



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLÁN**

**MÉTODOS CONVENCIONALES ACTUALMENTE
EMPLEADOS PARA ESTUDIOS DE PENETRACIÓN
PERCUTÁNEA (REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA)**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO
P R E S E N T A:
MARTÍN AVILA AVALOS**

ASESOR: DR. JOSÉ JUAN ESCOBAR CHÁVEZ



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN
UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES CUAUTITLAN



DEPARTAMENTO DE

DRA. SUEMI RODRIGUEZ ROMO
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLAN
P R E S E N T E

ATN: L. A. ARACELI HERRERA HERNANDEZ
Jefe del Departamento de Exámenes
Profesionales de la FES Cuautitlán

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la Tesis :

Métodos convencionales actualmente empleados para estudios de penetración percutánea (Revisión Bibliográfica).

que presenta el pasante: Martín Avila Avalos

con número de cuenta: 91560724 para obtener el título de :

Químico Farmacéutico Biólogo

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

ATENTAMENTE

"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 24 de junio de 2016.

PRESIDENTE	<u>Dr. Francisco López Mejía</u>	
VOCAL	<u>QFB. Elia Granados Enriquez</u>	
SECRETARIO	<u>Dr. José Juan Escobar Chávez</u>	
PRIMER SUPLENTE	<u>QFB. Guadalupe Rebollar Barrera</u>	
SEGUNDO SUPLENTE	<u>Dr. Roberto Díaz Torres</u>	

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a DIOS por permitirme llegar hasta aquí y cumplir mi sueño.

A mis padres por darme la vida.

A ti mamá por ser siempre el motor que me hace funcionar en los momentos difíciles.

A mis hermanos por estar ahí siempre.

A mis amigos y amigas por todos sus buenos deseos.

A Leticia que eres el espíritu de la solidaridad.

A mis sobrinos y sobrinas que quiero tanto.

Y a ti Juan Uriel.

Un agradecimiento muy especial al Doctor José Juan Escobar Chávez por su paciencia, su conocimiento en la elaboración de este trabajo pero sobretodo por sus palabras de aliento y su amistad.

A mi Universidad, mi alma mater.

I. ÍNDICE

I	Índice	1
II	Índice de figuras	4
III	Índice de tablas	6
IV	Tabla de abreviaturas	7
V	Resumen	8
1	Introducción	9
2	Objetivos	11
3	La piel	12
3.1	Generalidades	12
3.2	Estructura	13
3.2.1	Epidermis	13
3.2.2	Dermis	16
3.2.3	Hipodermis	17
3.3	Funciones	18
3.4	Inmunología	19
4	Absorción percutánea	20
4.1	Factores que intervienen en la velocidad de absorción	21
5	Tape stripping	24
5.1	Definición	24
5.2	Descripción	24
5.3	Protocolo de tape stripping	26
5.4	Factores que influyen en la técnica de tape stripping	28
5.4.1	Sitios de aplicación	28
5.4.2	Tipos de cintas	28
5.4.3	Aplicación de la cinta	29
5.4.4	Presión de aplicación	29
5.4.5	Velocidad de remoción	29
5.5	Métodos de cuantificación de la cantidad de EC removido	29

5.5.1	Pesaje	30
5.5.2	Contenido de proteínas	30
5.5.3	Espectroscopia óptica	31
5.5.4	Microscopía	32
5.5.5	Pérdida de agua transepidermal (TEWL)	32
5.6	Parámetros de influencia sobre el tape stripping	32
5.6.1	Efectos de pliegues	32
5.6.2	Descartando la primera cinta retirada	33
5.7	Aplicaciones de tape stripping	34
5.7.1	Determinación de la distribución de la sustancia aplicada sobre la piel	34
5.7.2	Determinación por TS de la eficacia <i>ex vivo</i> de la protección solar de bloqueadores	35
5.7.3	Determinación de los perfiles de penetración	36
6	Microdiálisis	46
6.1	Teoría y principios de microdialisis	46
6.1.1	Principios de microdiálisis	46
6.1.2	Características de la microdiálisis	49
6.1.3	Recuperación	49
6.1.3.1	Retrodiálisis	52
6.1.4	Invasividad	54
6.1.5	Limitaciones actuales y desafíos	55
6.2	Investigaciones en animales	56
6.2.1	Estudios de formulaciones de fármacos	58
6.2.2	Aplicaciones	59
6.2.2.1	Estudios de biodisponibilidad/bioequivalencia en animales	59
6.2.2.1.1	Estudios de administración de fármacos mediante microdialisis en humanos	62
6.2.2.2	Estudios de biodisponibilidad/bioequivalencia en humanos	66
7	Otras técnicas	67

7.1	Blisters	67
7.1.1	Materiales	68
7.1.2	Método	69
7.1.2.1	Producción de ampollas por succión	69
7.1.2.2	Análisis	72
7.1.2.2.1	Burbuja abierta	72
7.1.2.2.2	Ampolla intacta	73
7.1.2.3	Fármacos evaluados utilizando Blisters	73
7.2	Infrarrojo	78
7.2.1	Definición y generalidades	78
7.2.2	Instrumentos	80
7.2.2.1	Técnica de transformada de Fourier	80
7.2.2.2	Espectroscopia fotoacústica: FTIR – EFA	81
7.2.2.3	Reflexión total atenuada (RTA)	83
7.2.3	Cuantificación de fármacos	85
7.2.3.1	El contenido de fármacos en las formulaciones de semisólidos y tabletas determinados por TFIR–EFA	85
7.2.4	El efecto modificador de las propiedades de penetración del EC en un estudio con TFIR-RTA	88
8	Conclusión	89
9	Referencias	91

II. ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	Estructura de la piel donde se muestran las tres capas bien diferenciadas.	13
Figura 2	Estructura del estrato corneo.	15
Figura 3	Representación esquemática de la piel. Arriba a la izquierda observamos una micrografía de la piel en la que podemos apreciar claramente el EC, epidermis viable y la dermis. Arriba a la derecha y abajo se ilustra una representación del modelo de ladrillo y cemento del EC.	16
Figura 4	Representación esquemática de las capas de la piel y otras estructuras.	17
Figura 5	Procesos de absorción percutánea y transdérmica.	21
Figura 6	Penetración de un activo en el estrato córneo.	24
Figura 7	Método de Tape Stripping (a- aplicación de la formulación sobre un área marcada de la piel; b-distribución homogénea; c- presión de la cinta con un rodillo utilizando una hoja de papel; d- Remoción de la cinta.	26
Figura 8	Distribución de lo corneocitos sobre la cinta removida.	27
Figura 9	Influencia de la formulación sobre el EC removido con algunas cintas.	28
Figura 10	Distribución de la fluorescencia sobre la primera cinta removida desde áreas de la piel tratadas con dos diferentes formulaciones (a-Formulación oléica; b-formulación etanólica).	34
Figura 11	Determinación de la transmisión del espectro de bloqueador solar por TS.	36
Figura 12	Perfiles de penetración de aplicaciones tópicas de sustancias (a- bloqueador solar; b-esteroides).	38
Figura 13	Ilustraciones de la sonda lineal (a) y la sonda concéntrica (b) de los diseños de tubos para microdiálisis. Las flechas indican la	47

	dirección del flujo del perfusante.	
Figura 14	Ilustración del procedimiento de implantación de microdialisis con sonda lineal y cánula guía. Dos sondas han sido implantadas y la cánula guía dibujada en la parte superior de la ilustración y una tercera sonda es implantada vía inserción con una cánula guía.	48
Figura 15	Retirado de sustancias desde una aplicación tópica con la técnica de microdialisis en la dermis de la piel.	48
Figura 16	El dispositivo de ampolla de succión es fijado al brazo y es conectada la bomba de vacío.	69
Figura 17	Desarrollo completo de ampollas de succión.	71
Figura 18	Comparación del IR y espectros de Raman de benceno. arriba: El espectro de transmitancia de IR; en la parte inferior: el espectro de Raman.	79
Figura 19	El plano de un interferómetro Michelson.	81
Figura 20	El plano de una celda fotoacústica.	83
Figura 21	El plano de la reflexión total atenuada.	84
Figura 22	Escaneo de espectros fotoacústicos de FTIR de mezclas de vaselina/didranol. El contenido de fármaco se muestra.	87
Figura 23	Concentración de Didranol en mezclas de vaselina / didranol pronosticada por FTIR-EFA contra el contenido de fármaco determinado por HPLC.	87
Figura 24	Escaneo de espectros fotoacústicos de FTIR de la tableta de Emcocel con diferente cantidad de teofilina. Las flechas corrigen las alteraciones importantes del espectro características atribuibles a la teofilina.	88

III. ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1	Vías de penetración de los fármacos y su coeficiente de difusión.	22
Tabla 2	Resistencia a la penetración de los preparados tópicos en las distintas regiones anatómicas en orden creciente.	23
Tabla 3	Investigaciones utilizando la técnica de TS como un método para determinar la diferente permeación en piel.	39
Tabla 4	Correlación teórica entre varios actores que influyen en la recuperación relativa y absoluta de sondas de microdiálisis para una total libertad indeterminada de concentración de fármaco en la piel.	50
Tabla 5	Parámetros que aumentan la recuperación relativa.	51
Tabla 6	Resumen de la distribución de fármacos cutáneos estudiados usando microdiálisis en animales.	57
Tabla 7	Resumen de la distribución de fármacos cutáneos estudiados usando microdiálisis en humanos.	64
Tabla 8	Formulaciones estudiadas con la técnica de blisters.	74

IV. TABLA DE ABREVIATURAS

EC	Estrato córneo
UV	Ultra violeta
TEWL	Pérdida de agua transepidermal
TS	Tape stripping
VIS	Visible
UVB	Rayos ultravioleta B
UVA	Rayos ultravioleta A
FPS	Factor de protección solar
FEC	Fluido extracelular
RR	Recuperación relativa
HPLC	Cromatografía de líquidos de alta resolución
LC	Cromatografía de líquidos
ABC	Área bajo la curva
PG	Propilen glicol
C	Concentración
IR	Infrarrojo
TFIR	Transformadas de Fourier infrarrojo
TF	Transformadas de Fourier
EFA	Espectroscopía fotoacústica
RTA	Reflectancia total atenuada
HPTLC	Cromatografía de capa fina de alta resolución

V. RESUMEN

La piel es el órgano más grande del cuerpo. Es el intermediario entre el cuerpo y su medio ambiente, sirve como barrera protectora que previene la entrada de microorganismos así como de productos químicos diversos, previene la pérdida de fluidos corporales y calor pero aunque es un barrera eficaz también funciona como una gran puerta de entrada para productos con ciertas características dentro del cuerpo; aunque no todos los productos químicos tienen la misma capacidad para atravesarla se han realizado estudios para comprender y pronosticar la penetración de esos materiales al interior de la piel que logran alcanzar la circulación general.

No hace mucho tiempo los estudios estaban encaminados a desarrollar técnicas para valorar la irritación o las reacciones alérgicas tanto en piel de animales como en humanos, sin embargo, recientemente se han encausado a desarrollar otras técnicas que permitan cuantificar la cantidad de fármaco que penetra en la piel y logra alcanzar torrente sanguíneo para producir el efecto deseado, muchas de estas técnicas surgen de la incapacidad del paciente para recibir los fármacos por vías convencionales.

Algunas de estas técnicas se refieren en este trabajo de investigación y son el tape stripping, la microdiálisis, blisters e infrarrojo.

El propósito de esta investigación bibliográfica es mostrar una visión general y actual sobre estas cuatro técnicas que se utilizan para cuantificar fármacos que penetran a través de la piel, dando un panorama general sobre la metodología de cada técnica, ventajas y limitaciones y la información que han arrojado los estudios realizados hasta la fecha.

1. INTRODUCCIÓN

La piel surge en los primeros días de la vida del embrión humano, casi al mismo tiempo que el cerebro. Pocas semanas después de la fecundación, las células que se están multiplicando para formar los distintos tejidos se distribuyen en tres estratos, llamados "hojas embrionarias". Del primero se formarán todos los órganos internos (endodermo) y del segundo los músculos y el esqueleto (mesodermo). De la tercera hoja (ectodermo) se origina el sistema nervioso y el revestimiento del organismo, es decir, la piel y las mucosas. Pero la maduración de este preciado órgano sólo termina con el nacimiento, aunque sigue perfeccionándose también después. Especialmente, la piel posee una formidable capacidad de regeneración.

La piel ocupa en el adulto una superficie de aproximadamente dos metros cuadrados. Según las distintas partes del cuerpo, puede variar su espesor, color así como la presencia de vello y glándulas.

La piel está constituida por tres capas sucesivas: La epidermis la más superficial, la dermis y la hipodermis, la más profunda. Está constituida por dos millones de células que se renuevan de forma continua, 300 millones de ellas son reemplazadas cada día, pesa entre tres y cinco kilogramos y completamente extendida puede llegar a ocupar un área de 1.8 m^2 .

Siendo la piel el órgano más extenso con el que contamos, se hace necesario utilizarla para aplicar fármacos, sobretodo en pacientes que por problemas de salud o por accidentes están imposibilitados y no cuentan con otras vías de administración.

Por esto también es necesario conocer los mecanismos de absorción percutánea y aquellos métodos que se pueden utilizar para cuantificar esos fármacos que penetran, de ahí que se detallarán métodos como el tape stripping, la microdiálisis, los blisters y el infrarrojo.

Este trabajo de investigación bibliográfica tiene la finalidad de describir el procedimiento para cada método, mostrar los estudios realizados por diferentes grupos de investigación con distintas sustancias y fármacos aplicados por piel y enumerar las ventajas y desventajas de estos métodos y bajo qué circunstancias se recomienda utilizar cada uno de ellos ya que la capa en la que normalmente se trabaja es en la epidermis y

siendo más específicos en el estrato córneo que está formado por células queratinizadas y que varía su espesor dependiendo de la región anatómica además esta tesis tiene el propósito de familiarizarnos con un tema poco conocido pero sobretodo establecer las posibilidades para investigaciones posteriores o sugerir afirmaciones verificables.

2. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL: Estudiar los métodos utilizados para cuantificar el paso de fármacos a través de la piel, mediante una revisión bibliográfica, como base para futuros estudios *in vitro* de penetración percutánea.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Describir las generalidades sobre la piel del ser humano.
- Explicar las características de la piel y los mecanismos con que los fármacos son absorbidos a través de ella.
- Realizar una descripción de los métodos y técnicas que se utilizan para cuantificar la cantidad de fármacos y otras sustancias que penetran en la piel, así como las ventajas que ofrecen y las limitaciones que presentan.

3. LA PIEL

Se dice que la piel es el espejo del alma, de forma que la belleza de la piel tiene una relación directa con el bienestar y la salud del ser humano. La piel es nuestro órgano más extenso y asciende al 16% del peso corporal por lo que se convierte también en la superficie de entrada más extensa. Se puede considerar a la piel como una barrera entre el cuerpo y el entorno.

Sus funciones son múltiples y de gran importancia es la barrera protectora que aísla nuestro organismo del exterior al tiempo que actúa como un sistema de comunicación con todo lo que la rodea, es la principal barrera de defensa contra gérmenes y otros factores externos, controla la temperatura corporal y nos proporciona tacto y sensibilidad.

3.1. Generalidades

Es el tejido que recubre nuestro cuerpo, es el órgano más extenso del organismo: ocupa en el adulto una superficie de aproximadamente dos metros cuadrados. Según las distintas partes del cuerpo, puede variar su espesor, color así como la presencia de vello y glándulas.

La piel está constituida por tres capas sucesivas: i) La epidermis, que es la más superficial, ii) la dermis y iii) la hipodermis, la más profunda (Figura 1). Está constituida por dos millones de células que se renuevan de forma continua, 300 millones de ellas son reemplazadas cada día. Pesa entre tres y cinco kilogramos y completamente extendida puede llegar a ocupar un área de 1.8 m^2 [1].

La piel surge en los primeros días de la vida del embrión humano, casi al mismo tiempo que el cerebro. Pocas semanas después de la fecundación, las células que se están multiplicando para formar los distintos tejidos se distribuyen en tres estratos, llamados "hojas embrionarias". Del primero se formarán todos los órganos internos (endodermo) y del segundo los músculos y el esqueleto (mesodermo). De la tercera hoja (ectodermo) se origina el sistema nervioso y el revestimiento del organismo, es decir, la piel y las mucosas. Pero la maduración de este preciado órgano sólo termina con el nacimiento,

aunque sigue perfeccionándose también después. Especialmente, la piel posee una formidable capacidad de regeneración [2].

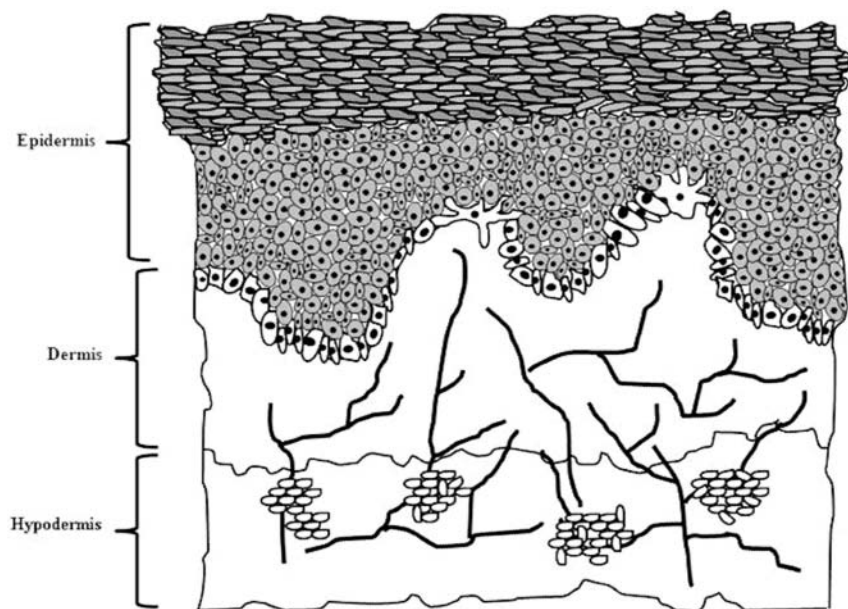


Figura 1. Estructura de la piel donde se muestran las tres capas bien diferenciadas [3].

3.2. Estructura

Estructuralmente, como ya se mencionó la piel consta de tres capas bien diferenciadas, la epidermis, la dermis y la hipodermis. A continuación se describe cada una de ellas.

3.2.1. Epidermis

La epidermis es la capa más externa. Tiene un milímetro de espesor aproximadamente, aunque es mucho más gruesa en las palmas de las manos y en las plantas de los pies. Por el contrario es más fina en los párpados. Se constituye por varias capas de células (queratinocitos), dispuestas unas encima de otras formando una barrera aproximadamente cada 2 meses, y mantiene la piel hidratada y protegida de las

radiaciones solares. A su vez, la epidermis está formada por diferentes capas, que desde el nivel más interno al más superficial, son:

1.- Capa basal o germinativa. Formada por una hilera de células que constantemente regeneran la epidermis. En ella se encuentran los melanocitos, que son las células con forma de estrella cuyas prolongaciones se denominan dendritas, y que son las células responsables de la fabricación de melanina. La melanina es un pigmento que contribuye al color de nuestra piel y nos protege de los efectos negativos de los rayos solares. Además en esta capa también se encuentran células del sistema inmunológico (células Langerhans) encargadas de presentar los antígenos (sustancias extrañas del exterior) a los linfocitos, e iniciar así la respuesta inmune de defensa.

2.- Capa espinosa. Esta capa está situada por encima de la capa basal y está formada por varias hileras de células, estas células se unen entre sí y con las de la capa basal constituyen un fuerte armazón.

3.- Capa granulosa. Está formada por elementos celulares aplanados que contienen gránulos de queratohialina. No tienen la capacidad de dividirse ya que están dedicadas únicamente a la producción de queratina.

4.- Capa córnea. Constituida por capas de células muertas (corneocitos). Se encuentra en constante descamación, aunque en condiciones normales este fenómeno es imperceptible. Esta capa aparece en toda la piel, salvo en las mucosas (labios, vulva, boca, etc.) [5].

El estrato corneo (EC) tiene un grosor variable en función de la región anatómica (entre 10 y 50 μm) y está compuesto por proteínas (40%), lípidos (20%) y agua (40%) (Figura 2). La cinética de renovación del EC implica un recambio completo del mismo cada 15 a 30 días en una piel normal [6].

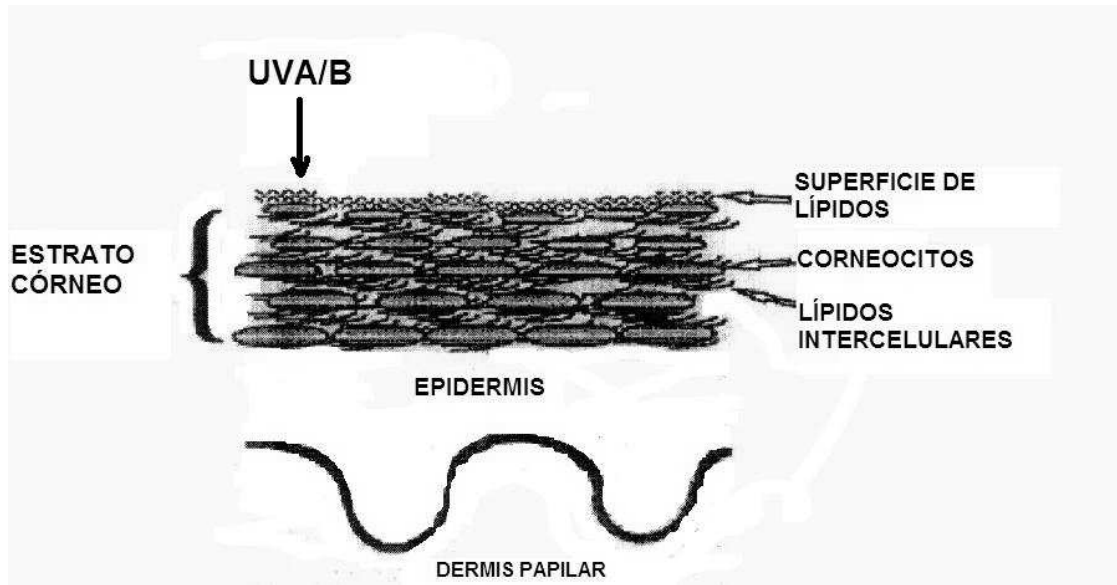


Figura 2. Estructura del estrato córneo [7].

El EC o capa córnea está constituida de células muertas queratinizadas, los corneocitos. Estas células son ricas en proteínas fibrosas y son de forma aplanada. Una célula de EC mide en promedio $1\ \mu\text{m}$ de espesor y su superficie varía entre 700 y $1200\ \mu\text{m}^2$. Esta fase protéica discontinua está rodeada por una fase lipídica continua. Muy a menudo comparadas a “ladrillos”, están rodeadas de lípidos intercelulares: “el cemento” (Figura 3) [8].

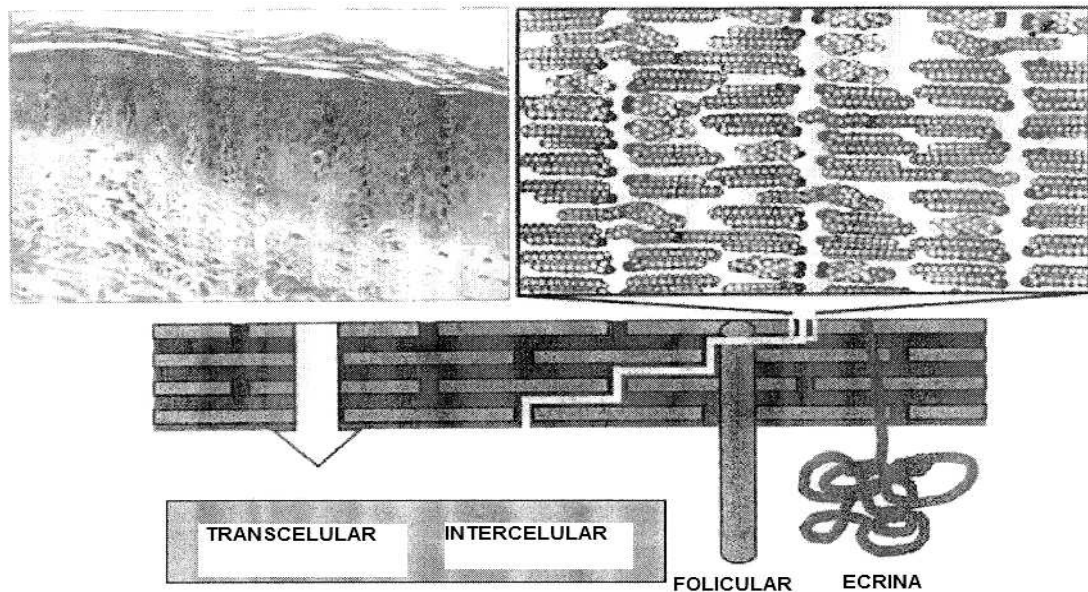


Figura 3. Representación esquemática de la piel. Arriba a la izquierda observamos una micrografía de la piel en la que podemos apreciar claramente el EC, epidermis viable y la dermis. Arriba a la derecha y abajo se ilustra una representación del modelo de ladrillo y cemento del EC [8]

3.2.2. Dermis

La Dermis forma la mayor parte de la piel. Su espesor es de unos cuatro milímetros. Se divide a su vez en otras tres zonas que, de un nivel más superficial a un nivel más profundo son: Dermis papilar, Dermis reticular y Dermis profunda. Se trata de un sistema de fibras entrelazadas, embebidas de una sustancia denominada “sustancia fundamental”, en la que existen varios tipos de células. En la dermis se encuentran también los anexos cutáneos, córneos (pelos y uñas) y glandulares (glándulas sebáceas y glándulas sudoríparas) (Figura 4). También se encuentran los vasos sanguíneos que irrigan la piel y las terminaciones nerviosas. Las fibras que forman el armazón de la dermis y que son los causantes de la tersura, la flexibilidad y la elasticidad de la piel son:

Fibras de colágeno: son el principal componente de la dermis.

Fibras elásticas: son las responsables de la elasticidad de la piel.

Fibras de reticulina. Que son muy escasas y se disponen alrededor de los pelos, uñas, glándulas y de los vasos sanguíneos.

Las células que forman la dermis se denominan fibroblastos. Se encargan de producir fibras de colágeno, fibras elásticas y la sustancia fundamental. Existen también distintas células del sistema inmunológico; linfocitos, macrófagos, eosinófilos y mastocitos que se encuentran presentes en número variable dependiendo de las circunstancias de la piel.

La sustancia fundamental se encuentra entre las fibras y está constituida por proteínas, electrólitos, glucosa y agua.

3.2.3. Hipodermis

La hipodermis es la capa más profunda de la piel. También se le denomina tejido celular subcutáneo o panículo adiposo. Se halla constituida por gran multitud de células grasas. La grasa forma tejido metabólico muy activo que además protege al organismo proporcionándole amortiguación y aislamiento térmico [5].

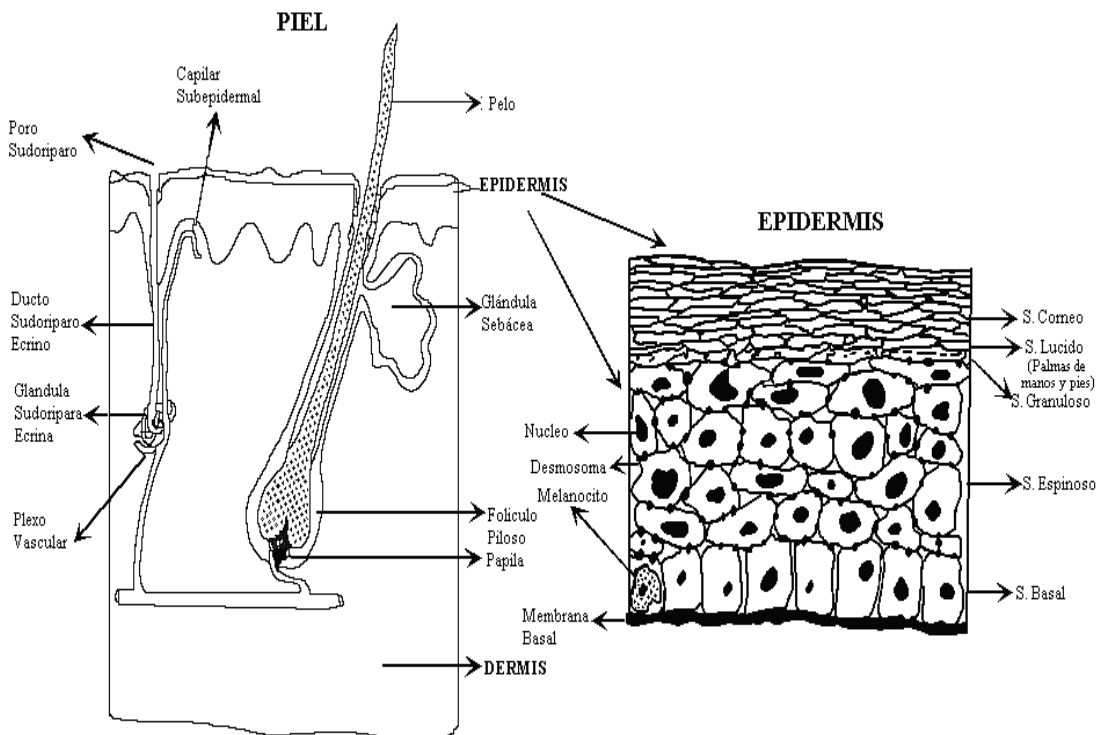


Figura 4. Representación esquemática de las capas de la piel y otras estructuras [8].

