilidad de ser administrados por diferentes vías, lo que los hace sistemas polifuncionales, generando una nueva opción en la industria farmacéutica, ya que es la primera propuesta de formular un sistema biodegradable en medios acuosos, además de controlar la velocidad de liberación del principio activo.

ii) NANOPARTÍCULAS E IONTOFORESIS EN PIEL HUMANA

- a) La cantidad de triclosán retenida en piel humana con el uso de nanopartículas catiónicas por difusión pasiva, se incrementó 8.5 veces más que con el uso del fármaco en solución.
- b) La combinación de iontoforesis con nanopartículas catiónicas incrementó 1.4 veces más la residencia del triclosán en piel humana que con el uso del fármaco en solución.
- c) Los resultados obtenidos en el presente trabajo acerca del uso de nanopartículas catiónicas cargadas con triclosán por difusión pasiva, podrían mejorar significativamente el tratamiento para el acné y otros tratamientos dérmicos, incrementando la penetración y la residencia del fármaco dentro de la piel y, de esta manera, lograr un efecto local.

9. REFERENCIAS

Alvarez-Román, G. Barré, Guy, R.H., Fessi, H. Biodegradable polymeric nanocapsules containing a sunscreen agent: preparation and photoprotection. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 52 (2001) 191-195.

Alvarez-Román, R., Naik, A., Kalia, Y.N., Fessi, H., Guy, R.H. Visualization of skin penetration using confocal laser scanning microscopy, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 58 (2004a) 301-316.

Alvarez-Román, R., Naik, A., Kalia, Y.N., Fessi, H., Guy, R.H. Skin penetration and distribution of polymeric nanoparticles, *J. Control. Rel.* 99 (2004b) 53-62.

Azarmi, S., Farid, J., Nokhodchi, A., Bahari-Saravi, S.M., Valizadeh, H. Thermal treating as a tool for sustained release of indomethacin from Eudragit RS and RL matrices. *Int. J. Pharm.* 246 (2002) 171-177.

Banga, A.K. Electrically assisted transdermal and topical drug delivery. *Taylor Francis group*, 2003, Nueva York.

Bernad Bernad, M.J., Ganem Rondero, A., Melgoza Contreras, L.M. Quintanar Guerrero, D. Sistemas de liberación controlada de activos farmacéuticos. *Asociación Farmacéutica Mexicana*, 2003, México, D.F.

Barry, B.W. Novel mechanisms and devices to enable successful transdermal drug delivery, *Eur. J. Pharm. Sci.* 14 (2001) 101-114.

Barry, B.W. Drug Delivery Routes in skin: a novel approach, *Advanced Drug Delivery Review* 54 (1) 2002, S31-S40.

Bertilsson, L. Clinical pharmacokinetics of carbamazepine. *Clin. Pharmacokinet.* 3 (1978) 128-143.

Bhargava, H. N., Leonar, P.A. Triclosan: Applications and safety, *AJIC Am., J. Infect. Control.* 24 (1996) 209-218.

Bronaugh, L.R., Maibach, H.I. Topical absorption of dermatological products. *Marcel Dekker*, 2001, Nueva York.

Burnette, R. R., Ongpipattanakul, B. Characterization of the permselective properties of excised human skin during iontophoresis, *J. Pharm. Sci.* 76 (1987) 765-773.

Byrn, S.R. Solid-state Chemistry of drugs, *Academic press*, 1982, New York.

- Carafa, M., Santucci, E., Lucania, G. Lidocaine-loaded non-ionic surfactant vesicles: characterization and in vitro permeation studies, *Int. J. Pharm.* 231 (2002) 21-32.
- Chen, H.B., Du, D.R., Chang, X.L., Liu, W., Liu, J., Weng, T., Yang, Y.J., Xu, H.B., Yang, X.L. Podophyllotoxin-loaded solid lipid nanoparticles for epidermal targeting. *J. Control. Rel.* 110 (2006) 296-306.
- Chien, Y.W. Novel drug delivery systems. 2a. edición, *Marcel Dekker*, 1991, E.U.A.
- Chung, T.W., Huang, Y.Y., Liu, Y.Z. Effects of the rate of the solvent evaporation on the characteristics of the drug loaded PLLA and PDLLA microspheres, *Int. J. Pharm.*, 212 (2001) 161-169.
- Cui, F., Cun, D., Tao, A., Yang, M., Shi, K., Zhao, M., Guan, Y. Preparation and characterization of melittin-loaded poly (DL-lactic acid) or poly (DL-lactic-co-glycolic acid) microspheres made by the double emulsion method. *J. Control. Rel.* 107 (2005) 310-319.
- De Jalón, E., Blanco-Prieto, M., Ygartua, P., Santoyo, S. Topical application of acyclovir-loaded microparticles: quantification of the drug in porcine skin layers, *J. Control. Rel.* 75 (2001) 191-197.
- Domínguez-Delgado, C.L. 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. *Tesis de Licenciatura, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Universidad Nacional Autónoma de México*, México (2006).
- Eljarrat-Binstock, E., Orucov, F., Aldouby, Y., Frucht-Pery, J., Domb, A. Charged nanoparticles delivery to the eye using hydrogel iontophoresis. *J. Control. Rel.* 126 (2008) 156-161.
- Escobar-Chávez, J.J., Merino-Sanjuán, V., López-Cervantes, M., Rodríguez-Cruz, I.M., Quintanar-Guerrero, D, Ganem-Quintanar, A. The Use of Iontophoresis in the Administration of Nicotine and New Non-Nicotine Drugs Through the Skin for Smoking Cessation. *Curr. Drug Discov. Technol.* 6:3 (2009) 171-185.
- Escobar-Chávez, J.J., Bonilla-Martínez, D., Villegas-González, Ma., Rodríguez-Cruz, I.M., Domínguez-Delgado, C.L. The use of sonophoresis in the administration of drugs throughout the skin, *J. Pharm. Pharm. Sci.*; 12:1 (2009) 88-115.
- Fang, J.Y., Fang, C.L., Liu, C.H., Su, Y.H. Lipid nanoparticles as vehicles for topical psoralen delivery: Solid lipid nanoparticles (SLN) versus nanostructured lipid carriers (NLC). *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 70 (2008) 633-640.

- Femenía-Font, A. Balaguer-Fernández, C. Merino, V. López-Castellano, A. Combination strategies for enhancing transdermal absorption of sumatriptan through skin, *Int. J. Pharm.* 323 (2006) 125-130.
- Guy, R.H., Kalia, Y.N., Delgado-Charro, M.B., Merino, V., López, A., Marro, D. Iontophoresis: electrorepulsion and electrosomosis, *J. Control. Rel.* 64 (2000) 129-132.
- Guy, R.H., Hadgraft, J. *Transdermal Drug Delivery*, 2a ed., *Marcel Dekker*, Nueva York, 2003.
- Haznedar, S., Dortunc, B. Preparation and in vitro evaluation of Eudragit microspheres containing acetazolamide, *Int. J. Pharm.* 269 (2004) 131-140.
- Higuchi, T., 1961. Rate of release of medicaments from ointment base containing drug in suspension. *J. Pharm. Sci.*, 50 (1961) 874-875.
- Honeywell-Nguyen, P.L. Bouwstra, J.A. Vesicles as a tool for transdermal and dermal delivery, *Drug disc. Today: Technologies 2* (2005) 67-74.
- Ikada, Y., Tsuji, H., Biodegradable polyesters for medical and ecological applications. *Macromol. Rapid Commun.*, 21 (2000) 117-132.
- Israelachvili, J.N., *Intermolecular and surface forces*, 2nd ed., *Academic Press*. (1995) California, pp. 145-151.
- Jenning, V., Gysler, A., Schäfer-Korting, M., Gohla, S. Vitamin A loaded solid lipid nanoparticles for topical use: occlusive properties and drug targeting to the upper skin, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 49 (2000) 211-218.
- Kalia, Y.N., Naik, A., Garrison, J., Guy, R.H. Iontophoretic drug delivery, *Advanced drug delivery review*, 56 (2004) 619-658.
- Kang, M.H., Yong, W.C., Kinam, P. PLGA-PEG copolymers for drug formulations, *Drug Delivery Technology*, Vol. 3 No. 5. (2003) 42-49.
- Katzhendler, I., Azoury, R., Friedman, M. Crystalline properties of carbamazepine in sustained release hydrophilic matrix tablets based on hydroxypropyl methylcellulose. *J. Control. Rel.* 54 (1998) 69-85.
- Killian, J.M., Fromm, G.H. Carbamazepine in the treatment of neuralgia. Use of side effects. *Arch. Neurol.*, 19 (1968) 129-136.
- Kim, T., Yoon, J., Lee, D., Park, T. Gas foamed open porous biodegradable polymeric microspheres. *Biomaterials*, 27 (2006) 152-159

- Krahn, F.U., Mielck, J.B. Relations between several polymorphic forms and the dehydrate of carbamazepine. *Pharm. Acta Helv.* 62 (1987) 247-254.
- Lane, N., Heath, J.R. Handbook of nanotechnology. Bharat Bhushan (Ed.) *Springer*. (2004), Berlín.
- Lee, T.W., Kim, J.C., Hwang, S. Hydrogel patches containing Triclosan for acne treatment, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 56 (2003) 407-412.
- Lemaire, V., Bélair, J., Hildgen, P. Structural modeling of drug release from biodegradable porous matrices based on a combined diffusion/erosion process. *Int. J. Pharm.* 258 (2003) 95-107.
- Leroux, J.C., Alléman, E., Doelker, E. New approach for the preparation of nanoparticles by an emulsion-diffusion method, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 41:1 (1995) 14-18.
- Li, X., Jasti, B.R. Design of controlled release drug delivery systems. *Mc Graw Hill*, 2006, Nueva York.
- Lieb, L.M., Liimatta, A.P., Bryan, R.N., Brown, B.D., Krueger, G.G., Description of the intrafollicular delivery of large molecular weight molecules to follicles of human scalp *in vitro*. *J. Pharm. Sci.* 86 (1997)1022-1029.
- Liu, J., Hu, W., Chen, H., Ni, Q., Xu, H., Yang, X. Isotretinoin-loaded solid lipid nanoparticles with skin targeting for topical delivery, *Int. J. Pharm.* 328 (2007) 191-195.
- Lu, L., Peter, S.J., Lyman, M., Lai, H., Leite, S., Tamada, J., Uyama, S., Vacanti, J., Langer, R., Mikos, A. In vitro and in vivo degradation of porous poly(DL-lactic-co-glycolic-acid) foams. *Biomaterials* 21 (2000a) 1837-1845.
- Lu, L., Peter, S.J., Lyman, M., Lai, H., Leite, S., Tamada, J., Vacanti, J., Langer, R., Mikos, A. In vitro degradation of porous poly(DL-lactic-co-glycolic-acid) foams. *Biomaterials* 21 (2000b) 1595-1605.
- Mao, S., Shi, Y., Li, L., Xu, J., Schaper, A., Kissel, T. Effects of process and formulation parameters on characteristics and internal morphology of poly (D, L- lactide-co-glycolide) microspheres formed by the solvent evaporation method. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 68 (2008) 214-223.
- Marples, R.R. The microflora of the face and acne lesions, *J. Invest. Dermatol.* 3 (1974) 326-331.
- Middleton, J.C., Tipton, A.J. Synthetic biodegradable polymers as medical devices. *Medical Plastics & Biomaterials*, 5 (2) (1998) 30-39.

- Mikos, A.G., Sarakinos, G., Leite, S.M., Vacanti, J.P., Langer, R. Laminated three-dimensional biodegradable foams for use in tissue engineering. *Biomaterials*, 14 (1992) 323-330.
- Mikos, A.G., Thorsen, A., Czerwonka L., Bao, Y., Langert, R. 1994. Preparation and characterization of poly (L-lactic acid) foams. *Polymer*, 35 (1994) 1068-1077.
- Moffat, C. Clarke's Analysis of drugs and poisons, 3a Ed., *Pharmaceutical Press*, 2005.
- Müller, R.H., Willis, K.H. Rheological properties of poloxamer vehicles. *Int. J. Pharm.* 18 (1989) 269-276.
- Müller, R.H., Willis, K.H. Surface modification of i.v. injectable biodegradable nanoparticles with poloxamer polymers and poloxamina 908. *Int. J. Pharm.* 89 (1993) 25-31.
- Nicoli, S., Santi, P., Couvreur, P., Couarraze, G., Colombo, P., Fattal, E. Design of triptolein loaded nanospheres for transdermal iontophoretic administration. *Int. J. Pharm.* 214 (2001) 31-35.
- Niwa, T., Takeuchi, T., Hino, T., Kunou, N., Kawashima, Y. Preparations of biodegradable nanospheres of water-soluble and insoluble drugs with D,L-lactide/glycolide copolymer by a novel spontaneous emulsification solvent diffusion method, and the drug release behavior. *J. Control. Rel.* 25 (1993) 89-98.
- Okada, H., Doken, Y., Ogawa, Y., Toguchi, H. Preparation of 3-month depot injectable microspheres of leuprorelin acetate using biodegradable polymers. *Pharmacol. Res.*, 11(1994) 1143-1147.
- Park, J., Lee, J., Jung, E., Park, Y., Kim, K., Park, B., Jung, K., Park, E., Kim, J., Park, D. In vitro antibacterial and anti-inflammatory effects of honokiol and magnolol against *Propionibacterium sp.* *Eur. J. Pharmacol.* 496 (2004) 189-195.
- Peppas, N. A., Bures, P., Leobandung, W., Ichikawa, H. Hydrogels in pharmaceutical formulations. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 50 (2000) 27-46.
- Piñón-Segundo, E., Ganem-Quintanar, A., Alonso-Pérez, V., Quintanar-Guerrero, D. Preparation and characterization of triclosan nanoparticles for periodontal treatment. *Int. J. Pharm.*, 294 (2005) 217-232.
- Porter, R.S., Woodbury, D.M., Penry, J.K., Pippenger, C.E. 1982. Antiepileptic Drugs, *Raven Press*, New York, pp. 167-175.

