



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS  
QUÍMICAS**

**“ESTUDIO DEL TRANSPORTE A TRAVÉS DE PIEL *IN VIVO* DE  
TRICLOSÁN, INCLUIDO EN UNA DISPERSIÓN DE NANOPARTÍCULAS  
POLIMÉRICAS”**

TESIS  
PARA OPTAR POR EL GRADO DE

**DOCTORA EN CIENCIAS**

PRESENTA

M. en C. CLARA LUISA DOMÍNGUEZ DELGADO



TUTOR: DRA. ADRIANA GANEM RONDERO

AÑO: 2014



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.

## *Dedicatorias*

*Dedico este trabajo a mis padres Hedilberto y Gema por todo el amor, comprensión y apoyo brindado tanto en mis estudios como en todos los momentos de mi vida.*

*Este escrito también lo dedico a mis sobrinos Alejandra, Josué e Isaác por llenar con tan inmesurable alegría cada espacio de mi corazón.*

## AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) por ser mi casa de estudios en mi formación académica y al programa PAPIIT (216313).

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo financiero brindado a través de la beca (No. registro 204990/129320) que me fue otorgada.

A los miembros de mi Comité Tutelar conformado por la Dra. Luz María Melgoza, la Dra. Helgi Junk Cook y mi asesora de tesis, la Dra. Adriana Ganem, por sus valiosas aportaciones, revisiones y consejos.

Al Dr. Gerardo Jiménez Cruz por su confianza depositada en mi y por la colaboración y apoyo con los estudios de microbiología.

Al Dr. Y. N. Kalia y a la Universidad de Ginebra, Suiza por el apoyo otorgado para la realización de los estudios de microscopía confocal y de dos fotones.

A los miembros de mi Jurado por enriquecer este trabajo con tan importantes comentarios y aportaciones.

A mis amigos de la FES-C especialmente a Liliana Sánchez, Pedro Clemente y Gregorio Sánchez; a mis amigos del Posgrado en Ciencias Químicas, de manera particular a José Juan Escobar, Iván Calderón, Enrique Fuentes, Marlén Rodríguez y Lorena García; por ser esa luz que ilumina mi sendero, producto de su cariño, amor, comprensión y lealtad.

Al Técnico José Martín Neri Mondragon del Departamento de Microbiología de la FES Cuautitlán por su apoyo en la preparación de los medios de cultivo en este trabajo.

Al Técnico Iván Puente Lee de la Sección de Microscopía Electrónica de la Facultad de Química, C.U., por el material fotográfico proporcionado.

Al Técnico Draucin Jiménez Celi del Taller de Soplado de Vidrio por su apoyo en la reparación de material ocupado en este proyecto.

Al Dr. Olivier Dorchies y a la Dr. Ophèlie Patthey del Departamento de Farmacología de la Sección de Ciencias Farmacéuticas (Facultad de Ciencias, Universidad de Ginebra, Suiza) por el asesoramiento sobre los cortes, la preparación y la tinción de los tejidos de la piel en este estudio.

Al Dr. Christoph Bauer y a Jérôme Bosset del grupo “Bioimaging Platform of the NCCR-Frontiers in Genetics” en la Universidad de Ginebra, Suiza, por su asistencia en los estudios de microscopía confocal y de dos fotones.

Finalmente agradezco a la Clínica Vert-Pré (Ginebra, Suiza), en particular, al Dr. Gabor Varadi y la señora Amalia Vittoz-Rivero, por la donación de piel humana abdominal, extirpada de los procedimientos de cirugía estética.

## **JURADO ASIGNADO**

### **Presidente:**

Dr. Rogelio Gregorio Pereda Miranda

### **Vocal:**

Dra Margarita Rivera Hernández

### **Vocal:**

Dra. María Josefa Bernad Bernad

### **Vocal:**

Dra. Luz María Melgoza Contreras

### **Secretario:**

Dr. Eduardo Rodríguez de San Miguel Guerrero

## PUBLICACIONES

### ARTÍCULOS

- Domínguez-Delgado Clara Luisa, Rodríguez-Cruz Isabel Marlen, Escobar-Chávez José Juan, Calderón-Lojero Iván Omar, Quintanar-Guerrero David, Ganem Adriana. Preparation and characterization of triclosan nanoparticles intended to be used for the treatment of acne. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2011; 79 (1) 102-107.
- Domínguez-Delgado Clara Luisa, Vidal Romero Gustavo, Cruz-Jiménez Gerardo, Kalia Yogeshvar Naik, Dubey Sachin, Escobar-Chávez José Juan, Ganem Adriana. Delivery, efficacy, penetration and distribution studies of triclosan from sensitive-skin pH nanoparticles: targeting the follicular pathway. *Journal of Controlled Release*. Sometido (en correcciones), Septiembre 2013.

### CONGRESOS

- **XLII Congreso Nacional de Ciencias Farmacéuticas.** *Liberación in vitro de triclosán a partir de nanopartículas poliméricas propuestas para el tratamiento de acné.* Modalidad: cartel. Cancún, Quintana Roo. Octubre de 2009.
- **XLIII Congreso Nacional de Ciencias Farmacéuticas.** *Permeación in vivo de triclosán a partir de una emulsión comercial (o/w) y de una dispersión de nanopartículas poliméricas, formuladas para tratar el acné.* Modalidad: cartel. Puerto Vallarta, Jalisco. Octubre de 2010.
- **38<sup>th</sup> Annual Meeting & Exposition of the Controlled Release Society (CRS).** *In vivo permeation study of triclosan included in polymeric nanoparticles and in an emulsion (o/w) intended to be used for the treatment of acne.* Modalidad: cartel. Maryland, Estados Unidos, 2011.
- **I Reunión Iberoamericana de Estudiantes de Posgrado en Farmacia dentro del V Foro Internacional Sobre Avances en Tecnología Farmacéutica.** *Estudio comparativo de la permeación in vivo de triclosán a partir de dos formulaciones. Nanopartículas poliméricas: propuesta interesante para el tratamiento de acné.* Modalidad: cartel. México, Distrito Federal, Noviembre del 2011.
- **XLV Congreso Nacional de Ciencias Farmacéuticas.** *Evaluación de la distribución y penetración en la piel de nanopartículas para tratar el acné.* Modalidad: cartel. Oaxaca, Oax, Septiembre del 2012.