3.3. Funciones

Las funciones más importantes de la piel son:

1.- Termorregulación: regula la temperatura corporal a través de las glándulas sudoríparas y la irrigación sanguínea en tejido adiposo subcutáneo actúa como una capa aislante. En respuesta a un incremento de la temperatura ambiental o al ejercicio extenuante, la producción de la transpiración por las glándulas (sudor) ayuda a disminuir la temperatura o el calor corporal hasta el nivel normal, los cambios en el flujo sanguíneo hacia la piel también alteran las propiedades de aislamiento y ayuda a equilibrar la temperatura corporal.

2.- Protección: La piel es una barrera semipermeable que posee una película superficial en la capa cornea que protege los tejidos subyacentes de la abrasión, bacterias, deshidratación, y radiación ultravioleta (UV).

3.- Recepción de estímulos: La piel contiene numerosas terminaciones y receptores nerviosos que detectan los estímulos relacionados con temperatura, tacto, presión y dolor [6].

4.- Excreción: Para eliminar las impurezas la piel, sin embargo, dispone de glándulas sudoríparas que cumplen la función de eliminar parte del material de desecho de las células como el sudor [9]. Con su acción, se libera agua, sales, algunos minerales y también algunas sustancias tóxicas. Esta función de la piel es paralela a la de los riñones y de los pulmones.

5.- Síntesis de Vitamina D: La vitamina D es una hormona ya que se produce en la epidermis se transporta a la sangre y ejerce su efecto sintetizador y productor en otras partes.

6.- Queratogénesis: Función de la piel para la formación de queratina.

7.- Melanogénesis: Función de la piel para la formación de la melanina [10].

3.4. Inmunología

La piel lleva a cabo también una compleja función de defensa. La capacidad de la piel para distinguir lo propio de lo que no es, resulta verdaderamente impresionante si consideramos la vasta variedad de sustancias exógenas a las cuales está continuamente expuesta.

Al ambiente inmunológico de nuestra piel incluyendo los componentes humorales y celulares se le ha dado el nombre de sistema inmunológico de la piel. Problemas en este sistema pueden manifestarse como enfermedades inmunodermatológicas, incluyendo edema atópico, soriasis, lupus eritematoso cutáneo, esclerodermia, etc. Se sabe que las células de Langerhans habitan en la epidermis y expresan un alto nivel de moléculas de complejo de histocompatibilidad clase II y fuertes funciones estimuladoras para la activación de los linfocitos T. Las células de Langerhans comprenden del 2 al 4% de las células que constituyen la epidermis y también las encontramos en los nodos linfáticos. Estas actúan sobre los antígenos y los presentan a los linfocitos, para de esta manera proveer al organismo de un medio de control contra virus y bacterias. Los queratinocitos también juegan un papel importante en el sistema inmune de la piel. Otros compuestos adicionales relevantes en cuanto a la inmunología de la piel son los eicosanoides, metabolitos oxigenados de ácidos grasos de 20 carbonos, especialmente del ácido araquidónico, que juegan un rol importante en la fisiopatología del proceso inflamatorio y de los desordenes inmunológicos de la piel. Por ejemplo, los leucotrienos juegan un papel muy importante y central en patogénesis asociadas a la soriasis [8].

4. ABSORCIÓN PERCUTÁNEA

La principal barrera de permeación está constituida por los lípidos intercelulares del EC, que es una barrera predominantemente lipofílica y que además minimiza la pérdida de agua transepidermal (TEWL). De igual manera, es la principal barrera de permeación para la absorción percutánea. La liberación transdérmica de pequeñas moléculas ha sido considerada como un proceso de partición interfacial y de difusión molecular a través de esta barrera. Un modelo matemático simple muestra al EC como una membrana heterogénea de dos fases lípido-proteínas, siendo la matriz lipídica la fase continua. Numerosos modelos teóricos de permeación se han propuesto para predecir el flujo transdérmico de un fármaco basado en algunas de las propiedades fisicoquímicas del fármaco. Estos modelos generalmente hacen consideraciones acerca de las propiedades de barrera de la piel y predicen el flujo transdérmico de un fármaco con soluciones acuosas saturadas, proporcionando información sobre su solubilidad en agua, peso molecular del fármaco y su coeficiente de partición lípido-proteínas. La mayoría de estos modelos teóricos asumen que el EC se comporta como un modelo de dos compartimentos heterogéneos de células ricas en proteínas embebidas en los lípidos intercelulares. Una analogía con ladrillos y cemento es una representación frecuentemente dada para este modelo (Figura 3). Basado en este modelo, los fármacos pueden difundir a través del EC vía transepidermal o a través de los apéndices presentes en la piel (folículos pilosos y glándulas sudoríparas). La penetración transepidermal de fármacos a través del EC puede tener lugar por la matriz lipídica en la cual se encuentran embebidos los corneocitos (vía intercelular) o a través de los corneocitos (vía transcelular) (Figura 5). La contribución relativa de estas vías depende de la solubilidad, el coeficiente de partición y la difusividad del fármaco entre las proteínas y las fases lipídicas. La vía a través de los apéndices normalmente contribuye solamente con un porcentaje limitado del perfil cinético de liberación transdérmico de un fármaco. Recientemente, se mostró que la penetración de ácido retinóico fue más elevada a través de piel de cobayos rasurada, demostrando que la estructura y composición del EC es más importante que la densidad folicular para la difusión pasiva. Sin embargo, los folículos

pílosos y los ductos sudoríparos pueden actuar como caminos para moléculas iónicas mediante un transporte iontoforético [8].

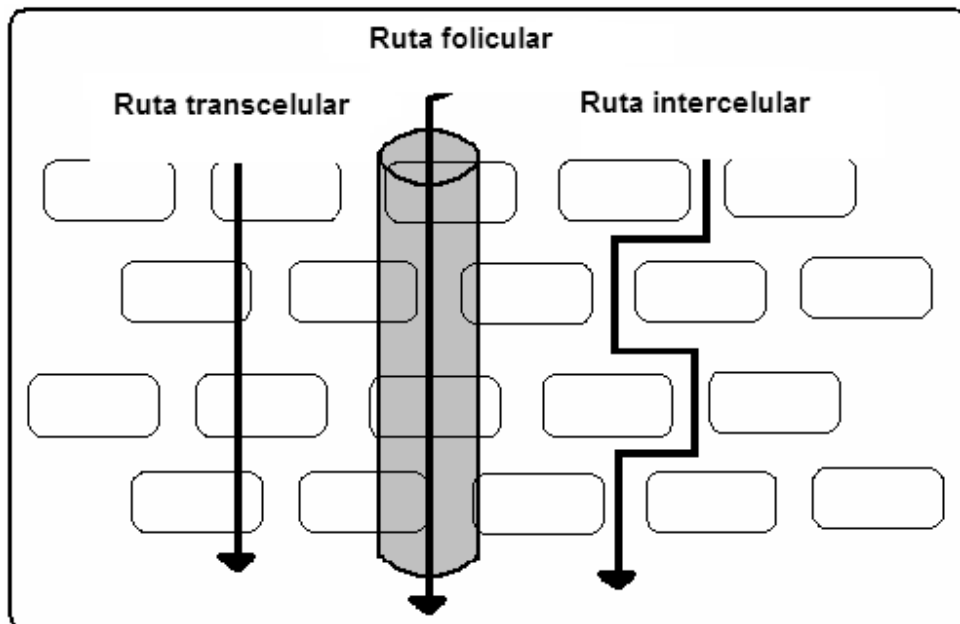


Figura 5. Procesos de absorción percutánea y transdérmica [3].

4.1. Factores que intervienen en la velocidad de absorción

Tres variables principales explican la velocidad de absorción en los medicamentos por vía tópica del mismo fármaco en diferentes vehículos: a) la concentración del principio activo en el vehículo; b) el coeficiente de partición entre el vehículo y el estrato córneo; y c) el coeficiente de difusión del medicamento y el EC [11].

- a) **Concentración del fármaco en el vehículo:** La velocidad de difusión es proporcional a dicha concentración. La relación es lineal a concentraciones bajas del fármaco y sólo cuando este es soluble en el vehículo. la curva de concentración respuesta a diferentes corticoides tópicos presenta una pendiente pronunciada hasta llegar a una meseta en que los aumentos de concentración no

generan un incremento en la respuesta. Este factor explica los efectos terapéuticos variables de diferentes formulaciones de un mismo compuesto [12].

- b) Coeficiente de partición del fármaco entre el EC y el vehículo: es una medida de la capacidad del fármaco para escapar del vehículo y se define como la relación entre la solubilidad del medicamento en el EC y en el vehículo. Teniendo presente que el EC es lipófilo, los fármacos liposolubles tendrán facilidad para atravesarlo [13]. En consecuencia, la penetración de los principios activos a través de la piel será óptima cuando se mantengan en solución dentro del vehículo, pero, además, tengan un coeficiente de partición favorable, es decir, que el principio activo sea más soluble en el EC que en el propio excipiente [14].
- c) Coeficiente de difusión del fármaco en el EC es la magnitud con que la piel se opone al paso del fármaco. Depende de dos factores:
- Tamaño molecular: las moléculas de tamaño grande tienen coeficiente de difusión pequeño [13, 15].
 - Capacidad de difusión de la capa de la piel: Como puede observarse en la Tabla 1, el menor coeficiente de difusión corresponde al EC, que como ya se ha comentado es el que se opone con mayor intensidad al paso de los fármacos, y, sin embargo, casi la totalidad del fármaco que atraviesa la piel lo hace a través del EC (99% del volumen de difusión total).

Tabla 1. Vías de penetración de los fármacos y su coeficiente de difusión

Vías de penetración	Porcentaje del volumen de difusión total	Coficiente de difusión
Glándulas sudoríparas	0.04 – 0.1	8×10^{-6}
Folículos pilosebáceos	0.15 – 1.2	4×10^{-7}
Estrato córneo	99 – 99.9	5×10^{-11}

En esta tabla, se muestran la proporción en que participan los distintos componentes de la piel en la difusión de los preparados farmacológicos [16].

Otro factor que interviene en el paso del fármaco a través de la piel es la región anatómica que sea tratada ya que el grosor de EC es variable en función de la región anatómica; estos factores explican las diferencias regionales en cuanto la absorción de los fármacos [17].

La absorción varía según la zona de aplicación (1% en el antebrazo, 7% en la frente, 37% en el escroto, etc.) zonas de alta absorción son las ingles, axilas, y cara; zonas de baja absorción son los codos, rodillas, palmas de las manos y plantas de pies [18]. En la tabla 2 se presenta el orden de resistencia a la penetración de los preparados farmacológicos en función de la región anatómica [13].

Tabla 2. Resistencia a la penetración de los preparados tópicos en las distintas regiones anatómicas en orden creciente [13].

1	Mucosas
2	Escroto
3	Párpados
4	Cara
5	Pecho y espalda
6	Brazos y muslos
7	Antebrazos y piernas
8	Dorso de las manos y pies
9	Palmas de las manos y plantas de los pies
10	Uñas

5. TAPE STRIPPING

5.1. Definición

El “tape stripping” (TS) como su nombre en inglés lo indica, consiste en ir retirando consecutivamente, capas de EC, utilizando para ello una cinta adhesiva. La cuantificación de la sustancia de interés se realiza posteriormente mediante un método analítico adecuado, para que, finalmente, por un análisis matemático, determinar que tanto penetró [19].

5.2. Descripción

La técnica consiste en tratar un área definida de la piel con la sustancia o formulación a estudiar, durante un período determinado, para posteriormente aplicar una cinta adhesiva y retirarla. La cinta se aplica repetidamente en la misma zona (en promedio 20 veces) ya que la concentración de un activo cosmético va disminuyendo en capas más profundas del EC (Figura 6). El supuesto es que, en cada cinta se retira una capa de este EC [19].



Fig. 6. Penetración de un activo en el estrato córneo [19].

El EC de la piel funciona como una barrera del cuerpo limitando la entrada de algunas sustancias hacia el interior además de la excreción de sustancias endógenas. El TS se utiliza subsecuentemente después de aplicar alguna sustancia para removerla con una cinta adhesiva [20-22]. Este procedimiento es mínimamente invasivo y es usado universalmente: *in vivo*, [23-25] *in vitro*, [26-28] en humanos [23-27] y animales tales como: cerdos, [26,27,29] ratas, [30-31] cobayos, [32-33] y ratones [34]. El TS remueve con fuerza los queratinocitos [35], y es un método de estudio para la penetración de sustancias tópicas aplicadas de forma exógena [36], es muy adecuado para estudiar la fisiología del EC [37-38], la epidermis [39-40] y también la excreción de sustancias endógenas [41]. La cantidad de EC removido por una sola cinta adhesiva depende de algunos factores intrínsecos y extrínsecos como el sitio anatómico donde se encuentren [23-42], la edad [43] y las sesiones [38]. En suma, la cantidad de capas celulares [44] y corneocitos [45], el espesor del EC [46], la composición y la cantidad de lípidos [47], varía también dependiendo del sitio anatómico que se trate. Los parámetros de la piel tales como la pérdida de agua transepidérmica y los valores de pH se ven afectados por la sesión [38,45], la raza [48] y el tipo de piel [49]. Factores extrínsecos que afecten al EC pueden ser reportados durante la remoción de la cinta dependiendo cuál de estas se utilice [50], la fuerza con la que se remueva desde la piel [51], la duración de la presión sobre la piel [49] y la sustancia tópica aplicada [53].

5.3. Protocolo de tape stripping

El principal método de TS más o menos usado en todos los protocolos se muestra a continuación en la Figura 7.

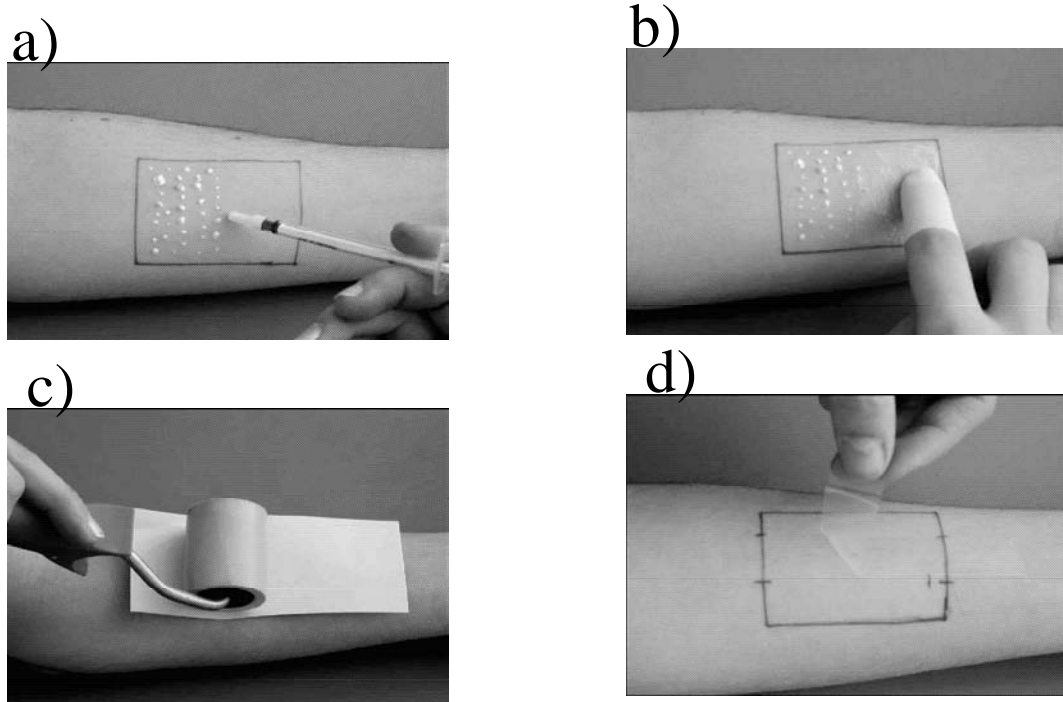


Figura 7. Método de TS (a- aplicación de la formulación sobre un área marcada de la piel; b-distribución homogénea; c- presión de la cinta con un rodillo utilizando una hoja de papel; d Remoción de la cinta) [52].

Después de la aplicación tópica y la penetración de la formulación, se inicia el procedimiento del TS. En el protocolo actual la piel no debe ser limpiada antes del TS ya que contiene las cantidades de sustancia aplicadas originalmente.

Cintas adhesivas se aplican y se remueven consecutivamente en el área de la piel escogida como muestra. El adhesivo puede ser comprimido sobre la piel utilizando un rodillo que pase por esta. Este procedimiento evitará la influencia de arrugas o pliegues durante el procedimiento del TS.

Al quitar la cinta contiene cantidades de EC pero también contendrá cantidades de la sustancia aplicada, la distribución típica de los corneocitos sobre la cinta removida desde diferentes profundidades se presenta en la figura 8; la primera cinta contiene una

capa completa de células (corneocitos) adheridos a ella y poco a poco van disminuyendo en las siguientes.

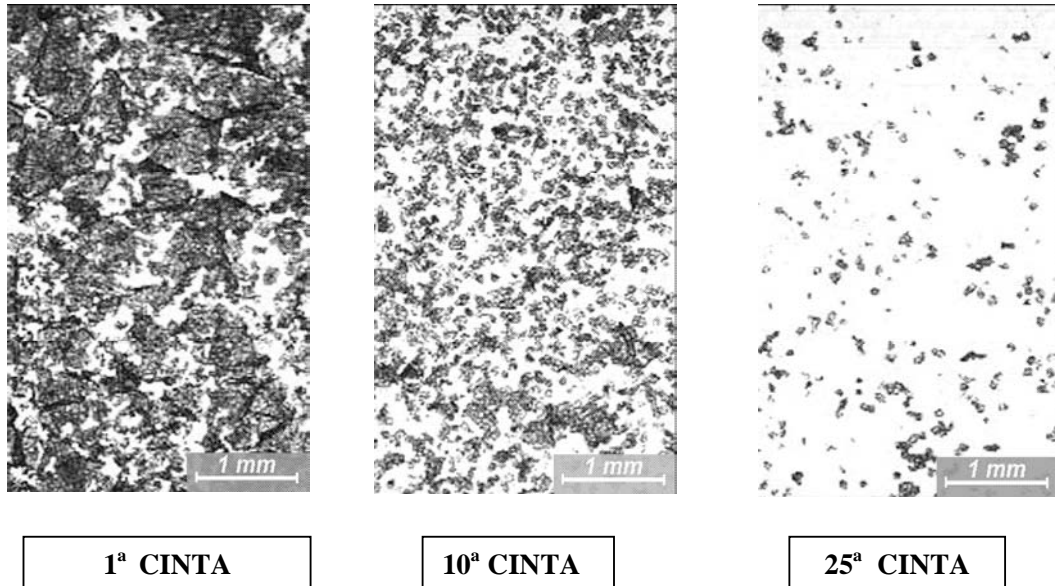


Figura 8. Distribución de los corneocitos sobre la cinta removida [52].

Las propiedades de las formulaciones tópicas aplicadas tienen una fuerte influencia sobre las cantidades de EC que se puede remover en cada cinta (Figura 9).

Después de la aplicación de una solución etanólica, la adhesión de la capa córnea sobre la cinta aumenta. Un tiempo después de la aplicación de una formulación oleosa en el brazo del voluntario la adhesión de la cinta se reduce, se necesitarán más cintas para remover una cantidad relativa del EC.

Como se puede ver en la figura 9, la cantidad de EC que es removido con cinco cintas puede ser diferente al total, esto puede causar fuertes errores en la interpretación de la dermatofarmacocinética de sustancias si el número de cintas es tomado como una medida de la penetración de la sustancia aplicada tópicamente.

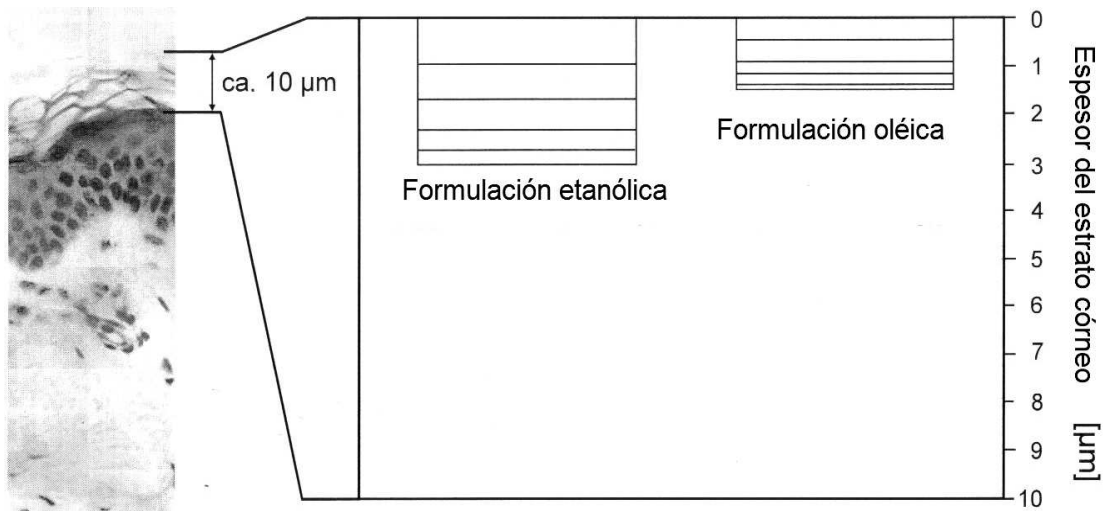


Figura 9. Influencia de la formulación sobre el EC removido con algunas cintas [52].

5.4. Factores que influyen en la técnica de tape stripping

5.4.1. Sitios de aplicación

El sitio de aplicación debe estar libre de vello, cabello y áreas disparejas causadas por cicatrices o uniones de músculos. En el caso de estudiar sitios velludos, éste debe ser removido cuidadosamente utilizando tijeras o navajas especiales afeitando la zona para posteriormente aplicar la sustancia [52].

5.4.2. Tipos de cintas

Distintos tipos de cintas adhesivas pueden ser utilizados para el desprendimiento del EC, incluyendo productos especialmente hechos para este fin [49,53,54]. En cualquier caso una composición y distribución uniforme del adhesivo córneo puede garantizar una buena remoción, en algunos estudios fueron utilizadas cintas con un tamaño definido o área constante; en otras las cintas fueron utilizadas directamente del rollo presentando un ancho constante y un largo variable. En general, las propiedades de transparencia y flexibilidad de la cinta son determinadas por el sujeto de estudio y el método de la cantidad a cuantificar del EC. La compatibilidad con la piel puede ser probada de antemano para evitar efectos adversos.

5.4.3. Aplicación de la cinta

La cinta o discos de cinta adhesiva deben ser cuidadosamente adheridos sobre el sitio de interés marcado en la piel evitando pliegues, este procedimiento puede complicarse si la cinta tiene el tamaño del área de investigación, en el caso de ser una área larga, la posición de la cinta debe ser marcada sobre la superficie de la piel. En algunos estudios, se marca el área sobre la piel y el TS se aplica por encima de la cobertura [55].

5.4.4. Presión de aplicación

Además del tipo de cinta, la presión uniforme es un factor básico que influye en la cantidad de EC removido [56], de cualquier manera, este parámetro en algunos estudios no se describe detalladamente. Un peso constante [57], una espátula [58] y un rodillo [53] fueron usados para presionar la cinta sobre la superficie de la piel; en comparación con un peso constante, el rodillo puede también presionar los pliegues sobre la piel evitándose así un efecto no deseado en estudios *in vivo* de la penetración de la sustancia aplicada tópicamente [59], especialmente para estudios fisiológicos al parecer el camino más viable puede ser la combinación de un peso constante y un buen rodillo para realizar un buen trabajo [55]; el peso del mismo rodillo se puede usar para presionar la cinta diez veces sobre la superficie de la piel [60] alcanzando presumiblemente la garantía de una adhesión óptima de la cinta con el EC [56].

5.4.5. Velocidad de remoción

Hasta ahora la velocidad con que se arranca la cinta es otro de los factores que influye en la cantidad que se remueve del EC y no está estandarizado, esto quiere decir que la influencia del aplicador determina la cantidad que se obtiene, una velocidad constante, lenta o baja en el procedimiento puede incrementar la cantidad adherida del EC sobre la cinta y un incremento en la velocidad puede presentar un decremento en la cantidad resultante de corneocitos [56].

5.5. Métodos de cuantificación de la cantidad de EC removido

Un camino decisivo para evitar la influencia de algunos problemas en la determinación de la cantidad removida en el EC con cada cinta individual, por lo tanto distintos métodos pueden ser propuestos para cuantificar la cantidad de capa córnea removida por la cinta, algunos de estos son: diferencia de pesos [32, 38, 50], espectroscopia [50, 60- 61] y mediciones microscópicas [63]. En contraste, la medición de la pérdida de agua trasepidermal (TEWL) puede ser utilizada para determinar el EC remanente [33, 46] pero algunos problemas pueden presentarse al cuantificar la cantidad exacta de la densidad de corneocitos sobre la primera cinta que es a menudo la decisiva [80]. En general, la homogeneidad de la distribución de los corneocitos sobre la cinta se puede verificar visualmente antes de la cuantificación.

5.5.1. Pesaje

La diferencia en el peso de una cinta se obtiene al pesarla antes de la aplicación y después de la remoción [52,57,61], pero esto se vuelve tedioso y tardado [57] esto basándose en la suposición que las partes del EC son exclusivamente removidas.

Las sustancias aplicadas tópicamente incrementan la cantidad y por lo tanto la diferencia de peso. El fluido intersticial puede incrementar la diferencia de peso para las cintas retiradas sobretodo de partes más profundas de la piel [52, 61].

5.5.2. Contenido de proteínas

Existen distintas propuestas para cuantificar la cantidad removida de EC y estas se basan en la determinación de proteínas en los corneocitos que son los componentes mayoritarios de esta capa. Estas proteínas presentan una absorción a una longitud de onda de 278 nm [61] que puede ser medida directamente en la cinta usando un espectrómetro UV [57,60], esta señal fue comparada con éxito con la pseudoabsorción de los corneocitos ($r^2 = 0.92$) [60]. La debilidad de esta absorción y una posible superposición con bandas de fuerte absorción de otras sustancias, sustancias aplicadas tópicamente [52] en algunos rangos del espectro pueden limitar la aplicación de este método. Por lo tanto, se han desarrollado investigaciones para incrementar la absorción de proteínas y pasar al rango visible (con menores posibilidades de superposiciones). En

el modo más conveniente las células son coloreadas cuando se encuentran adheridas sobre la cinta [57] utilizando azul brillante R 250 para las proteínas del EC, La comparación con el peso de los corneocitos da como resultado un bajo coeficiente de correlación $r^2 = 0.71$, debido presumiblemente al color profundo de la cinta antes de teñirlas. En otros estudios azul tripán fue usado como un reactivo que colorea partículas selectivamente del EC [60], la medición de la absorción a una longitud de onda de 652 nm genera una buena correlación con la pseudoabsorción de los corneocitos antes de teñirlos ($r^2 = 0.95$).

En investigaciones realizadas se ha encontrado que a un mayor tiempo [59] extrayendo las proteínas de las cintas arrancadas teñidas y la determinación de las proteínas coloreadas, el impacto de componentes endógenos sobre la masa de corneocitos es abrumador usando células del EC de piel que tiene que ser tratada con tripsina. La curva de calibración obtenida por correlación de las proteínas coloreadas del EC contra la masa de los corneocitos fue utilizada para calcular la masa de los corneocitos removidos con el TS; recientemente este método fue extendido para usar 96 microláminas [64], de cualquier modo altas variaciones en la cantidad de corneocitos detectados por 4 sub-áreas (con un diámetro de 5 mm) fueron obtenidos debido a la no homogénea distribución microscópica de las células, en suma, una alta masa de EC fue generalmente determinada usando el método colorimétrico como el peso comparado con la determinación de las proteínas de este estrato utilizando estudios fisiológicos [59].