Puglia, C., Blasi, P., Rizza, L., Schoubben, A., Bonina, F., Rossi C., Ricci M. Lipid nanoparticles for prolonged topical delivery: An *in vitro* and *in vivo* investigation, *Int. J. Pharm.* 358 (2008) 295-304.

Pruniéras, M. (1981). Précis de cosmetologie dermatologique, Masson Paris.

Quintanar-Guerrero, D., Fessi, H., Allémann, E., Doelker, E. Influence of stabilizing agents and preparative variables on the formation of poly (D, L-Lactic acid) nanoparticles by an emulsification-diffusion technique. *Int. J. Pharm.*, 143 (1996) 133-141.

Quintanar-Guerrero, D., Ganem-Quintanar, A., Allemán, E., Fessi, H., Doelker, E. Influence of the stabilizer coating on the purification and freeze drying of the poly(D, L-Lactic acid) nanoparticles prepared by an emulsion-diffusion technique. *J. Microencapsulat.*, 15 (1998) 107-119.

Quintanar-Guerrero, D., Allemán, E., Fessi, H., Doelker, E. 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.

Riddick, T.M. Control of Colloid through Zeta Potential. Zeta-meter Inc via *Livingston Publishing Company*, Wynnewod (1968).

Rodríguez-Cruz, I. M., Domínguez-Delgado, C.L., Escobar-Chávez, J.J., Leyva-Gómez, G., Ganem-Quintanar, A., Quintanar-Guerrero, D. Nanoparticle infiltration to prepare solvent-free controlled drug delivery system; *Int. J. Pharm.* 371 (2009) 177-181.

Rolland, A., Wagner, N., Chatelus, A., Shroot, B., Schaefer, H. Site-Specific Drug Delivery to Pilosebaceous Structures Using Polymeric Microspheres, *Pharm. Res.* 10:12 (1993) 1738-1744.

Sáez, V., Hernández, E. Revista Iberoamericana de polímeros. 3:3 (2002) 1-20.

Santoyo, S., De Jalón, E. Ga., Ygartua, P., Renedo, M. J., Blanco-Príeto, M. J. Optimization of topical cidofovir penetration using microparticles, *Int. J. Pharm.*, 242 (2002) 107-113.

Sato, T., Kanke, M., Schroeder, H.G., De Luca, P.P. Porous biodegradable microspheres for controlled drug delivery. I. Assessment of processing conditions and solvent removal techniques. *Pharm. Res.* Vol. 5, No. 1 (1988) 21-30.

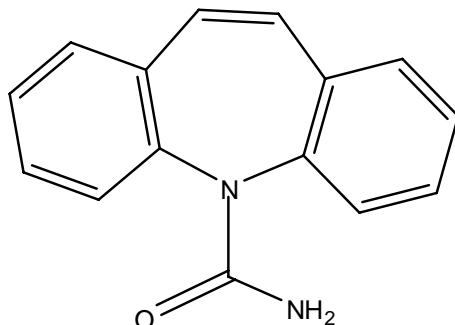
Schaefer, H., Watts, F., Brod, J., Illel, B. Follicular penetration. Scott R.C., Guy, R.H., Hadgraft, J. (eds.), Prediction of Percutaneous Penetration, Methods, Measurements, Modelling, *IBC Technical Services*, London (1990) 163-173.

- Schuetz, Y.B., Naik, A., Guy, R.H., Vuaridel, E., Kalia, Y.N. Transdermal iontophoretic delivery of vapreotide acetate across porcine skin *in vitro*, *Pharm, Res.* 22 (2005) 1305-1312.
- Sheihet, L., Chandra, P., Batheja, P., Devore, D., Kohn, J., Michniak, B. Tyrosine- derived nanospheres for enhanced topical skin penetration, *Int. J. Pharm.* 350 (2008) 312-319.
- Shim, J., Kang, H.S., Park, W.S., Han, S.H., Kim, J. Chang, I. Transdermal delivery of minoxidil with block copolymer nanoparticles, *J. Control. Rel.* 97 (2004) 477-484.
- Singh, B., Kim, K. Encyclopedia of Pharmaceutical Technology: Drug delivery. *Marcel Dekker*, 2002.
- Soppimath, K.S., Aminabhavi, T.M., Kulkarni, A.R., Rudzinski, W.E. Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. *J. Control. Rel.*, 70 (2001) 1-20.
- Thassu, D., Deleers, M., Pathak, Y. Nanoparticulate drug delivery systems. Informa healthcare, 2007, E.U.A.
- Turner, N.G., Guy, R.H. Visualization and quantitation of iontophoretic pathways using confocal microscopy, *J. Investig. Dermatolog. Sym. Proc.* 3(1998) 136-142.
U.S. Pharmacopeia XXIV NF 19, 1999, E.U.A.
- Valenta, C., Auner, B.G. The use of polymers for dermal and transdermal delivery. *Eur. J. Pharm. and Biopharm.* 58 (2004) 279-289.
- Weert, M., Hennink, W. E., Jiskoot, W. Protein instability in poly (lactic-co-glycolic acid) microparticles, *Pharm. Res.*, 17 (2000) 1159-1167.
- Witschi, C., Doelker, E. Residual solvents in pharmaceutical products: acceptable limits, influences on physicochemical properties, analytical methods and documented values. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 43 (1997) 215-242.
- Walters, K.A. Dermatological and transdermal formulations. *Marcel Dekker*, 2002, E.U.A.
- Woolfson, D., McCaffety, D. (1993). Percutaneous local anaesthesia. Ellis Horwood.
- Zobel, H.P., Stieneker, F., Atmaka-Abdel, S., Gilbert, M., Werner, D., Noe, C.R., Kreuter, J., Zimmer A. Evaluation of aminoalkylmetacrylate nanoparticles as colloidal drug carrier systems. Part II: characterization of antisense oligonucleotides loaded copolymer nanoparticles, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 48 (1999) 1-12.

10. ANEXOS

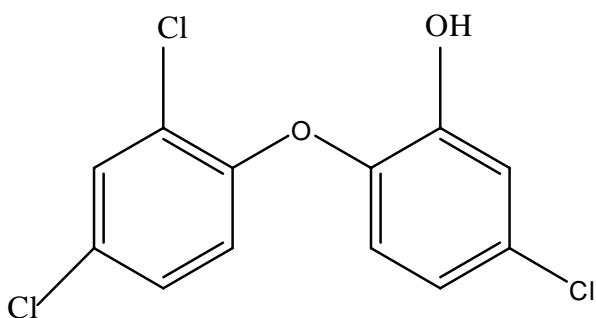
Anexo I. Estructura química y generalidades de los materiales empleados

1.- Carbamazepina



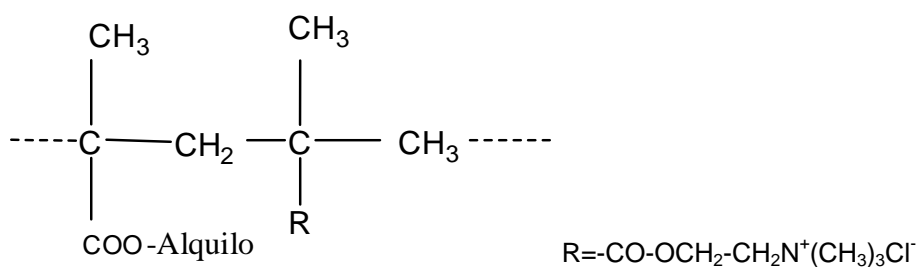
- Fórmula condensada: C₁₅H₁₂N₂O
- Peso Molecular: 236.3 g/mol
- Descripción: Cristales blancos o ligeramente amarillos.
- Punto de fusión: 189-193° C
- Logaritmo negativo de la constante de disociación ácida: pKa 7.0
- Coeficiente de partición (log P): octanol/agua 2.45
- Rango terapéutico: 4-12 mg/L.

2. Triclosán



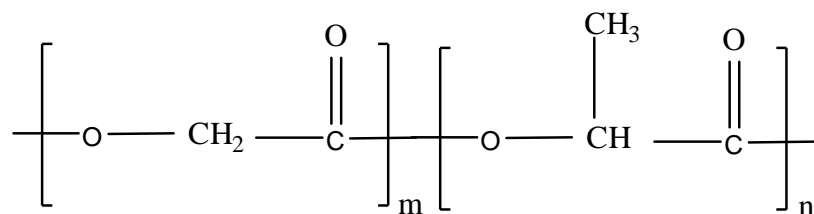
- Fórmula condensada: $C_{12}H_7Cl_3O_2$
- Peso Molecular: 289.5 g/mol
- Descripción: Cristales blancos.
- Punto de fusión: 54-57° C
- Logaritmo negativo de la constante de disociación ácida: pKa 7.9
- Coeficiente de partición (log P): octanol/agua 4.8

3. Eudragit ®RL 100



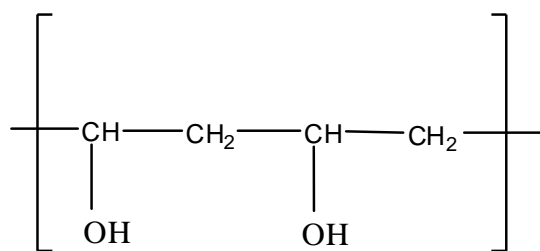
- Nombre químico: Copolímero de metacrilato de aminoalquilo.
- Composición química: Copolímero de ácido acrílico y ácido metacrílico con un bajo contenido de sales de amonio.
- Descripción: Gránulos blancos
- Solubilidad: En metanol, etanol, alcohol isopropílico conteniendo pequeñas cantidades de agua o acetona, acetato de etilo y cloruro de metileno, mezclas de solventes de aproximadamente partes iguales de acetona/alcohol isopropílico y alcohol isopropílico/cloruro de metileno.
- Permeabilidad: Altamente permeable, independiente del pH.
- Aplicaciones principales: Formulaciones de liberación prolongada.

4. PLGA 1:1



- Descripción: Gránulos blanco
- Nombre químico: Ácido poli(D,L-láctico-co-glicólico)
- Olor: inodoro
- Composición: 48:52 a 52:48 fracción mol (D, L-láctico:glicólico)
- Monómero residual: máx. 0.5 %D,L-láctico; máx. 0.5 % glicólico
- Solvente residual: máx. 0.1 % acetona; máx. 0.089 % tolueno; máx. 0.1 % total
- Índice de acidez: mín. 6 mgKOH/g

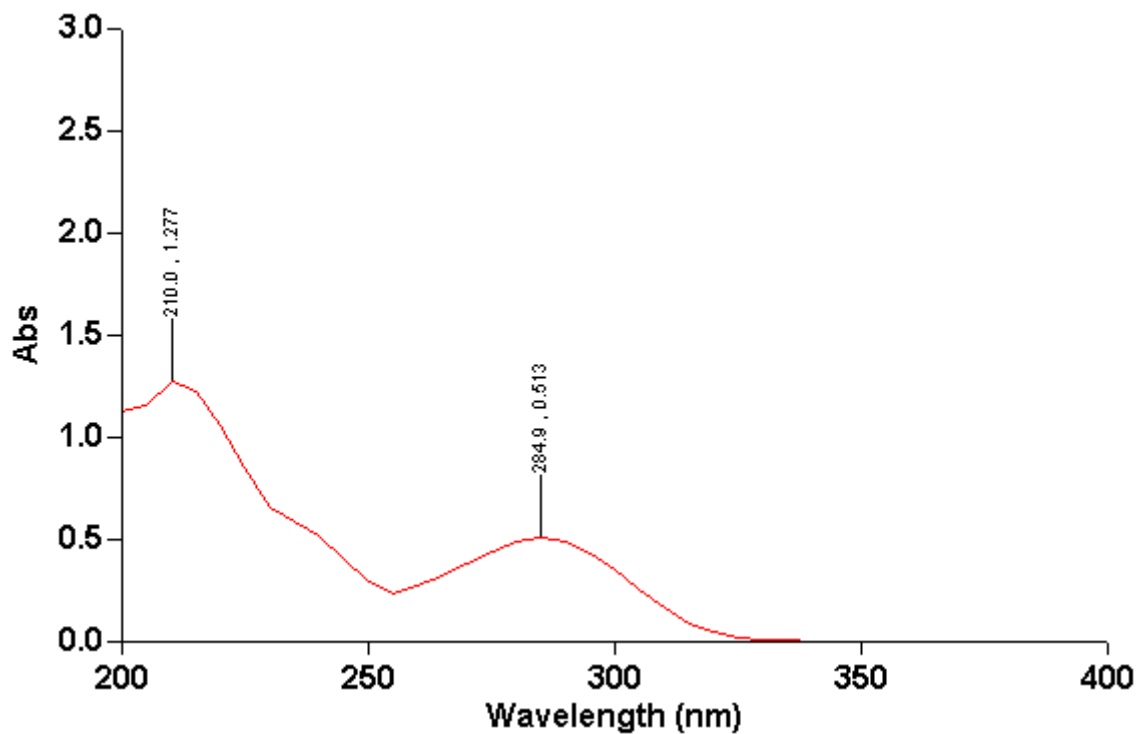
5. Mowiol® 4-88



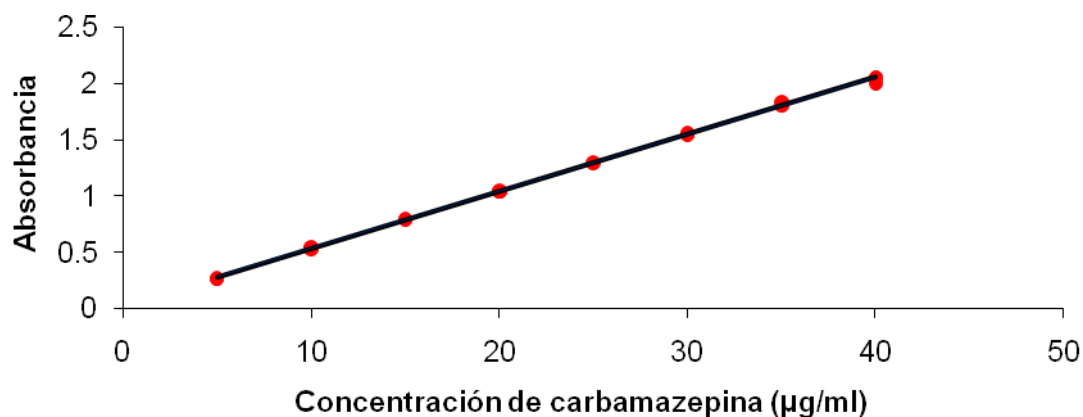
- Nombre químico: Alcohol polivinílico
- Peso molecular: 26,000 g/mol
- Descripción: polvo blanco inodoro
- Solubilidad: soluble en agua
- Densidad: 1.25 – 1.31 g/cm³
- Usos: Fabricación de adhesivos y surfactante.