### LUGAR EN DONDE SE REALIZÓ LA TESIS:

- *Laboratorio de Posgrado en Farmacia, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, México.*
- *Laboratorio de Farmacia, Universidad de Ginebra, Suiza.*

## ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE GENERAL.....	I
ÍNDICE DE FIGURAS.....	V
ÍNDICE DE CUADROS.....	X
ÍNDICE DE ABREVIATURAS .....	XII
ABSTRACT.....	XIII
RESUMEN .....	XIV
INTRODUCCIÓN .....	1
MARCO TEÓRICO.....	3
1. Estructura de la piel .....	3
1.1 Epidermis .....	3
1.2 Dermis .....	5
1.3 Hipodermis.....	6
1.4 Anexos cutáneos.....	6
2. Vías de penetración de los fármacos a través de la piel: Nuevos conceptos .....	8
2.1 La ruta transcelular: .....	8
2.2 La ruta lipídica intercelular: .....	9
3. Clasificación de la piel .....	11
3.1 De acuerdo a aspectos cosmetológicos .....	11
3.2 Diferencias funcionales y morfológicas de la piel de acuerdo al género, edad, raza, especie y sitio anatómico .....	13
3.3 De acuerdo a su fotosensibilidad.....	17
4. Acne vulgaris.....	18
4.1 Definición.....	18
4.2 Clasificación:.....	18
4.3 Incidencia: .....	18
4.4 Costos en tratamientos de acné .....	19
4.5 Patogénesis.....	19
4.5.1 Características generales de Propionibacterium acnes .....	19

4.5.1.1 Patogenicidad.....	19
4.5.1.2 Morfología .....	20
4.5.1.3 Características de cultivo .....	20
4.5.1.4 Características bioquímicas .....	20
4.6 Tratamientos.....	20
4.7 Análisis de los tratamientos convencionales y no convencionales (nanoparticulados) para acné.....	23
5. Sistemas Nanoacarreadores .....	28
5.1 Nanopartículas sólidas.....	29
5.2 Liposomas .....	29
5.2.1 Transfersomas.....	30
5.2.2 Etosomas.....	30
5.2.3 Niosomas .....	31
5.3 Dendrímeros.....	31
5.4 Nanoemulsiones .....	32
6. Técnicas de preparación de nanopartículas .....	32
6.1 Emulsificación-evaporación.....	32
6.2 Técnica de homogenización a alta presión.....	33
6.3 Técnica de hidratación de película-Homogenización a alta presión .....	33
6.4 Técnica de microemulsión .....	34
6.5 Técnica de membrana contráctil .....	34
6.6 "Salting out" .....	34
6.7 Difusión de solvente en medio acuoso.....	34
7. Aplicaciones de sistemas nanoacarreadores para vía tópica/transdérmica.....	35
7.1 Ventajas y desventajas de nanoacarreadores para vía tópica/transdérmica .....	38
8. Técnicas más utilizadas para elucidar las vías de penetración de fármacos a través de la piel.....	41
<b>HIPÓTESIS .....</b>	<b>44</b>
<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>45</b>
1. Objetivo general .....	45
2. Objetivos particulares.....	45
<b>PARTE EXPERIMENTAL .....</b>	<b>46</b>





1. Material y reactivos .....	46
2. Muestras biológicas.....	46
3. Aparatos y equipos.....	47
4. Producto comercial utilizado en el estudio.....	48
5. Metodología .....	49
5.1 Determinaciones previas .....	49
5.2 Determinación de las condiciones óptimas y validación de los métodos analíticos para la cuantificación del triclosán mediante la técnica de HPTLC .....	49
5.3 Validación de los métodos analíticos para la cuantificación de triclosán .....	49
5.3.1 Selectividad.....	50
5.3.2 Linealidad .....	50
5.3.3 Precisión.....	51
5.3.3.1 Repetibilidad (Intra-día) .....	51
5.3.3.2 Precisión intermedia (Inter-día) .....	51
5.3.4 Exactitud .....	52
5.3.5 % de Recobro del triclosán extraído de la piel .....	52
5.3.6 Límite de cuantificación .....	52
5.3.7 Límite de detección.....	52
5.4 Preparación y caracterización de las nanopartículas .....	53
5.5 Caracterización fisicoquímica de las nanopartículas poliméricas .....	54
5.6 Liberación de triclosán a partir de nanopartículas poliméricas.....	54
5.7 Evaluación de la eficacia de las nanopartículas contra la bacteria <i>p. Acnés</i> .....	55
5.7.1 Técnica de mtt (bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolio)	55
5.8 Estudios de permeación in vivo de la dispersión de nanopartículas .....	55
5.9 Estudio de la distribución de nanopartículas en la piel mediante microscopía láser de dos fotones y confocal.....	56
5.9.1 Preparación de formulaciones conteniendo rojo de nilo.....	56
5.9.2 Estudios de permeación in vitro.....	56
5.9.3 Estudios de microscopía confocal de dos fotones .....	57
5.9.4 Estudios de microscopía confocal.....	58
5.9.4.1 Método de congelación de muestras con piel .....	58
5.9.4.2 Obtención de muestras de piel seccionadas transversalmente y su visualización por microscopía confocal .....	58
5.10 Análisis estadístico .....	59

<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>60</b>
1. Caracterización de nanopartículas.....	60
2. Optimización de los métodos analíticos para la cuantificación del triclosán .....	62
3. Validación del método para la cuantificación de triclosán utilizado en los estudios de liberación .....	63
4. Estudios de liberación <i>in vitro</i> .....	68
5. Validación del método analítico para la cuantificación de triclosán en muestras obtenidas con piel de los estudios de permeación in vivo .....	74
6. Estudios de permeación <i>in vivo</i> de triclosán .....	80
7. Estudios de la eficacia del triclosán contra la bacteria “ <i>P. acnes</i> ” .....	90
8. Estudio de la distribución y la localización de las nanopartículas en la piel .....	100
<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>131</b>
<b>PERSPECTIVAS .....</b>	<b>133</b>
<b>REFERENCIAS .....</b>	<b>134</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>150</b>
1. Anexo I.....	150
1.1 Monografía del polímero Eudragit® E 100 .....	150
1.2 Monografía del fármaco triclosán .....	152
1.3 Preparación de una solución al 5 % de goma tragacanto .....	153
2. Anexo II: Análisis estadístico .....	154
<b>PUBLICACIÓN.....</b>	<b>198</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Micrografía de una sección histológica de la piel. Los tejidos se fijaron en una solución de formaldehído al 4% solución, embebidos en parafina. Las secciones transversales de 5 mm fueron teñidas. Los núcleos celulares (azul) se tiñeron con hematoxilina, el citoplasma se tiñó con floxina (rosa) y la matriz extracelular del tejido conjuntivo se tiñó con azafrán (amarillo). a) Muestra la piel completa (la epidermis, dermis y la hipodermis). En el folículo piloso se observa el conducto piloso y la glándula sebácea como un bolsillo a su lado derecho. b) Muestra una amplificación de la epidermis de la piel en rojo: el estrato córneo muestra los corneocitos apilados, algunos de ellos sufriendo descamación (Modificada de [9]).	4
Figura 2. Micrografía fluorescente de un folículo piloso tomada a un ángulo de 45° (la barra del x-eje no es apta para estimar en el eje y). Piel teñida con rojo de nilo con una amplificación de 40 X [Modificada de 28].	7
Figura 3. Esquema de un folículo piloso mostrando las vías de penetración en la piel.	9
Figura 4. Permeación <i>in vitro</i> del compuesto VX (5 mg.cm <sup>-2</sup> ) a través de piel completa manteniendo condiciones de exposición de 24 horas: de oreja, cabeza, costado y muslo de cerdo; y humana del área abdominal y cuero cabelludo [53,57]. Las cantidades acumuladas permeadas son expresadas como % de dosis aplicadas ( $n=6$ ). Los perfiles de permeación mostraron un clásico tiempo de latencia, seguido por una variación lineal a partir del cual un flujo estacionario es determinado [70].	16
Figura 5. Guía para el tratamiento de acné basado en el tipo de lesiones [9].	26
Figura 6. Diagrama general de la metodología seguida en este trabajo.	48
Figura 7. Representación esquemática de la preparación de nanopartículas a base de Eudragit E 100 y cargadas con triclosán.	53
Figura 8. Distribución del tamaño de nanopartículas cargadas con triclosán de tres lotes con 3 réplicas cada uno.	60
Figura 9. Distribución del potencial Z de la dispersión nanoparticular cargada con triclosán de tres lotes con 3 réplicas de cada lote.	61
Figura 10. Micrografías de la dispersión de nanopartículas poliméricas cargadas con triclosán; a) SEM (bar = 1 μm) and b) TEM (bar = 200 nm).	62
Figura 11. Cromatograma de una muestra blanco en la solución de metanol-miristato de isopropilo (90:10).	64
Figura 12. Cromatograma de una muestra de triclosán en la solución de metanol-miristato de isopropilo (90:10).	64
Figura 13. Curva de calibración de triclosan en medio metanol-miristato de isopropilo (90:10), $n=3$ .	65
Figura 14. Residuales estudentizados de las cantidades de triclosán en medio metanol-miristato de isopropilo (9:1) obtenidos de curva de calibración.	66