5.5.3. Espectroscopia óptica

La pseudoabsorción de los corneocitos fue usada como un valor para la cantidad de EC removido [52], por lo tanto, una cinta removida de la piel fue medida usando un espectrómetro UV/VIS, los corneocitos agregados disminuyen la transmisión de la luz por reflexión, difracción resultando esparcidos en un incremento de la absorción linealmente, con una baja longitud de onda (hablando de pseudo-absorción) [57]. Este método fue confirmado por comparación de la pseudo-absorción, también los datos de peso [52] y el número de células removidas del EC [62], en suma, una buena correlación de la pseudo-absorción con la proteína contenida [60] y la relativa cubierta densa de células sobre la cinta arrancada [63,64], la rapidez y la determinación simple de los

corneocitos removidos vía espectrometría óptica pueden ser utilizados universalmente en estudios sobre ambos comportamientos de sustancias aplicadas tópicamente y EC fisiológico como se describe en la literatura [61,65]. Recientemente un sistema seguro fue introducido para cuantificar las proteínas semi-cuantitativamente por el método de absorción espectroscópica [66].

5.5.4. Microscopía

Técnicas microscópicas se han utilizado para determinar la densa cubierta de los corneocitos adheridos a la cinta [63]. El área relativa cubierta por los corneocitos fue automáticamente calculada como un valor medio de la capa determinada de todas las sub-áreas, la ventaja de este método está en usar un equipo microscópico ampliamente disponible [48].

5.5.5. Pérdida de agua transepidermal (TEWL)

El decremento en el espesor del EC causado por la cinta removida fue medido mediante el incremento en los valores de TEWL [46,67]. Usualmente la pérdida de agua transepidermal fue medida antes y después de remover varias cintas, se obtiene una correlación lineal entre los valores de TEWL y la masa acumulada en el EC removido, esto considerando al EC como una membrana homogénea [46]. Esta relación se confirma en varios estudios [67] y pueden ser usados para determinar la cantidad contenida en el EC de la piel, esto no es conveniente para medir la cantidad en una única cinta [68]. El EC contenido puede ser calculado como cantidad relativa [60] y como masa o espesor total usando un método adicional para cuantificar el EC removido (pesando [69]) en combinación de una baja densidad de 1 g/cm^3 y un coeficiente de partición [46]. En suma, la medición sensible de TEWL es influenciada por varios parámetros ambientales [70] y esto puede ser afectado por las sustancias aplicadas tópicamente y el fluido intersticial.

5.6. Parámetros de influencia sobre el tape stripping

5.6.1. Efectos de pliegues

La topografía de la superficie de la piel se caracteriza por una red elástica y pliegues [46] esto puede causar la remoción de partes de EC de diferentes estratos con una sola cinta y se convierte en una desventaja del TS [71] limitando el estudio sobre la penetración y permeación de sustancias aplicadas tópicamente. Estos efectos se evitan *in vivo*, utilizando una cinta adhesiva con alta flexibilidad y presionada sobre la superficie de la piel utilizando un rodillo [59].

Por otro lado, los tejidos *in vitro* presentan otras propiedades comparadas con la piel viva dependiendo de las condiciones de origen, remoción, almacenamiento y experimentación [72], esto puede afectar la cantidad removida en el EC durante todo el estudio de TS. En algunos casos, el EC puede no removerse completamente por TS como se observa en estudios *in vitro* sobre piel humana [59,71], partes del TS se quedan en los pliegues, Por lo tanto, la homogeneidad del EC adherido en la primera cinta y el tejido que se mantiene después de arrancarla puede ser investigada antes del experimento del estudio *in vitro*.

5.6.2. Descartando la primera cinta retirada

En estudios sobre el comportamiento de sustancias aplicadas tópicamente, la primera cinta retirada frecuentemente es descartada porque representa un fármaco no absorbido y que está sobre la superficie de la piel [73] no obstante, esta cantidad es necesaria para calcular la concentración de la sustancia recuperada sin el EC en el caso de aplicar una dosis definitiva. Recientemente fue propuesto un método estandarizado de preparación de la superficie[74]. Diferentes cantidades de EC pueden ser removidos con la primera cinta retirada en estudios en donde se comparan distintos vehículos [54] o tiempos de penetración [74], este efecto podría ser causado por diferencias en la cohesión de los corneocitos y la adhesión de la cinta en esas células. Al menos, la penetración de la sustancia aplicada tópicamente en la superficie de los pliegues de la piel puede ser sujeto de interés, especialmente en estudios cinéticos de penetración del

EC [33]. Por lo tanto, la cantidad de EC y sustancia aplicada de antemano debe ser determinada y considerada en el estudio.

5.7. Aplicaciones del tape stripping

5.7.1. Determinación de la distribución de la sustancia aplicada sobre la piel

Las cintas removidas contienen no solo información acerca de la cantidad de corneocitos y la penetración de sustancias sino también acerca de la distribución de las sustancias en las diferentes capas del EC. En la figura 10 se muestra la distribución de un tinte fluorescente sobre la primera cinta removida en áreas de la piel tratadas con dos distintas formulaciones.

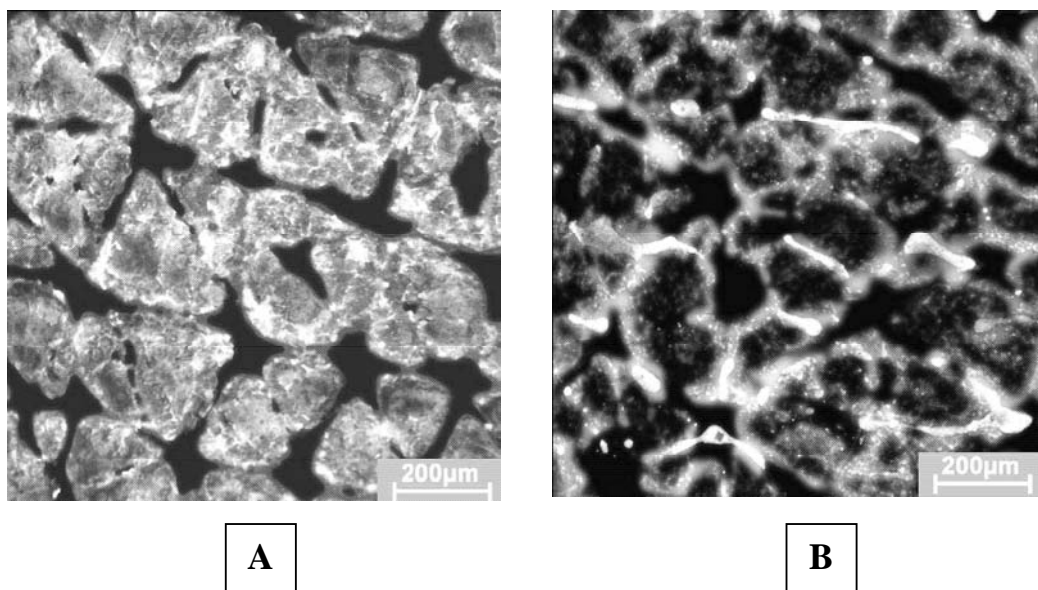


Figura 10. Distribución de un tinte fluorescente sobre la primera cinta removida de la piel en áreas tratadas con dos diferentes formulaciones (a – formulación oléica; b– formulación etanólica) [52]

El primer caso es una formulación oleosa (Figura 10 [A]) el tinte fluorescente está distribuido homogéneamente sobre los corneocitos mientras que en el caso de una formulación etanólica (Figura 10 [B]) el tinte casi está localizado en las arrugas o

pliegues. Usando láser *in vivo*, se observa que la distribución del tinte en la cinta retirada corresponde exactamente a la distribución en la piel humana *in vivo* [75].

La influencia de la piel sobre la variación de la eficacia de bloqueadores ha sido discutida con detalle [76] este efecto puede ser dado como base para la determinación de un factor característico homogéneo de la distribución de una formulación sobre la piel, esto se basa en la relación entre una determinada absorción de tinte sobre la cinta removida y en el extracto obtenido por la cinta muestra.

El factor de homogeneidad es de especial interés para la optimización de la formulación bloqueadora, esa protección eficaz está determinada no sólo por las propiedades de absorción y la concentración de sustancias filtro de UV sino también por la homogeneidad de su distribución sobre la piel.

5.7.2. Determinación por tape stripping de la eficacia *ex vivo* de la protección solar de bloqueadores

El efecto que la concentración y distribución de protectores solares en el EC en condiciones *ex vivo* mediante cintas removidas fue utilizado recientemente para la determinación de un factor de protección solar universal [77] durante este procedimiento, las capas de células del EC son removidas por TS después de la aplicación y penetración de protectores solares, las cintas arrancadas fueron medidas en un espectrómetro especial UV-VIS con un área de medición de 1 cm² [78].

Como los protectores solares son usualmente localizados solamente en la superficie de la piel y las células superficiales del EC, Normalmente de 5 -10 cintas son necesarias para remover completamente el protector solar de la piel. Posteriormente, midiendo en la primera cinta y el protector transmitido se determinó un rango especial de UV (figura 11).

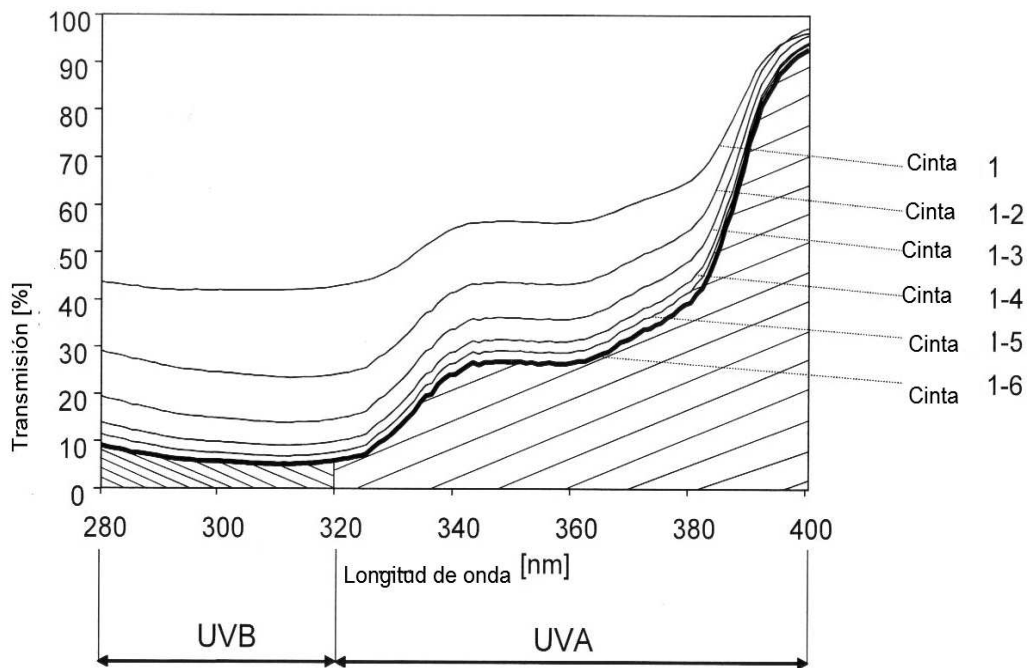


Figura 11.- Determinación de la transmisión del espectro de bloqueador solar por TS.[52]

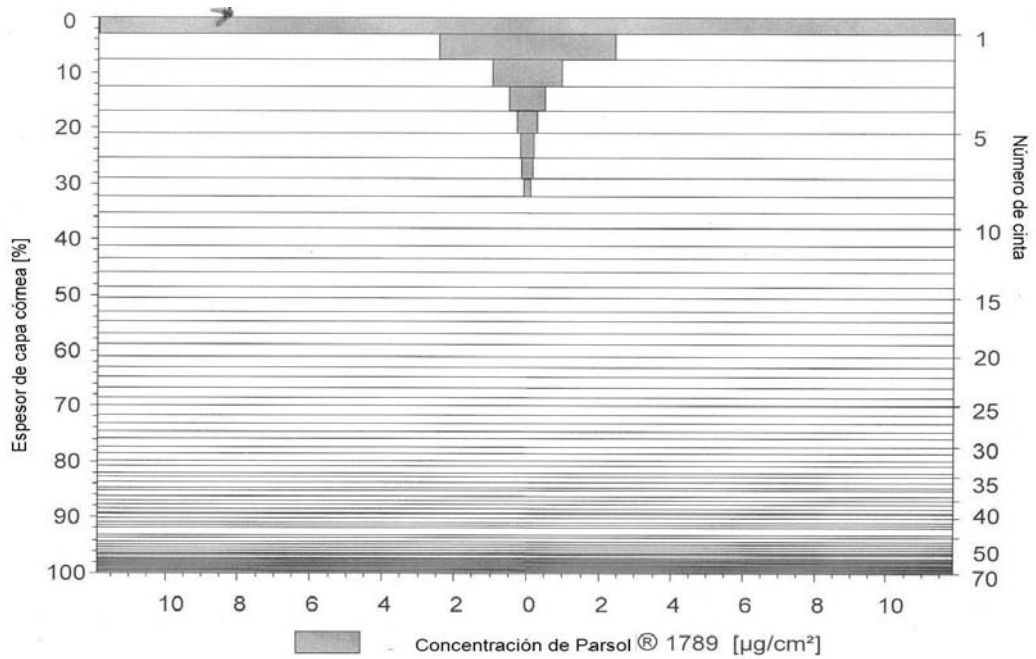
El espectro describe la suma de las curvas de transmisión calculadas para cada cinta reportando en el informe el espectro hasta que los cambios sean ilegibles. El área sobre la curva corresponde a la cantidad relativa de fotones de UV pasando por la barrera protegida de la piel debido al bloqueador solar y alcanzando la epidermis viable.

Este valor es determinado en el rango del espectro UVB y corresponde al factor de protección solar clásico (FPS) [79] determinado por la dosis mínima de eritema sobre condiciones *in vivo*, este valor debe ser determinado en el rango total (UVB +UVA) y corresponde a un factor de protección universal que teniendo en consideración la eficacia de protección en el UVA es parte del espectro.

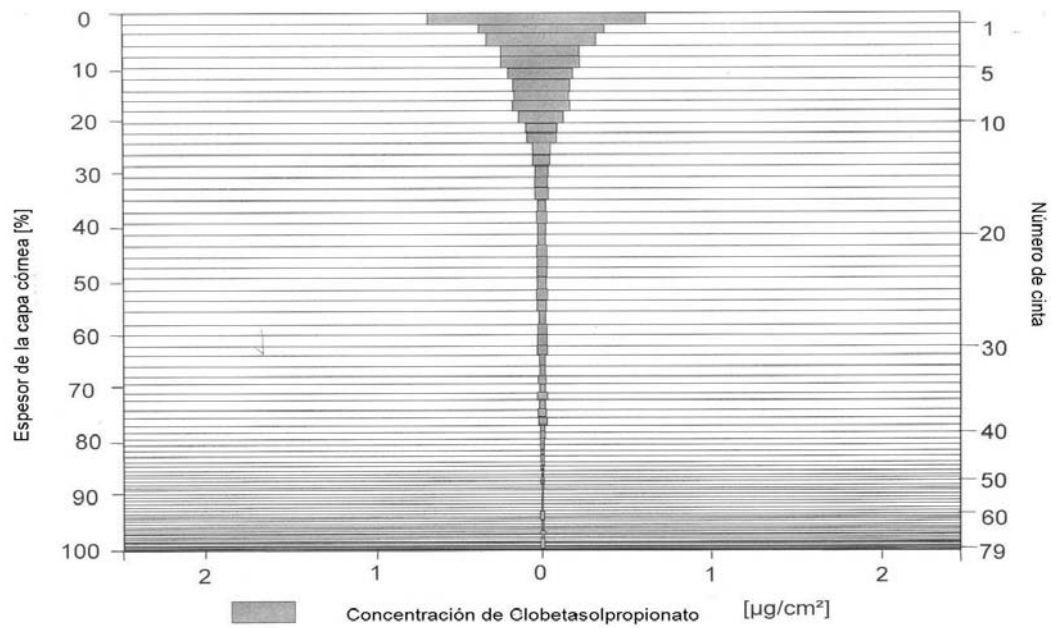
5.7.3. Determinación de los perfiles de penetración

Las posibilidades discutidas usando TS y espectroscopia claramente muestran que la pseudo-absorción correlacionada a la cantidad removida de EC [53], generan el perfil de penetración por la correlación de la cantidad aplicada tópicamente y el espesor de la capa córnea removida con el TS.

En la figura 12 se presentan los perfiles de penetración de protectores solares y un esteroide, en ambos experimentos el TS se realizó después de una hora de aplicación, las distancias entre las líneas horizontales corresponden a las cantidades de EC removido, como se puede ver, esas cantidades se reducen al aumentar el número de TS, la línea superior corresponde a los perfiles de la superficie de la piel y la línea inferior al límite de las células vivas.



a)



b)

Figura 12.- Perfiles de penetración de aplicación tópicas de sustancias (a – bloqueador solar; b – esteroides).[52]

La formulación del protector solar fue optimizada para quedarse en la superficie del EC, el perfil de penetración en la figura 12 [a] demuestra que verdaderamente la sustancia protectora de UV está localizada solamente en la capa córnea superior a 30%, en contraste, el esteroide Figura12 [b] debe pasar el barrido hasta las células vivas, para el perfil de penetración del esteroide, se puede ver que la sustancia fue detectada en todas las capas del EC encima de las células vivas.

En la tabla 3 se muestran los fármacos que han sido evaluados al aplicarse en piel haciendo uso de la técnica del TS para estudiar su penetración a través de ella.

Tabla 3. Investigaciones utilizando la técnica de TS como un método para determinar la diferente permeación en piel [3]

INVESTIGACIÓN	RESULTADO	AUTOR, (AÑO)
Efecto de Azone y Transcutol sobre la permeación en piel humana de naproxeno sódico formulado en geles PF-127.	La combinación de azona y transcutol aumenta la penetración de naproxeno sódico comparado con la formulación únicamente conteniendo transcutol.	Escobar–Chavez <i>et al.</i> (2005) [80]
Administración de Piroxicam de un gel comercialmente disponible bajo la aplicación de iontoforesis.	La cantidad total de droga recuperada en el EC post-iontoforesis fue significativamente más alta que la que se recuperó luego de difusión pasiva.	Curdy <i>et al.</i> (2001) [81]
Efecto de hidroxipropil-P-ciclodextrin (HP-P-CD) sobre la penetración cutánea y activación de etil 4-bipenililacetato (EBA) usando piel de ratón <i>in vitro</i> .	El efecto aumentando de HP-P-CD sobre la penetración de EBA se atribuye en gran parte a un aumento en la concentración del ungüento EBA.	Arima <i>et al.</i> (1998) [82]
Producción y caracterización de una dispersión de Monoleina (MO) para liberación cutánea de indometacina.	Con reflectancia espectroscópica se demostró que la incorporación de indometacina dentro de la dispersión de MO puede ser realizada. El uso de TS corroboró esta conclusión.	Espósito <i>et al.</i> (2005) [83]
Películas unilaminares de Eudragit E100 preparadas con carga de nanopartículas de naproxeno comparadas contra películas convencionales.	Los estudios de penetración <i>in vivo</i> no mostraban diferencia estadísticamente significativa para la penetración de naproxeno en el EC y la profundidad de penetración para las dos películas. Las películas formuladas con dispersión de nanopartículas son eficaces para la administración transdermal de naproxeno.	Ganem-Quintanar <i>et al.</i> (2006) [84]

Investigación en piel de oreja de cerdo como un sustituto de piel humana en la medición de fármacos tópicos biodisponibles por secuencia de TS en el EC.	La piel de oreja de cerdo <i>ex vivo</i> es una prometedora herramienta para la evaluación y optimización de una formulación tópica.	Herkenne <i>et al.</i> (2006) [85]
Estudio de la difusión de cobre a través de EC humano <i>in vivo</i> luego de la puesta en práctica del metal como polvo sobre el antebrazo por períodos de hasta 72 h.	El cobre al oxidarse puede penetrar el EC después de que se forma un par iónico con exudados de piel. La ruta de reacción parece depender del tiempo de contacto y disponibilidad de oxígeno	Hostynek <i>et al.</i> (2006) [86]
Comparación de la biodisponibilidad de ketoprofeno en una formulación de gel fotoestabilizado sin fotoprotección usando un nuevo modelo de penetración dermatofarmacocinético de TS <i>ex vivo</i> usando piel humana.	La comparación de la cantidad de ketoprofeno en la piel después de 45 min con la cantidad a las 36 h sugiere un cambio en la actividad termodinámica de ketoprofeno durante la exposición.	Lodén <i>et al.</i> (2004) [87]
Cinética de penetración de SLs (Lactones de sesquiterpeno) en preparaciones de <i>Árnica montana</i> usando un método de TS en piel de cerdo como modelo.	La preparación en gel presentaba un decremento en la ruta de penetración, mientras que la ruta de penetración de ungüento era constante con el tiempo, la cantidad total de SLs depende solamente de la clase de formulación y el contenido de SLs pero no sobre la composición de SLs o sobre la extracción del agente usado.	Wagner Steffen <i>et al.</i> (2006) [88]
Experimentos de penetración de ácido flufenámico para investigar varios tiempos de incubación con tres diferentes tipos de piel, usando el modelo	Una línea directa de correlación fue encontrada entre EC/coeficiente de partición de agua y la cantidad de fármaco penetrada dentro del EC para	Wagner Heike <i>et al.</i> (2002) [89]

de penetración Saarbruecken.	todos los intervalos de tiempo probados.	
Efecto de dosis y frecuencia de aplicación sobre la penetración de acetónido de triamcinolona (ACTA) en EC humano <i>in vivo</i> .	Cantidades considerables de ACTA fueron retenidas dentro del EC independientemente de la dosis y frecuencia de aplicación.	Pallenda <i>et al.</i> (2006) [90]
Mantener la actividad bactericida de nanocápsulas de clorhexidina contra <i>staphylococcus epidermidis</i> inoculado en piel de oreja de cerdo.	Aplicación tópica de clorhexidina base-cargada positivamente de nanocápsulas en un gel acuoso activado consiguiendo un aumento sostenido de actividad bactericida contra <i>staphylococcus epidermidis</i> por al menos 8 h.	Lboutounne <i>et al.</i> (2002) [91]
Diseño de un ácido retinoico trans (RA) realizando un sistema tópico que modifique los parámetros de difusión de fármacos en el vehículo y la piel, con la finalidad de reducir la absorción sistemática y los efectos secundarios asociados con la aplicación tópica del fármaco en la piel.	La encapsulación de RA no solamente prolonga la liberación del fármaco sino que también promueve la retención del fármaco en piel viable.	Fresno-Contreras <i>et al.</i> (2005) [92]
Comportamiento de una película bioadhesiva conteniendo lidocaína <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> .	Experimentos <i>in vivo</i> con TS indican que la presencia de agua durante la aplicación de la película es esencial para activar no solamente la adherencia correcta sino también una acumulación efectiva.	Padula <i>et al.</i> (2003) [93]
Eficacia queratolítica de preparaciones tópicas conteniendo ácido salicílico en humanos por TS y cuantificación del activo en EC por análisis de proteínas	TS combinado con análisis de proteínas fue detectado sensiblemente el efecto queratolítico de ácido salicílico con horas de aplicación.	Bashir <i>et al.</i> (2005) [63]

<p>Una técnica sintética nueva para sintetizar el pro-fármaco retinil ascórbico (RA-AsA) ester desde all-trans-retinol clorado (RA) y l-ácido ascórbico (AsA) suspendido en etanol a baja temperatura.</p>	<p>Los datos indican el valor potencial pro-fármaco RA-AsA para tratar el daño en piel resultado de UV inducida por la producción de radicales libres.</p>	<p>Abdulmajed <i>et al.</i> (2004) [94]</p>
<p>La sustitución de glicerina corrige cada uno de los defectos en aquaporina-3 (AQP3) en ratones nulos.</p>	<p>Las conclusiones establecen una base científica para la práctica empírica mayor a 200 años que incluye glicerol en cosméticos y formulaciones medicinales para piel programadas para influenciar sobre la retención de agua y las funciones mecánicas biosintéticas del EC.</p>	<p>Hara <i>et al.</i> (2003) [95]</p>
<p>Contribución de la barrera de EC y perfusión de microvasculas en determinación dermal en niveles tisulares de fármacos hidrolíticos (aciclovir y penciclovir) <i>in vivo</i>.</p>	<p>No había ninguna relación entre la profundidad de fibra y la cantidad de fármaco dializada que sugiere un libre movimiento del fármaco antiviral sobre la investigación del desarrollo acuoso de la dermis.</p>	<p>Morgan <i>et al.</i> (2003) [96]</p>
<p>La determinación dermal <i>in vitro</i> distribución de una nueva clase de lipofílico, altamente potente y unicamente selectivo anti-VZV nucleosido análogo comparado con aciclovir.</p>	<p>La distribución tópica de esos compuestos es altamente prometedora como una primera nueva línea de tratamiento para infecciones VZV.</p>	<p>Jarvis <i>et al.</i> (2004) [97]</p>
<p>Efecto de CpG oligodeoxynucleotido (CpG-ODN) sobre la respuesta inmune a un antígeno aplicado para TS en piel de ratón evaluando la producción de citocinética y Ig isótopos.</p>	<p>Administración de CpG ODN completamente en piel es una muestra estratégica para pacientes con enfermedades como dermatitis atópica que es caracterizada por Th2-inflamación dominante.</p>	<p>Inoue <i>et al.</i> (2005, 2006) [98,99]</p>

Efecto de sucroésteres (oleato y laureato en agua o Transcutol (TC) sobre la penetración cutánea <i>in vivo</i> de 4-hidroxibenzonitrilo (4-HB).	La combinación de sucroésteres (oleato o laureato) y TC modifica temporalmente las propiedades del EC, incrementado la penetración del 4-HB.	Ayala-Bravo <i>et al.</i> (2003) [100]
Absorción de 4-cianofenol (4CP) en humanos usando experimentos de TS para medir las condiciones bajo qué difusión se modifican los resultados de TS.	Las concentraciones no son significativamente afectadas por t_{TS} .	Reddy <i>et al.</i> (2002) [75]
Desarrollo de un método sensitivo para la determinación de polietilen glicoles con diferentes pesos moleculares (MW) en el EC humano obtenido con TS.	El método presentado es útil para estudiar la permeabilidad en piel normal.	Jakasa <i>et al.</i> (2004, 2007) [101,102]
Dependencia existente de la permeabilidad percutánea sobre peso molecular con diferentes modelos de fármacos.	La interrupción no solamente es en cantidades altas, también en más variedades químicas (moléculas largas) pueden penetrar dentro de la piel en la presencia de una barrera comprometida comparada con piel normal.	Tsai <i>et al.</i> (2003) [103]
Penetración <i>in vitro</i> de octil metoxicinamato (OMC) encapsulado en nanopartículas de poli(E-caprolactona) a través de piel de oreja de cerdo.	Encapsulación de nanopartículas de OMC incrementan la biodisponibilidad con el EC.	Álvarez-Román <i>et al.</i> (2004) [104]
Perfil de distribución <i>in vivo</i> de OMC contenido en nanocapsulas (NCs) a través del EC. La comparación con una nanoemulsión (NE) y una convencional o/w emulsión	La NE incrementó la extensión de OMC penetración con respecto a la penetración conseguida por NCs o EM.	Olvera –Martínez <i>et al.</i> (2005) [105]

(EM)		
Cuantificación de cuatro acciones ordinarias de agentes de pantalla solar, concretamente 2-metoxibenzofenona, 2-etilhexil-p-metoxicinamato, 2-etilhexilsalicilato (octilsalicilato) y ácido salicílico 3,3,5-trimetilhexil ester en un rango de matrices biológicas.	Un estudio clínico preliminar demostró una significativa penetración de todos los agentes de pantalla solar sobre la piel como bueno desde oxibenzona a través de los metabolitos de la piel.	Sarveiya <i>et al.</i> (2004) [106]
La cantidad de pantalla solar presente sobre la piel de gente en la playa.	Las mejores áreas protegidas fueron la parte superior del brazo y décolleté, pero incluso en estas áreas la mayoría de los voluntarios habían aplicado solamente 10% del nivel de COLIPA.	Lademann <i>et al.</i> (2004) [107]
Penetración de dióxido de titanio (TiO ₂) y metileno bisbenzotriazolotetrametilbutilfenol (MBBT) incluido en una formulación de pantalla solar de amplio espectro en piel humana <i>in vivo</i> usando el método de TS y <i>in vitro</i> usando una propuesta compartimental.	Estudios de penetración <i>in vivo</i> y <i>in vitro</i> mostraron una falta de penetración de TiO ₂ en las capas de piel viables completamente en senderos transcorneales o transfoliculares y una insignificante absorción de transcutáneos de MBBT.	Mavon <i>et al.</i> (2007) [108]
Permeación de piel humana <i>in vitro</i> y la distribución de geranyl nitrilo (GN).	La exposición sistémica resultado del uso de GN como un ingrediente de fragancia bajo las condiciones no incluidas, serían bajos basados sobre el reporte concurrente de los niveles en uso.	Brian <i>et al.</i> (2007) [109]
Desarrollo de un método para investigar el cierre de represas por diferentes formulaciones.	La aplicación de nata de barrera no puede reemplazar otras medidas protectoras y debe ser	Teichmann <i>et al.</i> (2006) [110]

Modelo penetrante: Patente V azul.	usado máximamente para impedir pocas molestias o en combinación con otros protectores o en áreas del cuerpo donde otras medidas protectoras no se pueden aplicar.	
Penetraciones altas de tinturas hidrofílicas y lipofílicas dentro de la piel usando aceite puro o agua, comparando ellos con una emulsión o/w.	Las diferencias en el reparto y la localización de ambas tinturas dentro del EC fue observado. Estas diferencias dependen de las propiedades fisicoquímicas de ambos vehículos y las tinturas.	Jacobi <i>et al.</i> (2006) [111]

6. MICRODIÁLISIS

La microdiálisis consiste en el intercambio de moléculas a través de una membrana porosa, siguiendo gradientes de concentración, lo que permite extraer o introducir sustancias en matrices químicas complejas. Esta técnica ha sido de gran utilidad en el control o vigilancia de compuestos libres, de bajo peso molecular, presentes en el medio extracelular. Se puede realizar prácticamente en cualquier tejido o fluido biológico. Actualmente la microdiálisis tiene una gran aplicación en investigación básica en animales de experimentación, diagnóstico y terapéutica en humanos. Esto se evidencia en el gran número de publicaciones sobre sus aplicaciones en los últimos años.