Anexo II. Espectros de absorción y curvas de calibración de carbamazepina y triclosán.

1. Espectro de absorción de carbamazepina en medio acuoso.



2. Curva de calibración de carbamazepina a 285 nm.



a) Resumen del análisis estadístico

Regresión lineal	
r	0.9996
r ²	0.9993
r ² ajustado	0.9993
C.V.	1.80%
Observaciones	24

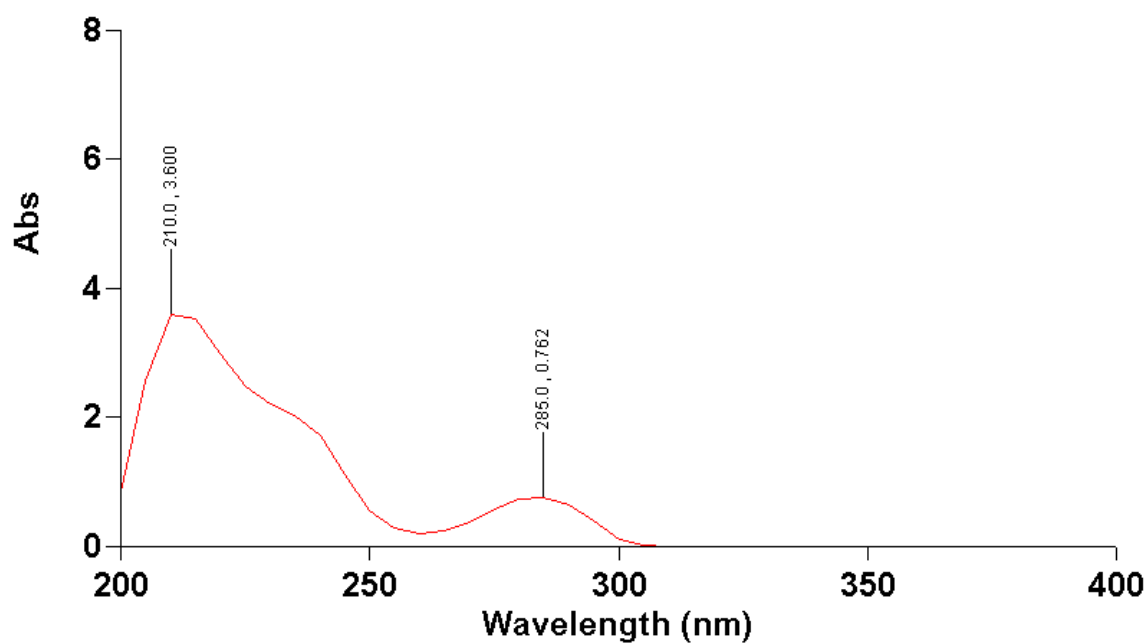
b) ANADEVVA

	g.l.	SC	CM	F	P-value
Regresión	1	8.137908431	8.137908431	34911.4276	1.0397E-36
Residuos	22	0.005128234	0.000233102		
Total	23	8.143036665			

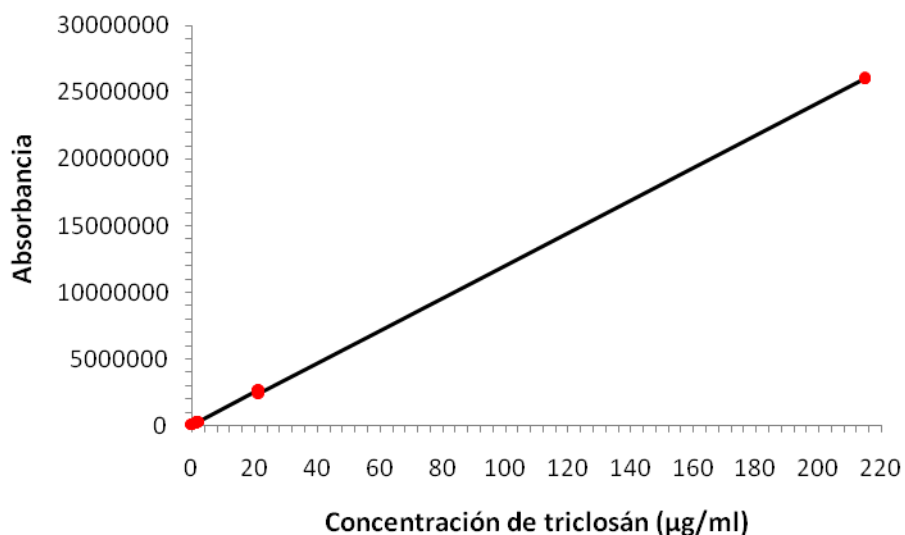
c) Pruebas estadísticas a los coeficientes

	Coefficientes	t	P-value
Intercepto	0.0236	3.436011352	0.002359359
Pendiente	0.050827778	186.8459997	1.03972E-36

3. Espectro de absorción de triclosán.



4. Curva de triclosán a 285 nm por HPLC UV.



a) Resumen del análisis estadístico

Regresión lineal	
r	0.9999797
r ²	0.9999594
r ² ajustado	0.99995627
C.V.	2.80%
Observaciones	15

b) ANADEV

	g.l.	SC	CM	F	P-value
Regresión	1	1.5438E+15	1.5438E+15	320168.959	6.197E-30
Residuos	13	6.2684E+10	4821861858		
Total	14	1.5439E+15			

c) Pruebas estadísticas a los coeficientes

	Coefficientes	t	P-value
Intercepto	46667.6433	2.25927242	0.04168725
pendiente	121059766	565.834745	6.197E-30

ANEXO III. Diámetros de poros de las membranas biodegradables.

Diámetro (μm)								
Poros	longitudinal	transversal (45°)	Poros	longitudinal	transversal (45°)	Poros	longitudinal	transversal (45°)
1	49.3	58.8	35	43.2	48.9	69	40.7	46.3
2	53.1	47.2	36	48.6	50.1	70	41.1	48.6
3	39.5	43.1	37	39.7	44.1	71	31.9	39.5
4	45.1	42	38	46.5	39.4	72	38.3	34.5
5	52.3	45.3	39	30.1	38.3	73	43.1	49.1
6	56.7	59.7	40	51.2	59.9	74	35.7	31.9
7	40.9	50.1	41	38.8	48.8	75	54.1	57.3
8	40.2	51.9	42	56.4	58.8	76	50.2	54.7
9	61.1	64.3	43	49.9	45.2	77	55.1	59.2
10	53.4	56.4	44	43	48.2	78	49.1	53.1
11	46.8	55.7	45	23.1	30.1	79	37.8	40.1
12	38.7	33.8	46	22.6	27.7	80	36.9	42.4
13	42.5	49.4	47	16.9	27.4	81	45.8	51.1
14	45.2	53.4	48	27.1	38.4	82	23.3	30.1
15	27.3	34.6	49	42.7	49.6	83	36.9	42.1
16	53.2	55.3	50	30.5	35.5	84	51.2	55.6
17	34.8	44.1	51	32.1	38.6	85	48.1	50.6
18	35.8	38.4	52	45.6	43.8	86	47.2	44.3
19	47.4	53.2	53	26.3	34.6	87	36.9	43.3
20	43.4	50.5	54	52.9	55.2	88	28.9	37.1
21	44.5	56.1	55	55.1	51.7	89	45.6	49.3
22	37.1	36.1	56	29.3	34.2	90	27.3	36.1
23	39.3	48.6	57	33.5	35.9	91	36.1	33.7
24	43.1	51.1	58	42.8	44.5	92	48.2	55.9
25	34.6	42.7	59	47.8	49	93	58.5	55.9
26	38.7	43.7	60	45.1	48.1	94	54.1	48.1
27	55.2	61.1	61	51.4	50.1	95	49.3	57.1
28	43.8	50.5	62	35.2	37.7	96	38.3	36.1
29	40.1	47.2	63	56.1	53.6	97	52.6	57.9
30	43.1	53.5	64	38.7	42.1	98	49.5	55.4
31	54.4	45.9	65	33.1	38.2	99	43.2	50.1
32	36.7	59.3	66	43.9	45.7	100	54.9	59.9
33	44.7	53.7	67	37.1	43.8			
34	45.1	54.9	68	29.2	32.7			
Promedio =							42.425	46.679
d.e. =							9.16	8.59
Promedio general = 44.55 ± 8.8								

ANEXO IV. Resultados de las cantidades permeadas *in vitro* por difusión pasiva analizadas por HPLC UV.

a) Solución de triclosán (2,500 µg/ml), $n = 4$

Tiempo (h)	Triclosán (µg/cm ²)
2	0.048 ± 0.005
4	0.237 ± 0.031
6	0.735 ± 0.223
8	1.637 ± 0.352
24	20.656 ± 1.721
26	23.021 ± 1.845
28	25.474 ± 2.132
30	27.743 ± 1.652
32	30.818 ± 2.631

b) Suspensión de nanopartículas (2,500 µg de triclosán/ml), $n=4$.

Tiempo (h)	Triclosán (µg/cm ²)
2	0.433 ± 0.01
4	1.351 ± 0.35
6	2.717 ± 0.65
8	4.45 ± 1.31
24	16.131 ± 1.99
26	17.416 ± 2.01
28	18.23 ± 2.34
30	18.695 ± 2.33
32	19.324 ± 2.34

ANEXO V. Resultados de las cantidades permeadas *in vitro* con iontoforesis analizadas por HPLC UV.

a) Solución de triclosán (2,500 µg/ml), $n=4$.

Tiempo (h)	Triclosán (µg/cm ²)
1	4.963 ± 1.10
2	7.044 ± 1.54
3	13.77 ± 3.43
4	27.678 ± 4.62
5	48.01 ± 5.04
6	65.52 ± 8.26
7	78.434 ± 5.62
8	93.259 ± 8.63
24	589.78 ± 30.45
26	642.994 ± 32.31
28	677.826 ± 40.98
30	719.598 ± 34.41
32	767.422 ± 27.18

b) Suspensión de nanopartículas (1,500, 2,500 y 4,000 µg de triclosán/ml), $n=4$.

Tiempo (h)	Triclosán (µg/cm ²)		
	1,500	2,500	4,000
1	3.116 ± 0.12	2.487 ± 0.83	0.456 ± 0.05
2	3.201 ± 0.27	4.131 ± 0.56	2.296 ± 0.32
3	4.596 ± 0.94	6.785 ± 0.96	4.465 ± 1.94
4	6.226 ± 1.20	9.216 ± 2.63	5.631 ± 1.85
5	7.924 ± 1.30	12.256 ± 1.95	7.897 ± 2.01
6	9.793 ± 1.31	15.117 ± 2.63	11.244 ± 4.62
7	12.671 ± 2.18	18.152 ± 0.80	13.181 ± 5.01
8	16.259 ± 1.75	21.013 ± 4.48	17.745 ± 6.94
24	51.935 ± 2.68	63.765 ± 7.32	60.695 ± 14.08
26	56.753 ± 3.75	68.519 ± 9.59	68.772 ± 15.54
28	63.271 ± 4.55	73.261 ± 3.07	79.667 ± 12.71
30	69.549 ± 5.18	78.829 ± 5.90	91.705 ± 10.81
32	76.019 ± 5.12	82.925 ± 6.24	99.843 ± 12.24

PENETRATION OF TRICLOSAN NANOSPHERES THROUGH HUMAN SKIN: PASSIVE DIFFUSION VS. IONTOPHORESIS

**Isabel Marlen Rodríguez-Cruz^a, Virginia Merino^b, Matilde Merino^b, Octavio Díez^b,
Amparo Nácher^b, Adriana Ganem-Quintanar^a, David Quintanar-Guerrero^a**

^aLaboratorio de Posgrado en Tecnología Farmacéutica, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Universidad Nacional Autónoma de México, Av. 1° de Mayo s/n, Cuautitlán Izcalli, C.P. 54743, México.

^bDepartamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica, Universidad de Valencia. Avda. Vicente Andrés Estellés s/n, 46100 Burjassot, Valencia, España.