Figura 15. Cinéticas de liberación <i>in vitro</i> de triclosán a partir de nanopartículas en medios con diferente pH (5.7 y 6.0).....	69
Figura 16. Cromatograma de una muestra blanco en metanol con estrato córneo (cinta adhesiva Scotch 3M). .....	74
Figura 17. Cromatograma de una muestra de triclosán en metanol con estrato córneo (cinta adhesiva Scotch 3M, pico correspondiente al triclosán: $R_f = 0.6$ , 500 ng aplicados).....	75
Figura 18. Curva de calibración de triclosán en metanol, en contacto con muestras con piel humana ( $n = 3$ )......	75
Figura 19. Residuales estudentizados de las cantidades de triclosán en medio metanol-con estrato córneo humano, obtenidos de curva de calibración. ....	77
Figura 20. Distancia de penetración <i>in vivo</i> de triclosán incluido en a)  una emulsión (o/w) y b)  en una dispersión de nanopartículas ( $n=12$ ).....	80
Figura 21. Cantidad de triclosán obtenida en cada cinta removida de la piel en voluntarios tratados con la emulsión (o/w) y con la dispersión de nanopartículas. ....	81
Figura 22. Cantidad total permeada de triclosán contenida en las formulaciones probadas en los estudios de permeación <i>in vivo</i> . ....	83
Figura 23. Distancia total de penetración <i>in vivo</i> de triclosán ( $\mu\text{m}$ ) contenida en las formulaciones probadas en los estudios de permeación. ....	86
Figura 24. Cantidad de triclosán total penetrada <i>in vivo</i> en los voluntarios por género tratados con las formulaciones probadas en los estudios de permeación. ....	88
Figura 25. Distancia total de penetración de triclosán en los voluntarios por género tratados con las formulaciones probadas en los estudios de permeación. ....	90
Figura 26. Sembrado e incubación de la bacteria <i>P. acnes</i> en tubos de conservación bajo condiciones anaerobias. ....	91
Figura 27. <i>P. acnes</i> en medio de cultivo; a) agar cerebro corazón (BHI) y b) agar sangre de bovino .....	92
Figura 28. Morfología bacteriana. Tinción Gram para <i>Propionibacterium acnes</i> .....	92
Figura 29. Prueba de licuefacción de la gelatina: A) <i>Pseudomona aeruginosa</i> , B) <i>P. acnes</i> y C) Blanco. ....	93
Figura 30. Prueba de indol: A) Blanco, B) Control positivo ( <i>E. coli</i> ) y C) <i>P. acnes</i> . ....	93
Figura 31. Fermentación de carbohidratos. ....	94
Figura 32. Prueba de óxido-fermentación: A) <i>E. coli</i> ; B) Blanco (medio sin bacterias); y C) <i>P.acnes</i> . ....	95
Figura 33. Prueba de reducción de Nitratos. a) Control positivo con <i>E. coli</i> (medio adicionado de ácido sulfanílico y alfa naftilamina en ácido acético, además de zinc), b) Blanco adicionado de reactivos utilizados en el control positivo y c) <i>P. acnes</i> (medio adicionado de ácido sulfanílico y alfa naftilamina en ácido acético).....	95
Figura 34. a) Prueba de esterilidad: I) Agua estéril; II) Solución de triclosán 100 ppm; III) Solución de triclosán 40 ppm y IV) Solución de triclosán 20 ppm. ....	96
Figura 35. Actividad antimicrobiana contra <i>P. acnes</i> de una solución acuosa de triclosán realizada en microplacas de 96-pozos. La MIC fue determinada como la concentración en donde el crecimiento/inhibición empezó a ocurrir. A-C, pozo 1, solución de triclosán de 10 ppm con 2 % Transcutol (MIC-no determinada); D-F, pozo 1, solución de triclosán de 20 ppm con 3 % Transcutol (MIC-pozo 2);	

	G-H, pozo 1, solución de triclosán de 50 ppm con 4 % Transcutol (MIC-pozo 4).....	97
Figura 36.	Actividad antimicrobiana contra <i>P. acnes</i> de una solución acuosa de triclosán realizada en microplacas de 96-pozos. La MIC fue determinada como la concentración en donde el crecimiento/inhibición empezó a ocurrir. A-C, pozo 1, solución de triclosán de 5 ppm con 2 % Transcutol (Ninguna inhibición); D-F, pozo 1, solución de triclosán de 50 ppm con 4 % Transcutol (MIC-pozo 4).	98
Figura 37.	Porcentajes de crecimiento/inhibición bacteriana contra <i>P. acnes</i> de una solución acuosa de triclosán de 50 ppm con 4 % Transcutol, después de la adición del reactivo MTT. La MIC fue determinada como la concentración en donde el crecimiento /inhibición empieza a ocurrir (MIC-6.25 ppm). .....	99
Figura 38.	Imágenes tridimensionales xyz de secciones de piel humana con la localización en la zona folicular, tratadas con diferentes formulaciones conteniendo rojo de nilo durante 1 hora de tiempo de contacto en los estudios de permeación. Las micrografías fueron obtenidas mediante la técnica de microscopía dos fotones (filtros de autofluorescencia de la piel: 494-549 nm (919) y de rojo de nilo: 567-674 nm (878). .....	101
Figura 39.	Imagen ortogonal de piel de oreja porcina tratada con la dispersión nanoparticular conteniendo rojo de nilo durante 8 horas de tiempo de contacto en los estudios de permeación. La micrografía obtenida mediante la técnica de microscopía de dos fotones muestra el inicio del folículo en los cortes transversales de la piel (filtros de autofluorescencia de la piel: 494-549 nm (797) y de rojo de nilo: 567-674 nm (490).....	102
Figura 40.	Intensidad de la fluorescencia del colorante rojo de nilo contenido en las formulaciones a diferentes intervalos de profundidad en la zona folicular de la piel humana (Tiempo de contacto en los estudios de permeación: 1 hora). .....	102
Figura 41.	Imágenes tridimensionales xyz de secciones de piel humana con la localización en la zona folicular, tratadas con diferentes formulaciones conteniendo rojo de nilo durante 8 horas de tiempo de contacto en los estudios de permeación. Las micrografías fueron obtenidas mediante la técnica de microscopía de dos fotones (filtros de autofluorescencia de la piel: 494-549 nm (797) y de rojo de nilo: 567-674 nm (490). .....	103
Figura 42.	Intensidad de la fluorescencia del colorante rojo de nilo contenido en las formulaciones a diferentes intervalos de profundidad en la zona folicular de la piel humana (Tiempo de contacto en los estudios de permeación: 8 horas). ...	103
Figura 43.	Imágenes tridimensionales xyz de secciones de piel humana con la localización en la zona folicular, tratadas con diferentes formulaciones conteniendo rojo de nilo durante 24 horas de tiempo de contacto en los estudios de permeación. Las micrografías fueron obtenidas mediante la técnica de microscopía de dos fotones (filtros de autofluorescencia de la piel: 494-549 nm (797) y de rojo de nilo: 567-674 nm (500). .....	104
Figura 44.	Intensidad de la fluorescencia del colorante rojo de nilo contenido en las formulaciones a diferentes intervalos de profundidad en la zona folicular de la piel humana (Tiempo de contacto en los estudios de permeación: 24 horas). .	104
Figura 45.	Imágenes tridimensionales xyz de secciones de piel de oreja porcina con la localización en la zona folicular, tratadas con diferentes formulaciones	