El uso de la microdiálisis en la clínica ha aumentado en los últimos años, especialmente en pacientes en estado crítico, por ser una técnica prácticamente inocua.

6.1. Teoría y principios de microdiálisis

6.1 .1. Principios de microdiálisis

Durante la última década la microdiálisis ha sido estudiada por un gran número de de investigadores, avalado por la abundante cantidad de publicaciones [112,113,114-134], por ser una técnica muy prometedora para la valoración de la entrega cutánea de fármaco. La técnica se está mejorando constantemente, pero está aún en desarrollo en el área dermatológica, allí tiene que ser dirigida en algunos casos, antes de que pueda ser vista como una técnica rutinaria para la medición cuantitativa de fármaco en piel.

Una fibra de microdiálisis consta de una membrana semipermeable que moldea un "tubo" hueco fino (típicamente de 0.2 - 0.5 mm de diámetro), que funcionalmente asemeja a un vaso sanguíneo. La fibra solamente admite el paso de moléculas con un volumen más pequeño que las aberturas en la membrana. Dependiendo de la prueba diseñada, la fibra tiene conectado al final un tubo impermeable que conecta a una microbomba y un tubo para muestra. El tubo muestreador debe poseer un volumen tan pequeño como sea posible minimizando la concentración al gradiente de difusión del fármaco probado después de la diálisis. Los diseños más habituales son el de sonda lineal, que actualmente no está disponible comercialmente, pero es imprescindible para

la manufactura de fibras artificiales de riñón [127,135], y el de sonda concéntrica que esta comercialmente disponible, pero que es bastante suntuoso en comparación con la versión casera (Figura 13).

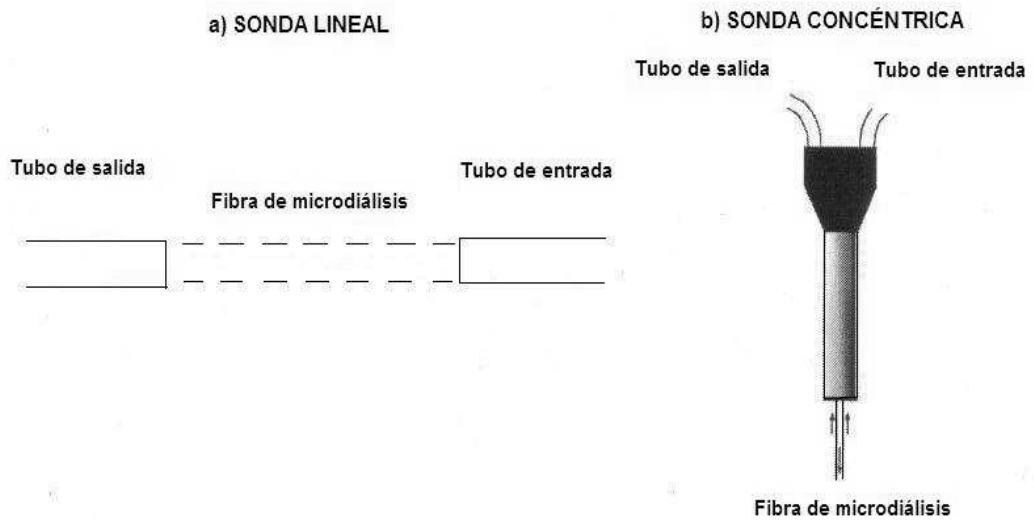


Figura 13. Ilustraciones de la sonda lineal (a) y la sonda concéntrica (b) de los diseños de tubos para microdiálisis. Las flechas indican la dirección del flujo del perfusante [136].

Para microdiálisis cutánea, la aguja es inoculada en la piel vía cánula (Figura 14). La fibra de microdiálisis es inyectada despacio (típicamente 0.1 - 5 mL/ minuto) con una solución fisiológica, que se equilibra con el fluido extracelular (FEC) del tejido circundante, cambiando sustancias más pequeñas que el valor límite de la membrana durante el viaje por la fibra (Figura 15).

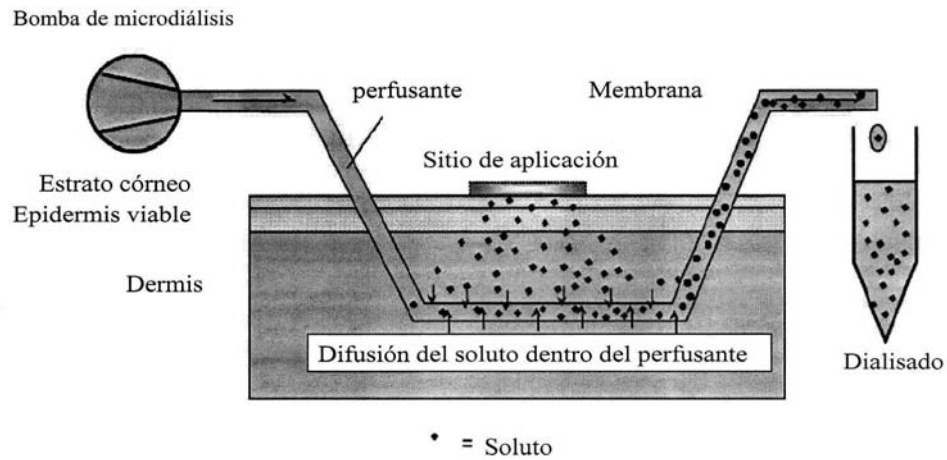


Figura 14. Esquema del principio de microdiálisis [136].

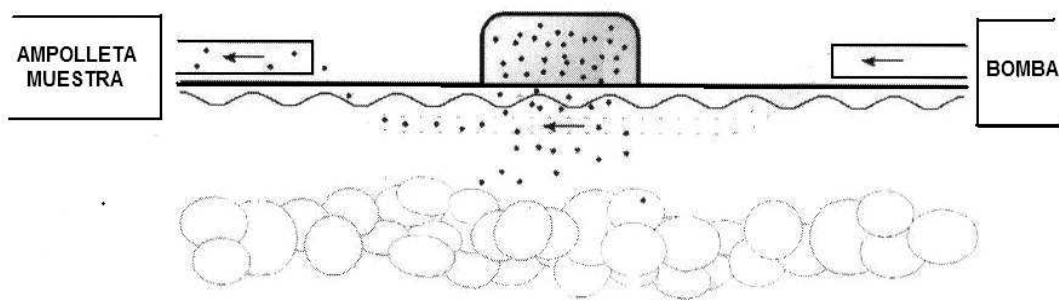


Figura15.- Retirado de sustancias desde una aplicación tópica con la técnica de microdiálisis en la dermis de la piel [136].

Al entrar el catéter de microdiálisis, la solución llega al límite, y dialisa la siguiente sustancia, la solución que se retira de la fibra es dialisada al límite. El intercambio de sustancias ocurre programado por gradientes de concentración de acuerdo con la segunda ley de difusión de Fick [137], y la velocidad del equilibrio es consecuentemente proporcional al tamaño del gradiente y a la ruta de difusión de la sustancia en el medio.

Como las sustancias pueden difundirse en ambas direcciones a través de la membrana, la microdiálisis puede principalmente ser usada tanto para extraer y repartir sustancias hacia el interior de los tejidos.

6.1. 2. Características de la microdiálisis

La característica principal de la microdiálisis es la posibilidad de medir niveles de sustancia directamente en el blanco tisular, que es muy útil para la comparación farmacocinética y respuestas farmacodinámicas.

La técnica permite el cálculo de ambas sustancias endógenas y exógenas en la mayoría de los tejidos y órganos, y también puede ser usado para la entrega de sustancias en tejidos. Debido al límite típicamente bajo de valores de membranas de microdialisis, las muestras son proteínas libres y fácilmente analizables sin la necesidad de la purificación analítica adicional. Las proteínas libres y la fracción del fármaco libre son, por lo tanto, determinadas directamente. Como el nivel de fármaco libre en general corresponde con la respuesta farmacodinámica hacia el interior de los tejidos, a esta característica se le añade la relación lógica del fármaco. Fibras con valores de límite más altos (KDa de 100 - 3000) también pueden estar disponibles si la muestra de macromolécula o de proteína es la meta [138].

El perfil farmacocinético puede ser de una alta solución temporal dependiendo principalmente de la ruta de circulación del perfusante y el método analítico (sistemas analíticos en línea se pueden establecer para monitorear continuamente los niveles de fármaco) [139].

Además, la técnica es mínimamente invasiva y solamente implica un trauma menor revocable por la inserción de la guía cánula usada para la microdialisis [127,140-143].

6.1.3. Recuperación

La partición de una sustancia entre la perfusión y el FEC depende de la composición de la perfusión y las propiedades hidrofílicas y lipídicas del FEC que rodea la fibra de microdiálisis dentro del tejido, más, debido a la breve duración del viaje de la perfusión por la fibra, no se consigue a menudo. La fracción de fármaco, que es colectada en el dialisado es relativa en comparación con el verdadero FEC, la concentración de fármaco no unido está condicionada por la respectiva recuperación. La

cantidad total de fármaco colectado en el dialisado es definido como la recuperación total.

La respectiva recuperación es en teoría independiente de la concentración y del coeficiente de partición, pero es proporcional a la cantidad, que se difunde en el perfusante.

Esto es un requisito esencial para la puesta en práctica de la microdiálisis para calcular los verdaderos niveles de un compuesto extracelular. Sin embargo, problemas técnicos como por ejemplo la adherencia del compuesto de interés para la prueba de microdiálisis hace una investigación independiente de la concentración obsoleta, y deber ser por lo tanto probada *in vitro* antes del inicio de un estudio de microdiálisis [144], para evitar problemas posteriores.

La recuperación total de la sustancia es un parámetro crítico para el éxito de la técnica de microdiálisis. Una recuperación total baja disminuirá proporcionalmente las concentraciones de la muestra y/o resultará en períodos demasiado largos. Además de los volúmenes de muestra bajos (típicamente 10 – 100 μL) obtenido en microdiálisis debido a la ruta de circulación baja del perfusante.

La recuperación del fármaco es afectada por algunos parámetros que pueden ser manipulados para incrementar el contenido de fármaco contenido en las muestras (Tablas 4 y 5).

Tabla 4.- Correlación teórica entre varios factores que influyen en la recuperación relativa y absoluta de sondas de microdiálisis para una total libertad indeterminada de concentración del fármaco en la piel [136].

Recuperación	Área de membrana	Flujo del perfusante	Temperatura	Difusividad alrededor del tejido	Solubilidad del perfusante	Límite de libre fracción FEC	Profundidad de implantación
Relativa	↑	↓	↑	↑	↑	↔	↔
Absoluta	↑	↓ ↑	↑	↑	↑	↑	↓

Tabla 5.- Parámetros que aumentan la recuperación relativa [136].

PARÁMETROS CON LOS QUE LA RECUPERACIÓN RELATIVA AUMENTA	PARÁMETROS CON LOS QUE LA RECUPERACIÓN RELATIVA AUMENTA TOTALMENTE
Área de superficie más grande de la membrana de la microdiálisis [144,145].	Los factores que incrementan la respectiva recuperación (potencialmente aparte de la disminución de la ruta de circulación).
Disminución de la circulación del perfusante [144,146].	Las concentraciones de tejido totales de la sustancia [144].
Una temperatura más alta también acelera el proceso de equilibrio, de acuerdo con el patrón de las leyes de la física para difusión [144,147].	La alta circulación del perfusante.
Una alta difusividad del fármaco en los tejidos circundantes /FEC [148].	La profundidad de implantación para el sitio de aplicación [114,115,119,120, 134,144].
Alta afinidad entre la sustancia y el perfusante, que incrementará el las coeficiente de partición del fármaco entre el perfusante y FEC [148].	

La mayoría de estos parámetros son optimizados al inicio de un experimento de microdiálisis y se estiman como constantes que no producen variabilidad en el resultado del estudio. Sin embargo, se bifurcan las diferentes propiedades inter.-e-intraindividuales del tejido causando las diferencias entre los experimentos [122,123,134] y podrían no sufrir cambios durante el experimento [122,123]. La recuperación relativa debe ser individual resuelta preferentemente por la misma persona y por lo tanto para cada investigación si es posible, monitoreada durante el experimento.

Las dos variables principales en la piel son la autorización del fármaco de los tejidos circundando la membrana de microdiálisis, que es afectada por la actividad enzimática y el suministro de sangre del vaso capilar (dependiendo de la mejor ruta de la eliminación) y el coeficiente de partición entre los tejidos y el perfusante, que es afectado por lipoficidad y pH de los tejidos / FEC circundantes. Para permitir las comparaciones entre estudios y correlacionar los efectos farmacodinámicos al perfil farmacocinético de un fármaco, el énfasis debe ser hecho para obtener respectivos valores de recuperación tan cerca como sea posible de los valores verdaderos.

Algunos métodos han sido usados para valorar la recuperación relativa en los experimentos de microdiálisis, los resultados de los métodos *in vitro* no son a menudo indicadores seguros para la recuperación *in vivo* [144]. Sin embargo, estos métodos son aplicados para asegurar un gradiente de concentración independiente inicialmente a menudo con equipo de microdiálisis y proveen un cálculo aproximado de la magnitud de la recuperación *in vivo*.

De los métodos *in vivo*, uno de los más seguros es el método de retrodiálisis [137, 145, 149, 150] y los métodos "puntos sin flujo neto", estos requieren un estado de concentración estable y firme y utilizan el principio de la difusión de la sustancia del perfusante. Dentro del tejido ocurrirán concentraciones inferiores al valor del tejido verdadero y opuesto para las concentraciones más altas [135]. El método experimental más habitual para estimar la recuperación en microdiálisis cutánea *in vivo* es el método de retrodiálisis.

6.1.3.1. Retrodiálisis

La retrodiálisis es el método que mide la pérdida del fármaco desde el perfusante y además, parte del supuesto de que la red transporta fármaco a través de la microdiálisis membranal del perfusante dentro del tejido circundante igual que la red transporta desde los tejidos dentro del perfusante. La recuperación relativa (RR) es calculada de la siguiente manera:

$$RR = (C_{\text{perfusante}} - C_{\text{dialisante}}) / (C_{\text{medio}} - C_{\text{perfusante}})$$

Un requisito esencial para el cálculo correcto de la recuperación relativa con este es por lo tanto una concentración insignificante del compuesto en el FEC. La ecuación para el cálculo de la recuperación relativa con el método de retrodiálisis es por lo tanto a menudo abreviado a:

$$RR = (C_{\text{perfusante}} - C_{\text{dialisante}}) / (C_{\text{perfusante}})$$

Hasta la fecha, los valores de recuperación de microdiálisis subcutánea han sido calculados por el método de retrodiálisis en distintos experimentos [115,116,134] con la sustancia de interés en experimentos anteriores o posteriores [119], que no permiten la corrección de las diferencias interindividuales típicas de la respectiva recuperación. Adicionalmente, cuando la respectiva recuperación varía durante el experimento, el enfoque podría resultar en cálculos aproximados, corregidos o distorsionados de las verdaderas concentraciones obtenidas en los tejidos [122, 123].

Para monitorear la recuperación durante el experimento, retrodiálisis por calibrador (también referida como “norma interna” o “método de referencia”) ha sido introducida la microdiálisis en pulmón / sangre [151], cerebro [152] y como monitor endógeno de glucosa dentro de la piel [149,153-155]. Recientemente, esta técnica también ha sido aplicada con éxito en estudios para la entrega cutánea de fármaco [122,123]. El calibrador debe tener propiedades fisicoquímicas y una farmacocinética local que será un indicador seguro para los cambios de los niveles de recuperación. Si la respectiva recuperación del calibrador es diferente del fármaco de interés significativamente, la proporción entre los dos deben ser determinados subsecuentemente o antes del experimento por adición de ambos para el perfusante [152] y la relativa recuperación del fármaco durante el experimento puede ser calculada de acuerdo con:

$$RR = (C_{\text{perfusante}} - C_{\text{dialisante}}) / (C_{\text{perfusante}}) \times (RR_{\text{fármaco}}) / (C_{\text{perfusante}})$$

6.1.4. Invasividad

Los traumas de piel producidos por el procedimiento de implantación del catéter, incluyen un aumento en el flujo de sangre, eritema en la piel y liberación de histamina [140-143,156-158]. Cuando la recuperación del fármaco es afectada por las alteraciones en el flujo de sangre y los otros parámetros, que es infringido por la implantación de la prueba de microdiálisis, esta debe ser disminuida antes del inicio del experimento. Los estudios han indicado que en el diseño de investigación, las especies y la anestesia son importantes factores que determinan la duración del trauma. Groth *et al.* Estudió los traumas de piel en ratas [141,158] y seres humanos [142] siguiendo la inserción de sondas lineales de microdiálisis con un ancho de vía de 21 (0.8 mm de diámetro interior).

Los estudios presentan un incremento inicial en el flujo de sangre, grosor de la piel y los niveles de histamina en ratas, que se fueron normalizando aproximadamente 30 minutos después de la inserción, en piel (30 % del grosor normal), no se redujo significativamente durante los experimentos. Observaciones similares fueron hechas en seres humanos; sin embargo, los efectos vasculares requerían que en un mínimo de 90 minutos para que se normalizaran. La inyección simultánea de lidocaina reduce los efectos vasculares del trauma. Anderson *et al.* encontró una normalización del incremento de flujo de sangre [140] en seres humanos 60 minutos después de la inserción de una sonda concéntrica de unos 0.5 mm de diámetro exterior, obteniéndose una normalización estándar de los niveles de aumento de histamina [157] después de 40 minutos. También ha sido demostrado un decremento en el efecto vascular si los sujetos reciben anestesia local (mepivacaina) antes de la inserción.

Por la puesta en práctica inicial de crema de EMLA (lidocaina, Prilocaina), Petersen [143] observó un regreso de los niveles de sangre del punto de partida de circulación después de 40 minutos, seguido de la inserción en una sonda lineal con un guía cánula con un ancho de 23 (0.6 mm intradérmica) en seres humanos. En general aparecen pequeños traumas que se desarrollan después de la implantación de la prueba (o más correctamente, controlada por el uso de la cánula implantada) con el diámetro

más pequeño, y el aumento en sangre el flujo decrece más rápido en ratas comparado con seres humanos y por la puesta en práctica simultánea de anestesia local

Un estudio histológico de las capas celulares de piel de rata luego de la implantación de una sonda lineal (usando cánula con un ancho de vía de 25) después de 32 h, no muestra edema importante o acumulación de sangre alrededor de la sonda después de la implantación [127]. Sin embargo, se observa infiltración de linfocitos después de 6 h y desarrollo de una cicatriz después de las 24 h. En otro estudio, Ault *et al.* hizo una demostración de un aumento en el flujo transdermal *in vitro* de 5 - fluorouracil cuando una sonda concéntrica (cánula con un ancho de 21) fue inoculada [159] comparada con una sonda lineal (cánula con un ancho de 25) [127], demuestra que la interrupción de tejido era más grande por la inserción de una cánula concéntrica. La observación era más probable debido al pequeño diámetro de la guía cánula usada para la inserción de sonda lineal.

6.1.5. Limitaciones actuales y desafíos

La técnica de microdiálisis ha demostrado ser aplicable a múltiples tejidos y órganos para muestrear numerosas y diferentes sustancias. Hoy en día existen desafíos importantes para la técnica de microdiálisis en el muestreo de sustancias lipofílicas [144,160]. Las limitaciones actuales para la muestra de sustancias muy lipofílicas están relacionadas a la naturaleza hidrofílica del perfusante solicitada en la mayoría de los experimentos de microdiálisis y las posibilidades de adhesión del fármaco para ese equipo de microdiálisis. Actualmente, un buffer isotónico acuoso, por ejemplo, una solución salina es utilizada a menudo como perfusante en el que las sustancias lipofílicas tienen una solubilidad baja por consiguiente tendrán una respectiva recuperación baja. La baja solubilidad de las sustancias lipofílicas pueden principalmente disolverse con la adición de solventes (por ejemplo polietilen glicol, ciclodextrinas, lípidos y proteínas) al perfusante [161-163] o cambiando el pH del perfusante si la sustancia es ácida o alcalina. Sin embargo, algunas consideraciones deben hacerse para asegurar la compatibilidad entre el perfusante y los de la fibra de microdiálisis.

Antes, la muestra de sustancias con volumen medio alto también se consideraba una limitación para la técnica de microdiálisis, sin embargo, con la reciente introducción de membranas de microdiálisis con un valor límite de alrededor de 3000 kDa [138,164], el desafío tiene preparado un cambio en los métodos analíticos donde los preparativos de la muestra pueden ser requeridos debido a la subsecuente introducción de macromoléculas y proteínas en el dialisado. Esto puede ser problemático con los volúmenes de muestra pequeños colectados típicamente (10-50 μ l). La purificación en línea de la muestra con turbulenta circulación cromatográfica [165] o métodos analíticos similares, han permitido disminuir este desafío.

Las limitaciones actuales y los desafíos de la microdiálisis prueban hoy una relativa recuperación, está, por lo tanto, también relacionada a las limitaciones analíticas. Estudios anteriores han utilizado esencialmente HPLC con detección UV para cuantificar niveles de sustancia en muestras de microdiálisis, que podría ser suficiente si la respectiva recuperación de la sustancia es alta. Sin embargo, estos métodos analíticos convencionales son a menudo la limitación de la aplicación de la técnica de microdiálisis para sustancias con baja recuperación [160]. La introducción reciente de los métodos de cromatografía líquida (LC) de microsonda / vaso capilar y detectores más sensibles, (espectrómetros de masas, biosensores, etcétera) para analizar muestras en microdiálisis, los métodos tienen que ampliar exhaustivamente la extensión de sustancias que pueden ser probadas y analizadas por la técnica de microdiálisis. Los aspectos analíticos de la microdiálisis han sido descritos con detalle por Davies *et al.* [166].

6.2. Investigaciones en animales

Hasta la fecha, todos los fármacos cutáneos han sido evaluados en estudios usando microdiálisis en animales. Una visión general de estos estudios se presenta en la tabla 6.

Tabla 6.- Resumen de la distribución de fármacos cutáneos estudiados usando microdiálisis en animales [136].

FÁRMACO	SONDA	PERFU SANTE	FLUJO DEL PERFUSAN TE ($\mu\text{L}/\text{min}$)	ESPECIES	RR (%)	Refs.
Enoxacin	Concéntrica 4 mm	Amortiguado	1	Ratas wistar	13-34	[124]
Diclofenaco	Concéntrica 10 mm	Amortiguado	1	Ratas wistar	80-90	[125]
Ondansetron	Concéntrica 10 mm (18 kDa)	Salino	1	Ratas	33 \pm 1.8	[126]
5-Fluorouracil	Lineal 5 x 0.2 mm (9 kDa)	Amortiguado	2	Ratas velludas	20-25	[125]
Ácido fusídico	Lineal 30 x 0.2 mm (2 kDa)	Buffer de fosfato pH 7.4, 2.5 mM glucosa	2	Ratas rasuradas	44 ^a	[159]
Betametaso na-17 - velerato	Lineal 30 x 0.2 mm (2 kDa)	Buffer de fosfato pH 7.4, 2.5 mM glucosa	2	Ratas rasuradas	38 ^a	[159]
Metotrexato	Concéntrica 10 x 0.5 mm (20 kDa)	Amortiguado, pH 6.5	1	Ratas wistar	n.d.	[128]
Valproato	Concéntrica 10 x 0.5 mm (20 kDa)	Amortiguado, pH 6.5	1	Ratas wistar	n.d.	[130]
Ciclosporina	Concéntrica 10 x 0.5 mm (20 kDa)	Amortiguado, pH 6.5	1	Ratas wistar	n.d.	[129]
Tranilat	Lineal 30 x 0.2 mm (2 kDa)	Tiroideo	3	Ratas wistar	n.d.	[118]

Ácido salicílico	Lineal 30 x 0.2 mm (2 kDa)	Buffer de fosfato pH 7.4, 2.5 mM glucosa	5	Ratas rasuradas	29±4	[116]
	Concéntrica 4 x 0.5 mm (20 kDa)	Tiroideo	3	Ratas wistar	4-5 ^b	[117]
Lidocaína	Lineal 30 x 0.2 mm (2 kDa)	Glucosa Amortiguado PH 6.5	1.2	Ratas wistar	69-91	[122]
Prilocaina	Lineal 30 x 0.2 mm (2 kDa)	Glucosa Amortiguado PH 6.5	1.2	Ratas wistar	58-98	[122]

n.d.: no determinado

^a solamente determinado *in vitro*

^b Determinado relativamente en toda la piel

6.2.1. Estudios de formulaciones de fármacos

La viabilidad de microdiálisis para muestras de 5 – fluorouracilo en la piel han sido demostradas por Ault *et al.* [127]. Se determinaron los niveles plasmáticos del fármaco siguiendo la aplicación tópica en seis ratas con pelo durante un período de 12 h. Una diferencia mayor a diez se observó en C_{ss} (se extiende de 0.03360±/0.008 a 0.3860±/0.30 µg / ml), Ilustrando la larga variabilidad de los niveles dermales del fármaco penetrado medido por la técnica de microdiálisis. Benfeldt y Serup [116] han investigado la penetración del ácido salicílico en ratas con pelo con el objetivo de investigar la función de barrera de la piel, luego del tratamiento con acetona, lauril sulfato de sodio y TS respectivamente. Las ABC del ácido salicílico determinado por la muestra de microdiálisis en la dermis de la piel muestran buena correlación con los valores de la pérdida de agua transepidermal y eritema, demostrando que la

microdiálisis es una técnica muy eficaz de valoración para la función de barrera de piel. El promedio de la recuperación relativa determinada por el método de retrodiálisis en experimentos distintos (n=11) fue $29\pm 4\%$ indicando ser independiente de la región anatómica de la rata.

Benfeldt y Groth [160] intentaron probar el ácido fusídico (log P=2.7, 97% de proteína depositada) y betametasona-17-valorada (log P=3.5, baja proteína depositada) en ratas por la técnica de microdiálisis, usando una solución de glucosa estándar como perfusante. Dejaron de recuperarse el ácido fusídico en el dialisado y solamente se colectó una muy baja muestra de betametasona-17-valorada. Este estudio ilustró el desafío actual de la muestra lipofílica, fármacos y proteína con destino en el tradicional perfusante acuoso aplicados por microdiálisis hoy en día para la mayoría de los experimentos cutáneos.

6.2.2. Aplicaciones

6.2.2.1 Estudios de biodisponibilidad/bioequivalencia en animales

El primer informe sobre un estudio transdérmico de microdiálisis *in vivo* en animales fue realizado por Matsuyama *et al.* [128] en 1994, quien realizó un estudio de bioequivalencia con diferentes niveles de penetración (1 – [2-(decilidio) etil] azaciclopentano-2- uno, (- de HPE-101)) aplicable a un vehículo tópico. Los autores aplicaron con éxito la técnica de microdiálisis para diferenciar la acumulación dialisada entre cantidades de metotrexato durante 10 h desde la dermis de ratas wistar de acuerdo con los diferentes incrementos de niveles de vehículo. Matsuyama ha divulgado estudios con respecto al realce de la entrega de fármaco liberado en piel usando varias concentraciones de HPE – 101 en las formulaciones, utilizando la técnica de microdiálisis [129,130]. Los estudios muestran que niveles de valproato y ciclosporina en ratas podían ser significativamente incrementados, arriba de 80 veces para valproato y 7 veces para ciclosporina.