Sometido a: Journal of Controlled Release (Enero, 2010)

Abstract

The aim of this work was to evaluate the passive and iontophoretic permeation of triclosan through human skin using a triclosan solution and triclosan-loaded cationic nanospheres in order to determine which of the two strategies is more effective in allowing triclosan to accumulate in the skin. Triclosan-loaded nanospheres were prepared by the emulsification-solvent displacement technique using aminoalkyl methacrylate (Eudragit RL® 100) as a polymer. Nanospheres of 261.0 ± 15.1 nm with a positive surface charge ($\Psi_z = +26.0 \pm 3.2$ mV) were obtained. Drug loading and entrapment efficiency were 62.0 ± 1.7 and $68.0 \pm 2.1\%$, respectively. Results demonstrated that the accumulation of triclosan in the skin was significantly greater (8.5 times) when cationic nanospheres were administered by passive diffusion than when the solution was employed. The amount of triclosan retained within the skin when the cationic nanospheres were administered by iontophoresis was 3.1-fold greater than when the solution was administered by passive diffusion. Iontophoresis proved to be effective in enhancing the passage of triclosan in solution throughout the skin, whereas the triclosan nanospheres achieved a local effect by forming a depot within the skin.

Keywords: triclosan, nanospheres, passive diffusion, iontophoresis, dermal delivery.

1. Introduction

Dermal and transdermal routes offer a viable non-invasive alternative for the administration and delivery of therapeutic agents that avoids the hepatic first-pass effect. Dermal delivery consists of localizing a drug within the skin in order to achieve a local effect, and has the advantage of localizing high concentrations of drug at the site of action and reducing the systemic drug levels and, therefore, associated side effects (Honeywell-Nguyen, 2005). On the other hand, transdermal delivery aims to increase the penetration of a drug throughout the skin when a systemic effect is desired (Carafa, 2002). Nevertheless, the composition and architecture of the stratum corneum is a formidable barrier for the topical and transdermal administration of therapeutic agents, which depends on a drug's physicochemical properties such as charge, polarity and molecular weight. Furthermore, at pH ~7.0 the skin is negatively charged, and is, thus, permselective to cations (Burnette, Ongpipattanakul, 1987).

Dermal drug delivery is desirable for the treatment of skin pathologies that are associated with pilosebaceous structures (e.g., acne, skin inflammation, alopecia and other sebaceous gland dysfunctions). Acne is an inflammatory disease of the sebaceous glands that induces inflammation at the skin surface due to several factors including hormonal imbalance, bacterial infection, stress, diet and use of cosmetics (Park, 2004). One such bacterial infection is *Propionibacterium acnes*, which is a microorganism that is frequently found on the surface of skin (Marples, 1974) and is sensible to triclosan (5-chloro-(2,4-dichlorophenoxy) phenol), a non-cationic, broad-spectrum antibacterial agent. This drug is usually employed for the treatment of acne (Bhargava, Leonar, 1996).

Currently, polymeric nanoparticles are showing great potential as drug carriers for topical administration, owing to what seems to be their targeting effect and controlled release (Puglia, 2008). Additionally, polymers and colloidal particles are capable of targeting follicles (Barry, 2001; Alvarez-Román, 2004b). It has been demonstrated that particles with a diameter smaller than 3 μm penetrate the annexes of the skin (sweat glands, sebaceous glands and hair follicles) (Rolland, 1993). Moreover, with respect to the skin, nanoparticles have been proposed as topical vehicles that are capable of extending the residence time of sunscreen agents in the stratum corneum and targeting vitamin A to the upper layers of the skin (Alvarez-Román, 2004a, b, c).

Cutaneous delivery can be improved by enhancement methods consisting of either a carrier system (microemulsions, liposomes and colloidal polymeric suspensions) or physical or chemical enhancers. Among the physical approaches used, iontophoresis appears to be a suitable technique for improving the transdermal transport of drugs and even nanoparticles through the application of a low-level electric current ($\leq 0.5 \text{ mA/cm}^2$) (Kalia et al., 2004; Turner, Guy 1998). The mechanisms by which iontophoresis enhances molecular transport

across the skin are: i) electrorepulsion, in which a charged ion is repelled from an electrode with the same charge, ii) electroosmosis, the convective flow of solvent through a charged pore that occurs in response to the preferential passage of counter ions when an electric field is applied, and iii) current-induced skin permeability increment (Femenía-Font et al., 2006). Thus, positively charged nanoparticles are thought to be the most appropriate for iontophoresis, as they are forced to cross the skin by the electrorepulsion.

Until now, the application of polymeric nanoparticles and iontophoresis has been evaluated separately. We decided to investigate their combined application with the ultimate objective of enhancing (trans-) dermal drug transport as much as possible. Thus, the aim of this work was to evaluate the *in vitro* passive and iontophoretic permeation of triclosan in solution and cationic triclosan-loaded nanospheres in terms of the accumulation of this drug in the skin.

2. Materials and methods

2.1 Materials

Triclosan was supplied by Multiquim, Mexico. Aminoalkyl methacrylate copolymer (Eudragit RL 100 ®) was generously donated by Helm de México, S.A. de C.V. Poly(vinyl alcohol) (PVAL, Mw 26,000) was purchased from Glomarza, Mexico. Methyl ethyl ketone was provided by J.T. Baker, Mexico. HEPES was obtained from Sigma-Aldrich, Spain. HPLC-grade Methanol was provided by Sharlau (Scharlab, Spain). 1,2-propanediol was obtained from Prolabo (Spain). All other reagents were of analytical grade. Distilled water was obtained from a RiOs Millipore® distiller, USA.

2.2 Nanosphere preparation

Triclosan-loaded nanospheres were prepared using the emulsification-diffusion by solvent displacement technique. In short, the organic solvent (methyl ethyl ketone) and water were mutually saturated for at least 20 min prior to use in order to ensure the thermodynamic equilibrium of both liquids. 180 mg of triclosan and 400 mg of aminoalkyl methacrylate were dissolved in 20 ml of water-saturated organic solvent, and this organic solution was emulsified with 40 ml of an organic solvent-saturated aqueous solution of PVAL (5 % w/v) using a stirrer (Heidolph RZR-1) at 2000 rpm for 10 min. Organic solvent was directly eliminated from the system by vacuum steam distillation at 30 rpm and 40° C. Solvent diffusion from the internal to the external phase induces polymer and drug aggregation, leading to the formation of triclosan-loaded nanospheres. The nanosphere suspension was centrifuged (Optima ® LE-80K, Beckman, USA) twice at 27000 rpm for 40 min. Nanospheres were finally frozen at -40° C for 20 min and freeze-dried at 60x10⁻³ mbar (Labconco ®, USA) for 24 h.

2.3 Scanning electron microscopy (SEM) studies

An aqueous dispersion of triclosan-nanospheres (0.2 mg/ml) was spread over a slab and dried in a vacuum at room temperature. Nanospheres were coated with a thick gold layer (~20 nm) (Fine Coat Ion Sputter JFC-1100, JEOL, Japan) and their surface morphology was then observed by SEM using a JSM-25 S II scanning electron microscope (JEOL, Japan).

2.4 Particle size analysis

The average size and the polydispersity index were determined by the laser light scattering technique (Coulter N4 Plus, FL, USA). The laser light (He/Ne 10 mW) wavelength was 678 nm. Measurements were obtained over a 180 s period at a 90° fixed-angle and a temperature of 25° C. The scattering intensity data were analyzed by a digital correlator under a unimodal analysis mode. Dispersions were diluted with water to ensure that the light scattering signal, as indicated by the particle counts per second, was within the instrument's sensitivity range. Measurements were performed in triplicate for all the batches prepared.

2.5 Zeta potential analysis

The zeta potential of the triclosan-nanospheres suspension was measured by electrophoretic mobility using a Laser Doppler Velocimetry (Zetasizer nano-series ZS, ZEN 3600, Malvern Instruments, USA). The laser light (He/Ne 4.0 mW) wavelength was 633 nm. Measurements were obtained during a 180 s period at a 17° fixed-angle and a temperature of 20° C. Dispersions were diluted in bidistilled water. Measurements were performed in triplicate for all the batches prepared.

2.6 Determination of drug loading and entrapment efficiency

Approximately 20 mg of lyophilized triclosan-nanospheres were dissolved in 5 ml of ethanol. This suspension was then filtered in order to eliminate PVAL. The solution obtained was analyzed by HPLC in order to determine the concentration of triclosan.

Drug loading and entrapment efficiency were calculated according to Leroux et al. (1995). Determinations of drug loading were performed in triplicate for all the batches prepared.

2.7 Solubility studies

Mixtures of solutions of HEPES 25 mM and NaCl 30 mM pH 7.4 and propanediol in different proportions (20:80, 30:70, 40:60, 50:50 and 60:40) were saturated with triclosan by constant stirring at ambient temperature.

Once filtered and appropriately diluted, solutions were analyzed by HPLC for triclosan concentration.

2.8 Skin permeation experiments

2.8.1 Preparation of skin

Human abdominal skin was obtained from surgical rejections. The skin was excised (500 μm thickness) with an Aesculap-Wagner electro-dermatome C. GA 176 (B. Braun Surgical S.A., Barcelona, Spain). The pieces obtained were wrapped in aluminum film and stored in the freezer at -20°C for a maximum period of fifteen days. For the assays, the samples were thawed in isotonic solution and placed as a barrier between the donor and receptor compartments of the diffusion cells.

2.8.2 Passive diffusion permeation

The passive and iontophoretic *in vitro* permeation studies were performed using Franz-type vertical glass diffusion cells with an available area for diffusion of 0.6 cm^2 . The solution used as receptor and employed to prepare the donor consisted of HEPES 25 mM containing NaCl 30 mM pH 7.4 and propanediol (50:50 v/v). The receptor phase (4 ml) was constantly stirred with a teflon-coated magnetic bar and maintained at $37 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ in a water bath throughout the experiment. Either 1 ml of triclosan solution (2.5 mg/ml) or 1 ml of nanosphere dispersion (equivalent to 2.5 mg of triclosan) was placed in the donor compartment. During experiments (32 h), samples (400 μl of the receptor solution) were collected every 2 h, at which point the receptor solution was replaced in order to maintain sink conditions. Triclosan content was analyzed by high performance liquid chromatography (HPLC).

2.8.3 Iontophoretic permeation

The diffusion cells mentioned above were employed for the iontophoretic experiments. The anode solution (150 Mm NaCl) was isolated from the donor (containing a 2.5 mg/ml triclosan solution or nanospheres equivalent to 1.5, 2.5 or 4.0 mg of triclosan/ml) via a salt bridge assembly (3 % agarose in 50 mM NaCl) to minimize the effect of competing ions (Schuetz et al., 2005). The cathode was placed in the receptor compartment. The receptor

phase was constantly stirred with a teflon-coated magnetic bar and maintained at $37 \pm 0.5^\circ$ C in a water bath throughout the experiment. A constant current density of 0.5 mA/cm^2 was applied for 8 h via Ag/AgCl electrodes connected to a Kepco BHK-MG 0-2000 V power supply (Kepco, Inc. Flushing, NY, USA). After 8 h of iontophoresis, permeation assays were continued for 32 h for passive diffusion. Samples were taken at different times to characterize the iontophoretic period and subsequent passive diffusion. Triclosan content was determined by HPLC.

Ag/AgCl electrodes were chosen because they do not alter pH (Kalia et al., 2004).

All the passive and iontophoretic permeation experiments were performed in quadruplicate. Following this, skin samples were cut and immersed in the HPLC mobile phase (described later) for 7 h and stirred constantly at ambient temperature to determine the amount of triclosan retained in the skin. Samples were analyzed by HPLC.

2.9 HPLC assay

Analyses were performed using a reverse phase isocratic separation. A Supelcosil C-18 column (150 mm x 4.6 mm, 5 μm particle size) Supelco®, France and a pre-filter of the same particle size and characteristics were employed. The HPLC system consisted of an isocratic pump (Waters 1515), a spectrophotometric detector (Waters 2487) set to 280 nm and Breeze® software (Waters, Barcelona, Spain). The flow rate and injection volume were 1.0 ml/min and 150 μl , respectively. The mobile phase consisted of a methanol: phosphate buffer 25 mM pH 6.0 (90:10). All the solvents were filtered (0.45 μm pore size nylon membrane filter) and degassed prior to use. The column was equilibrated for 50 min. The limits of quantification (LOQ) and detection (LOD) were 432 and 140 ng/ml, respectively. Calibration curves were constructed within a range of 200 and 20000 ng/ml.

3. Results and discussion

Characterization of triclosan nanospheres

The emulsification-solvent displacement technique allowed the preparation of triclosan-loaded cationic nanospheres of $261.0 \pm 15.1 \text{ nm}$ with a low polydispersity index of 0.21 ± 0.03 ($n = 6$). Scanning electron microscopy (SEM) confirmed spherical submicron polymeric particles. A representative micrograph of nanospheres obtained by SEM is shown in Fig. 1. The process efficiency was higher than 99.0 %. Drug loading and entrapment efficiency were 62.0 ± 1.7 and $68.0 \pm 2.1\%$, respectively. Zeta potential, (Ψ_z) measured after ultracentrifugation, was $+26.0 \pm 3.2 \text{ mV}$ for all batches, signifying a positive surface charge on the particle and, thus, suggesting stability. In this way, zeta

potential is an important parameter for characterizing the electrostatic interaction between particles in dispersed systems; the physical stability of the system is determined by the balance between the repulsive and attractive forces. Hence, zeta potential is a good indicator of the magnitude of the repulsive interaction between colloidal particles, and is, therefore, an indicator of the stability of the system (an absolute value of ~ 30 mV is required for stable suspensions) (Riddick, 1968). Polymer quaternary ammonium groups, located on the surface of the particle, were responsible for the positive charge, a result that is in agreement with those of a previous report by Zobel et al. (1999). Furthermore, there was no difference between the zeta potential of unloaded and loaded nanospheres, suggesting that the drug was not localized on the surface of the particles. In this situation, a lowering of zeta potential would be expected due to the nonionic character of triclosan.