- conteniendo rojo de nilo durante 1(a-d), 8 (e-h) y 24 (i-l) horas de tiempo de contacto en los estudios de permeación. Muestras de piel a), e), i): ningún tratamiento; b), f), j): emulsión (o/w) *Dermobras*; c), g), k): solución saturada; y d), h), l): dispersión de nanopartículas). Las micrografías fueron obtenidas mediante la técnica de microscopía de dos fotones (filtros de la autofluorescencia de la piel: 494-549 nm (753) y de rojo de nilo: 567-674 nm (490))..... 106
- Figura 46. Intensidad de la fluorescencia del colorante rojo de nilo contenido en las diferentes formulaciones a diferentes intervalos de profundidad en la zona folicular de la piel porcina (Tiempos de contacto en los estudios de permeación: 1, 8 y 24 horas). ..... 107
- Figura 47. Imágenes de secciones ortogonales xz de piel de oreja porcina tratada con las formulaciones conteniendo rojo de nilo y subsecuentemente teñidas con azul de Hoechst. Tratamientos aplicados en el tejido durante 1 hora en los estudios de permeación: a) sin ningún tratamiento, b) emulsión (o/w), c) solución y d) dispersión de nanopartículas. Micrografías tomadas mediante microscopía de dos fotones..... 108
- Figura 48. Imágenes de secciones ortogonales xz de piel de oreja porcina tratada con las formulaciones conteniendo rojo de nilo y subsecuentemente teñidas con azul de Hoechst. Tratamientos aplicados en el tejido durante 8 horas en los estudios de permeación: a) sin ningún tratamiento, b) emulsión (o/w), c) solución y d) dispersión de nanopartículas. Micrografías tomadas mediante microscopía de dos fotones..... 108
- Figura 49. Imágenes de secciones ortogonales xz de piel de oreja porcina tratada con las formulaciones conteniendo rojo de nilo y subsecuentemente teñidas con azul de Hoechst. Tratamientos aplicados en el tejido durante 24 horas en los estudios de permeación: a) sin ningún tratamiento, b) emulsión (o/w), c) solución y d) dispersión de nanopartículas. Micrografías tomadas mediante microscopía de dos fotones..... 109
- Figura 50. Imágenes de secciones transversales xy de piel humana abdominal tratada con la dispersión de nanopartículas cargadas con rojo de nilo y teñidas con azul de Hoechst: (a y d) del azul de Hoechst; (b y e) del rojo de nilo y (c y f) de la combinación de ambos colorantes. Duración de los estudios de permeación: (a, b, c) piel sin tratamiento o blanco; (d, f, e) piel tratada con la dispersión nanoparticulada durante 1 hora. Micrografías tomadas mediante microscopía confocal. .... 110
- Figura 51. Imágenes de secciones transversales xy de piel humana abdominal tratada con la dispersión de nanopartículas cargadas con rojo de nilo y teñidas con azul de Hoechst. Imágenes tomadas mostrando la fluorescencia: (a y d) del azul de Hoechst; (b y e) del rojo de nilo y (c y f) de la combinación de ambos colorantes. Piel tratada con la dispersión nanoparticulada durante: (a, b, c) 8 y (d, f, e) 24 horas en los estudios de permeación. Micrografías tomadas mediante microscopía confocal..... 111
- Figura 52. Imágenes transversales xy de muestras de piel de oreja porcina tratadas durante 1 h, con las diferentes formulaciones conteniendo rojo de nilo y subsecuentemente teñidas con azul de Hoechst. Las imágenes fueron

	seccionadas a través del plano z, a una proyección de ángulo de 90° con incrementos subsecuentes (con secuencia de izquierda a derecha y de arriba hacia abajo) de: (a) 10 μm, ningún tratamiento; (b) 15 μm, solución; (c) 15 μm, emulsión; d) 15 μm, dispersión de nanopartículas. Micrografías obtenidas por microscopía confocal. ....	113
Figura 53.	Imágenes transversales xy de secciones de piel de oreja porcina tratadas durante 8 horas con las diferentes formulaciones conteniendo rojo de nilo y subsecuentemente teñidas con azul de Hoechst. Las imágenes de la piel fueron seccionadas a través del plano z, usando una proyección a un ángulo de 90° con incrementos subsecuentes (con secuencia de izquierda a derecha y de arriba hacia abajo) de: (a) 5 μm, aplicando ningún tratamiento; (b) 5 μm, aplicando un tratamiento con la solución; (c) 15 μm, aplicando un tratamiento con la emulsión (o/w); d) 5 μm y e) 60 μm, aplicando un tratamiento con la dispersión de nanopartículas. Micrografías obtenidas por microscopía confocal. ....	117
Figura 54.	Imágenes xy de secciones transversales de piel de oreja porcina tratada con las diferentes formulaciones conteniendo rojo de nilo y subsecuentemente teñidas con azul de Hoechst. Las imágenes de la piel con la localización en la zona folicular fueron seccionadas a través del plano z, usando una proyección a un ángulo de 90° con incrementos subsecuentes de 5 μm (con secuencia de izquierda a derecha y de arriba hacia abajo), en las que se aplicó: (a) ningún tratamiento; (b) un tratamiento con la solución; (c) un tratamiento con la emulsión (o/w); d) un tratamiento con la dispersión de nanopartículas. Las micrografías fueron obtenidas mediante la técnica de microscopía confocal después de los estudios de permeación durante 24 horas. ....	122
Figura 55.	Imágenes de folículos pilosos de piel de oreja porcina sin ningún tratamiento mostrando una reducción de autofluorescencia tiempo-dependiente. Duración de los estudios de permeación: A, 1 h; B, 8 h y C, 24h. Micrografías tomadas mediante Microscopía de dos fotones (filtro: 494-549 nm (753)). ....	129

## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Fármacos clasificados por su acción terapéutica y formulaciones utilizadas para el tratamiento de acné [6, 9, 89, 90].....	22
Cuadro 2. Efectos adversos de los fármacos comunmente utilizados para el tratamiento de acné, clasificados con base a su vía de administración [103-105].....	25
Cuadro 3. Desventajas de las formulaciones convencionales con triclosán disponibles comercialmente en México para el tratamiento de acné [106-110].....	27
Cuadro 4. Novedosas formulaciones no convencionales con triclosán.....	28
Cuadro 5. Ventajas y desventajas de sistemas nanoacarreadores.....	40
Cuadro 6. Parámetros de caracterización por tamaño y carga de la dispersión de nanopartículas poliméricas cargadas con triclosán.....	61
Cuadro 7. Condiciones óptimas de los 2 métodos analíticos para la cuantificación del triclosán en los estudios de liberación y en los de permeación por HPTLC. ..	63
Cuadro 8. Parámetros obtenidos para la curva de calibración de triclosán en metanol-miristato de isopropilo (90:10) .....	65
Cuadro 9. Análisis de varianza para la curva de calibración de triclosán en metanol-miristato de isopropilo (9:1) .....	66
Cuadro 10. Coeficientes obtenidos del modelo de regresión de la curva de calibración de triclosán en metanol-miristato de isopropilo (9:1).....	66
Cuadro 11. Repetibilidad intra-día de triclosán en el medio metanol-miristato de isopropilo (90:10), $n=3$ .....	67
Cuadro 12. Precisión intermedia en dos días diferentes de triclosán en el sistema metanol-miristato de isopropilo (90:10), $n=3$ . .....	67
Cuadro 13. Límite de cuantificación de triclosán en medio metanol-miristato de isopropilo (90:10), $n=3$ .....	68
Cuadro 14. Análisis de varianza (suma de cuadrados tipo III) del triclosán (mg) liberado por intervalos de tiempo en 2 diferentes medios de pH.....	70
Cuadro 15. Parámetros obtenidos de diferentes modelos matemáticos utilizados para describir la liberación del triclosán (mg) liberado a partir de las nanopartículas poliméricas.....	72
Cuadro 16. Parámetros obtenidos para la curva de calibración de triclosán en metanol con estrato córneo.....	76
Cuadro 17. Porcentajes de desviación absoluta para cada nivel de concentración de triclosán en metanol en contacto con muestras con piel humana obtenidas para la curva de calibración ( $n=3$ ). .....	76
Cuadro 18. Análisis de varianza para la curva de calibración de triclosán en metanol-en contacto con estrato córneo humano.....	77
Cuadro 19. Coeficientes obtenidos del modelo de regresión de la curva de calibración de triclosán en muestras de metanol-estrato córneo humano .....	77
Cuadro 20. Repetibilidad intra-día de triclosán en metanol en contacto con muestras con piel humana ( $n=6$ ).....	78



Cuadro 21. Precisión intermedia en dos días diferentes de triclosán en metanol en contacto con muestras con piel humana ( $n=12$ ).....	78
Cuadro 22. Exactitud del método analítico para la cuantificación de triclosán en metanol en contacto con muestras con piel humana ( $n=6$ ). .....	78
Cuadro 23. Porcentaje de recobro de triclosán en medio de metanol con muestras de piel humana ( $n=6$ ).....	79
Cuadro 24. Límite de cuantificación de triclosán en medio de metanol con muestras con piel humana ( $n=6$ ).....	79
Cuadro 25. Análisis de varianza (suma de cuadrados tipo III) de las cantidades de triclosán ( $\mu\text{g}$ ) obtenidas en cada cinta (stripping) para cada formulación probada en los estudios de permeación.....	81
Cuadro 26. Análisis de comparación de medias de las cantidades totales de triclosán obtenidas para cada voluntario tratados con las formulaciones estudiadas. ....	83
Cuadro 27. Análisis de comparación de medias de las distancias totales de penetración obtenidas para cada voluntario tratados con las formulaciones estudiadas .....	85
Cuadro 28. Cantidades totales promedio de triclosán ( $\mu\text{g}$ ) obtenidas de voluntarios agrupados por género.....	87
Cuadro 29. Análisis de varianza (suma de cuadrados tipo III) para las cantidades totales de triclosán ( $\mu\text{g}$ ) obtenidas de cada voluntario por género en los estudios de permeación.....	88
Cuadro 30. Distancias totales de penetración de triclosán ( $\mu\text{m}$ ) en voluntarios agrupados por género .....	89
Cuadro 31. Análisis de varianza (suma de cuadrados tipo III) para las cantidades totales de triclosán ( $\mu\text{g}$ ) obtenidas de cada voluntario por género en los estudios de permeación.....	89

## ÍNDICE DE ABREVIATURAS

<b>ABREVIATURA</b>	<b>SIGNIFICADO</b>
ABC	Área bajo la curva
Abs	Absorbancia
ANOVA	Análisis de la varianza
BHI	Brain Heart Infusion
C.V.	Coefficiente de variación
CFU	Unidades formadoras de Colonias
D.E.	Desviación estándar
FDA	Food and Drug Administration
h	Horas
HPTLC	High Performance Thin Layer Chromatography
I.P.	Índice de polidispersidad
ICH	International Conference on Harmonisation
MIC	Concentración mínima inhibitoria
ml	Mililitros
MPM	Multiphoton Microscopy
MTT	Reactivo de bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol
mV	Milivolts
NITE	National Institute of Technology and Evaluation
nm	Nanómetros
Nps	Nanopartículas
o/w	Aceite/agua
°C	Grados centígrados
<i>P. acnes</i>	<i>Propionibacterium acnes</i>
ppm	Partes por millón
PVAL	Alcohol Polivinílico
rpm	Revoluciones por minuto
SEM	Microscopía Electrónica de Barrido
SHG	Generación armónica secundaria
TEM	Microscopía Electrónica de Transmisión
Tg	Temperatura de transición vítrea
THG	Generación armónica terciaria
µg	Microgramos
µm	Micrómetros

## ABSTRACT

This work focuses on the study of the transport of triclosan loaded nanoparticles intended for the treatment of acne. The sensitive pH-nanoparticle on skin pH suspensions (31% of triclosan /95.9% encapsulation efficiency) were prepared using Eudragit E<sup>®</sup> 100 as material to form the polymeric matrix and poly (vinyl alcohol) as stabilizer. Nanoparticles were characterized by their size and charge, showing a size smaller than 200 nm and a positive Z potential ( $48.63 \pm 0.32$  mV), high enough, to ensure a good physical stability for the nanosystems. The spheric shape and the confirmation of the size were obtained by transmission electron microscopy (TEM), and scanning electron microscopy (SEM).