Las rutas dérmicas de absorción fueron medidas para relacionar la parte lineal de cantidad acumulada del fármaco en el dialisado contra tiempo. Una Curva lineal de la

cantidad acumulada de fármaco contra el tiempo es solamente obtenida en niveles de fármaco regular con muestras de microdiálisis (dermis), donde el aumento fraccional de la cantidad acumulada es la misma.

Los parámetros de bioequivalencia están actualizados en mediciones de curva C_{ss} , que es proporcional a la ruta de absorción e inversamente proporcional a la ruta de eliminación y volumen de distribución, suministrando el promedio para estos parámetros.

Un aumento sólido en niveles dermales de tranilast, en términos de C_{ss} y área bajo la curva (ABC), por aplicación tópica en un vehículo que contiene un máximo de 20% de ácido de oléico y 0-10% de propilen glicol (PG) también ha sido demostrado mediante el uso de la técnica de microdiálisis [118]. El estudio demuestra una buena correlación entre el respectivo aumento de C_{max} y ABC entre las seis formulaciones en dermis y en plasma, respectivamente, indicando que los incrementos aumentan a ambas entregas dermales y transdermales. Los niveles dermales (determinados por ABC) obtenidos fueron arriba de 400 veces mayor que la siguiente aplicación tópica comparada con la inyección intravenosa de una dosis similar de tranilast. El estudio es una excelente demostración de administración tópica como la ruta primaria de elección para el futuro tratamiento con tranilast e hipertróficos para cicatrices queloides.

La respectiva recuperación *in vivo* no fue calculada en ninguno de los estudios antes mencionados y no se reportan las concentraciones dermales de los fármacos, por consiguiente, no es un indicador confiable de verdaderas concentraciones infinitas en tejidos y comparaciones entre diferentes tejidos, la técnica de valoración debe realizarse con mucha precaución. Sin embargo, estos estudios demuestran el tremendo potencial de la técnica de microdiálisis para estudios de bioequivalencia y biodisponibilidad para optimizar vehículos de actualidad para la entrega cutánea de fármacos.

El efecto de ácido oléico sobre la entrega dermal también ha sido demostrado por Ding *et al.* [126], usando clorhidrato de ondansetron como fármaco modelo, ambos ácidos oléicos al 2 y 5 % en PG aumentan la recuperación comparada utilizando solamente PG y también se encontró que el intervalo de tiempo fue substancialmente menor.

Murakami *et al.*. [117] tiene publicado un estudio evaluando el efecto de diferentes vehículos tópicos sobre la absorción dermal de ácido salicílico comparado con niveles sistémicos. Se observó una diferencia 100 veces mayor entre C_{\max} y ABC de niveles dérmicos de ácido salicílico, con una emulsión acuosa u oléica.

La proporción entre ABC_{dermal} y $ABC_{\text{plasmática}}$ se bifurcó entre las formulaciones, el autor asume que la diferencia de los vehículos habilita la retención del fármaco en la piel, incrementando la liberación transdermal del fármaco. Éstos resultados enfatizan la relevancia del estimado de la distribución cutánea del fármaco en la dermis que puede ser hecha en la actualidad solamente *in vivo* por la técnica de microdiálisis.

La recuperación de ácido salicílico fue determinada como el coeficiente de concentración entre el dialisado (solución tiroidea) y extirpación de piel de la rata sacrificada y fue calculado obteniéndose un valor entre 4-5 %. Esto es de 6 a 7 veces más bajo y fue calculado por el método de retrodiálisis [116], esta cantidad es presumiblemente atribuible a la distribución entre el fármaco liberado en el FEC y la concentración en piel.

La microdiálisis ha sido recientemente aplicada también para medir la distribución de fármacos cutáneos utilizando iontoforésis [124,125], la técnica parece ser una herramienta prometedora, cuando la iontoforésis es principalmente usada con moléculas ionizadas y muy polares. Fang *et al.*, evaluó la influencia de las formulaciones en hidrogel sobre la penetración dérmica de diclofenaco [125] y enaxin [124], respectivamente. Dos polímeros (polivinilpirrolidina e hidroxipropil metilcelulosa) se utilizaron para el hidrogel de diclofenaco, cualquiera de los dos solo o combinado y en el último se aumentó la penetración con aceite de cardamomo. Aun cuando la liberación relativa *in vivo* sea muy alta (80 - 90 %), el diclofenaco apenas fue detectable en el dialisado cuando no fue aplicado un incremento del aceite. Doce horas de pretratamiento con aceite de cardamomo incrementaron significativamente los niveles dermales de fármaco y elevaciones adicionales de FEC se observaron para las cuatro formulaciones cuándo fue aplicada iontoforesis. En el último estudio, se revisó el efecto de pH y la adición de azona para los hidrogeles en la entrega iontoforética de enaxin a la piel. Niveles de fármaco dérmico pueden ser demostrados por el uso de hidrogel no amortiguado o la adición de azona comparado con un hidrogel amortiguado en pH 5.

La influencia de una microemulsión tópica compuesta sobre la absorción cutánea de un fármaco lipofílico (lidocaína) y un fármaco hidrofílico (hidroclorato de prilocaína), se investigó en ratas wistar [122]. Por medio de la retrodiálisis se encontró un alto porcentaje de recobro *in vivo*. Para el caso de lidocaina (69-91 %) y prilocaína (58 - 98 %) usando un perfusante acuoso isotónico a pH 6.5 para monitorear la respectiva recuperación durante los experimentos, el estudio introdujo a la retrodiálisis como método calibrado. Además, la técnica de microdiálisis permitió la demostración de la influencia significativa de la composición de microemulsión en la entrega de fármacos dermales.

6.2.2.1.1. Estudios de administración de fármacos mediante microdiálisis en humanos

La primera publicación estudiada de una microdiálisis cutánea fue un estudio de absorción de etanol en la piel por Anderson *et al.* [120]. El estudio demostró que el etanol traspasa la piel y se maximizan los niveles dérmicos desde 15 a 800 mg/ml entre sujetos durante el período de muestra. El dialisado fue, sin embargo, probado durante 50 minutos y solamente se colectó dos veces en cinco de los sujetos, y una vez en cuatro de los sujetos. En un estudio posterior, Anderson *et al.* [121] extendió ese estudio de la concentración percutánea de disolventes orgánicos probados por microdiálisis incluyendo isopropanol y por medición de un incremento temporal de resolución (prueba colectada cada 10 minutos durante 140 minutos) niveles detectables de etanol e isopropanol se encontraron presentes en la dermis después de 20 minutos en todos los sujetos para llegar a un período estacionario después de 100 minutos. El grupo de investigación también ha publicado un informe preliminar que demostró que lidocaína y prilocaína podían ser probadas en la dermis por la técnica de microdiálisis [133].

Comparable a sus estudios en ratas, Benfeldt *et al.* [115] investigó la penetración cutánea de ácido salicílico a través de piel normal y dañada en seres humanos. La respectiva recuperación del fármaco se determinó en dos personas por separado y se calcularon obteniéndose de 24 ± 4 %, que eran considerablemente diferentes de la recuperación *in vitro* recuperando (80 ± 3 %), Ilustrando la falta de fiabilidad *in vivo* sobre

los resultados *in vitro*. El ácido salicílico pudo ser detectado en el dialisante, a los 10 minutos después de la aplicación en piel tanto normal como dañada, demostrando que a intervalos de tiempo contra la penetración cutánea está considerablemente incrementada en relación con ABC de los perfiles de concentración y tiempo en la piel. La técnica de microdiálisis demostró ser considerablemente más sensible que el TEWL (la pérdida de agua de transepidermal) y eritema para medir la función de la barrera de permeabilidad de la piel. La penetración fue medida en cuatro diferentes ubicaciones sobre el antebrazo izquierdo, a una distancia equivalente equitativamente del codo a la mano. No se observó ninguna variación intra regional en la función de barrera de la piel.

La viabilidad de la microdiálisis para un estudio de la entrega iontoforética de fármaco en seres humanos ha sido demostrada subcutáneamente con propranolol como fármaco modelo [131].

El perfil farmacocinético de nicotina dentro de la dermis siguiendo la aplicación de una muestra recomendada comercialmente (Nicotinell TTS 20, Ciba - Geigy), ha sido informado por Hegemann *et al.* [114], detectándose niveles de fármaco en las muestras de microdiálisis aproximadamente entre 120 - 150 minutos después de la aplicación en nueve sujetos y llegar a una fase estacionaria dentro de 330 - 360 minutos. Sin embargo, se observó variabilidad interindividual de $C_{m\acute{a}x}$ desde 500 a 2140 ng/ml.

Se han investigado también, los niveles de nicotina en capas de tejido cutáneo-subcutáneos aplicando Nicotinell TTS 30, Ciba-Geigy (21 mg /24 h)), por Müller *et al.* [134]. Se encontró una buena correlación entre ABC y sondeo de la profundidad. También se investigó la permeación de un sistema transdermal de estradiol de una formulación Estraderm TTS (100 μ g / 24 h); sin embargo, el fármaco dejó de recuperarse en las cantidades detectables en el dialisado con sondas que se extienden a unas profundidades de 5 a 10 mm. El respectivo recobro de fármaco *in vivo*, fue calculada en distintos días por el método de retrodiálisis en rangos de 25 a 36 % para nicotina y 1 a 3 % para estradiol.

Nicotinato de metilo dermal se encontró solamente en dos de tres sujetos cuando una dosis (100 mM) se aplicaron tópicamente durante 10 minutos. utilizado en estudios *in vitro* se determinó una recuperación alta (66 % hasta 1 μ L/min de flujo) [132].

Cuando la formulación fue aplicada por 1 minuto, pudo ser detectada en cinco sujetos. Una rápida absorción y eliminación se demostró en piel extirpada *in vitro* usando microdiálisis con los mismos períodos de aplicación, solamente el estudio *in vivo* pudo haber sido dificultado por el corto período de aplicación, la rápida degradación del fármaco al interior de la piel en conjunto con la elevada capilaridad del flujo sanguíneo se debió al desarrollo extensivo de eritema / edema en el sitio de aplicación. Además la recuperación *in vivo* que no fue determinada pudo haber sido mucho más baja de lo que se demostró *in vitro*.

La administración transdérmica de diclofenaco en tejidos subcutáneos fue investigada adicionalmente por Müller *et al.* [119]. Las pruebas fueron definidas en dos capas de tejido de diferente grosor (3.9 ± 0.3 mm y 9.3 ± 0.5 mm). El diclofenaco fue solamente detectado en el dialisado en 11 de 20 sujetos, independientemente de la profundidad de la prueba y el ABC de la corriente de la concentración - curvas de tiempo de las dos implantaciones de los niveles investigados no fueron significativamente diferentes.

La administración de fármacos usando microdiálisis en humanos se presenta a continuación en la tabla 7.

Tabla 7.- Resumen de la distribución de fármacos cutáneas estudiadas usando microdiálisis en humanos [136].

FÁRMACO	SONDA	PERFUSANTE ($\mu\text{L}/\text{min}$)	FLUJO DE PERFUSANTE	RR (%)	Refs.
8- Metoxipsorales	Concéntrica 30x0.6mm (20 kDa)	Agua	2	25 ^a	[112]
Propanolol	Lineal 10 x 0.2 mm (20 kDa)	Amortiguado Lactato	3	53 \pm 14	[131]
Metil Nicotinato	Concéntrica 10 x 0.5 mm (20 kDa)	Amortiguado	5/1	26 / 65 ^a	[132]

Lidocaína	Lineal 30 x 0.2 mm (20 kDa)	Glucosa-amortiguado pH 6.5	1.2	56 – 95	[123]
	Concéntrica 4 x 0.5 mm (20 kDa)	Amortiguado	3	n.d.	[133]
Prilocaina	Concéntrica 4 x 0.5 mm (20 kDa)	Amortiguado	3	n.d.	[133]
Etanol	Concéntrica 10 x 0.5 mm (20 kDa)	Amortiguado	1	90	[120]
	Concéntrica 10 x 0.5 mm (20 kDa)	Amortiguado	3	n.d.	[121]
Isopropanol	Concéntrica 10 x 0.5 mm (20 kDa)	Amortiguado	13	n.d.	[121]
Ácido salicílico	Lineal 30 x 0.2 mm (20 kDa)	Buffer de fosfato pH 7.4, 2.5 mM glucosa	5	24±4	[115]
Nicotina	Concéntrica 10 x 0.5 mm (20 kDa)	Amortiguado	10	13 ^a	[114]
	Concéntrica 16 x 0.5 mm (20 kDa)	Amortiguado 7% albúmina	1.5	25 - 36	[134]
Estradiol	Concéntrica 16 x 0.5 mm (20 kDa)	Amortiguado 7% albúmina	1.5	1 - 3	[134]
Diclofenaco	Concéntrica 16 x 0.5 mm (20 kDa)	Amortiguado	1.5	66±12	[119]

n.d.: no determinado

^a: Determinado *in vitro*

6.2.2.2. Estudios de Biodisponibilidad/Bioequivalencia en humanos

A pesar de los muchos informes de los estudios de biodisponibilidad/bioequivalencia en ratas, solamente dos estudios humanos han sido reportados [112,123]. El primero comparó la biodisponibilidad de lidocaína de un vehículo de microemulsión y una emulsión oleosa o acuosa comercialmente disponible (xilocaína 5%) en ocho sujetos [122]. Se midieron los parámetros farmacocinéticos de acuerdo a un modelo compartimental, demostrando un aumento significativo de un dígito en la absorción y un decremento en el intervalo de bioequivalencia de lidocaína aplicado en una microemulsión comparada con una emulsión de prilocaína acuosa u oleosa usándolo como un calibrador de recuperación y esta se monitoreó durante los experimentos para cada investigación por el método de retrodiálisis. La respectiva recuperación se extendió desde 56 a 95 % durante el estudio y variaron ambos dentro de y entre las investigaciones, demostrando una investigación adecuada para monitorear la respectiva recuperación durante estos.

El segundo estudio de biodisponibilidad comparando tejidos humanos y niveles de plasma de 8 - metoxypsoraleno después de la administración oral (1 mg/kg) y después de la aplicación tópica; en cualquiera de los dos 95% etanol (3mg/ l) o una crema (0.1 %, w / w) [112].

El estudio de microdiálisis vía dérmica indica que la relación piel /plasma de 8-metoxiporaseleno fue 3-5 órdenes de magnitud con administración tópica comparada con la administración oral. Por lo tanto, la ruta tópica podía disminuir enorme y potencialmente los efectos secundarios graves que se observaron después del tratamiento oral.

Niveles cutáneos de una cantidad grande de fármacos han sido determinados en seres humanos por la técnica de microdiálisis, indicando el tremendo potencial para los estudios de bioequivalencia, que tiene que ser tomado en cuenta.

7. OTRAS TÉCNICAS

7.1. BLISTERS

También conocido como método de ampolla de succión, fue originalmente desarrollado para la separación de epidermis viable de dermis por Kiistala [167]. Desde su desarrollo, su uso ha sido amplio. Se utiliza recientemente para la síntesis de colágeno *in vivo* [168]. Este método es sensible y puede detectar los cambios en la síntesis de colágeno para enfermedades y terapias sistémicas. Otras aplicaciones de la técnica de blisters incluye las mediciones de agentes farmacológicos o sus derivados de fluido intersticial y la determinación de varias citosinas, enzimas, etcétera [169-173]. Adicionalmente, esta técnica ha sido utilizada para tratar vitiligo coleccionando melanocitos vivientes de la ampolla de piel sana e inyectándolos en las cavidades de la ampolla producida hacia dentro de la piel afectada.

Ya que la técnica de blisters separa epidermis de dermis dentro del basamento de la membrana [174], este modelo también puede ser usado para un estudio de reepitalización y la regeneración de piel de heridas superficiales de un tamaño estándar. El nivel de la separación de epidermis y de dermis esta encima del colágeno de tipo IV, ya que este colágeno queda totalmente en el piso de la ampolla después de formar una burbuja [175].

La proliferación de células epidermales comienza en el borde de la herida y el apéndice dermal. Unas horas después del inicio de la proliferación, las células empiezan a emigrar sobre el basamento de la membrana parcialmente intacta, simultáneamente se efectúa la síntesis estricta y coordinada de componentes de la membrana basal [176-177], los cambios en el citoesqueleto, permiten la migración entre célula y célula. El proceso es controlado vía citosinas originadas por células epidermales, plaquetas, fibroblastos, y leucocitos de herida.

La reepitalización puede ser seguida por la no invasividad midiendo el agua que se evapora del área de la ampolla. Uno de los propósitos principales de la epidermis es restringir la evaporación de agua del cuerpo. Inicialmente la herida de una ampolla debe hacerse de 15 a 20 veces. Cuando la curación epidermal sigue, la evaporación de agua disminuye, esto permite la continuación no invasiva de la curación de la herida midiendo el decremento hacia la evaporación (por ejemplo., la restauración de la función de

barrera de permeabilidad). A la epitelización también se le puede dar seguimiento tomando muestras de piel de ampollas de curación y estudiando las muestras con las técnicas apropiadas.

La inflamación es una parte esencial del proceso de curación. Las características de la inflamación es el incremento de flujo de sangre en el área afectada, la contrastación de leucocitos, e iniciación de procesos revitalizadores. La inflamación es controlada vía neuropéptidos. La sangre incrementada entra a raudales a la herida de la ampolla y da como resultado la vasodilatación. La medición del nivel de inflamación local no es sencillo debido a que el fenómeno mismo es complejo. El nivel del flujo de sangre en el área es un parámetro seguro.

7.1.1. Materiales

Los materiales que se utilizan en la técnica Blisters son dispositivos de ampolla de succión desechables comercialmente disponibles (Dermovac ampollar dispositivo; Mucel Co., Nummela, Finlandia). Éstos son fabricados de butenestireno. El dispositivo contiene cinco agujeros de 6 milímetros de diámetro. El diámetro interior del dispositivo es de 40 mm y el diámetro exterior es de 50 mm. El dispositivo es transparente, lo cuál hace fácil la observación crítica durante la formación de las burbujas. Contiene un tubo de goma de 30 cm, que puede ser conectado a una bomba de vacío. Ventosas plásticas con tamaños variables y números variables de agujeros son utilizadas [167]. Todavía es posible hacer tazas de plástico individuales del tamaño deseado y números de agujeros. El tamaño de agujero es variado se sugiere de 3 a 10 mm. El diámetro total de la taza puede ser de 20 a 50 mm (ver figura 16).

La bomba que se utiliza es una bomba de vacío comercialmente disponible de las que se usan en operaciones generales. La bomba de vacío debe ser capaz de generar un vacío aproximado de 40 a 70 kPa.

El Vaporímetro EP1 (Servomed, Estocolmo, Suecia) es un instrumento capaz de medir la humedad del aire en un cilindro abierto de 12 mm de diámetro. Los valores son dados como los gramos de agua evaporada por metro cuadrado midiendo la duración en horas.

Un Laser-Doppler flowmeter (Periflux Pf 1; KBs de Perimed, Estocolmo, Suecia), es utilizado para medir el flujo de sangre. El equipo tiene una multifibra de 5 mm de diámetro. El rayo láser traspasa aproximadamente 1 mm en el tejido. La señal respectiva muestra el número y la velocidad de las células sanguíneas en movimiento en el área de meta.

Lámpara eléctrica (60 W), para calentar. Jeringa de Mantoux, para coleccionar fluido de ampolla y formalina amortiguada al 10%, para preparar muestras de tejido.

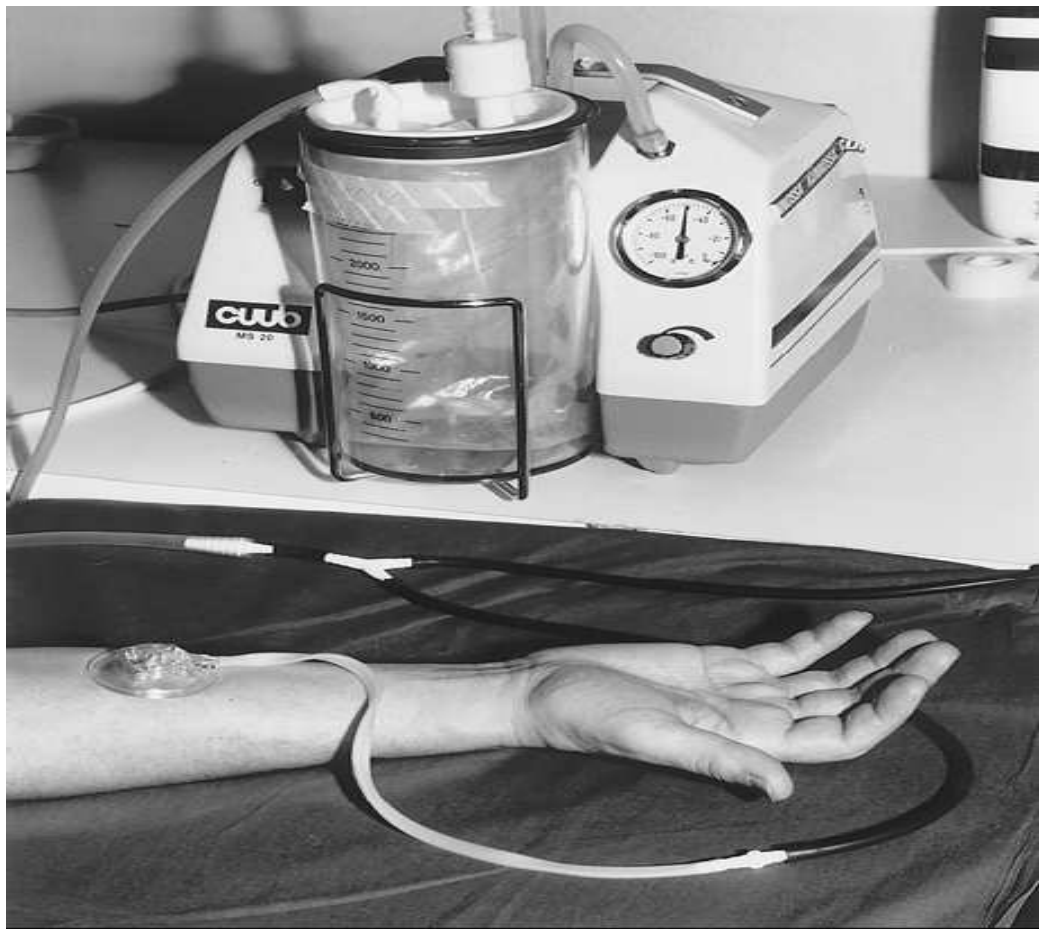


Figura 16. El dispositivo de ampolla de succión es fijado al brazo y es conectada la bomba de vacío [179].

7.1.2. Método

7.1.2.1. Producción de ampollas por succión

Las ampollas de succión pueden ser producidas sobre el cuerpo, los brazos, y piernas. No se recomienda producirlas en la cabeza o la piel facial. Asegurándose de que la piel esté limpia y el pelo sea retirado la metodología da una idea general, de aquí que pueda ser usada para estudiar reepitalización *in vivo* de heridas superficiales de un tamaño estándar en que la curación ocurre parcialmente restituyendo la membrana basal. El dispositivo de ampolla de succión desechable es muy apropiado para estudios humanos, aunque también puede ser usado en animales, como cerdos o ratas, después de que el pelo ha sido retirado. Para estudios de ratón el dispositivo podría ser demasiado grande, pero podría ser aplicado a la piel dorsal experimentalmente.

Esta técnica tiene algunas desventajas: tarda aproximadamente 40-120 minutos para producir ampollas y hay sitios hiperpigmentados en las bases de ampolla por hasta algunos meses después de formadas las burbujas. Sin embargo, ninguna cicatriz quedará, si las biopsias de piel no son tomadas de las ampollas. El método no es aplicable a la piel facial, cuero cabelludo, dedos, palmas, pies, dedos del pie, boca, o genitales. No se ha utilizado este método en jóvenes, niños, aunque podría ser usado, ya que es solamente invasor en grado mínimo y prácticamente sin dolor.

Conectar el dispositivo de ampolla de succión a una bomba de vacío y poner el dispositivo sobre la piel mientras se enciende el vacío. El vacío debe ser incrementado aproximadamente 50 kPa, también pegar el dispositivo fuertemente a la piel, de allí en adelante, no es necesario sujetar el dispositivo a la mano. Es posible producir algunas ampollas al mismo tiempo usando varios dispositivos. A menudo se utilizan cuatro dispositivos conectados con la misma bomba de vacío para producir ampollas en piel abdominal al mismo tiempo.

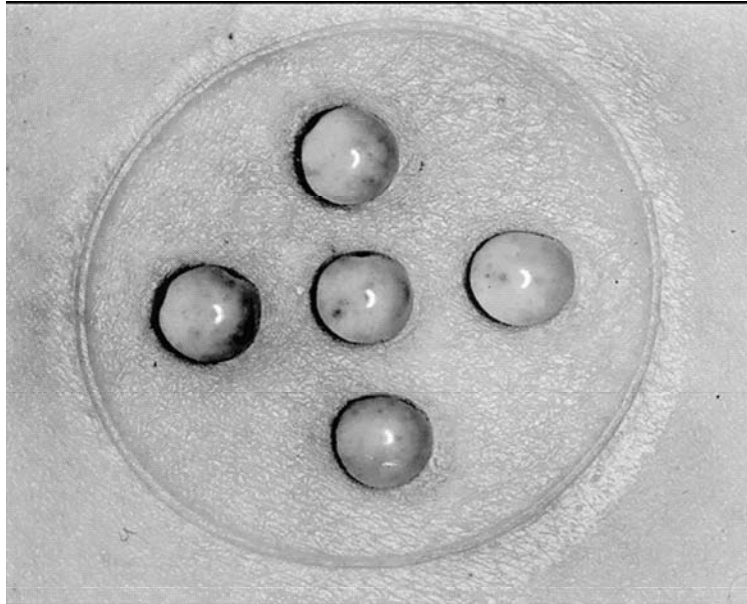


Figura 17. Desarrollo completo de ampollas de succión [180].

Para producir ampollas, el recalentamiento de la piel es esencial. Por lo que, se pondrá la lámpara aproximadamente 30 cm por encima del área a tratar. Es importante no quemar la piel, sino solamente calentarla [178].

Se verifica la incorporación de ampollas aproximadamente 30 minutos después de la puesta en práctica del vacío. En este lapso de tiempo, es posible ver ampollas diminutas. Recordar no parar el vacío o retirar el dispositivo cuando se produzca el ampollado. Toma aproximadamente 40-120 minutos para que las ampollas se desarrollen completamente (figura 17). El tiempo de abrasión está en función del vacío y el recalentamiento de la piel [178]. Si ninguna ampolla es producida dentro de 2 h, puede haber algunas razones: la bomba de vacío podría no funcionar apropiadamente, haciéndola incapaz de generar un vacío aproximado de 40-50 kPa; el dispositivo no se ha colocado fuertemente debido al pelo, crema, u otra cosa sobre la superficie de piel. En algunas enfermedades de piel, como lesiones, soriasis en la piel, ictiosis y edemas, sería imposible producir ampollas. Además, calentar la piel podría ser suficiente con una lámpara eléctrica (pero solamente es calentar no quemar).

A veces hay defectos técnicos en el dispositivo de ampolla. Si esto ocurre, el investigador debe tratar de usar otro.

Cuando las ampollas se desarrollen completamente, apagar el vacío y retirar cuidadosamente el dispositivo de ampolla de succión para que las ampollas no se rompan.

7.1.2.2. Análisis

Cuando las ampollas son desarrolladas completamente, se hacen posibles algunos análisis, dependiendo del estudio diseñado.

7.1.2.2.1. Burbuja abierta

Para seguir la reepitalización de heridas abiertas, los bordes de ampolla deben ser retirados cuidadosamente con tijeras y tenazas. Los techos de ampolla son compuestos por células vivientes, que pueden ser usados para cultivo de células, y también análisis de ácido ribonucleíco microsomal. Antes de que los techos de ampolla sean retirados, es posible coleccionar fluido de ampolla usando una jeringa de mantoux. De una ampolla es posible conseguir de 20-50 μl de fluido, que quiere decir que las cinco ampollas contienen hasta 250 μl de fluido, que puede ser usado para análisis de citosinas, enzimas, o propéptidos de colágeno, dependiendo lo que se requiera estudiar.