DSC thermograms of triclosan, polymer (aminoalkyl methacrylate), stabilizer (PVAL), unloaded nanospheres and loaded nanospheres (triclosan content 31 %) have previously been obtained in our laboratory (Domínguez-Delgado, 2006). The presence of drug crystals in the nanospheres was not detected, suggesting that triclosan was molecularly dispersed in the nanospheres. In the present study, similar data were obtained for the same triclosan concentration.

Passive diffusion delivery

Cumulative amounts of triclosan in the receptor solution vs. time are plotted in Fig. 2. The steady state flux (J_s), permeation coefficient (K_p), cumulative amount after 32 h of experiment and amount of triclosan retained within the skin after completion of the permeation experiments are summarized in Table 1. In order to increase the penetration and accumulation of triclosan within the skin, positively charged nanospheres were evaluated with the aim of enhancing the attraction between the skin (negatively charged) and the nanospheres (positively charged). As expected, the amount of triclosan that reached the receptor compartment via the solution was 1.8 higher than that obtained via the loaded nanospheres. These data confirm that nanospheres do not facilitate transdermal penetration across human skin and are in accordance with those of the study of Alvarez-Román et al. (2004b, c), who studied the efficacy of polystyrene nanoparticles as carriers, with the aim of improving drug residence in the skin without increasing transdermal transport. They observed an increase in the amount of drug retained in the skin, as transdermal transport through the porcine ear skin decreased due to the use of these carriers.

Schaefer et al. (1990) demonstrated that microparticles with a diameter of between 3 and 10 μm selectively penetrate the follicular ducts, whereas particles whose diameter is greater than 10 μm remain on the skin surface and microspheres smaller than 3 μm are randomly distributed into the hair follicles and stratum corneum. In view of the abovementioned evidence, we can assume that the nanospheres prepared in this work (~ 300 nm) were

randomly distributed in the stratum corneum and the pilosebaceous structures due to their size. Additionally, results reported by Rolland et al. (1993) have demonstrated the possibility of targeting drugs to pilosebaceous units using poly(DL-lactic-co-glycolic acid) microspheres as particulate carriers of defined size. They reported that PLGA microspheres of $< 5 \mu\text{m}$ in diameter were clearly visualized within pilosebaceous structures of full-thickness hairless rat skin and human skin after 35 minutes of passive permeation, while they did not observe penetration via the stratum corneum. As expected, in the present study, the amount of triclosan retained in the skin when nanospheres were employed was 8.5 times that retained when the solution was used. According to our results and those of the previously referred studies, this behavior can be explained by the fact that the drug remains encapsulated within the nanospheres, which act as reservoir systems that distribute themselves throughout the stratum corneum and pilosebaceous structures. The drug is released when the dissolution medium penetrates the nanosphere, after which it diffuses into the skin due to the high permeability of Eudragit RL®100 (a result of the presence of quaternary ammonium groups in its structure) (Haznedar, Dortunc, 2004). This suggests that the copolymer swells when it comes into contact with the skin's fluids.

De Jalon et al. (2001) and Santoyo et al. (2002) showed that antiviral agent-loaded microparticles of poly(DL-lactic-co-glycolic acid) increase drug retention in the epidermis and undermine its penetration of the skin. Nevertheless, they found that the increase of drug concentration in the epidermis was not significant.

Shim et al. (2004) reported that polymeric nanoparticles were absorbed by follicular penetration of skin appendages such as hair follicles and sweat ducts, as they were too large to permeate the stratum corneum directly (Barry, 2002). In this sense, it can be assumed that the penetration of cationic nanospheres occurs via these skin appendages (follicular pathway). This finding may be useful with respect to the treatment of pathologies associated with pilosebaceous structures, such as acne.

In addition, both lipidic (Jenning et al., 2002; Liu et al., 2007; Fang et al., 2008; Sheihet et al., 2008) and polymeric (Rolland et al., 1993; De Jalón et al., 2001; Santoyo et al., 2002; Alvarez-Román et al., 2004a; Shim et al., 2004; Sheihet et al., 2008) nanoparticles are characterized by the peculiarity of reducing permeation (transdermal delivery) through the skin while enhancing penetration (dermal delivery) of the skin layers by forming a reservoir, which prolongs the residence time of the drug within the skin. However, skin penetration of polymeric nanoparticles has been the focus of less research than that of liposomes and solid lipid nanoparticles. Moreover, some authors have reported the effect of negatively-charged nanoparticles (either lipidic or polymeric) as drug carriers for dermal delivery, despite the fact that the surface of the skin contains negatively-charged residues of proteins. It would be expected that a delivery system with a highly negative charge would be strongly repelled by the skin, thereby resulting in poor permeation. In the present study,

it is noteworthy that the use of cationic polymeric nanospheres significantly increased drug retention in the upper layer of the skin and decreased drug permeation through the skin.

The amount of triclosan retained in the skin using cationic nanospheres and passive diffusion was 77.49 ppm. Interestingly, the minimum inhibitory concentration (MIC) of triclosan against *Propionibacterium acnes* is 7.8 ppm (Lee et al., 2003). Given that triclosan is a non-toxic drug and is biocompatible with the skin, the results obtained here with triclosan-loaded cationic nanospheres, which increased drug retention in the skin, may be important in improving topical therapy.

On the other hand, it is remarkable to note that a reduction of the lag time (t_{lag}) was achieved with nanospheres, as shown in Fig. 2. This behavior may be due to the transport of triclosan in solution by passive diffusion, which would have facilitated transport along the concentration gradient. Nevertheless, cationic nanospheres, due to the high degree of attraction between nanospheres (positively charged) and the skin (negatively charged) were deposited in the stratum corneum, thereby decreasing the concentration gradient and simultaneously decreasing the t_{lag} .

Iontophoretic delivery

To our knowledge, there are no reports of the combined use of cationic polymeric nanospheres and iontophoresis for (trans-) dermal delivery. In this work, we studied the transport of triclosan itself and triclosan-loaded cationic nanospheres through the skin using iontophoresis. The cumulative amount of triclosan as a function of time in the receptor solution is plotted in Fig. 3. Steady state flux (J_s), permeation coefficient (K_p), cumulative amount after 32 h of experiment and amount of triclosan retained in the skin are shown in Table 1. The first iontophoretic experiments were carried out using a solution of triclosan in the donor compartment (2.5 mg/ml). As shown, the flux was 26 times higher with respect to passive diffusion due to the application of an electric current. In this case, the transport mechanism of the drug was exclusively electroosmosis, which is the convective solvent flow in the anode to cathode direction as a result of the skin's net negative charge. For the studies using a suspension of triclosan-loaded cationic nanospheres, three concentration levels of triclosan were evaluated: 1.5, 2.5 and 4.0 mg/ml. According to the statistical analysis of fluxes, there was not a significant difference (*analysis of variance, ANOVA*) between these varying concentrations of triclosan. When a substance is positively charged, and has low molecular weight, the main mechanism of transport during iontophoresis is electrorepulsion, by which the positively-charged particles are repelled from an electrode with the same charge (anode: Ag). Electrical mobility decreases with molecular weight, and, as a consequence, the electroosmotic contribution becomes increasingly important for larger molecules (Guy et al., 2000). Consequently, the transport mechanism of the

nanoparticles may be both electrorepulsion, and electroosmosis due to the size of the particles.

On the other hand, the statistical analysis of the amounts of drug retained within the skin using different concentrations of cationic nanosphere suspensions did not reveal significant differences (*analysis of variance, ANOVA*). Simply increasing the amount of drug in the formulation may not increase the number of molecules in the membrane (Kalia et al., 2004). The amount of triclosan retained within the skin by iontophoresis was 4 times greater using 2.5 mg/ml as the initial concentration in the donor compartment of cationic nanospheres than when triclosan was in solution. This was probably a result of the application of an electric current, which would have improved the penetration of the skin by cationic nanospheres. Nevertheless, the drug remained encapsulated within the nanospheres, thereby creating a reservoir within the skin. Furthermore, in this case, a strong attraction between cationic nanospheres and the skin was probable, thus favoring the retention of nanospheres with the skin. On the contrary, the application of an electric current to the solution significantly improved the transdermal transport of the drug through the skin.

The results of the present study show that iontophoresis increases the transdermal flux of triclosan with respect to passive diffusion when administered either as a solution (26-fold) or within nanoparticles (4.5-fold). Nevertheless, the increment in the amount of drug retained in the skin was higher when the nanospheres diffused freely (8.5 times more than triclosan in solution) than when iontophoresis was applied (3.1 times more than free drug). The application of iontophoresis to the nanospheres did not produce an increase in the amount of drug retained in skin.

The results of the present study suggest that cationic nanospheres may be useful in the treatment of skin diseases such as acne.

5. Conclusions

This work confirms the potential of cationic polymeric nanospheres as carriers for prolonged and targeted topical delivery of drugs. The results demonstrate that the accumulation of triclosan within the human skin was greater when triclosan-loaded nanospheres were employed (8.5 times) than when a solution was administered by passive diffusion. We believe that topical application of cationic triclosan-loaded nanospheres may act in an effective manner against acne. The application of iontophoresis to nanospheres does not appear to provide advantages in terms of increasing the amount of drug retained in the skin.

Dermal drug delivery by means of cationic nanospheres represents a promising therapeutic approach for enhancing the retention of a wide variety of drugs used to treat pathologies associated with pilosebaceous structures.

Acknowledgements

This work was supported by “Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología” (185682, México) and Generalitat Valenciana (GV/2008/237, Spain). The authors would like to thank Mr. Rodolfo Robles for his technical assistance with the scanning electron microscope.

References

^aAlvarez-Román R., G. Barré, Guy R.H., Fessi H., 2001. Biodegradable polymer nanocapsules containing a sunscreen agent: preparation and photoprotection. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 52, 191-195.

^bAlvarez-Román R., Naik A., Kalia Y., Fessi H., Guy R., 2004. Skin penetration and distribution of polymeric nanoparticles, *J. Control. Rel.* 99, 53-62.

^cAlvarez-Román R., Naik A., Kalia Y., Fessi H., Guy R., 2004. Visualization of skin penetration using confocal laser scanning microscopy, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 58, 301-316.

Barry B., 2001. Novel mechanisms and devices to enable successful transdermal drug delivery, *Eur. J. Pharm. Sci.* 14, 101-114.

Barry B, 2002. Drug Delivery Routes in skin: a novel approach, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 54:1, S31-S40.

Bhargava H, Leonar P., 1996. Triclosan: Applications and safety, *AJIC Am., J. Infect. Control.* 24, 209-218.

Burnette R., Ongpipattanakul B. 1987. Characterization of the permselective properties of excised human skin during iontophoresis. *J Pharm. Sci.* 76, 765-773.

Carafa M., Santucci E., Lucania G. 2002. Lidocaine-loaded non-ionic surfactant vesicles: characterization and in vitro permeation studies. *Int. J. Pharm.* 231, 21-32.

De Jalón E., Blanco-Prieto M., Ygartua P., Santoyo, S., 2001. Topical application of acyclovir-loaded microparticles: quantification of the drug in porcine skin layers, *J. Control. Rel.* 75, 191-197

Domínguez-Delgado C. 2006. 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. Tesis de Licenciatura, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Universidad Nacional Autónoma de México, México.

Fang J., Fang C., Liu C., Su Y.H., 2008. Lipid nanoparticles as vehicles for topical psoralen delivery: Solid lipid nanoparticles (SLN) versus nanostructured lipid carriers (NLC), *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 70, 633-640.

Femenía-Font A., Balaguer-Fernández C., Merino V., López-Castellano A., 2006. Combination strategies for enhancing transdermal absorption of sumatriptan through skin, *Int. J. Pharm.* 323, 125-130.

Guy R., Kalia Y., Delgado-Charro M., Merino V., López A., Marro D., 2000. Iontophoresis: electrorepulsion and electrosomosis, *J. Control. Rel.* 64: 129-132.

Haznedar S., Dortunc B., 2004. Preparation and *in vitro* evaluation of Eudragit microspheres containing acetazolamide, *Int. J. Pharm.* 269, 131-140.

Honeywell-Nguyen P., Bouwstra J., 2005. Vesicles as a tool for transdermal and dermal delivery. *Drug disc. Today: Technologies.* 2, 67-74.

Jenning V., Gysler A., Schäfer-Korting M., Gohla S., 2000. Vitamin A loaded solid lipid nanoparticles for topical use: occlusive properties and drug targeting to the upper skin, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 49, 211-218.

Kalia Y., Naik A., Garrison J., Guy R.H., 2004. Iontophoretic drug delivery, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 56, 619-658.

Lee T., Kim J., Hwang S., 2003. Hydrogel patches containing Triclosan for acne treatment, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 56, 407-412.

Leroux J., Alléman E., Doelker E., 1995. New approach for the preparation of nanoparticles by an emulsion-diffusion method, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 41:1, 14-18.

Liu J., Hu W., Chen H., Ni Q., Xu H., Yang X., 2007. Isotretinoin-loaded solid lipid nanoparticles with skin targeting for topical delivery, *Int. J. Pharm.* 328, 191-195.

Marples R., 1974. The microflora of the face and acne lesions, *J. Invest. Dermatol.*; 3, 326-331.

Park J., Lee J., Jung E., Park Y., Kim K., Park B., Jung K., Park E., Kim J., Park D., 2004. In vitro antibacterial and anti-inflammatory effects of honokiol and magnolol against *Propionibacterium sp.* Eur. J. Pharmacol. 496, 189-195.

Puglia C., Blasi P., Rizza L., Schoubben A., Bonina F., Rossi C., Ricci M., 2008. Lipid nanoparticles for prolonged topical delivery: An *in vitro* and *in vivo* investigation, Int. J. Pharm. 358, 295-304.