*In vitro* delivery kinetics of triclosan from nanoparticles were performed in different pH media taking into account that skin's pH may change under some diseases. The results showed that the amount of drug released from nanoparticles was modulated by the pH of the medium, increasing the amount and the release rate as decreasing the pH up to 5. On the other hand, it was determined the antimicrobial activity of triclosan included in a aqueous solution against the bacteria *Propionibacterium acnes*. However, the cultures media used were not able to determine the antimicrobial activity of the same drug included in the nanoparticles dispersion and in an emulsion (o/w, Dermobras<sup>®</sup>, currently available in the market). *In vivo* permeation studies using the *tape stripping* technique, were carried out in 12 healthy volunteers (men and women). The *in vivo* results revealed that the higher amount of triclosan was obtained, when it was included in the nanoparticle dispersion than in the emulsion (o/w). No significant differences on triclosan permeation or penetration distance were attributed to genre.

Finally, *in vitro* permeation studies of Nile red (contained in all formulations) through porcine ear and human abdominal skin were also performed. The skin samples were analyzed by two photons and confocal microscopy, and comparisons were made in order to evaluate the flourophore distribution. Interesting results were obtained with the formulation proposed in this work, polymeric nanoparticles. The dye included in the nanocarriers was found in the pilosebaceous follicles targeting the sebaceous gland. Nevertheless, it is important to mention that the flourophore included in the formulation available in the market (emulsion, o/w) and in the saturated solution was also able to penetrate the follicles, but the amount was lower than that obtained with the nanoparticle dispersion.

Thus, the nanoparticle suspension enables an sustained drug release (triggered on skin pH), being free of agents that may cause skin irritation such as surfactants commonly used in conventional formulations. This represents an interesting option to improve drug penetration through the skin, especially in the follicular zone, for the treatment of acne.

## RESUMEN

Este trabajo se enfoca en el estudio del transporte de nanopartículas cargadas con triclosán para el tratamiento del acné. La suspensión de nanopartículas (31% de triclosán/eficiencia de encapsulación del 95.9%) se preparó usando Eudragit E<sup>®</sup>100 como material para formar la matriz polimérica y alcohol polivinílico como estabilizante. Las nanopartículas se caracterizaron por su tamaño y carga, mostrando un tamaño menor a 200 nm y un potencial Z positivo ( $48.63 \pm 0.32$  mV), lo suficientemente alto, para asegurar la estabilidad física de los nanosistemas. La forma esférica y la confirmación del tamaño de partícula se obtuvieron mediante las técnicas de microscopía electrónica de transmisión (TEM) y microscopía electrónica de barrido (SEM).

Las cinéticas de liberación *in vitro* del triclosán a partir de la dispersión de nanopartículas se realizaron en medios con diferentes pH's, tomando en cuenta que el pH de la piel puede cambiar bajo la influencia de ciertos desórdenes. Los resultados mostraron que la cantidad de fármaco liberado a partir de las nanopartículas fue modulado por el pH del medio, aumentando la cantidad y la velocidad de liberación conforme se disminuía el pH de 6 hasta 5. Por otro lado, se determinó la actividad antimicrobiana del triclosán incluido en una solución acuosa contra la bacteria *Propionibacterium acnés*. Sin embargo, los medios de cultivo usados no fueron aptos para determinar la actividad antimicrobiana del fármaco incluido tanto en la dispersión de nanopartículas como en una emulsión (o/w, Dermobras<sup>®</sup>, actualmente disponible en el mercado). Los estudios de permeación *in vivo* se realizaron, utilizando la técnica del *tape stripping* en 12 voluntarios sanos (hombres y mujeres). Los resultados de este estudio revelaron que una mayor cantidad de triclosán penetró en la piel, cuando ésta fue tratada con la dispersión de nanopartículas que con la emulsión (o/w). No se observaron diferencias significativas por género sobre la penetración de triclosán o la distancia de penetración.

Finalmente, se realizaron estudios de permeación *in vitro* de rojo de nilo (contenido en todas las formulaciones) a través de piel de oreja porcina y piel abdominal humana. Las muestras de piel fueron analizadas por microscopía confocal y de dos fotones para comparar la distribución del fluoróforo. El colorante incluido en los nanoacarreadores fue encontrado dentro de los folículos pilosos de una manera tiempo-dependiente, llegando a la glándula sebácea. No obstante, es importante mencionar que el fluoróforo incluido en la formulación disponible en el mercado (o/w, de la emulsión) y en la solución saturada también fue capaz de alcanzar los folículos pilosos en función del tiempo, pero la cantidad fue menor que la obtenida con la dispersión de nanopartículas.

Así, la suspensión de nanopartículas, permitió una liberación del fármaco de manera prolongada (activada a base del pH de la piel) y al estar libre de agentes que pueden causar alguna irritación en la piel, tal como los tensoactivos comúnmente usados en las formulaciones convencionales, representa una opción interesante para mejorar la penetración del fármaco triclosán a través de la piel, especialmente en la zona folicular, para el tratamiento del acné.

## INTRODUCCIÓN

El acné es una enfermedad de carácter inflamatorio que afecta al pelo, al bulbo y a la glándula sebácea [1]. La patogénesis es multifactorial, sin embargo muchos investigadores concuerdan en que su iniciación comienza con una sobre producción de células y de sebo en el canal folicular que eventualmente forman una obstrucción que interfiere con el proceso normal en el que las células muertas epiteliales son llevadas por el sebo al eje del pelo para ser liberado hacia la superficie de la piel [2]. Muchos estudios han mostrado que la bacteria *Propionibacterium acnes* es la principal promotora de la inflamación. Este microorganismo crece en el ambiente anaerobio del comedón, aprovecha el atrapamiento de sebo como una fuente de alimentación y se reproduce. La bacteria secreta productos extracelulares que atraen a los neutrófilos, linfocitos y macrófagos que se acumulan dentro del epitelio folicular y se infiltran perifolicularmente estimulando a los neutrófilos a liberar enzimas, que rompen las paredes del folículo, promoviendo una respuesta inflamatoria [3, 4].

Las principales clases de agentes terapéuticos para tratar el acné en todas sus etapas (leve, moderado y severo) son peróxido de benzoilo, ácido salicílico, retinoides, antibióticos orales, anticonceptivos orales (para las pacientes con acné), isotretinoína así como la combinación de tratamientos tópicos y orales de los mismos [5]. Las formulaciones convencionales que contienen estos fármacos pueden provocar efectos adversos que van desde leves, como irritación, sequedad, eritema, comezón, picazón y ardor en la piel, hasta severos como dermatosis por contacto, colitis y efectos teratogénicos y mutagénicos, puntos decisivos para evitar su uso [6]. Además de su baja tolerabilidad y seguridad, las formulaciones para tratamientos tópicos utilizan vehículos (cremas, soluciones, lociones, geles y espumas) con características de absorción y propiedades estéticas limitadas, ya que ellas no penetran eficazmente a través de la unidad pilosebácea y la liberación de concentración efectiva de fármaco no es controlada. Desde que la bacteria *P. acnés* esta involucrada de muchas maneras en el proceso inflamatorio de la piel, un agente capaz de inhibir su crecimiento y de suprimir la respuesta inflamatoria proveerá grandes beneficios a los pacientes con acné vulgaris.