La recuperación de la barrera de la piel puede ser seguida en ampollas abiertas usando técnicas no invasivas, como medir la evaporación de agua transepidermal y la circulación de sangre [179,180]. El agua evaporada puede ser medida con un vaporímetro EP2, este es puesto sobre la herida, y se mide en las tres ampollas generalmente. La evaporación de piel sana también es medida. La evaporación de agua es generalmente $< 10 \text{ g}/(\text{m}^2 \times \text{h})$ en piel sana. En la base de la ampolla inmediatamente después de la incorporación el agua evaporada es de 90-110 $\text{g}/(\text{m}^2 \times \text{h})$ mientras que después de 2 días el valor es de 50-80 $\text{g}/(\text{m}^2 \times \text{h})$ y después de 4 días es de 20 – 40 $\text{g}/(\text{m}^2 \times \text{h})$ [180]. El flujo de sangre puede ser medido con un rayo láser-Doppler flowmeter sobre las bases de curación de las ampollas. Los valores son generalmente más altos al

curar las heridas de las ampollas entre 2-4 días después de la incorporación de las ampollas [179].

7.1.2.2.2. Ampolla intacta

Para el análisis de ampollas intactas, la curación de la herida puede hacerse aplicando anestesia local para extirparla completamente. Este modelo es idóneo para estudiar heridas curadas en las condiciones en las que no hay bacteria o costra en la parte alta de la herida. Las ampollas intactas pueden ser estudiadas hasta por 5 días protegiendo la forma de las burbujas con anillos de plástico de hule espuma hasta que las biopsias sean tomadas. De forma semejante se protegen las ampollas intactas, es también posible coleccionar fluido de ampolla para investigar la inducción y regulación de varias citosinas, enzimas, etcétera durante la reepitalización *in vivo*.

La curación de ampollas de 6 mm se completa dentro de 6-10 días. La curación puede ser seguida de una anestesia local para un análisis histológico o inmunohistoquímico. Antes de tomar una biopsia de una incisión de piel, se debe limpiar la piel con regularidad antes de las operaciones menores y el área de la ampolla debe ser cuidadosamente anestesiada con lidocaína-adrenalina. La incisión de piel muestra debe contener el área completa tomada de la ampolla con un cuchillo desechable o alicatas, evitando el daño en el área de la ampolla. La muestra puede ser dividida en dos partes. Una pieza es congelada a presión y procesada para su análisis. La otra parte puede fijarse en parafina. Si uno desea tomar varias incisiones de piel muestra, lo mejor es tomar la muestra de piel 4 días después de la inducción de la ampolla. En ese tiempo, la herida de la ampolla está parcialmente cubierta por epidermis nueva. De esta manera numerosos parámetros de piel muestra pueden ser analizadas.

7.1.2.3. Fármacos evaluados utilizando Blisters

Muchas formulaciones han sido estudiadas mediante esta técnica como un método para determinar la penetración de algunas formulaciones en piel algunas de estas se presentan en la tabla 8.

Tabla 8. formulaciones estudiadas con la técnica de blisters.

Cinética y profundidad de penetración de fármacos		
Analgésicos		
Investigación	Resultado	Autor (referencia) Año
Investigación de dos técnica para la muestra <i>in vivo</i> de farmacocinética de compartimento de dispositivo periférico después de la administración sistémica del ácido acetilsalicílico.	Las dos técnicas estaban en la concesión excelente incluso la correlación entre las concentraciones máximas obtenidas por microdiálisis y fluido probadas con ampolla de succión fueron muy cercanas. Sin embargo, comparando la tolerancia del procedimiento de muestra, la facilidad del análisis y el detalle en la cronología, microdiálisis es superior para probar farmacocinética <i>in vivo</i> en la dermis.	Benfeldt et al. 1999 [181]
Emparejamiento de plasma y fluido de ampolla donde las concentraciones de fármacos determinadas por un HPLC estereoespecíficos muestreadas después de una dosis oral sola de (R, s) - ibuprofeno (1200mg) a cinco voluntarios sanos.	El uso de blisters en piel, pueden ser probados repetivamente, ha probado ser una técnica experimental valiosa en estudios farmacocinéticos y farmacodinámicos de fármacos, especialmente en pacientes en los que el fluido sinovial no está disponible en la muestra.	Walker <i>et al.</i> 1993 [182]

Antibióticos		
<p>Para caracterizar la penetración de moxifloxacino en sitios de meta de dispositivo periférico, midiendo las concentraciones de moxifloxacino desatadas en fluido de espacio intersticial medidas por microdiálisis.</p>	<p>Las concentraciones de Moxifloxacino conseguidas en el fluido de espacio intersticial en seres humanos y en fluido de ampolla de piel siguiendo dosis solas de 400 mg exceden los valores para el MIC en qué 90 % del aislado esta impedido para las torceduras bacteriales más fríamente relevantes, notablemente incluyendo <i>pneumoniae</i> de estreptococo resistente a penicilina. Estas conclusiones respaldan el uso de moxifloxacino para el tratamiento de tejido blando e infecciones de tracto respiratorio en seres humanos.</p>	<p>Müller <i>et al.</i> 1999 [183]</p>
Antimicóticos		
<p>El consumo de fluconazol dentro del fluido intersticial de papel de seda en subcutáneos humanos usando la microdiálisis y la técnica de blisters.</p>	<p>Había buen acuerdo entre las concentraciones de fluconazol derivadas de la muestra de microdiálisis y se calcularon usando un modelo farmacocinético limitado por flujo de sangre.</p>	<p>Sasongko <i>et al.</i> 2002 [184]</p>
Fármacos antivirales		
<p>Comparación entre la técnica de blisters y microdiálisis como los métodos para medir la</p>	<p>Microdiálisis y la técnica blisters pueden ser usadas estudiando el perfil de tiempo - concentración de</p>	<p>Borg <i>et al.</i> 1999 [185]</p>

concentración de penciclovir en la piel después de una dosis sola (250 mg) de su profármaco, famciclovir	penciclovir en la piel y la microdiálisis admite una muestra ininterrumpida del fármaco una vez después de la administración.	
Teofilina		
Para medir la cinética de tejido de teofilina siguiendo la administración de una dosis sola simultáneamente en ampollas de piel inducidas, saliva y microdializadas de subcutaneous - y papel de seda de músculo escueto y comparado con las concentraciones de plasma.	Se llegó a la conclusión de que microdiálisis representaba una técnica confiable para la medición de concentraciones de compartimento de dispositivo periférico desatadas y es superior a la concentración de ampolla de piel y saliva.	Müller <i>et al.</i> 1998 [183]
Sulfas		
La determinación de la penetración de trimetoprima, sulfametoxazol y su metabolito principal - N4 - acetilsulfametoxazol dentro del fluido de ampolla de piel cantaridina inducida siguiendo la administración de una dosis de combinación oral sola de trimetoprima 320 mg y sulfametoxazol 1600 mg.	La ampolla de piel cantaridina - inducida es una técnica útil para determinar la penetración en piel de un fármaco y su metabolito y valorar los parámetros farmacocinéticos.	Królicki <i>et al.</i> 2002 [186]

Proteínas		
<p>Para valorar si la técnica de blisters más simple que usaba ampollas grandes podía reemplazar la técnica de mecha en la investigación de pacientes con edema de pierna postreconstructiva.</p>	<p>Había un buen acuerdo metodológico entre la técnica de blisters y la técnica de mecha. La técnica de succión de ampolla es menos invasora y debe ser vista como el método preferido para la investigación de flúidos subcutáneos de tejido intersticial en pacientes con edema de pierna de postreconstructiva.</p>	<p>Haaverstad <i>et al.</i> 1996 [187]</p>

7.2. INFRARROJO

7.2.1. Definición y generalidades

La espectroscopía de infrarrojos (IR) y Raman han sido métodos estándar empleados en el área de farmacia y química analítica por mucho tiempo. Espectros de IR y espectros de Raman son complementarios para proveer ideas de las vibraciones de los átomos de un compuesto. Por lo tanto, ambas técnicas son referidas como espectroscopía vibracional.

Un espectro de IR se obtiene por el paso de radiación infrarroja a través de una muestra y condiciona qué fracción incide cuando la radiación es absorbida con una frecuencia especial. Por otro lado, el espectro Raman es obtenido enfocando una radiación monocromática sobre una muestra al analizar el encendido disperso como una función de la frecuencia. En otras palabras, El espectro infrarrojo (IR) está basado en la absorción de la radiación electromagnética por un sistema molecular, mientras que la espectroscopía Raman depende del esparcimiento de la radiación inelástica electromagnética por un sistema molecular.

En una espectroscopía vibracional, es común el uso de la unidad de longitud de onda, $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}], en lugar de la frecuencia (ν), esto es el número de la onda en un cuerpo de 1 cm. La Longitud de onda recíproca esta dada por la siguiente relación:

$$\tilde{\nu} = 1/\lambda = \nu/c$$

Donde λ es la longitud de onda y c es la velocidad de luz en el vacío (2.997925×10^8 m/s). El número de onda como unidad tiene la ventaja de ser lineal con frecuencia o energía.

La figura 18 muestra la evidente diferencia entre espectroscopía de IR y Raman de benceno, la mayoría de las moléculas expuestas a infrarrojo se localizan en la región entre 400 y 4000 cm^{-1} y el espectro Raman comprende un alcance espectral de 0 – 3500 cm^{-1} .

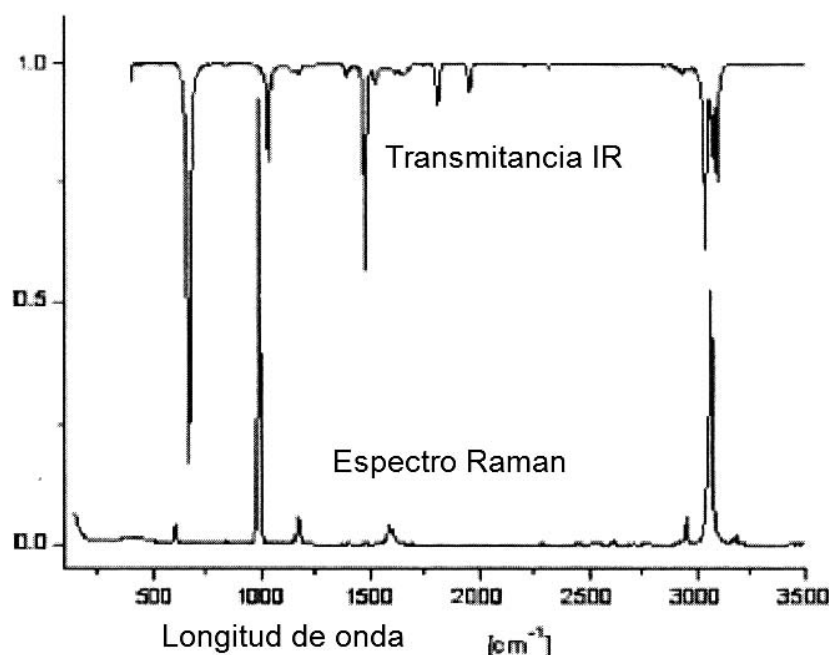


Figura 18. Comparación del IR y espectros de Raman de benceno. arriba: El espectro de transmitancia de IR; en la parte inferior: el espectro de Raman [188].

La posición y la intensidad de una banda vibracional son características del movimiento molecular subyacente y por consiguiente del átomo que participa en el vínculo químico, su conformación y su ambiente inmediato. Por lo tanto, cierto grupo submolecular produce bandas en una región espectral característica. Estas bandas características constituyen la base empírica para la interpretación de espectros vibracionales. El lector interesado en los detalles del fundamento sobre principios de espectroscopía vibracional y la interpretación de sus espectros pueden remitirse a los textos [189 - 194].

Es importante mencionar que la espectroscopia de IR ha sido exhaustivamente usada en ambos análisis farmacéuticos tanto del tipo cualitativo como cuantitativo. La espectroscopía Raman ahora es extensamente utilizada en las ciencias farmacéuticas también. Las aplicaciones convencionales de espectroscopía vibracional incluyen la

identificación de fármacos, excipientes, y materias primas; el control de calidad; también para la caracterización de polimorfos, sales e hidratos. Recientemente, Clark [195] ha estudiado una visión general del análisis de fármacos, sustancias y productos formulados por medio de espectroscopía vibracional, además estudios sobre polimorfos de fármacos han sido dirigidos por Threlfall [196].

7.2.2. Instrumentos

7.2.2.1. Técnica de Transformada de Fourier

En décadas anteriores, Fourier transformó el espectrómetro infrarrojo (TFIR) y ha ido reemplazando casi por completo instrumentos dispersivos debido a su mejor rendimiento en casi todos los aspectos. La aplicación de la técnica TF ha mejorado la adquisición dramáticamente de espectros de IR. El corazón del equipo físico óptico de los espectrómetros TF son los interferómetros. La instalación comúnmente usada es el interferómetro dos haces (*two-beam*) Michelson clásico mostrado esquemáticamente en la figura 19. Éste consta de dos espejos perpendiculares: Un espejo fijo y uno móvil. Una semireflectancia del espejo, el haz de luz, divide en dos a los espejos.

El rayo modulado por el movimiento del espejo deja el interferómetro, y se concentra en el detector. La señal es tomada por el detector. El interferograma, es por lo tanto, la intensidad de radiación de la combinación de haces como una función del espejo móvil. En general, es difícil comprender un interferograma porque es una función del tiempo y, tradicionalmente, solemos pensar en el dominio de la frecuencia (o longitud de onda), concretamente en relación con espectros.

La matemática de la conversión de un interferograma en un espectro es la Transformada de Fourier. Sobre la base del software completamente desarrollado, la computadora lleva a cabo esta transformación.

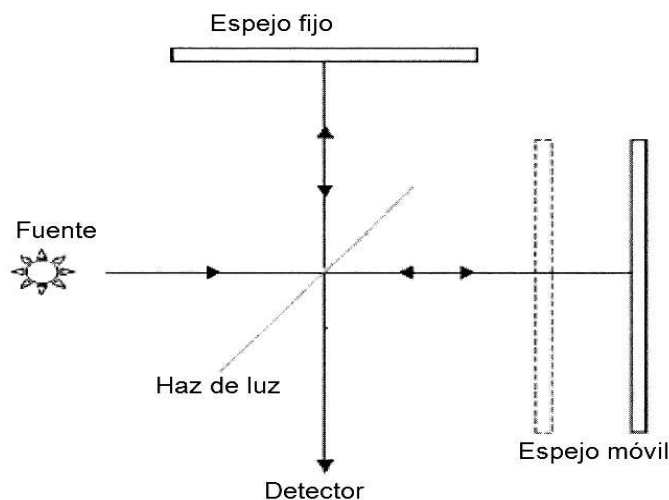


Figura 19. El plano de un interferómetro Michelson [188].

En la caja de espectroscopía de TFIR, la muestra se coloca entre el interferómetro y el detector.

7.2.2.2. Espectroscopía fotoacústica: FTIR – EFA

En espectroscopía fotoacústica (EFA), la intensidad de la radiación modulada vulnera la muestra, se absorbe, y genera las ondas de calor dentro de la muestra en turno, después de la difusión a la superficie de la muestra las ondas térmicas generan la modulación de presión (por ejemplo el sonido) en el gas de transferencia circundante, generalmente helio.

Un micrófono acoplado a la cámara detecta la señal de sonido que provee la información sobre las propiedades de la muestra (ver figura 20).

El requisito esencial para un experimento de fotoacústica es aplicable ajustando un ligero peso. En la caja de un espectrómetro de TFIR, ya disponible en la forma de interferograma. En otras palabras, usar TFIR–EFA el interferograma es grabado por un detector acústico.

Debido a la manera acústica de la detección, tanto óptica y térmica, las propiedades de la muestra condicionan la señal fotoacústica. Por lo tanto, es necesario diferenciar entre ópticamente transparente y ópticamente opaco también como

termalmente fino y termalmente grueso. Para una muestra termalmente gruesa sin efecto de saturación, la teoría pronostica la señal acústica, y es dada por la expresión [197,198]:

$$S_{PAS} = \frac{\alpha(\tilde{\nu})I_0}{4\pi\rho Cf}$$

Donde $\alpha(\tilde{\nu})$ es el coeficiente de absorción óptico espectral, I_0 es la intensidad de la viga de IR incidente, ρ es la densidad, C es el calor específico, y f es la frecuencia de modulación. Además, para un material ópticamente y termalmente homogéneo, la profundidad L_s de la cual surge la señal de la duración de la difusión térmica, se describe matemáticamente como:

$$L_s = \sqrt{\frac{\kappa}{\pi\rho Cf}} = \sqrt{\frac{\alpha}{\pi f}}$$

Donde K es la conductancia térmica de la muestra y $\alpha = K / \rho C$ es la difusividad térmica. Basada en la relación es posible seleccionar varias profundidades a prueba escogiendo la modulación de frecuencias apropiadas.

Hay espectrómetros TF que permiten grabar un interferograma usando el modo gradual con la fase de modulación. En tales experimentos al moverse el espejo, el interferómetro oscila aproximadamente con la frecuencia de modulación seleccionada y la amplitud de modulación.

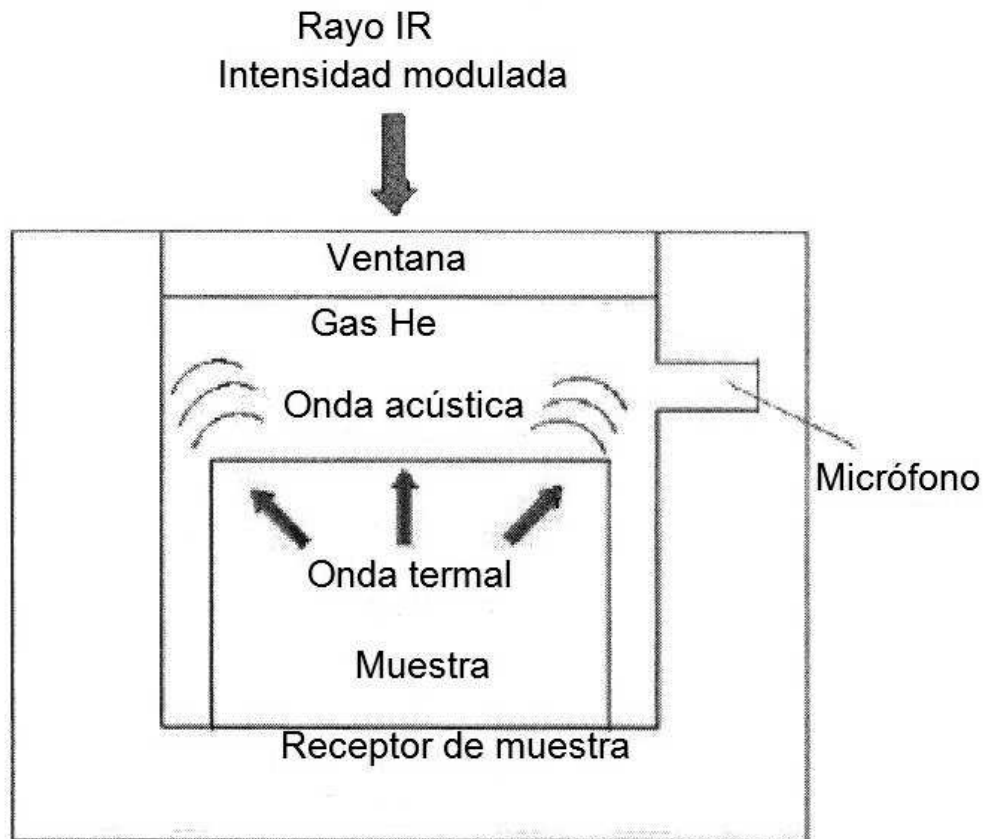


Figura 20. El plano de una celda fotoacústica [188].

De esta manera se provee la fase de modulación de la radiación. La demodulación de la señal de FA con el rayo de IR y es asegurada por el procesador de adquisición [199].

7.2.2.3. Reflexión total atenuada (RTA)

En la RTA, la muestra se coloca en el contacto óptico contra un cristal especial, llamado cristal de RTA, que está compuesto de una tela con un alto índice de refracción (Por ejemplo., Selenuro de zinc (ZnSe)). El haz de IR del espectrómetro es enfocado en el borde biselado del elemento de RTA por un juego de espejos, reflejando completamente el cristal, y luego dirigida al detector por otro juego de espejos.

El uso de espectroscopía de RTA esta fundamentada sobre el hecho de que aunque termine el reflejo interno ocurre la interfase de la muestra de cristal, la radiación a decir verdad traspasa una distancia breve en la muestra (ver figura 21).

Esta penetración es llamada onda evanescente. La muestra interactúa con la onda evanescente, dando como resultado la absorción de la radiación junto a la muestra, la cuál se parece al espectro de transmisión para la misma muestra. Sin embargo, el espectro de RTA es confiable en algunos parámetros, incluyendo el ángulo del índice para la radiación entrante, la longitud de onda de la radiación, y los índices refractivos de la muestra y el cristal de RTA.

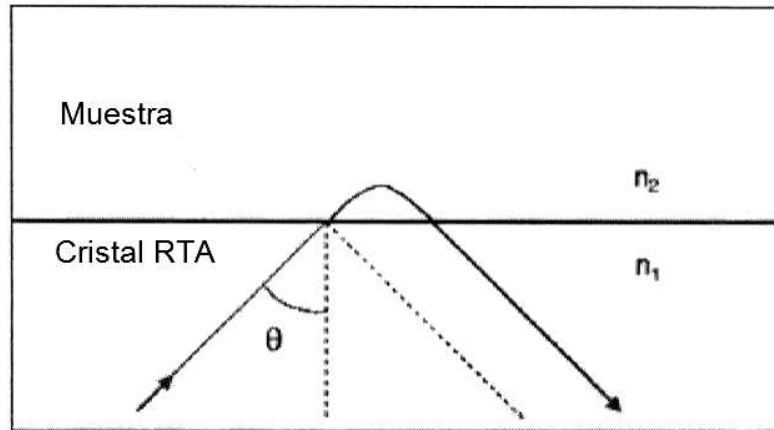


Figura 21. El plano de la reflexión total atenuada (RTA) [188].

La profundidad de penetración d_p de la onda evanescente, definida como la distancia requerida por la amplitud del campo eléctrico de caída a $1/e$ de su valor en la interfase, está dada por [200]:

$$d_p = \frac{\lambda}{2\pi n_1 \sqrt{\sin^2 \theta - (n_2/n_1)^2}}$$

Donde λ es la longitud de onda, n_1 y n_2 son los índices refractivos del cristal de RTA y la muestra, respectivamente, y θ es el ángulo del índice. Obviamente, la profundidad de penetración del haz depende de la longitud de onda.

Para una muestra con $n_2=1.6$, típico de un material polimérico, puesto sobre un elemento de ZnSe ($n_1 =2.4$) con un ángulo de incidencia de 45° , la profundidad de penetración está en el rango de 2.8 a $1.4 \mu\text{m}$ para el alcance espectral de 1000 a 2000 cm^{-1} . Además, la figura 21 muestra que el reflejo total ocurre cuando el ángulo del índice es más grande que el ángulo crítico $\theta_{\text{cr}} = \sin^{-1}(n_2 / n_1)$.

La RTA es una técnica rápida y no destructiva para obtener el espectro de IR de la superficie de un material. Muestras analizadas por TFIR–RTA requieren cantidades mínimas de muestra, pero un contacto óptico íntimo entre la muestra y el cristal de RTA es crucial. Desafortunadamente, el cristal del elemento mismo puede ser el talón de Aquiles de la técnica de RTA: el cristal se degradará y se agrietará. Actualmente existen cristales comercialmente disponibles con elementos intercambiables denominados Fresnel con un diámetro de área superficial de 20 mm.

En el área farmacéutica, la técnica de TFIR-RTA puede utilizarse para caracterizar la estructura y las propiedades de sistemas biológicos como EC; Estudiar la liberación de fármacos de formulaciones de semisólidos; medir la difusión de fármacos y sistemas farmacéuticos como polímeros, películas, etcétera.; investigar la penetración fármacos en sistemas artificiales y membranas biológicas y caracterizar las interacciones entre fármacos sintéticos, semisintéticos, y macromoléculas.

7.2.3. Cuantificación de fármacos

7.2.3.1. El contenido de fármacos en las formulaciones de semisólidos y tabletas determinados por TFIR–EFA

En la práctica farmacéutica, el contenido de fármaco en formulaciones es determinado usualmente por técnicas analíticas que generalmente son: HPLC, GC o HPTLC. Para determinar el fármaco, tiene que ser extraído de la formulación utilizando para esto extracciones de tipo líquido, líquido–líquido y fase sólida. Obviamente, tal

procedimiento es laborioso y consume tiempo; tiene una baja repetibilidad y un nivel bajo de recuperación. Desde este punto de vista, la gran ventaja del uso de TFIR-EFA es que el contenido de fármaco puede ser cuantificado directamente con o sin preparativos mínimos de muestra.

En general, la muestra se coloca puesta en un contenedor de metal, que cabe en el recipiente muestra de EFA.

Aún así, esta técnica no es invasiva pues no solo se utiliza en aplicaciones farmacéuticas. TFIR-EFA cuantifica con éxito hasta tres componentes de una mezcla sólida (aspirina tableta) con concentraciones que varían desde 0 % a 60 % [201]. Neuberte *et al.* [202] informó sobre la determinación de brivudin y didranol en una formulación semisólida (vaselina) empleando TFIR-EFA en conjunción con la técnica de modulación de fase. Los espectros relevantes dentro de la región de huella digital de la vaselina o mezcla de vaselina con fármaco didranol varían en el contenido presentado en la figura 22. Estos espectros de FA presentan una excelente señal de ruido y las bandas que pertenecen a didranol pueden ser identificados inequívocamente incluso con cantidades muy bajas del fármaco (aproximadamente 0.5% en peso). En este caso particular la relación de intensidad tiene buena separación entre las bandas de 1560 y 1670 cm^{-1} para didranol, para la banda de vaselina en 1462 cm^{-1} por lo que puede ser usado para el análisis cuantitativo, aunque también la cantidad de didranol puede ser determinado por HPLC.

El contenido de fármaco obtenido de los datos de EFA, contra el determinado por HPLC, es mostrado en la figura 23. La grafica prueba que la ley de Beer-Lambert se cumple, dando un coeficiente de correlación de 0.994.

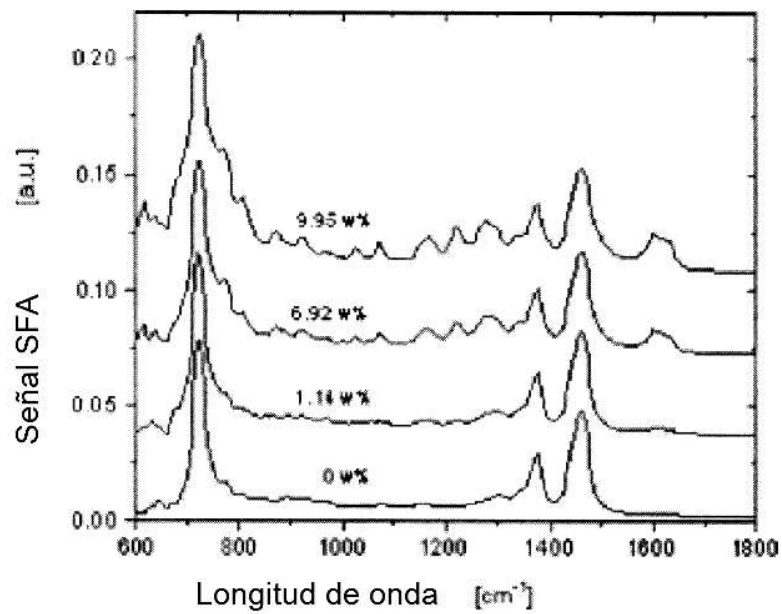


Figura 22. Escaneo de espectros fotoacústicos de FTIR de mezclas de vaselina/didranol. El contenido de fármaco se muestra [188].

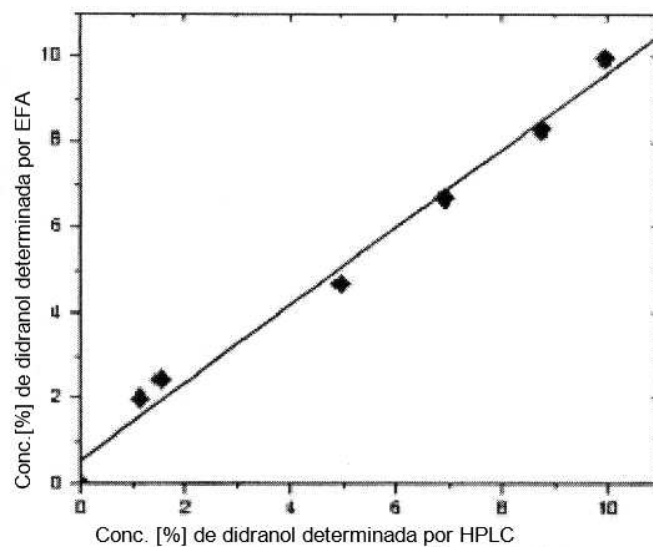


Figura 23. Concentración de Didranol en mezclas de vaselina / didranol pronosticada por FTIR-EFA contra el contenido de fármaco determinado por HPLC [188].