Riddick T., 1968. Control of Colloid through Zeta Potential. Zeta-meter Inc via Livingston Publishing Company, Wynnewod.

Rolland A., Wagner N., Chatelus A., Shroot B., Schaefer H., 1993. Site-Specific Drug Delivery to Pilosebaceous Structures Using Polymeric Microspheres, Pharm. Res. 10:12, 1738-1744.

Santoyo S., De Jalón E., Ygartua P., Renedo M. J., Blanco-Príeto M. J., 2002. Optimization of topical cidofovir penetration using microparticles, 242: 1-2, 107-113

Schaefer H., Watts F., Brod J., Illel B., 1990. Follicular penetration. In R.C. Scott, R.H. Guy, and J. Hadgraft (eds.), Prediction of Percutaneous Penetration, Methods, Measurements, Modelling, IBC Technical Services, London. 163-173.

Schuetz Y., Naik A., Guy R., Vuaridel E., Kalia Y.N., 2005. Transdermal iontophoretic delivery of vapreotide acetate across porcine skin *in vitro*, Pharm, Res. 22, 1305-1312.

Sheihet L., Chandra P., Batheja P., Devore D., Kohn J., Michniak B., 2008. Tyrosine-derived nanospheres for enhanced topical skin penetration, Int. J. Pharm. 350, 312-319.
Shim J., Kang H., Park W., Han S., Kim J., Chang I., 2004. Transdermal delivery of minoxidil with block copolymer nanoparticles, J. Control. Rel. 97, 477-484.

Turner N., Guy R., 1998. Visualization and quantitation of iontophoretic pathways using confocal microscopy, J. Investig. Dermatolog. Sym. Proc. 3, 136-142.

Zobel H., Stieneker F., Atmaka-Abdel S., Gilbert M., Werner D., Noe C.R., Kreuter J., Zimmer A., 1999. Evaluation of aminoalkylmetacrylate nanoparticles as colloidal drug carrier systems. Part II: characterization of antisense oligonucleotides loaded copolymer nanoparticles, Eur. J. Pharm. Biopharm. 48, 1-12.

Table 1. Data of passive diffusion and iontophoretic permeation of triclosan administered in solution and in nanospheres.

System	J_s ($\mu\text{g}/\text{cm}^2 \text{ h}$)	Total amount permeated ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	K_p ($\text{cm}/\text{hx}10^{-3}$)	Amount retained in the skin ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)
<i>Passive diffusion</i>				
Triclosan solution (2.5 mg/ml)	1.1 ± 0.07	31 ± 2.6	0.33	312 ± 91
Triclosan-nanospheres (2.5 mg/ml)	0.6 ± 0.08	19 ± 2.3	0.24	2676 ± 312
<i>Iontophoretic diffusion</i>				
Triclosan solution (2.5 mg/ml)	28.6 ± 2.1	767 ± 56.3	11.4	232 ± 111
Triclosan-nanospheres (1.5 mg/ml)	2.4 ± 0.12	76 ± 5.1	1.6	974 ± 374
Triclosan-nanospheres (2.5 mg/ml)	2.7 ± 0.17	83 ± 9.1	1.0	989 ± 15.3
Triclosan-nanospheres (4.0 mg/ml)	3.1 ± 0.7	100 ± 28	0.8	1010 ± 172

Fig. 1 Scanning electron micrograph of triclosan-nanospheres (bar = 10 μm).

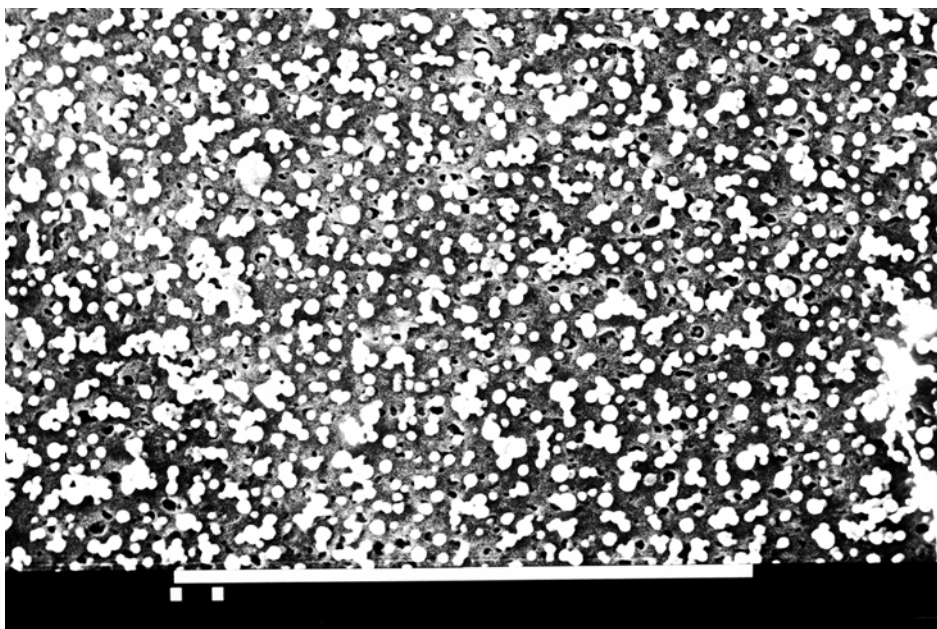


Fig. 2 Cumulative amount of triclosan permeated across the human skin by passive diffusion. Triclosan in solution (filled diamonds), positively charged triclosan-nanospheres (filled triangles).

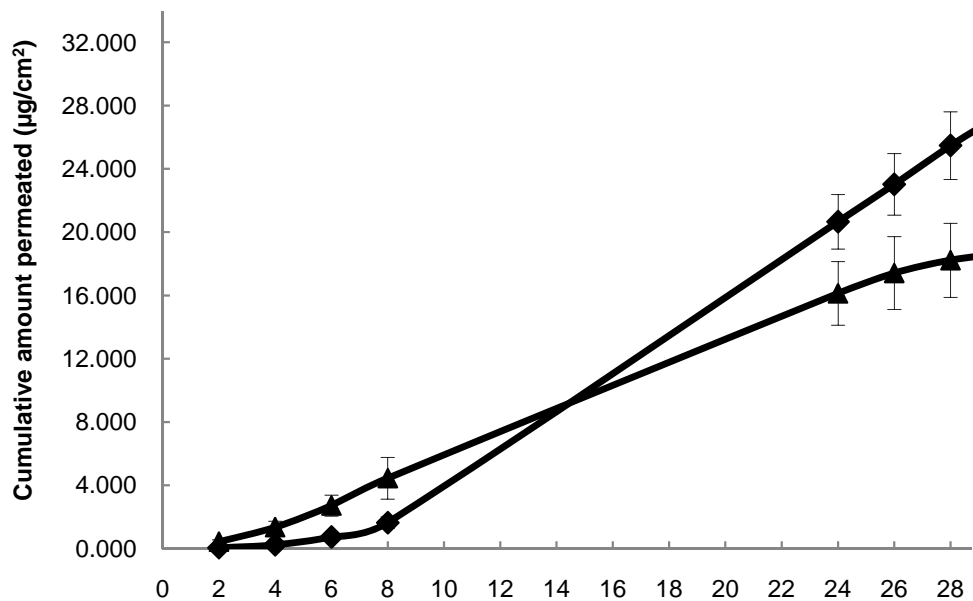
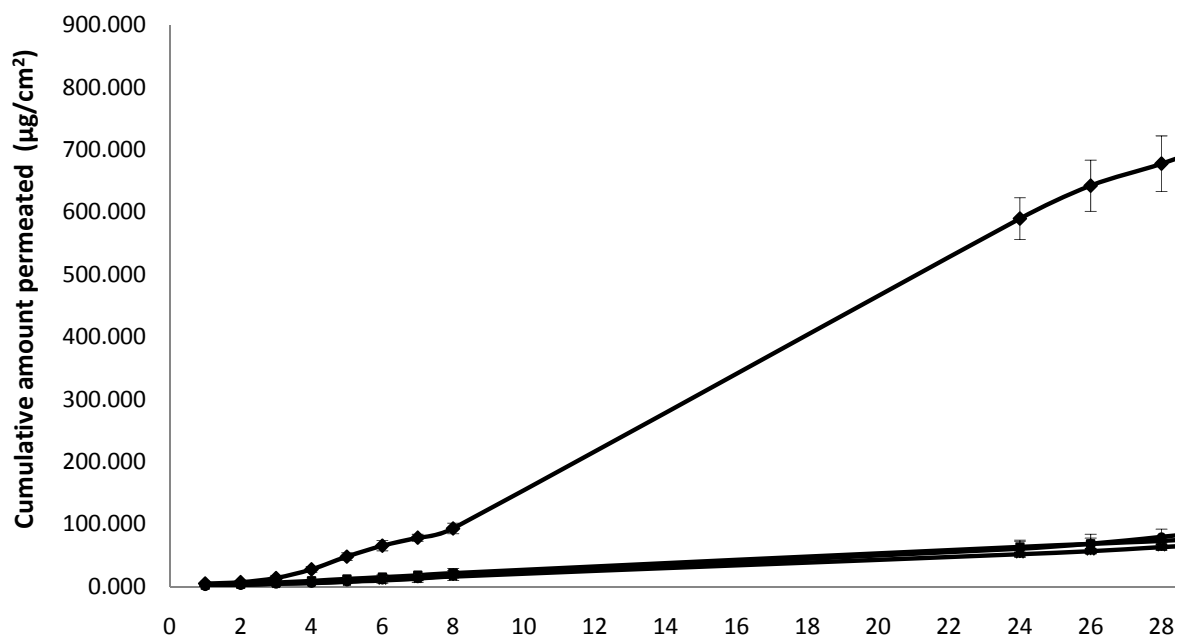


Fig. 3 Cumulative amount of triclosan permeated as a function of time during the 8 h of iontophoresis at 0.5 mA/cm² followed by passive diffusion. Triclosan in solution (filled diamonds), triclosan-nanospheres: 1.5 mg/ml (filled triangles), 2.5 mg/ml (filled circles), 4.0 mg/ml (*), (Mean ± SD) (*n* = 4).





Contents lists available at ScienceDirect

International Journal of Pharmaceutics

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ijpharm



Nanoparticle infiltration to prepare solvent-free controlled drug delivery systems

Isabel M. Rodríguez-Cruz*, Clara L. Domínguez-Delgado, Jose J. Escobar-Chávez, Gerardo Leyva-Gómez, Adriana Ganem-Quintanar, David Quintanar-Guerrero

Laboratorio de Posgrado en Tecnología Farmacéutica, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Universidad Nacional Autónoma de México. Av. 1° de Mayo s/n, Campo 1, Cuautitlán Izcalli, Estado de México, C.P. 54743, Mexico

ARTICLE INFO

Article history:

Received 30 September 2008
Received in revised form 12 December 2008
Accepted 17 December 2008
Available online xxx

Keywords:

Infiltration
Nanoparticles
Biodegradable porous membranes
Emulsification–diffusion technique
Drug delivery system

ABSTRACT

The purpose of this work was to propose a drug delivery system based on a biodegradable porous membrane, whose surface is covered by a nanoparticle film, thus achieving a controlled drug release rate. Furthermore, due to the fact that the assembly of the system is performed in aqueous medium, contact with organic solvents is avoided. The method is performed in two steps: (i) preparation of biodegradable porous membranes (by a solvent casting and particulate leaching technique) and biodegradable nanoparticles (by the emulsification–diffusion method), extensively eliminating the solvent in both of them; (ii) infiltration into membranes of an aqueous solution of a model drug (carbamazepine) and a nanoparticle dispersion. In both cases, poly(DL-lactic-co-glycolic acid) (PLGA 50:50) was used as a biodegradable polymer. Carbamazepine adsorbed onto biodegradable porous membranes shows an immediate release behavior (95% released in <15 min). Infiltration of different amounts of nanoparticles (50, 100, 400 and 600 mg of nanoparticles/0.625 g of membrane) into biodegradable porous membranes shows a Fickian diffusion according to Peppas model, and fits Higuchi's model. This behavior was attributed to the diffusional barrier constituted by the nanoparticle film. As expected, the carbamazepine release rate was dependent on the amount of infiltrated/adsorbed nanoparticles into biodegradable porous membrane. DSC studies show molecular dispersion of the drug throughout the membrane.

© 2008 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Sensitive drugs face different problems during their formulation processes due to contact with organic solvents, particularly if biodegradable polymers (e.g., poly(lactic acid), poly(glycolic acid), poly(lactide-co-glycolide acid), poly-ε-caprolactone, etc.) are involved. As it is known, organic solvents are very often used in the manufacturing of pharmaceutical products. However, an important drawback of organic solvents is their effect on the physicochemical properties of the drug, as well as the potential risk to human health owing to their toxicity and undesirable effects (Witschi and Doelker, 1997). In general, sensitive drugs need to be protected during formulation against chemical attack, and require gentle manufacturing processes (Cui et al., 2005).

Biodegradable porous scaffolds have been extensively used in medicine as temporary templates for tissues regeneration, and have recently been subject of study for the pharmaceutical industry

because they have been shown to be excellent drug devices due to the high porosity and interconnectivity throughout the system (Sato et al., 1988; Mikos et al., 1993, 1994; Kim et al., 2006). However, their behavior is characterized by a high initial burst effect and an incomplete release (Kim et al., 2006).

Nanotechnology is currently undergoing advancements in different areas, such as biomedical applications, molecular imaging, biomarkers, biosensors, and drug delivery. Nanoparticles have been studied for the pharmaceutical industry due to their effective drug delivery and carrier properties; hence they are considered as one of the most promising dosage forms for controlled release and drug targeting (Lane and Heath, 2004).