En este sentido, el fármaco triclosán (2,4,4'-tricloro-2'-hidroxidifenil éter), que es un agente antimicrobiano lipofílico (extensamente utilizado en muchos productos de cuidado para la salud tópica, cosmética y productos para el hogar) ha sido propuesto para tratar este desorden, debido a que presenta una buena tolerancia entre los pacientes. Para tratar de incrementar su actividad, muchas formulaciones tópicas han sido desarrolladas con este fármaco [7, 8]. Con lo que respecta a esta vía de administración, estudios recientes demostraron que la contribución de los folículos para la penetración de fármacos en la vía cutánea es mayor de lo que se pensaba, ofreciendo diversas ventajas como un sitio para la administración de fármacos [9]. Es importante señalar que muchos de los principios activos bajo investigación, no poseen las características fisicoquímicas necesarias (grado de ionización, solubilidad, estabilidad y coeficiente de partición) para penetrar en el tejido,

pero su inclusión en nuevos sistemas de liberación ha favorecido su penetración y/o absorción [10].

La nanoencapsulación de fármacos (nanomedicinas) ha sido descrita para incrementar la eficacia, vectorización (especificidad), tolerabilidad, control de la liberación e índice terapéutico de fármacos [7, 8, 10-12]. Dichas capacidades de vectorización (drug targeting) de estas nanomedicinas se determinan por el tamaño de la partícula, carga superficial, modificación superficial e hidrofobicidad. Entre éstos, el tamaño y la distribución del tamaño de las nanopartículas son importantes para determinar su penetración a través de las barreras fisiológicas y su interacción con la membrana celular, el sitio blanco y la circulación [13]. Estos nanosistemas, por tanto, han demostrado ser superiores a las formulaciones convencionales. Por su estructura multifuncional, estabilidad y posible escalamiento, las nanopartículas aparecen como una alternativa muy interesante para la vectorización y la liberación controlada de activos farmacéuticos y cosméticos.

En este trabajo, se desarrolló una dispersión de nanopartículas cargadas con triclosán para mejorar la penetración del fármaco a través de la piel, incrementando la eficacia y disminuyendo la necesidad de usar una combinación de productos. También se desarrolló dicho sistema para proveer una formulación vectorizada (drug targeting) y conseguir una liberación controlada del fármaco. De aquí, estudios de liberación *in vitro*, así como de penetración tanto *in vivo* como *in vitro* de triclosán y de un fluoróforo (utilizado como marcador) formulados en nanopartículas fueron llevados a cabo. La determinación de su distribución y su capacidad de penetración en la piel (humana y porcina) se obtuvieron mediante las técnicas de microscopía de excitación láser de dos fotones y microscopía confocal, evaluando con ello la novedosa formulación aquí propuesta para el tratamiento del acné. Esta formulación representa una alternativa para evitar los efectos adversos como la irritación en la piel, causados por otros productos convencionales.

## MARCO TEÓRICO

### 1. ESTRUCTURA DE LA PIEL

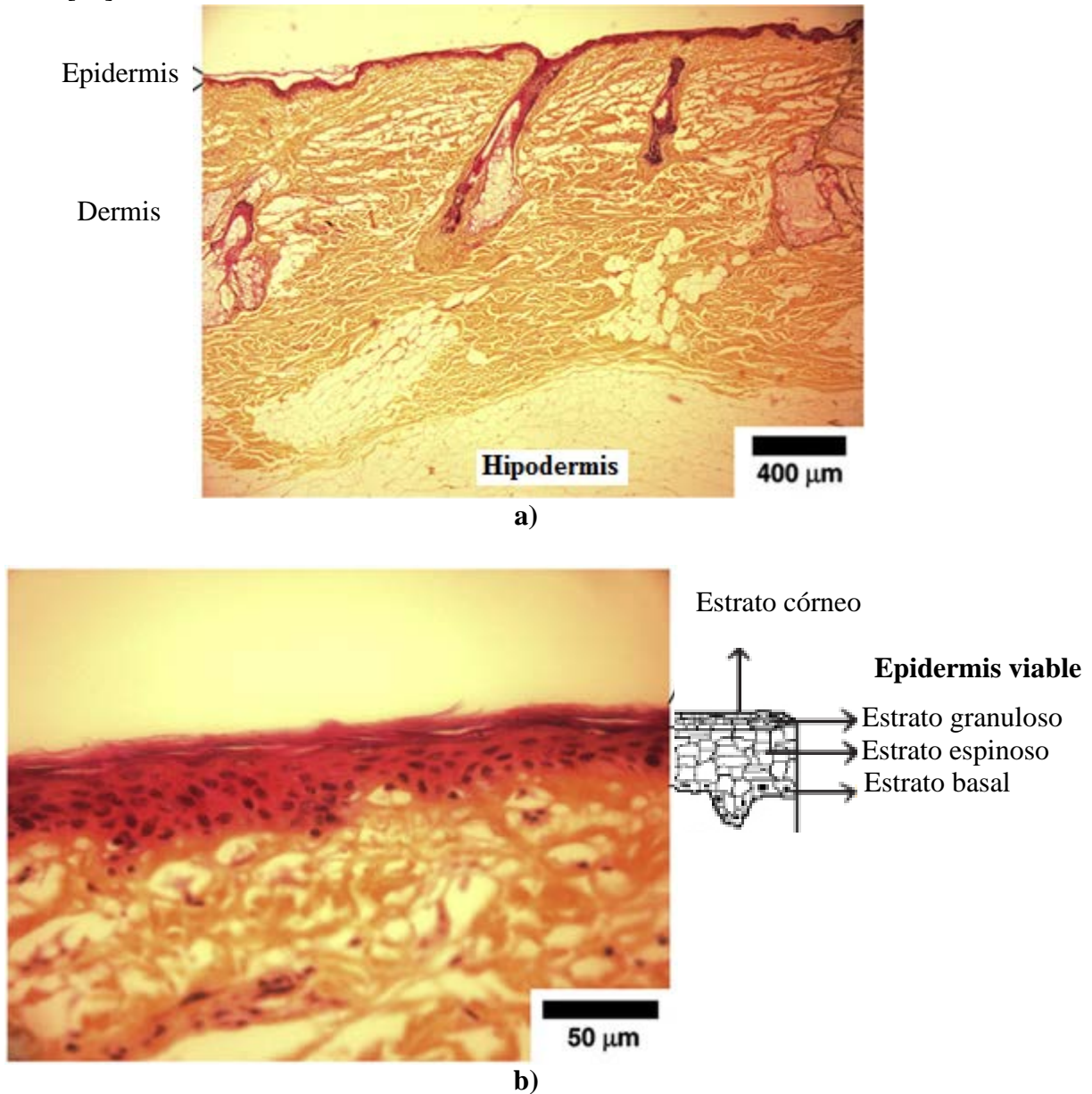
La piel es el órgano más grande del cuerpo con un área superficial de aproximadamente  $2 \text{ m}^2$  y que representan más del 10% de la masa corporal. Su principal función es la de proteger al organismo contra los efectos indeseables del medio ambiente. Esencialmente, la piel se compone de tres capas: la epidermis, la dermis y la hipodermis (Figura 1). Una membrana basal separa la epidermis y la dermis, mientras que la dermis es una estructura continua con el tejido subcutáneo y adiposo [14]. Es bien sabido que el estrato córneo, la capa más superficial de la epidermis, actúa como la barrera de la piel [15]. Hay varios apéndices de la piel, que incluyen los folículos pilosos, glándulas sebáceas, glándulas sudoríparas y las uñas.