La cuantificación de fármacos en las formas de dosis sólidas usando FTIR-EFA es también una tarea fácil. Lo que solamente requirió que las tabletas cupieran en el

contenedor de muestra. Como ejemplo, los espectros de TFIR-FA en el alcance de huella digital de tabletas modelo Emcocel -celulosa microcristalina con varias cantidades de teofilina- como se observa en la figura 24. Las características espectrales evidentes pertenecen a la teofilina y las flechas marcadas se identifican sobre la base de un análisis multivariable de datos de EFA, lo que muestra que es fácil determinar la cantidad de teofilina en las tabletas.

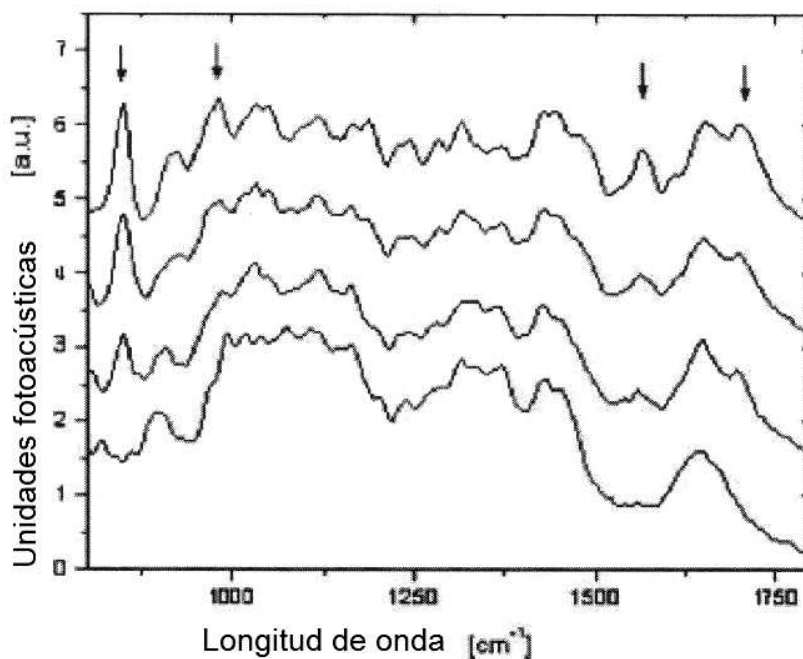


Figura 24. Escaneo de espectros fotoacústicos de FTIR de la tableta de Emcocel con diferente cantidad de teofilina. Las flechas corrigen las alteraciones importantes del espectro características atribuibles a la teofilina [188].

7.2.4. El efecto modificador de las propiedades de penetración del EC en un estudio con TFIR-RTA

En la actualidad, TFIR-RTA ha aparecido como un técnica de nivel para utilizarse en el estudio de la estructura de EC a nivel molecular valorando su influencia

en el incremento de la penetración sobre la función de barrera de este estrato [203-215]. La gran ventaja de la técnica de RTA es que permite dilucidar la extensión y el mecanismo de penetración percutánea *in vivo* en humanos. Solamente, porque el típico alcance de la profundidad de muestra es de 1–2 μm , la información obtenida desde un espectro RTA pertenece solamente a la capa inmediata en contacto con el cristal (por ejemplo, los estratos superficiales del EC). La información de las regiones más profundas del EC puede ser obtenida solamente a través de la remoción de capas mediante la técnica del TS, donde las capas sucesivas del EC son removidas progresivamente y examinadas espectroscópicamente. Naik y Guy [216] hicieron una evaluación excelente de este asunto en 1997 [217-223]. Recientemente, Alberti *et. al.* [221] valoró la biodisponibilidad del EC de terbinafina siguiendo un tratamiento con cuatro formulaciones diferentes usando mediciones de TFIR-RTA con TS en piel humana. Para la validación de las mediciones espectroscópicas *in vivo*, la cantidad de terbinafina extraídas de las tiras fueron determinadas por HPLC. Los perfiles de concentración de terbinafina fueron ajustados apropiadamente mediante la segunda ley de difusión de Fick, permitiendo así, la determinación de los parámetros de difusión y partición en la piel del fármaco.

8. CONCLUSIÓN

Es claro que la piel no es justamente una barrera inerte y protectora que rodea los órganos internos del cuerpo, pero si es un participante activo en el resultado de la exposición a ciertas formulaciones tópicas. La trascendencia de muchas investigaciones recientes versa en el proceso de absorción, en que es un órgano capaz de metabolizar fármacos y permite la entrada de estos para que logren alcanzar un órgano meta. Para saber la cantidad de fármaco que logra este objetivo se han desarrollado técnicas como el Tape Stripping, Microdiálisis, Blisters e Infrarrojo que hoy por hoy son utilizadas como herramienta para lograr esa cuantificación. Cada una de ellas tiene un futuro potencial en la investigación dermatológica y farmacéutica; algunas de ellas se combinan para distinguir entre las rutas de absorción transepidermal y la folicular para sustancias aplicadas tópicamente. El tape stripping parece ser una técnica simple y fuerte

para hacer estudios relacionados con el estrato córneo y para determinar la distribución de formulaciones aplicadas tópicamente sobre la piel en condiciones *in vivo*. La técnica de microdiálisis es considerablemente más sensible y menos invasiva que otras técnicas *in vitro/in vivo* para medir diferencias en rutas de penetración cutánea de sustancias. Los blisters son una técnica muy utilizada en aquellos pacientes que tienen cirugías con riesgos de daño en piel pues al realizarse en ellos no deja cicatriz, es mucho más empleada en pacientes con vitiligo sobretodo en cara. Por último la microscopia del sincrotón FT-IR no provee una gran ventaja para el estudio de entrega de fármacos transepidermales, da información en la piel y en las moléculas penetrantes aunque se recomienda para ser aplicada benéficamente a varios experimentos de penetración en piel.

De las cuatro técnicas aquí referidas ninguna tiene ventaja sobre otra, digamos que se utilizan dependiendo de las características del fármaco o del estado físico del paciente.

Este trabajo muestra las características de cada técnica aunque sólo es una recopilación de información que seguramente en un futuro traerá muchos más beneficios a la industria farmacéutica, cosmetológica y médica.

9. REFERENCIAS

- [1] <http://salud.inicia.es/mi-doctor//que-es-la-piel.html> (accesado 21-agosto-2009)
- [2] http://lapiel.com/frontend/lapiel/noticia.php?id_noticia=492 (accesado 25-septiembre-2009)
- [3] Escobar-Chávez, J.J., Merino-Sanjuán, V., López-Cervantes, Quintanar-Guerrero, D., Ganem-Quintanar A. 2008. The Tape-Stripping Technique as a Method for Drug Quantification in Skin. *J. Pharm. Pharmaceut. Sci.*, 11(1):104-130.
- [4] García Delgado Rafael, Escarlo Travesedo E., Sánchez Romero A., Sección de Farmacología Clínica, Sección de Dermatología, Complejo hospitalario y Universitario de Albacete, Albacete, España.
- [5] http://blogbellezza/la_piel/desarrollo_y_estructura_de_la_piel (accesado 17-octubre 2009)
- [6] <http://es.ask-schwarzkopf.com/articles/52> (accesado 13-agosto-2009)
- [7] Jens J. Thiele and Lester packer, Noninvasive Measurement of α -Tocopherol Gradients in Human Stratum Corneum by High-Performance Liquid Chromatography Analysis of Sequential Tape Strippings.
- [8] Escobar Chavez José Juan. Estudio de la penetración a través de la piel de naproxeno sódico utilizando agentes promotores de la penetración (azona y transcutol), y de digluconato de clorhexidina mediante iontoforésis. Tesis Doctoral, Universidad Nacional Autónoma de México, (2006).
- [9] http://www.geomundos.com/uruguay/auxfarm2007/estructura_de_la_piel_doc_101006.html (accesado 20-septiembre-2009)

- [10] www.monografias.com/trabajo29/piel-estrias/piel-estrias.shtml (accesado 23-septiembre-2009)
- [11] Guzzo C. A., Lazarus G. S., Werth V. P., Farmacología Dermatológica, En, Las bases farmacológicas de la Terapéutica, Ed. Hardman J. G., Limbird L. E., Molinof P. B., Ruddom R. W., Goodman Gilman, A. Ed. MacGraw-hill, Interamericana, 9ª edición; 1996, 1697-21.
- [12] Ling M. R., Extemporaneous compounding. The end of the road, Dermatologic Clinics, 1998, 16:321-7.
- [13] Shupack J. L., Washenik K., Park G. H., Principios de la Terapéutica tópica. En: Dermatología en Medicina General. Ed. Freedberg I. M., Eizen A. Z., Wolf K., Austen K. F., Goldsmith L. A., Katz S. I., Fitzpatrick T. B., Ed. Panamericana, 5ª edición, Tomo III, 2001: 2874-81.
- [14] Carreras Gimjaume E., Carreras Coma M., Formulación tópica en dermatología, (I): excipientes. Piel. 1999; 4: 397-04.
- [15] Kalia Y. N., Merino V., Guy R. H., Transdermal Drug Delivery. Dermatologic Clinics. 1998. 16: 289-99.
- [16] Herraéz Domínguez M., Diez Sales O., Martínez Villodre A., Formas de administración sobre la piel, En: Monografías Galénicas, Ed. Cerezo Galán A., García Sánchez M. J., Herraéz Domínguez M., Ibáñez Bermúdez S., Vila Jato J. L., Ed. International Marketing and Communications; 1993: 1-48.
- [17] Boada J. N. Farmacología Dermatológica. En: Farmacología Humana. Ed. Flores J., Arnijo. J. N., Madiavilla., A. Ed. MASSON. 3ª Edición 1988: 1251-72.

- [18] Shah V. P., Behl C. R., Flynn G. L., Higuchi W. I., Schaefer H., Principles and criteria in the development and optimization of topical therapeutic products. *Skin Pharmacol* 1993; 6: 72-80.
- [19] López C. M., Piñon S. E., Quintanar G. D., Ganem Q. A. La técnica del Tape Stripping como método para estudiar la penetración de sustancias sobre la piel, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. Postgrado en Ciencias Químicas 1998.
- [20] Touitou E., Meidan V. M., Horwitz E., Methods for quantitative determination of drug localized in the skin, *J. Control. Rel.* 56 (1998) 7-21.
- [21] Higo N., Naik A., Bommannan D., Potts R. O., Guy R.H., Validation of reflectance infrared spectroscopy as a quantitative method to measure percutaneous absorption in vivo, *Pharm. Res.* 10 (1993) 1500-1506.
- [22] Dick I. P., Blain P. G., Williams F. M., The percutaneous absorption and skin distribution of lindane in man. I. In vivo studies, *Human & Experimental Toxicology* 16 (1997) 645-651.
- [23] Schwarb F.P., Gabard B., Ruffli Th., Surber Ch., Percutaneous absorption of salicylic acid in man after topical administration of three different formulations, *Dermatology* 198 (1999) 44-51.
- [24] Cambon M., Issachar N., Castelli D., Robert C., An in vivo method to assess the photostability of Uv filters in a sunscreen, *J. Cosmet. Sci.* 52 (2001) 1-11.
- [25] Surber C., Wilhelm K. P., Bermann D., Maibach H. I., In vivo skin penetration of acitretin in volunteers using three sampling techniques, *Pharm. Res.* 10 (1993) 1291-4.

[26] Wagner H., Kostka K. H., Lehr C. M., Schaefer U. F., Interrelation of permeation and penetration parameters obtained from in vitro experiments with human skin and skin equivalents, *J. Control. Rel.* 75 (2001) 283-295.

[27] Benech-Kieffer F., Wegrich P., Schwarzenbach R., Klecak G., Weber T., Leclaire J., Schaefer H., Percutaneous absorption of sunscreens in vitro: Interspecies comparison, skin models and reproducibility aspects, *Skin Pharmacol. Appl. Skin Physiol.* 13 (2000) 324-335.

[28] Potard G., Laugel C., Schaefer H., Marty J. P., The stripping technique: in vitro absorption and penetration of five UV filters on excised fresh human skin, *Skin Pharmacol. Appl. Skin Physiol.* 13 (2000) 336-44.

[29] De Jalon E. G., Blanco-Prieto M. J., 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.

[30] Dupius D., Rougier A., Roguet R., Lotte C., Kalopissis G., In vivo relationship between horny layer reservoir effect and percutaneous absorption in human and rat, *J. Invest. Dermatol.* 82 (1984) 353-356.

[31] Benfeldt E., In vivo microdialysis for the investigation of drug levels in the dermis and the effect of barrier perturbation on cutaneous drug penetration. Studies in hairless rats and human subjects, *Acta Derm. Venereol. Suppl.* (Stockh) 206 (1999) 1-59.

[32] Kobayashi H., Aiba S., Yoshino Y., Tagami H., Acute cutaneous barrier disruption activates epidermal p44/42 and p38 mitogen-activated protein kinases in human and hairless guinea pig skin, *Exp. Dermatol.* 12 (2003) 734- 46.

- [33] Sheth N. V., McKeough M. B., Spruance S. L., Measurement of the stratum corneum drug reservoir to predict the therapeutic efficacy of topical iododeoxyuridine for herpes simplex virus infection, *J. Invest. Dermatol.* 89 (1987) 598-602.
- [34] Darmstadt G. L. , Mao-Qiang M., Chi E., Saha S. K., Ziboh V. A., Black R. E., Santosham M., Elias P. M., Impact of topical oils on the skin barrier: possible implications for neonatal health in developing countries, *Acta Paediatr.* 91 (2002) 546-54.
- [35] Jacobi U., Toll R., Audring H., Sterry W., Lademann J., The porcine snout – An in vitro model for human lips?, *Exp. Dermatol.* 14 (2005) 96-102. [33] K. Moser, K. Kriwet, A Naik, Y. N. Kalia, R. H. Guy, Passive skin penetration enhancement and its quantification in vitro, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 52 (2001) 103-12.
- [36] Kondo H., Ichikawa Y, Imokawa G., Percutaneous sensitization with allergens through barrier-disrupted skin elicits a Th2-dominant cytokine response, *Eur. J. Immunol.* 28 (1998) 769-79.
- [37] Bommannan D., Potts R. O., Guy R. H., Examination of stratum corneum barrier function in vivo by infrared spectroscopy, *J. Invest. Dermatol.* 95 (1990) 403-408.
- [38] Fluhr J. W., Dickel H., Kuss O., Weyher I., Diepgen T. L., Berardesca E., Impact of anatomical location on barrier recovery, surface pH and stratum corneum hydration after acute barrier disruption, *Br. J. Dermatol.* 146 (2002) 770-6.
- [39] Thiele J. J., Weber S. U., Packer L., Sebaceous gland secretion is a major physiologic route of vitamin E delivery to skin, *J. Invest. Dermatol.* 113 (1999) 1006-1010.

- [40] Goshi K. O., Iguchi M., Tagami H., Functional analysis of the stratum corneum of scalp skin: studies in patients with alopecia areata and androgenetic alopecia, *Arch. Dermatol. Res.* 292 (2000) 605-611.
- [41] Rougier A., Lotte C., Maibach H.I., In vivo percutaneous penetration of some organic compounds related to anatomic site in humans: predictive assessment by the stripping method, *J. Pharm. Sci.* 76 (1987) 451-4.
- [42] Ya-Xian Z., Suetake T., Tagami H., Number of cell layers of the stratum corneum in normal skin - relationship to the anatomical location on the body, age, sex and physical parameters, *Arch. Dermatol. Res.* 291 (1999) 555-559.
- [43] Black D., Del Pozo A., Lagarde J. M., Gall Y., Seasonal variability in the biophysical properties of stratum corneum from different anatomical sites. *Skin Res. Technol.* 6 (2000) 70-76.
- [44] Schwindt D. A., Wilhelm K. P., Maibach H. I., Water diffusion characteristics of human stratum corneum at different anatomical sites in vivo, *J. Invest. Dermatol.* 111 (1998) 385-389.
- [45] Greene R. S., Downing D. T., Pochi P. E., Strauss J. S., Anatomical variation in the amount and composition of human skin surface lipid, *J. Invest. Dermatol.* 54 (1970) 240-47.
- [46] Berardesca E., Pirot F., Singh M., Maibach H. I., Differences in stratum corneum pH gradient when comparing white Caucasian and black African- American skin, *Br. J. Dermatol.* 139 (1998) 855-7.
- [47] Reed J. T., Ghadially R., Elias P. M., Skin type, but neither race nor gender influence epidermal permeability barrier function, *Arch. Dermatol.* 131 (1993) 1134-1138.

- [48] Tsai J. C., Weiner N. D., Flynn G. L., Ferry J., Properties of adhesive tapes used for stratum corneum stripping, *Int. J. Pharm.* 72 (1991) 227 -231.
- [49] Loffler H, Dreher H. F., Maibach H. I., Stratum corneum adhesive tape stripping: influence of anatomical site, application pressure, duration and removal, *Br. J. Dermatol.* 151 (2004) 746-52.
- [50] Weigmann H. J., Lademann J., Meffert H., Schaefer H., Sterry W., Determination of the horny layer profile by tape stripping in combination with optical spectroscopy in the visible range as a prerequisite to quantify percutaneous absorption, *Skin Pharmacol. Appl. Skin Physiol.* 12 (1999) 34–45.
- [51] Jacobi U, Meykadeh N., Sterry W., Lademann J., Effect of the vehicle on the stratum corneum amount removed by tape stripping, *J. Dt. Dermatol. Gesell.* 11 (2003) 884-889.
- [52] Lademann J., Jacobi U, Surber C., Weigmann H. J., Fluhr J., The tape stripping procedure- evaluation of some critical parameters, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* (2008).
- [53] Tassopoulos T., Maeder S., Imandis G., Figueiredo V., Smith E. W., Surber C., Evaluation of a direct spectrophotometric method for percutaneous bioavailability studies; in: Brain KR, Walters KA (eds): *Perspectives in Percutaneous Penetration*. Cardiff, STS Publishing, 2002, vol 8a: p 63.
- [54] Ghadially R., Brown B. E., Sequeira-Martin S. M., Feingold K. R., Elias P. M., The aged epidermal permeability barrier. Structural, functional, and lipid biochemical abnormalities in humans and a senescent murine model, *J. Clin. Invest.* 95 (1995) 2281-90.

[55] Shah V. P., Flynn G. L., Yacobi A., Maibach H. I., Bon C., Fleischer N. M., Franz T. J., Kaplan S. A., Kawamoto J., Lesko L. J., Marty J. P., Pershing L. K., H. Schaefer, Sequeira J. A., Shrivastava S. P., Wilkin J., Williams R. L., Bioequivalence of topical dermatological dosage forms--methods of evaluation of bioequivalence, *Pharm. Res.* 15 (1998) 167-71.

[56] Marttin E., Neelissen-Subnel M. T. A., De Haan F. H. N., Bodde H. E., A critical comparison of methods to quantify stratum corneum removed by tape stripping, *Skin Pharmacol. Appl. Skin Physiol.* 9 (1996) 69-77.

[57] Weigmann H. J., Schanzer S., Teichmann A., Durat F., Antoniou C., Schaefer H., Sterry W., Lademann J., Ex vivo Spectroscopic Quantification of Sunscreen Efficacy - Proposal of a Universal Sun Protection Factor, *J. Biomed. Opt.* 12 (2007) 044013 – 044021.

[58] Kandárová H., Richter H., Liebsch M., Lademann J., Stratum Corneum Architecture of Reconstructed Human Skin Models monitored by Fluorescent Confocal Laser Scanning Microscopy Laser, *Laser Phys. Lett.* 4 (2007) 308- 311.

[59] Lindemann U., Weigmann H. J., Schaefer H., Sterry W., Lademann J., Evaluation of the pseudo-absorption method to quantify human stratum corneum removed by tape stripping using the protein absorption, *Skin Pharmacol. Physiol.* 16 (2003) 228 – 236.

[60] Weigmann H. J., Lindemann U., Antoniou C., Tsikrikas G. N., Stratigos A. I., Katsambas A., Sterry W., Lademann J., UV/VIS absorbance allows rapid, accurate, and reproducible mass determination of corneocytes removed by tape stripping, *Skin Pharmacol. Appl. Skin Physiol.* 16 (2003) 217-227.

[61] Dreher F., Arens A., Hostynek J. J., Mudumba S., Ademola J., Maibach H. I., Colorimetric method for quantifying human Stratum corneum removed by adhesive-tape stripping, *Acta Derm. Venereol.* 78 (1998) 186-9.

- [62] Diffey B. L., A mathematical model for ultraviolet optics in skin, *Phys. Med. Biol.* 28 (1983) 647-657.
- [63] Bashir S. J., Dreher F., Chew A. L., Zhai H., Levin C., Stern R., Maibach H. I., Cutaneous bioassay of salicylic acid as a keratolytic, *Int. J. Pharm.* 292 (2005) 187-94.
- [64] Jacobi U., Kaiser M., Richter H., Audring H., Sterry W., Lademann J., The number of SC cell layers correlates with the pseudo-absorption of the corneocytes, *Skin Pharmacol. Physiol.* 18 (2005) 175-179.
- [65] Lindemann U., Wilken K., Weigmann H. J., Schaefer H., Sterry W., Lademann J., Quantification of the horny layer using tape stripping and microscopic techniques, *J. Biomed. Opt.* 8 (2003) 601-607.
- [66] Dreher F., Modjtahedi B. S., Modjtahedi S. P., Maibach H. I., Quantification of stratum corneum removal by adhesive tape stripping by total protein assay in 96-well microplates, *Skin Res. Technol.* 11 (2005) 97-101.
- [67] Teichmann A., Jacobi U., Weigmann H. J., Sterry W., Lademann J., Reservoir function of the Stratum corneum: Development of an in vivo method to quantitatively determine the Stratum corneum reservoir for topically applied substances, *Skin Pharmacol. Physiol.* 18 (2005) 75-80.
- [68] Voegeli R., Heiland J., Doppler S., Rawlings A. V., Schreier T., Efficient and simple quantification of stratum corneum proteins on tape strippings by infrared densitometry, *Skin Res. Technol.* 13 (2007) 242-51.
- [69] Kalia Y. N., Pirot F., Guy R., Homogeneous transport in a heterogeneous membrane: Water diffusion across human stratum corneum in vivo, *Biophys. J.* 71 (1996) 2692-2700.

[70] Weigmann H. J., Ulrich J., Schanzer S., Jacobi U., Schaefer H., Sterry W, Lademann J., Comparison of transepidermal water loss and spectroscopic absorbance to quantify changes of the Stratum corneum after tape stripping, *Skin Pharmacol. Physiol.* 18 (2005) 180-185.

[71] Pinnagoda J., Tupker R. A., Agner T., Serup J., Guidelines for transepidermal water loss (TEWL) measurement. *Contact Dermatitis* 22 (1990) 164-178.

[72] Piérard G. E., EEMCO guidance to the in vivo assessment of tensile functional properties of the skin. Part 1: Relevance to the structures and ageing of the skin and subcutaneous tissues, *Skin Pharmacol. Appl. Skin Physiol.* 12 (1999) 352-362.

[73] Van der Molen R. G.; Spies F.; Van 't Noordende J. M.; Boelsma E.; Mommaas A. M.; Koerten H. K., Tape stripping of human stratum corneum yields cell layers that originate from various depths because of furrows in the skin. *Arch. Dermatol Res.* 289 (1997) 514-8.

[74] Surber C., Schwarb F., Smith E. W., Tape-stripping technique, *J. Toxicol. Cut. Ocular. Toxicol.* 20 (2001) 461-474.

[75] Reddy M. B., Stinchcomb A. L., Guy R. H., Bunge A. L., Determining Dermal Absorption Parameters in Vivo From Tape Strip Data, *Pharm. Res.* 19 (2002) 292-298.

[76] Suzuki Y., Nomura J., Hori J., Koyama J., Takahashi M., Horii I., Detection and characterization of endogenous protease associated with desquamation of stratum corneum, *Arch. Dermatol. Res.* 285 (1993) 372-7.

[77] Lademann J., Rudolph A., Jacobi U., Weigmann H. J., Schaefer H., Sterry W., Meinke M., Influence of nonhomogeneous distribution of topically applied UV filters on sun protection factors, *J. Biomed. Opt.* 9 (2004) 1358 – 1362.

[78] Stoscheck C. M., Nanney L. B., King L. E. Jr., Quantitative determination of EGF-R during epidermal wound healing, *J. Invest. Dermatol.* 99 (1992) 645- 649.

[79] Weigmann H. J., Schanzer S., Herrling J., Wünsch T., André V., Schaefer H., Sterry W., Lademann J., Spectroscopic Characterization of the Sunscreen Efficacy-Basis of a Universal Sunscreen Protection Factor, *SÖFW-Journal* 9 (2006) 2-10.

[80] Escobar Chávez J. J., Quintanar Guerrero D., and Ganem Quintanar A., *In vivo* skin permeation of sodium naproxen formulated in PF-127 gels: Effect of Azone® and Transcutol®, *Drug Develop Ind Pharm.* 31:447-454, (2005).

[81] Curdy C., Kalia Y.N., Naik A., Guy R. H., Piroxicam delivery into human stratum corneum in vivo: iontophoresis versus passive diffusion. *J Control Rel.* 76, 73-79, (2001).

[82] Arima H., Miyajib T., Irie T., Hirayama F., Uekamaa K., 1998. Enhancing effect of hydroxypropyl-P-cyclodextrin on cutaneous penetration and activation of ethyl 4-biphenyl acetate in hairless mouse skin. *Eur J Pharm Sci.* 6:53-59, (1998).

[83] Esposito E., Cortesi R., Drechsler M., Paccamiccio L., Mariani P., Contado C., Stellin E., Menegatti E., Bonina F., Puglia C., Cubosome dispersions as delivery systems for percutaneous administration of indomethacin.

[84] Ganem Quintanar A., Silva Alvarez M., Alvarez Roman R., Casas Alancaster N., Cazares Delgadillo J., Quintanar Guerrero D., Design and evaluation of a self –adhesive naproxen-loaded film prepared from a nanoparticle dispersión. *J Nanosci Nanotechnol.* 6(9-10):3235-3241, (2006).

[85] Herkenne C., Naik A., Kalia Y. N., Hadgraft J., Guy R. H., Pig ear skin ex vivo as a model for in vivo dermatopharmacokinetic studies in man. *Pharm Res.* 23(8), 1850-1856, (2006).

- [86] Hostýnek J. J., Dreher F., Maibach H. I., 2006. Human stratum corneum penetration by copper: *In vivo* study after occlusive and semioclusive application of the metal as powder. *Food Chem Toxicol.* 44:1539–1543, (2006).
- [87] Lodén M., Akerstrom U., Lindahl K., Berne B., 2004. Bioequivalence determination of topical ketoprofen using a dermatopharmacokinetic approach and excised skin penetration. *Int J Pharm.* 284:23–30, (2004).
- [88] Wagner S. and Merfort I. Skin penetration behaviour of sesquiterpene lactones from different *Arnica* preparations using a validated GC-MSD method. *J Pharm Biomed Anal.* *In press*, (2006).
- [89] Wagner H., Kostka K. H., Lehr C. M., Schaefer U. F., Correlation between stratum corneum/water-partition coefficient and amounts of flufenamic acid penetrated into the stratum corneum. *J Pharm Sci.* 91(8):1915- 1921, (2002).
- [90] Pellanda C., Ottiker E., Strub C., Figueiredo V., Rufli T., Imanidis G., Surber C., Topical bioavailability of triamcinolone acetonide: Effect of dose and application frequency. *Arch Dermatol Res.* 298:221–230, (2006).
- [91] Lboutounne H., Chaulet J. F., Ploton C., Falson F., Pirot F., Sustained ex vivo skin antiseptic activity of chlorhexidine in poly(ε-caprolactone) nanocapsule encapsulated form and as a digluconate. *J Control Rel.*82:319–334, (2002).
- [92] Fresno Contreras M. J., Jiménez Soriano M. M., RamírezDiéguez A., In vitro percutaneous absorption of all-*trans* retinoic acid applied in free form or encapsulated in stratum corneum lipid liposomes. *Int J Pharm.* 297:134–145, (2005).
- [93] Padula C., Colombo G., Nicoli S., Catellani P. L., Massimo G., Santi P., Bioadhesive film for the transdermal delivery of lidocaine: in vitro and in vivo behaviour. *J Control Rel.* 88: 277–285, (2003).