The aim of the present study is to propose a new controlled drug delivery system combining the properties of biodegradable porous membranes and biodegradable nanoparticles. The preparation process of these systems consists of: (a) production of biodegradable porous membranes, (b) preparation of biodegradable nanoparticles; and once these systems are available, (c) incorporation of an aqueous solution of a model drug (carbamazepine) and a nanoparticle dispersion, into biodegradable porous membranes, in order to form a nanoparticle film on the surface of the membrane, thus retaining the drug and controlling

* Corresponding author. Current address: Avenida 16 de Septiembre s/n, Tequixquiac, Estado de México. C.P. 55650, Mexico. Tel.: +52 591 91 20015.
E-mail address: isabelmarlen@yahoo.com.mx (I.M. Rodríguez-Cruz).

its release rate. It is hypothesized that the drug release rate will be dependent on the amount of nanoparticles infiltrated into the system.

In this study, the drug is not exposed to any stress process (i.e. heat, stirring, etc.), and contact with the solvent is avoided since the systems (biodegradable nanoparticles and biodegradable porous membranes) are prepared by independent methods, in which the model drug was not yet included, and solvents are extensively eliminated. System assembly is then performed in an aqueous medium.

Nanoparticles were prepared according to the well-known emulsification-diffusion technique (Quintanar-Guerrero et al., 1996), while biodegradable porous membranes were prepared by solvent casting and particulate leaching technique (Mikos et al., 1994). In both systems poly(DL-lactic-co-glycolic acid) (PLGA 50:50) was used as a biodegradable polymer.

Carbamazepine (chosen as a model drug) is a polymorphic drug used in the treatment of epilepsy, characterized by a slow and irregular gastrointestinal absorption (Bertilsson, 1978). Carbamazepine polymorphs can be interconverted by phase transformations or by a solvent-mediated process; phase transformations can also be induced by heat or by mechanical stress (Byrn, 1982).

2. Materials and methods

2.1. Materials

Poly(D,L-lactide-co-glycolide) (PLGA 50:50, Medisorb[®], MW 31 kDa), was obtained from Lakeshore Biomaterials, USA. Poly(vinyl alcohol) (PVAL, MW 58 kDa) was purchased from Glomarza, Mexico. Carbamazepine was supplied by Sigma–Aldrich, China. Granular sodium chloride and methylene chloride were provided by J.T. Baker, Mexico. Distilled water was obtained from a RiOs Millipore[®] distiller, USA. Ground particles of sodium chloride were sieved with USA Standard Testing Sieves (ASTM-E11 Specification, W.S. Tyler), with 53 μm (No. 270), 106 μm (No. 140) and 150 μm (No. 100) openings, placed on a sieve shaker (Octagon model 200, England).

2.2. Preparation of biodegradable porous membranes

Biodegradable porous membranes were prepared by a solvent casting and particulate leaching technique (Mikos et al., 1994). Briefly, 0.625 g of polymer (PLGA 50:50) were dissolved in methylene chloride, and 0.625 g of sodium chloride particles (size $\sim 63 \mu\text{m}$) were scattered into this organic solution. Sodium chloride was used with the purpose of creating pores within the system. The solution was casted in Teflon moulds with a diameter of 3.0 cm. The solvent was allowed to evaporate from the moulds at room temperature for 48 h. Residual amounts of solvent were removed by vacuum. Once dried, the membranes were immersed in 250 ml of distilled water during 72 h at room temperature, at 100 rpm (water was changed every 6 h) to leach out the sodium chloride. Sodium chloride-free membranes were dried at room temperature in a desiccator (RH = 56%).

2.3. Nanoparticle preparation

Nanoparticles were prepared using the emulsification–diffusion technique (Quintanar-Guerrero et al., 1996). Briefly, the organic solvent (ethyl acetate) and water were mutually saturated for at least 20 min before use, in order to ensure initial thermodynamic equilibrium of both liquids. 400 mg of PLGA 50:50 were dissolved in 20 ml of water-saturated organic solvent, and this organic solution was emulsified with 40 ml of an organic solvent-saturated aqueous solution of PVAL (5%, w/v) using a stirrer (Heidolph RZR-1) at 2200 rpm for 10 min. 160 ml of distilled water were subsequently added to the emulsion to induce diffusion of the organic solvent

into the continuous phase, leading to the formation of nanoparticles. The organic solvent was eliminated from the raw nanoparticle suspension by vacuum steam distillation at 35 °C. The nanoparticle suspension was centrifuged (Optima[®] LE-80K, Beckman, USA) at 20,000 rpm for 20 min. Nanoparticles were finally frozen at –40 °C for 20 min and freeze-dried for 24 h at 60×10^{-3} mbar (Labconco[®], USA).

2.4. Scanning electron microscopy (SEM) studies

Cross-sections of biodegradable porous membranes dried samples were coated with a thick gold layer ($\sim 20 \text{ nm}$) (Fine Coat Ion Sputter JFC-1100, JEOL, Japan) and observed by SEM using a JSM-25 S II scanning electron microscope (JEOL, Japan) before and after nanoparticle infiltration.

In the same way, the surface morphology of nanoparticles was also observed. To do this, an aqueous nanoparticle dispersion (0.2 mg/ml) was spread over a slab and dried under vacuum at room temperature.

2.5. Particle size analysis

The average size and the polydispersity index of nanoparticles were determined by the laser light scattering technique (Coulter N4 Plus, FL, USA). The laser light wavelength was 678 nm (He/Ne 10 mW). Measurements were obtained at a 90 °C fixed-angle for 180 s, at a temperature of 25 °C. The scattering intensity data were analyzed by a digital correlator under an unimodal analysis mode. Dispersions were diluted with water to ensure that the light scattering signal, as indicated by the particle counts per second, was within the instrument's sensitivity range. Measurements were made in triplicate for all batches prepared.

2.6. Specific surface area characterization

The specific surface area was calculated in terms of the standard Brunauer–Emmett–Teller (BET) method with an Autosorb 1MP analyzer (Quantachrome Instruments), equipped with a 1 mTorr pressure transducer. The sample was vacuum degassed at 22 °C for 8 h following a standard protocol for the Autosorb-1 series. Adsorption isotherms were constructed with a nitrogen adsorbate. The temperature transpiration effect was accounted for automatically by the instrument.

2.7. Drug loading and infiltration of nanoparticles into biodegradable porous membranes

Biodegradable porous membranes were dipped into 10 ml of a saturated aqueous solution of carbamazepine ($\sim 180 \mu\text{g/ml}$) for 12 h, so that the drug was adsorbed into the system. This system is the control (without nanoparticles, system 1). Biodegradable porous membranes were vacuum-dried at room temperature.

The systems with nanoparticles were prepared by dipping biodegradable porous membranes into 10 ml of a saturated aqueous solution of carbamazepine containing different amounts of lyophilized PLGA-nanoparticles: 50, 100, 400 or 600 mg (designated as system 2, 3, 4 and 5, respectively) for 12 h. They were vacuum-dried at room temperature.

2.8. Differential scanning calorimetry (DSC) studies

DSC analyses were carried out on samples of individual substances such as carbamazepine and PLGA 50:50, as well as on biodegradable porous membranes with and without nanoparticle infiltration. The dried samples were weighed directly in aluminum pans (4–6 mg) and scanned between 25 and 230 °C at a 10 °C heating

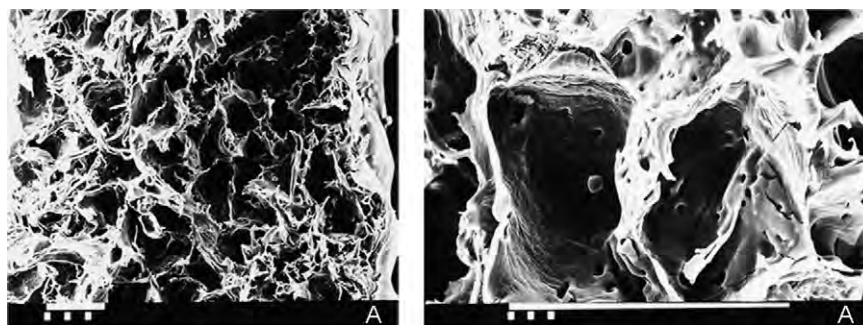


Fig. 1. Scanning electron micrographs of biodegradable porous membrane cross-sections before film formation with nanoparticles; (A) system 1 (bar = 100 μm).

rate under nitrogen, using a DSC Q10 differential scanning calorimeter (TA Instruments, USA).

2.9. *In vitro* release kinetics

Carbamazepine's release profiles from biodegradable porous membranes were performed in 10 ml of simulated intestinal fluid, according to the US Pharmacopeia XXIV, ($n = 3$). Sink conditions (carbamazepine concentration $<60 \mu\text{g/ml}$) were maintained throughout the study. The systems were shaken at 25 rpm, at 37°C with a water bath shaker (GyromaxTM, model 939, USA). At selected time intervals, 2 ml of medium were withdrawn and replaced with fresh medium. Sample absorbance was measured spectrophotometrically at 285 nm and interpolated in a calibration curve (ranging from 5 to 40 $\mu\text{g/ml}$, $r^2 = 0.9993$). The amount of drug released at each time point was corrected for the dilution effect. Release experiments were carried out in triplicate.

3. Results and discussion

Scanning electron microscopy (SEM) showed that biodegradable porous membranes had a high porosity with an average diameter of the exposed pore of $\sim 44.5 \pm 3.0 \mu\text{m}$ (Fig. 1). A large surface area with an interconnected porous structure throughout the matrix was observed in cross-sectional cuts. B.E.T. studies for biodegradable porous membranes showed a specific surface area of $10.07 \pm 0.21 \text{ m}^2/\text{g}$ and a total pore volume of $0.03 \text{ cm}^3/\text{g}$.

Regarding nanoparticle preparation, the emulsification–diffusion technique allowed the obtention of spherical submicronic polymeric particles up to 300 nm in size for all batches prepared, with a polydispersity index lower than 0.03. A representative micrograph of the nanoparticles is shown in Fig. 2. The process efficiency was higher than 99.0%. The drug and nanoparticles were infiltrated into biodegradable porous membranes in

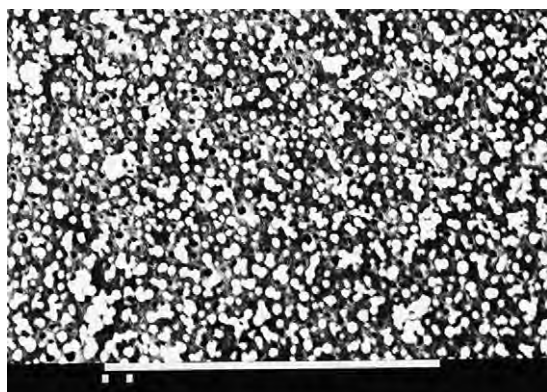


Fig. 2. Scanning electron micrograph of PLGA-nanoparticles (bar = 10 μm).

order to form a film on the membrane surface. Nanoparticles can adsorb the drug and they can form films on the surface of biodegradable porous membranes due to an effective attraction between the nanoparticle surface and the membrane surface, since both of them have the same chemical nature (Israelachvili, 1995). This film can act as an additional diffusional barrier, thereby obtaining a controlled drug delivery system.

The infiltration effect of different nanoparticle concentrations within biodegradable porous membranes is evidenced in Fig. 3. As shown, a thin nanoparticle coating covers the biodegradable porous membrane surface. As expected, film continuity was dependent on the amount of infiltrated nanoparticles. In this sense, system 2, with the smallest amount of infiltrated nanoparticles, did not show a continuous film on the biodegradable porous membrane surface (Fig. 3B). The systems showed a continuous film as the amount of infiltrated nanoparticles increased (Fig. 3C–E). Higher concentrations of infiltrated nanoparticles may build up an interface promoting the formation of a continuous film adsorbed on a solid surface, a process similar to that observed for the film coating technology.

The release profiles of carbamazepine with and without nanoparticles are shown in Fig. 4. System 1 (without nanoparticles) showed an immediate release behavior (90% released in $<15 \text{ min}$). This burst effect is attributed to the drug adsorbed on the surface of the system's pores, as well as to the high porosity with interconnected channels that were present in the system. The drug had a high contact with the dissolution medium, allowing a rapid desorption. It is expected that the drug substance near the surface will diffuse out of the system quickly, causing burst release (Sato et al., 1988; Mao et al., 2008). Obviously, porosity has an important effect on drug release characteristics, and it is related with this rapid release (Mao et al., 2008; Chung et al., 2001).

However, when carbamazepine was loaded in biodegradable porous membranes in the presence of nanoparticles (systems 2–5), a controlled release behavior was obtained. As the amount of nanoparticles infiltrated in the systems was increased, the release rates were significantly slower than that for system 1. As expected, the release rate of carbamazepine was dependent on the amount of nanoparticles infiltrated into the system. This behavior can be explained by the fact that the drug remains occluded by nanoparticle deposition, which forms a film on the biodegradable porous membrane surface (Table 1). Therefore, this film acts as an additional diffusion barrier for the drug on the surface of the membrane entrapping the drug (Fig. 3B–E). Thus, if the amount of nanoparticles infiltrated is higher, the diffusion barrier will be thicker and the release rate of the drug will be slower.

Drug loading within biodegradable porous membranes was calculated for each system (Table 1). As the amount of nanoparticles infiltrated was increased, the amount of nanoparticles adsorbed into the system increased, and, consequently, the amount of drug adsorbed in biodegradable porous membranes was also increased.