- [94] Abdulmajed K. and Heard Ch. M., Topical delivery of retinyl ascorbate co-drug Synthesis, penetration into and permeation across human skin. *Int J Pharm.* 280:113–124, (2004).
- [95] Hara M., Verkman A. S., Glycerol replacement corrects defective skin hydration, elasticity, and barrier function in aquaporin-3-deficient mice. *PNAS.* 100(12):7360–7365, (2003).
- [96] Morgan C. J., Renwick A. G., Friedmann P. S., The role of stratum corneum and dermal microvascular perfusion in penetration and tissue levels of water-soluble drugs investigated by microdialysis. *Br J Dermatol.* 148:434–443, (2003).
- [97] Jarvis C. A., McGuigan C., Heard C. M., In vitro delivery of novel, highly potent anti-Varicella Zoster virus nucleoside analogues to their target site in the skin. *Pharm Res.* 21(6):914-919, (2004).
- [98] Inoue J., Yotsumoto S., Sakamoto T., Tsuchiya S., Aramaki Y., Changes in immune responses to antigen applied to tape-stripped skin with CpG oligodeoxynucleotide in mice. *J Control Rel.* 108:294– 305, (2005).
- [99] Inoue J. and Aramaki Y., 2006. Toll-like receptor-9 expression induced by tape-stripping triggers on effective immune response with CpG-oligodeoxynucleotides. *Vaccine.* In press, (2006).
- [100] Ayala bravo H. A., Quintanar Guerrero D., Naik A., Kalia Y.N., Cornejo Bravo J.M., Ganem Quintanar A., 2003. Effects of sucrose oleate and sucrose laureate on *in vivo* human stratum corneum permeability. *Pharm Res.*20 (8):1267-1273, (2003).
- [101] Jakasa I., Calkoen F., Kezic S., Determination of polyethylene glycols of different molecular weight in the stratum corneum. *J Chromatogr B.* 811:177–182, (2004).

- [102] Jakasa I., Verbek M. M., Esposito M., Bos J. D., Kezic S., Altered penetration of polyethylene glycols into uninvolved skin of atopic dermatitis patients. *J Investigative Dermatol.* 127:129–134, (2007).
- [103] Tsai J. C., Shen L. C., Sheu H. M., Lu C. C., Tape stripping and sodium dodecyl sulfate treatment increase the molecular weight cut-off of polyethylene glycol penetration across murine skin. *Arch Dermatol Res.* 295:169–174, (2003).
- [104] Alvarez Román R., Naik A., Kalia Y. N., Guy R. H., Fessi H., Enhancement of topical delivery from biodegradable nanoparticles. *Pharm Res.* 21(10):1818-1825, (2004).
- [105] Olvera Martínez B. I., Cazares Delgadillo J., Calderilla Fajardo S.B., Villalobos García R., Ganem Quintanar A., Quintanar Guerrero D., Preparation of polymeric nanocapsules containing octyl methoxycinnamate by the emulsification–diffusion technique: Penetration across the stratum corneum. *J Pharm Sci.* 94:1552–1559, (2005).
- [106] Sarveiya V., Risk S., Benson H.A.E., Liquid chromatographic assay for common sunscreen agents: application to in vivo assessment of skin penetration and systemic absorption in human volunteers. *J Chromatogr B.* 803:225–231, (2004).
- [107] Lademann J., Schanzer S., Richter H., Pelchrzim R. V., Zastroe L., Golz K., Sterry W., Sunscreen application at the beach. *J Cosmet Dermatol.* 3(2):62-68, (2004).
- [108] Mavon A., Miguel C., Lejeune O., Payre B., Moretto P., In vitro percutaneous absorption and in vivo stratum corneum distribution of an organic and mineral sunscreen. *Skin Pharmacol Physiol.* 20(1):10-20, (2007).
- [109] Brian K. R., Green D. M., Lalko J., Api A. M., Invitro human skin penetration of the fragrance material geranyl nitrile. *Toxicology in Vitro* 21:133–138, (2007).

[110] Teichmann A., Jacobi U., Waibler E., Sterry W., Lademann J., An in vivo model to evaluate the efficacy of barrier creams on the level of skin penetration of chemicals. *Contact Dermatitis*. 54:5–13, (2006).

[111] Jacobi U., Tassopoulos T., Surber C., Lademann J., Cutaneous distribution and localization of dyes affected by vehicles all with different lipophilicity. *Arch Dermatol Res*. 297:303–310, (2006).

[112] Tegeder I., Brautigam L., Podda M., Meier S., Kaufmann R., Geisslinger G., Grundmann Kollmann M., Time course of 8-methoxypsoralen concentrations in skin and plasma after topical (bath and cream) and oral administration of 8-methoxypsoralen, *Clin. Pharmacol. Ther.* 71 (2002) 153–161.

[113] Franz T. J., Percutaneous absorption on the relevance of in vitro data, *J. Invest. Dermatol.* 64 (1975) 190–195.

[114] Hegemann L., Forstinger C., Partsch B., Lagler I., Wolff K., Microdialysis in cutaneous pharmacology: kinetic analysis of transdermally delivered nicotine, *J. Invest. Dermatol.* 104 (1995) 839–843.

[115] Benfeldt E., Serup J., Menne T., Effect of barrier perturbation on cutaneous salicylic acid penetration in human skin: in vivo pharmacokinetics using microdialysis and non-invasive quantification of barrier function, *Br. J. Dermatol.* 140 (1999) 739–748.

[116] Benfeldt E., Serup J., Effect of barrier perturbation on cutaneous penetration of salicylic acid in hairless rats: in vivo pharmacokinetics using microdialysis and non-invasive quantification of barrier function, *Arch. Dermatol. Res.* 291 (1999) 517–526.

[117] Murakami T., Yoshioka M., Okamoto I., Yumoto R., Higashi Y., Okahara K., Yata N., Effect of ointment bases on topical and transdermal delivery of salicylic acid in rats: evaluation by skin microdialysis, *J. Pharm. Pharmacol.* 50 (1998) 55–61.

[118] Murakami T., Yoshioka M., Yumoto R., Higashi Y., Shigeki S., Ikuta Y., Yata N., Topical delivery of keloid therapeutic drug, tranilast, by combined use of oleic acid and propylene glycol as a penetration enhancer: evaluation by skin microdialysis in rats, *J. Pharm. Pharmacol.* 50 (1998) 49–54.

[119] Müller M., Mascher H., Kikuta C., Schafer S., Brunner M., Dorner G., Eichler H. G., Diclofenac concentrations in deconfined tissue layers after topical administration, *Clin. Pharmacol. Ther.* 62 (1997) 293–299.

[120] Anderson C., Andersson T., Molander M., Ethanol absorption across human skin measured by in vivo microdialysis technique, *Acta Dermatol. Venereol.* 71 (1991) 389–393.

[121] Anderson C., Andersson T., Boman A., Molander M., Cutaneous microdialysis for the measurement in vivo of the percutaneous absorption of organic solvents, *Curr. Probl. Dermatol.* 25 (1996) 37–46.

[122] Kreilgaard M., Dermal pharmacokinetics of microemulsion formulations determined by in vivo microdialysis, *Pharm. Res.* 18 (2001) 367–373.

[123] Kreilgaard M., Kemme M. J., Burggraaf J., Schoemaker R. C., Cohen A. F., Influence of a microemulsion vehicle on cutaneous bioequivalence of a lipophilic model drug assessed by microdialysis and pharmacodynamics, *Pharm. Res.* 18 (2001) 593–599.

- [124] Fang J. Y., Hsu L. R., Huang Y. B., Tsai Y. H., Evaluation of transdermal iontophoresis of enoxacin from polymer formulations: in vitro skin permeation and in vivo microdialysis using Wistar rat as an animal model, *Int. J. Pharm.* 180 (1999) 137–149.
- [125] Fang J. Y., Sung K. C., Lin H. H., Fang C. L., Transdermal iontophoretic delivery of diclofenac sodium from various polymer formulations: in vitro and in vivo studies, *Int. J. Pharm.* 178 (1999) 83–92.
- [126] Ding P., Xu H., Wei G., Zheng J., Microdialysis sampling coupled to HPLC for transdermal delivery study of ondansetron hydrochloride in rats, *Biomed. Chromatogr.* 14 (2000) 141–143.
- [127] Ault J. M., Riley C. M., Meltzer N. M., Lunte C. E., Dermal microdialysis sampling in vivo, *Pharm. Res.* 11 (1994) 1631–1639.
- [128] Matsuyama K., Nakashima M., Nakaboh Y., Ichikawa M., Satoh S., Application of in vivo microdialysis to transdermal absorption of methotrexate in rats, *Pharm. Res.* 11 (1994) 684–686.
- [129] Nakashima M., Zhao M. F., Ohya H., Sakurai M., Sasaki H., Matsuyama K., Ichikawa M., Evaluation of in-vivo transdermal absorption of cyclosporin with absorption enhancer using intradermal microdialysis in rats, *J. Pharm. Pharmacol.* 48 (1996) 1143–1146.
- [130] Matsuyama K., Nakashima M., Ichikawa M., Yano T., Satoh S., Goto S., In vivo microdialysis for the transdermal absorption of valproate in rats, *Biol. Pharm. Bull.* 17 (1994) 1395–1398.

[131] Stagni G., O'Donnell D., Liu Y. J., Kellogg J. D. L., Morgan T., Shepherd A. M. M., Intradermal microdialysis: kinetics of iontophoretically delivered propranolol in forearm dermis, *J. Control. Release* 63 (2000) 331–339.

[132] Boelsma E., Anderson C., Karlsson A. M., Ponec M., Microdialysis technique as a method to study the percutaneous penetration of methyl nicotinate through excised human skin, reconstructed epidermis, and human skin in vivo, *Pharm. Res.* 17 (2000) 141–147.

[133] Anderson C., Andersson T., Nyquist Mayer A., Melin M., Roberts M. S., Cutaneous microdialysis technique in the study of the percutaneous absorption of a local anaesthetic cream in vivo in human skin, *Perspectives in Percutaneous Penetration* 5a (1997) Abstract.

[134] Müller M., Schmid R., Wagner O., Osten B., Shayganfar H., Eichler H. G., In vivo characterization of transdermal drug transport by microdialysis, *J. Control. Release* 37 (1995) 49–57.

[135] Lönnroth P., Jansson P. A., Smith U., A microdialysis method allowing characterization of intercellular water space in humans, *Am. J. Physiol.* 253 (1987) E228–E231.

[136] Kreilgaard M. Assessment of cutaneous drug delivery using microdialysis, Department of Neurochemistry and Discovery MADE, H. Lundbeck A/S, Ottiliavej 9, DK-2500 Valby, Denmark (2002).

[137] Stähle L., On mathematical models of microdialysis: geometry, steady-state models, recovery and probe radius, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 45 (2000) 149–167.

- [138] Schmelz M., Luz O., Averbeck B., Bickel A., Plasma extravasation and neuropeptide release in human skin as measured by intradermal microdialysis, *Neurosci. Lett.* 230 (1997) 117–120.
- [139] Lindberger M., Tomson T., Stahle L., Validation of microdialysis sampling for subcutaneous extracellular valproic acid in humans, *Ther. Drug Monit.* 20 (1998) 358–362.
- [140] Anderson C., Andersson T., Wardell K., Changes in skin circulation after insertion of a microdialysis probe visualized by laser Doppler perfusion imaging, *J. Invest. Dermatol.* 102 (1994) 807–811.
- [141] Groth L., Jørgensen A., Serup J., Cutaneous microdialysis in the rat: insertion trauma and effect of anaesthesia studied by laser Doppler perfusion imaging and histamine release, *Skin Pharmacol. Appl. Skin Physiol.* 11 (1998) 125–132.
- [142] Groth L., Serup J., Cutaneous microdialysis in man: effects needle insertion trauma and anaesthesia on skin perfusion, erythema and skin thickness, *Acta Dermatol. Venereol.* 78 (1998) 5–9.
- [143] Petersen L. J., Measurement of histamine release in intact human skin by microdialysis technique. Clinical and experimental findings, *Dan. Med. Bull.* 45 (1998) 383–401.
- [144] Groth L., Cutaneous microdialysis. Methodology and validation, *Acta Dermatol. Venereol. Suppl.* 197 (1996) 1–61.
- [145] Parsons L. H., Justice J. B., Quantitative approaches to in vivo brain microdialysis, *Crit. Rev. Neurobiol.* 8 (1994) 189–220.
- [146] Benveniste H., Brain microdialysis, *J. Neurochem.* 52 (1989) 1667–1679.

- [147] Wages S. A., Church W. H., Justice J. B., Sampling considerations for online micro-bore liquid chromatography of brain dialysate, *Anal. Chem.* 58 (1986) 1649–1656.
- [148] Kendrick K. M., Use of microdialysis in neuroendocrinology, *Methods Enzymol.* 168 (1989) 182–205.
- [149] Wong S. L., Wang Y., Sawchuk R. J., Analysis of zidovudine distribution to specific regions in rabbit brain using microdialysis, *Pharm. Res.* 9 (1992) 332–338.
- [150] Kehr J., A survey on quantitative microdialysis: theoretical models and practical implications, *J. Neurosci. Methods* 48 (1993) 251–261.
- [151] Larsson C. I., The use of an ‘internal standard for control of the recovery in microdialysis, *Life Sci.* 49 (1991) L73–L78.
- [152] Bouw M. R., Hammarlund Udenaes M., Methodological aspects of the use of a calibrator in vivo microdialysis- further development of the retrodialysis method, *Pharm. Res.* 15 (1998) 1673–1679.
- [153] Krogstad A. L., Jansson P. A., Gisslen P., Lönnroth P., Microdialysis methodology for the measurement of dermal interstitial fluid in humans, *Br. J. Dermatol.* 134 (1996) 6–12.
- [154] Stähle L., Drug distribution studies with microdialysis: I. Tissue dependent difference in recovery between caffeine and theophylline, *Life Sci.* 49 (1991) 1835–1842.
- [155] Wang Y., Wong S. L., Sawchuk R. J., Microdialysis calibration using retrodialysis and zero-net flux: application to a study of the distribution of zidovudine to rabbit cerebrospinal fluid and thalamus, *Pharm. Res.* 10 (1993) 1411–1419.

[156] Petersen L. J., Quantitative measurement of extracellular histamine concentrations in intact human skin in vivo by the microdialysis technique: methodological aspects, *Allergy* 52 (1997) 547–555.

[157] Anderson C., Andersson T., Andersson R. G., In vivo microdialysis estimation of histamine in human skin, *Skin Pharmacol.* 5 (1992) 177–183.

[158] Groth L., Jørgensen A., Serup J., Cutaneous microdialysis in the rat: insertion trauma studied by ultrasound imaging, *Acta Dermatol. Venereol.* 78 (1998) 10–14.

[159] Ault J. M., Lunte C. E., Meltzer N. M., Riley C. M., Microdialysis sampling for the investigation of dermal drug transport, *Pharm. Res.* 9 (1992) 1256–1261.

[160] Benfeldt E., Groth L., Feasibility of measuring lipophilic or protein-bound drugs in the dermis by in vivo microdialysis after topical or systemic drug administration, *Acta Dermatol. Venereol.* 78 (1998) 274–278.

[161] Carneheim C., Stähle L., Microdialysis of lipophilic compounds: a methodological study, *Pharmacol. Toxicol.* 69 (1991) 378–380.

[162] Kurosaki Y., Nakamura S., Shiojiri Y., Kawasaki H., Lipo- microdialysis: a new microdialysis method for studying the pharmacokinetics of lipophilic substances, *Biol. Pharm. Bull.* 21 (1998) 194–196.

[163] Khramov A. N., Stenken J. A., Enhanced microdialysis recovery of some tricyclic antidepressants and structurally related drugs by cyclodextrin-mediated transport, *Analyst* 124 (1999) 1027–1033.

[164] Schmelz M., Weber S., Kress M., Topical acetyl salicylate and dipyrone attenuate neurogenic protein extravasation in rat skin in vivo, *Neurosci. Lett.* 290 (2000) 57–60.

- [165] Wu J. T., Zeng H., Qian M., Brogdon B. L., Unger S. E., Direct plasma sample injection in multiple-component LC–MS–MS assays for high-throughput pharmacokinetic screening, *Anal. Chem.* 72 (2000) 61–67.
- [166] Davies M. I., Cooper J. D., Desmond S. S., Lunte C. E., Lunte S. M., Analytical considerations for microdialysis sampling, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 45 (2000) 169–188.
- [167] Kiistala, U. (1968) Suction blister device for separating viable epidermis from dermis. *J. Invest. Dermatol.* 50, 129–137.
- [168] Oikarinen A., Autio P., Kiistala, U., Risteli L., and Risteli J. (1992) A new method to measure type I and III collagen synthesis in human skin in vivo: demonstration of decreased collagen synthesis after topical glucocorticoid treatment. *J. Invest. Dermatol.* 98, 220–225.
- [169] Ingemansson Nordqvist B., Kiistala U., and Rorsman H. (1967) Culture of adult human epidermal cells obtained from roofs of suction blisters. *Acta Dermatol. Venereol.* 47, 237–240.
- [170] Averbeck D., Averbeck, S., Blais J., Moysan A., Hüppe G., Morlière P., Prognon P., Vigny P., and Dubertret L. (1989) Suction blister fluid: its use for pharmacodynamic and toxicological studies of drugs and metabolites in vivo in human skin after topical or systemic administration, in *Models in Dermatology*, vol. 4 (Maibach, H. I. and Lowe, N. J., eds.), Karger, Basel, pp. 5–11.
- [171] Benfeldt E., Serup J., and Menné T. (1999) Microdialysis vs. suction blisterechnique for in vivo sampling of pharmacokinetics in the human dermis. *Acta Dermatol. Venereol.* 79, 338–342.

- [172] Oikarinen A., Kylmäniemi M., Autio Harmainen H., Autio P., and Salo T. (1993) Demonstration of 72-kDa and 92-kDa forms of type IV collagenase in human skin: variable expression in various blistering diseases, induction during re-epithelialization and decrease by topical glucocorticoids. *J. Invest. Dermatol.* 101, 205–210.
- [173] Kylmäniemi M., Autio P., and Oikarinen A. (1994) Interleukin 1alfa (IL-1alfa) in human skin *in vivo*. Lack of correlation to markers of collagen metabolism. *Acta Dermatol. Venereol.* 74, 364–367.
- [174] Kiistala U. and Mustakallio K. K. (1967) Dermo-epidermal separation with suction: electron microscopic and histochemical study of initial events of blistering on human skin. *J. Invest. Dermatol.* 48, 466–477.
- [175] Oikarinen A., Savolainen E. R., Tryggvason K., Foidart J. M., and Kiistala U. (1982) Basement membrane components and galactosylhydroxylsyl glucosyltransferase in suction blisters of human skin. *Br. J. Dermatol.* 106, 257–266.
- [176] Kainulainen T., Häkkinen L., Hamidi S., Larjava K., Kallioinen M., Peltonen J., Salo T., Larjava H., and Oikarinen A. (1998) Laminin-5 expression is independent of the injury and microenvironment during re-epithelialization of wounds. *J. Histochem. Cytochem.* 46, 353–360.
- [177] Leivo T., Kiistala U., Vesterinen M., Owaribe K., Burgeson R. E., Virtanen I., and Oikarinen A. (2000) Re-epithelialization rate and protein expression in suction-induced wound model: comparison between intact blisters, open wounds and calcipotriol-pretreated open wounds. *Br. J. Dermatol.* 142, 991–1002.
- [178] Kiistala U. (1972) Dermal-epidermal separation II. External factors in suction blister formation with special reference to the effects of temperature. *Ann. Clin. Res.* 4, 236–246.

- [179] Koivukangas V., Annala A.-P., Salmela P. I., and Oikarinen A. (1999) Delayed restoration of epidermal barrier function after suction blister injury in patients with diabetes mellitus. *Diabet. Med.* 16, 563–567.
- [180] Koivukangas V. and Oikarinen A. (1998) Effects of PUVA and UVB treatment on restoration of epidermal barrier function and vascular response after suction blister injury in human skin in vivo. *Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.* 14, 119–124.
- [181] Benfeldt E., Serup J., Menné T. 1999. Microdialysis vs suction blister technique for in vivo sampling of pharmacokinetics in the human dermis. *Acta Derm., Venereol.*, 79(5):338-342.
- [182] Walker J. S., Knihinicki R. D., Seideman P., Day R. O. 1993. Pharmacokinetics of ibuprofen enantiomers in plasma and suction blister fluid in healthy volunteers. *J. Pharm. Sci.*, 82(8):787-790.
- [183] Müller M., Brunner M., Schmid R., Putz E. M., Schmiedberger A., Wallner I., and Eichler H. G., 1998. Comparison of three different experimental methods for the assessment of peripheral compartment pharmacokinetics in humans. *Life Sci.* 62:PL227–PL234.
- [184] Sasongko L., Williams K. M., Day R. O. & Lachlan A. J., Human subcutaneous tissue distribution of fluconazole: comparison of microdialysis and suction blister techniques, Australia, 2006.
- [185] Borg N., Götharson E., Benfeldt E., Groth L., Ståhle L. 1999. Distribution to the skin of penciclovir after oral famciclovir administration in healthy volunteers: comparison of the suction blister technique and cutaneous microdialysis. *Acta Derm. Venereol.*, 79(4):274-277.

- [186] Królicki A. 2002. Skin penetration of sulfamethoxazole and trimethoprim after oral administration. *Ann. Acad. Med Stetin.*, 48:59-73.
- [187] Haaverstad R., Romslo I., Larsen S., Myhre H.O. 1996. Protein concentration of subcutaneous interstitial fluid in the human leg. A comparison between the wick technique and the blister suction technique. *Int. J. Microcirc. Exp.*, 16(3):111-117.
- [188] Siegfried Wartewig, Reinhard H.H., Neubert T., Pharmaceutical applications of Mid-IR and Raman spectroscopy, Martin-Luther-University Halle-Wittenberg, Institute of Applied Dermatopharmacy, Germany, 2005.
- [189] Chalmers J., Griffiths P. R., (Eds.), Handbook of Vibrational Spectroscopy, vols. 1–5, Wiley & Sons, Chichester, 2001.
- [190] Colthup N. B., Daly L. H., Wiberley S. E., Introduction to Infrared and Raman Spectroscopy, 3rd ed., Academic Press, San Diego, 1990.
- [191] Gonzler H., Heise H. M., Gremlich H. U., IR Spectroscopy, Wiley-VCH, Weinheim, 2002.
- [192] Gremlich H. U., Yan B., (Eds.), Infrared and Raman Spectroscopy of Biological Materials, Marcel Dekker, New York, 2001.
- [193] Lin Vien D., Colthup N. B., Fateley W. G., Grasseli J. G., The Handbook of Infrared and Raman Characteristic Frequencies of Organic Molecules, Academic Press, Boston, 1991.
- [194] Schrader B. (Ed.), Infrared and Raman Spectroscopy, Methods and Applications, VCH, Weinheim, 1995.

- [195] Clark D., The analysis of pharmaceutical substances and formulated products by vibrational spectroscopy, in: J. Chalmers, P.R. Griffiths (Eds.), *Handbook of Vibrational Spectroscopy*, vol. 5, Wiley & Sons, Chichester, 2001, pp. 3576– 3589.
- [196] Threlfall T., Polymorphs, solvates and hydrates, in: Chalmers J., Griffiths P. R., (Eds.), *Handbook of Vibrational Spectroscopy*, vol. 5, Wiley & Sons, Chichester, 2001, pp. 3557– 3573.
- [197] Rosencwaig A., Gersho A., Theory of the photoacoustic effect with solids, *J. Appl. Phys.* 47 (1976) 64– 69. [10] A. Rosencwaig, *Photoacoustics and Photoacoustic Spectroscopy*, Wiley, New York, 1980.
- [198] Rosencwaig A., *Photoacoustics and Photoacoustic Spectroscopy*, Wiley, New York, 1980.
- [199] Smith M. J., Manning Ch. J., Palmer R. A., Chao J. L., Step scan interferometry in the mid-infrared with photothermal detection, *Appl. Spectrosc.* 42 (1988) 546– 555.
- [200] Mirabella F. M., Principles, theory, and practice of internal reflection spectroscopy, in: F.M. Mirabella (Ed.), *Internal Reflection Spectroscopy: Theory and Applications*, Marcel Dekker, New York, 1993, pp. 17– 52.
- [201] Rosenthal R. J., Carl R. T., Beauchaine J. P., Fuller M. P., *Microchim. Acta* 51 (1988) 149– 153.
- [202] Neubert R., Collin B., Wartewig S., Direct determination of drug content in semisolid formulations using step-scan FTIRPAS, *Pharm. Res.* 14 (1997) 946– 948.
- [203] Puttnam N. A., Baxter B. H., Spectroscopic studies of skin in situ by attenuated total reflectance, *J. Soc. Cosmet. Chem.* 18 (1962) 469– 472.

- [204] Comaish S., Infra-red studies of human skin by multiple internal reflection, *Br. J. Dermatol.* 80 (1968) 522–528.
- [205] Puttnam N. A., Attenuated total reflectance studies of the skin, *J. Soc. Cosmet. Chem.* 23 (1972) 209– 226.
- [206] Baier R. E., Noninvasive, rapid characterization of human skin chemistry in situ, *J. Soc. Cosmet. Chem.* 29 (1978) 283– 306.
- [207] Potts R. O., Guzek D. B., Harris P. R., McKie J. E., A noninvasive, in vivo technique to quantitatively measure water concentration in the stratum corneum using attenuated total reflectance infrared spectroscopy, *Arch. Dermatol. Res.* 277 (1985) 489–495.
- [208] Mak V. H. W., Potts R. O., Guy R. H., Oleic acid concentration and effect in human stratum corneum: non-invasive determination by ATR infrared spectroscopy in vivo, *J. Control. Release* 12 (1990) 67– 75.
- [209] Mak V. H. W., Potts R. O., Guy R. H., Percutaneous penetration enhancement in vivo measured by attenuated total reflectance, *Pharm. Res.* 7 (1990) 835–841.
- [210] Potts R. O., Golden G. M., Francoeur M. L., Mak V. H. W., Guy R. H., Mechanism and enhancement of solute transport across the stratum corneum, *J. Control. Release* 15 (1991) 249– 260.
- [211] Higo N., Naik A., Bommanna D. B., Potts R. O., Guy R. H., Validation of reflectance infrared spectroscopy as a quantitative method to measure percutaneous absorption in vivo, *Pharm. Res.* 10 (1993) 1500–1506.

[212] Takeuchi Y., Yasukawa H., Yamaoka Y., Takahashi N., Tamura Ch, Morimoto Y., Fukushima Sh, Vasavada R. C., Effect of oleic acid/propylene glycol on rat abdominal stratum corneum: lipid extraction and appearance of propylene glycol in the dermis measured by FTIR-ATR spectroscopy, *Chem. Pharm. Bull.* 41 (1993) 1434– 1437.

[213] Clancy M. J., Corish J., Corrigan O. I., A comparison of the effects of electrical current and penetration enhancers on the properties of human skin using spectroscopic FTIR and calorimetric DSC methods, *Int. J. Pharm.* 105 (1994) 47– 56.

[214] Pirot F., Kalia Y. N., Stinchcomb A. L., Keating G., Bunge A., Guy R. H., Characterization of the permeability barrier of human skin in vivo, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94 (1997) 1562– 1567

[215] Brand R. M., Singh P., Aspe Carranza E., Maibach H. I., Guy R. H., Acute effect of iontophoresis on human skin in vivo: cutaneous blood flow and transepidermal water loss measurements, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 43 (1997) 133– 138.

[216] Yokomizo Y., Effect of phosphatidylglycerol on the percutaneous drug penetration of drugs through the dorsal skin of guinea pigs in vitro and analysis of the molecular mechanism using ATR-FTIR spectroscopy, *J. Control. Release* 42 (1996) 249– 262.

[217] Bhatia K. S., Gao S., Singh J., Effect of penetration enhancers and iontophoresis on the FTIR spectroscopy and LHRM permeability through porcine skin, *J. Control. Release* 47 (1997) 81–89.

[218] Tanojo H., Junginger H. E., Bodde H. E., In vivo human skin permeability enhancement by oleic acid: transepidermal water loss and FTIR spectroscopic studies, *J. Control. Release* 47 (1997) 31–39.

- [219] Brancaleon L., Bamberg M. P., Kollias N., Spectral differences between stratum corneum and sebaceous molecular components in the Mid-IR, *Appl. Spectrosc.* 54 (2000) 1175–1182.
- [220] Alberti I., Kalia Y. N., Naik A., Bonny J. D., Guy G. H., In vivo assessment of enhanced topical delivery of terbinafine to human stratum corneum, *J. Control. Release* 71 (2001) 319– 327.
- [221] Brancaleon L., Bamberg M. P., Sakamaki T., Kollias N., Attenuated total reflection Fourier transform infrared spectroscopy as a possible method to investigate biophysical parameters of stratum corneum in vivo, *J. Invest. Dermatol.* 116 (2001) 380– 386.
- [222] Smyth H. D. C., Becket G., Mehta S., Effect of permeation enhancer pretreatment on the iontophoresis of luteinizing hormone releasing hormone (LHRH) through human epidermal membrane (HEM), *J. Pharm. Sci.* 91 (2002) 1296– 1307.
- [223] Casiraghi A., Minghetti P., Cilurzo F., Montanari L., Naik A., Occlusive properties of monolayer patches: in vitro and in vivo evaluation, *Pharm. Res.* 19 (2002) 423–426.