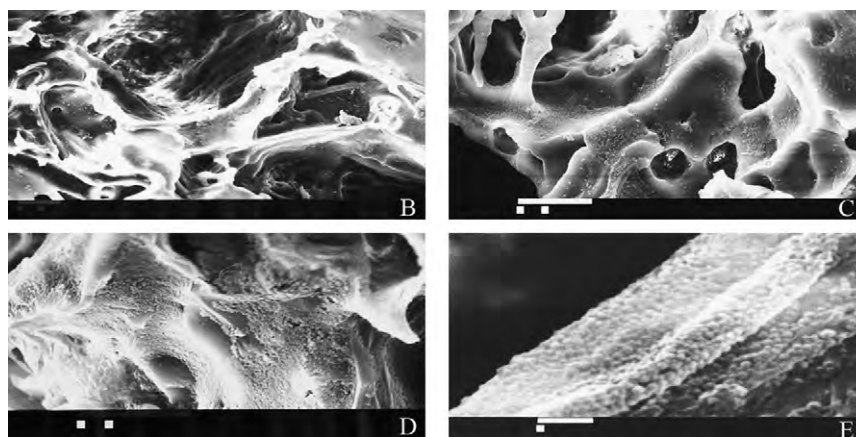


Fig. 3. Scanning electron micrographs of biodegradable porous membranes with film formation with different concentrations of PLGA-nanoparticles; (B) system 2, (C) system 3, (D) system 4 and (E) system 5; (bar: ■ 1 μm, ■■ 10 μm, ■■■ 100 μm).

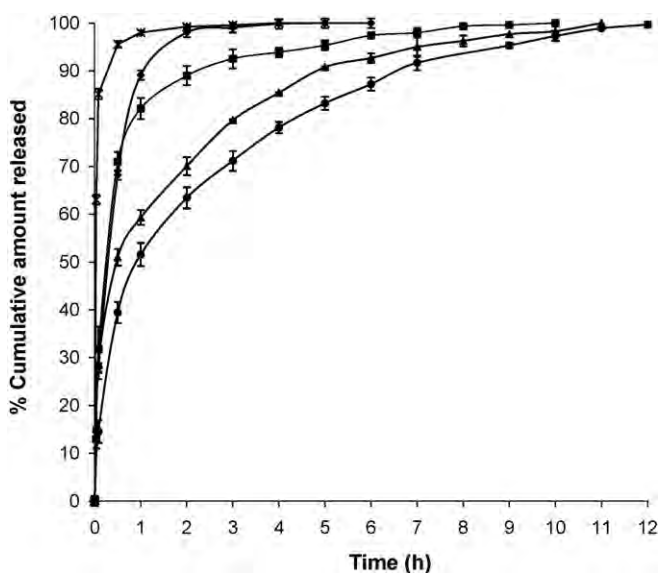


Fig. 4. Release profiles of carbamazepine from biodegradable porous membranes without and with film formation with different concentrations of infiltrated nanoparticles; system 1 (*), system 2 (◆), system 3 (■), system 4 (▲) and system 5 (●).

This effect was attributed to the greater surface area exposed, able to adsorb the drug on both membrane and nanoparticle surface. For this reason, system 5 had a greater amount of carbamazepine adsorbed into the biodegradable porous membrane than systems 1–4.

Systems 2–5 showed a Fickian diffusion according to Peppas model (Table 2), which was dependent on time ($t^{0.5}$) and fitted Higuchi's model (Table 3, Fig. 5). Therefore, carbamazepine release occurred by diffusion throughout the matrix. If drug release is faster than matrix erosion, as seen in this work, the mechanism of drug release occurs mainly by diffusion (Niwa et al., 1993; Soppimath et al., 2001).

Table 1
Carbamazepine load within biodegradable porous membranes for each system.

System number	Carbamazepine adsorbed (μg)
1	139
2	172
3	292
4	493
5	625

Table 2
Release rate constants according to the Higuchi's model from biodegradable porous membranes with infiltrated nanoparticles.

System number	K_H (μg/min) ^{1/2}	Correlation coefficient
2	0.09	0.996
3	62.91	0.965
4	3.18	0.974
5	1.27	0.968

Table 3
Diffusion exponents (n) according to Peppas model from biodegradable porous membranes with infiltrated nanoparticles.

System number	n	Correlation coefficient
2	0.59	0.998
3	0.59	0.950
4	0.52	0.998
5	0.44	0.987

DSC thermograms of carbamazepine, PLGA 50:50, biodegradable porous membranes without and with nanoparticle infiltration were carried out in order to determine the physical state of both carbamazepine and the polymer, to detect any drug–polymer interactions and to determine if carbamazepine was either totally dispersed or was present in its crystalline form. Fig. 6 shows the DSC thermograms of carbamazepine, PLGA 50:50, and biodegradable porous membranes with and without film formation. Pure

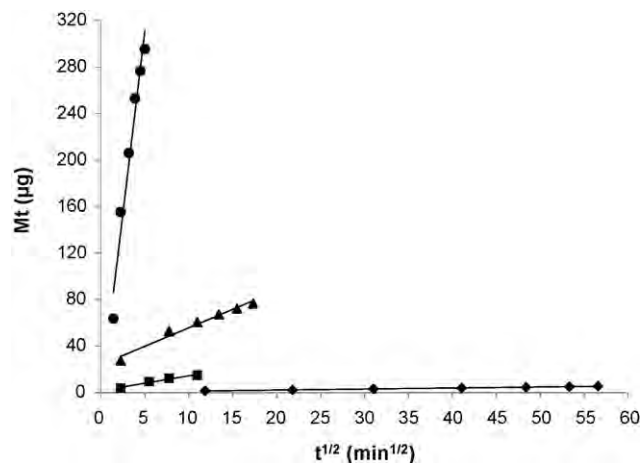


Fig. 5. Higuchi's model for carbamazepine released from biodegradable porous membranes with different concentrations of infiltrated nanoparticles; system 2 (◆), system 3 (■), system 4 (▲) and system 5 (●).

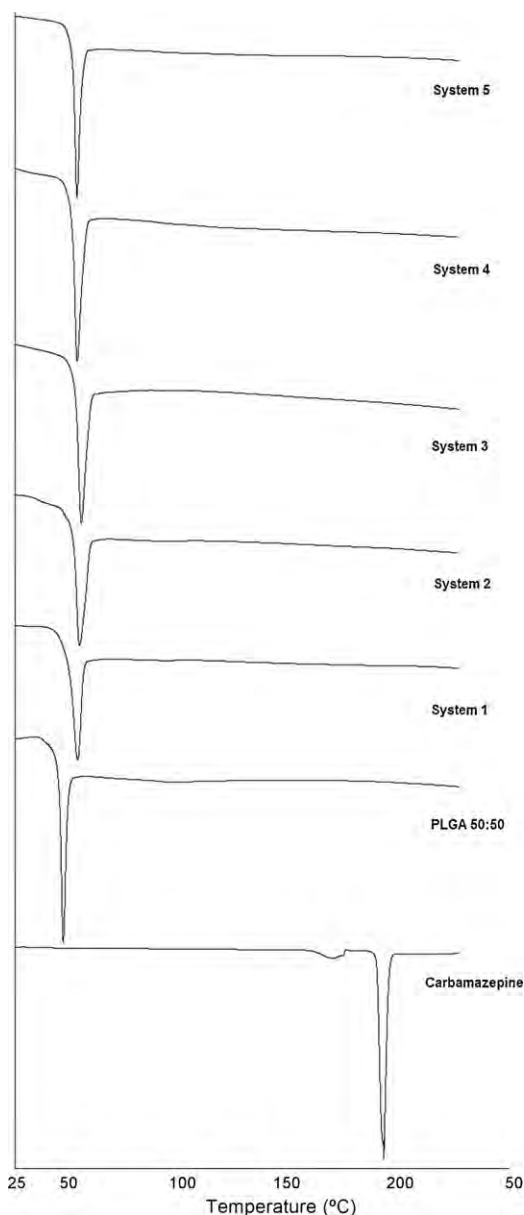


Fig. 6. DSC thermograms of free-carbamazepine, PLGA 50:50 and systems 1–5.

carbamazepine exhibited a small endothermic peak at 170 °C, which is characteristic of the transition of the β form to the α form (Katzhendler et al., 1998), as well as an endothermic peak of the melting point at 192 °C. The theoretical peak of carbamazepine ranges from 189 to 193 °C (Moffat, 2005). PLGA showed a glass transition temperature (T_g) at 47 °C (T_g reported 43–48 °C). In the case of systems 1–5, the T_g for PLGA increased to 53, 54, 54, 53 and 53 °C, respectively. Okada et al. (1994) reported that the T_g of a PLGA matrix raised as loading with a basic drug increased. This was due to the electrostatic interaction between carbamazepine (a basic drug) and the terminal carboxylic acids of the polymer. DSC studies did not detect any crystalline drug material in membrane samples. Taking this into consideration, this behavior suggests a molecular dispersion of carbamazepine throughout the membrane.

4. Conclusions

The present study has shown a possible method to obtain controlled drug delivery systems by film formation with nanoparticles

onto biodegradable porous membranes, avoiding drug contact with organic solvents, since drug loading was in aqueous medium using preformed systems as platforms, which is a suitable option to develop drug delivery systems for sensitive drugs. None film formation on biodegradable porous membranes showed an immediate release, nevertheless, film formation allowed a controlled release, dependent on the amount of nanoparticles infiltrated into the systems. This behavior was attributed to drug adsorption on the pores and on the surface of the nanoparticles contained in the system, which remained occluded by the film formed on the biodegradable porous membrane surface, having as a result a film which acts as a diffusion barrier.

The concept proposed in this work could provide a useful approach to solve the problems during the formulation process for sensitive drugs such as peptides, proteins, etc., combining porous and submicronic systems. Actually, we are working with different porous platforms and submicronic systems in order to encapsulate proteins and other sensible molecules.

Acknowledgments

Isabel Marlen Rodríguez-Cruz acknowledges a grant from CONACYT (185682). The authors are grateful to Mr. Rodolfo Robles for his technical assistance with the scanning electron microscope.

References

- Bertilsson, L., 1978. Clinical pharmacokinetics of carbamazepine. *Clin. Pharmacokinet.* 3, 128–143.
- Byrn, S.R., 1982. *Solid-state Chemistry of Drugs*. Academic Press, New York.
- Chung, T.W., Huang, Y.Y., Liu, Y.Z., 2001. Effects of the rate of the solvent evaporation on the characteristics of the drug loaded PLLA and PDLA microspheres. *Int. J. Pharm.* 212, 161–169.
- Cui, F., Cun, D., Tao, A., Yang, M., Shi, K., Zhao, M., Guan, Y., 2005. Preparation and characterization of melittin-loaded poly(D,L-lactic acid) or poly(D,L-lactic-co-glycolic acid) microspheres made by the double emulsion method. *J. Control Release* 107, 310–319.
- Israelachvili, J.N., 1995. *Intermolecular and Surface Forces*, 2nd ed. Academic Press, E.U., 145–151.
- Katzhendler, I., Azoury, R., Friedman, M., 1998. Crystalline properties of carbamazepine in sustained release hydrophilic matrix tablets based on hydroxypropyl methylcellulose. *J. Control Release* 54, 69–85.
- Kim, T., Yoon, J., Lee, D., Park, T., 2006. Gas foamed open porous biodegradable polymeric microspheres. *Biomaterials* 27, 152–159.
- Lane, N., Heath, J.R., 2004. In: Bhushan, B. (Ed.), *Handbook of Nanotechnology*. Springer, Germany.
- Mao, S., Shi, Y., Li, L., Xu, J., Schaper, A., Kissel, T., 2008. Effects of process and formulation parameters on characteristics and internal morphology of poly(D,L-lactide-co-glycolide) microspheres formed by the solvent evaporation method. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 68, 214–223.
- Mikos, A.G., Sarakinos, G., Leite, S.M., Vacanti, J.P., Langer, R., 1993. Laminated three-dimensional biodegradable foams for use in tissue engineering. *Biomaterials* 14, 323–330.
- Mikos, A.G., Thorsen, A., Czerwonka, L., Bao, Y., Langert, R., 1994. Preparation and characterization of poly(L-lactic acid) foams. *Polymer* 35, 1068–1077.
- Moffat, C.A., 2005. *Clarke's Analysis of Drugs and Poisons*, 3a ed. Pharmaceutical Press.
- Niwa, T., Takeuchi, T., Hino, T., Kunou, N., Kawashima, Y., 1993. Preparations of biodegradable nanospheres of water-soluble and insoluble drugs with D,L-lactide/glycolide copolymer by a novel spontaneous emulsification solvent diffusion method, and the drug release behavior. *J. Control Release* 25, 89–98.
- Okada, H., Doken, Y., Ogawa, Y., Toguchi, H., 1994. Preparation of 3-month depot injectable microspheres of leuporelin acetate using biodegradable polymers. *Pharmacol. Res.* 11, 1143–1147.
- Quintanar-Guerrero, D., Fessi, H., Allémann, E., Doelker, E., 1996. Influence of stabilizing agents and preparative variables on the formation of poly(D,L-lactic acid) nanoparticles by an emulsification–diffusion technique. *Int. J. Pharm.* 143, 133–141.
- Sato, T., Kanke, M., Schroeder, H.G., DeLuca, P.P., 1988. Porous biodegradable microspheres for controlled drug delivery. I. Assessment of processing conditions and solvent removal techniques. *Pharm. Res.* 5, 21–30.
- Soppimath, K.S., Aminabhavi, T.M., Kulkarni, A.R., Rudzinski, W.E., 2001. Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. *J. Control Release* 70, 1–20.
- U.S. Pharmacopeia XXIV NF 19, 1999, USA.
- Witschi, C., Doelker, E., 1997. Residual solvents in pharmaceutical products: acceptable limits, influences on physicochemical properties, analytical methods and documented values. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 43, 215–242.