#### 1.1 Epidermis

El estrato córneo es la capa más externa de la epidermis y es de aproximadamente 10-20  $\mu\text{m}$  de espesor. El estrato córneo se compone de aproximadamente 15 a 25 capas de células cornificadas, aplanadas, apiladas, hexagonales, embebidas en una matriz lipídica. Estos dominios lipídicos forman una estructura continua, juegan un papel crucial en el mantenimiento de la barrera de la piel, ayudando a evitar la pérdida de agua transepidermal. Cada célula es de aproximadamente 40  $\mu\text{m}$  de diámetro y 0.5  $\mu\text{m}$  de espesor. El espesor varía de acuerdo a las áreas del cuerpo tales como las de las palmas de las manos y plantas de los pies, así como zonas del cuerpo asociadas con interacción física directa y sustancial frecuente con el medio ambiente [16]. Las propiedades de barrera del estrato córneo pueden deberse en parte a su muy alta densidad ( $1.4 \text{ g/cm}^3$  en estado seco) y su baja hidratación de 15 a 20%, en comparación con la habitual del 70% para el resto del cuerpo. Cada célula del estrato córneo se compone principalmente de paquetes de queratina insoluble (70%) y de lípidos (20%) dentro de envolturas celulares, que representan aproximadamente el 5% del peso del estrato córneo. La barrera de permeabilidad está situada dentro de las bicapas lipídicas en los espacios intercelulares del estrato córneo [17, 18] y consta de ceramidas (40-50%), ácidos grasos (15-25%), colesterol (20-25%) y sulfato de colesterol (5-10%) [19-21].

La función de barrera se ve facilitada por la descamación continua de esta capa córnea con una renovación total de la capa córnea cada 2-3 semanas. Las funciones del estrato córneo como una barrera permiten prevenir la pérdida de los componentes internos del cuerpo al ambiente externo, en particular el agua. Las células del estrato córneo se originan en la epidermis viable y sufren muchos cambios morfológicos antes de su descamación, mostrando distintos niveles de diferenciación. Los orígenes de las células de la epidermis se encuentran en la lámina basal entre la dermis y la epidermis viable. En esta capa hay melanocitos, células de Langerhans, células de Merkel, y dos tipos principales de

células de queratina que sirven, en primer lugar, como células madre teniendo la capacidad de dividirse y producir células nuevas y, también, para anclar la epidermis a la membrana basal [22].



**Figura 1.** Micrografía de una sección histológica de la piel. Los tejidos se fijaron en una solución de formaldehído al 4% solución, embebidos en parafina. Las secciones transversales de 5 mm fueron teñidas. Los núcleos celulares (azul) se tiñeron con hematoxilina, el citoplasma se tiñó con floxina (rosa) y la matriz extracelular del tejido conjuntivo se tiñó con azafrán (amarillo). a) Muestra la piel completa (la epidermis, dermis y la hipodermis). En el folículo piloso se observa el conducto piloso y la glándula sebácea como un bolsillo a su lado derecho. b) Muestra una amplificación de la epidermis de la piel en rojo: el estrato córneo muestra los corneocitos apilados, algunos de ellos sufriendo descamación (Modificada de [9]).



La membrana basal tiene un espesor de 50-70 nm y consta de dos capas, la lámina densa y la lámina lúcida compuestas principalmente de proteínas, tal como el colágeno tipo IV, laminina, nidogeno y fibronectina. El colágeno tipo IV es responsable de la estabilidad mecánica de la membrana basal, mientras que la laminina y la fibronectina están relacionadas con la unión entre la membrana basal y los queratinocitos basales. Las células de la lámina basal se unen a la membrana basal por los hemidesmosomas que se encuentran en la superficie ventral de los queratinocitos basales [23]. Los hemidesmosomas comprenden tres grupos de proteínas diferentes: dos de las cuales son antígenos penfigoides (BPAG1 y BPAG2) y otras células epiteliales específicas, las integrinas [23, 24]. El BPAG1 se asocia con la organización de la estructura del citoesqueleto y forma un enlace entre la estructura del hemidesmosoma y los filamentos intermedios de queratina. Las integrinas son receptores transmembranales que median la unión entre la célula y la matriz extracelular. Las células basales de la epidermis humana contienen integrinas de tipo  $\alpha_2\beta_1$ ,  $\alpha_3\beta_1$  y  $\alpha_6\beta_4$ . Las integrinas  $\alpha_6\beta_4$  y BPAG2 parecen ser las principales proteínas hemidesmosomales para el anclaje de los queratinocitos que se extienden desde el filamento intermedio de queratina, a través de la lámina lúcida, a la lámina densa de la membrana basal. En la lámina densa, estas proteínas interactúan con la proteína laminina-5 que, a su vez, está relacionada con el colágeno VII, el constituyente principal de las fibrillas de anclaje dentro de la matriz dérmica. Se ha sugerido también, que tanto BPAG2 y  $\alpha_6\beta_4$  median en las transducciones de señal requeridas para la formación de hemidesmosomas, la diferenciación celular y la proliferación. La integrina  $\alpha_3\beta_1$  está asociada con la actina y puede estar relacionada con la laminina-5. Estudios en heridas epidérmicas sugieren una regulación de esas proteínas en la motilidad celular y la difusión. La importancia de mantener un enlace entre las células de la lámina basal y la membrana basal es evidente, pues la ausencia de estas uniones, resulta en enfermedades crónicas como la formación de ampollas pénfigo y la epidermólisis bullosa [25, 26].

### 1.2 Dermis

La dermis tiene un espesor aproximadamente de 1-2 mm y se compone de colágeno (70%) y fibras de elastina. En la dermis, los glucosaminoglicanos o ácidos mucopolisacáridos se unen covalentemente a las cadenas peptídicas para formar proteoglicanos, la sustancia fundamental que promueve la elasticidad de la piel. Las células principales presentes son los fibroblastos, que producen los componentes de tejido conectivo de colágeno, laminina, fibronectina, vitronectina, mastocitos, (relacionados con las respuestas inmunes e inflamatorias) y melanocitos (relacionados en la producción del pigmento melanina) [26]. Los nervios, vasos sanguíneos y los vasos linfáticos también están presentes en la dermis.

La dermis es una extensa red vascular que proporciona la nutrición de la piel, la reparación, las respuestas inmunes en el resto del cuerpo y la regulación de intercambio de calor. Los vasos sanguíneos en la piel se derivan de los tejidos subcutáneos (hipodermis), con una red arterial que suministra a la capa papilar, a los folículos pilosos, a las glándulas sudoríparas apocrinas y al área subcutánea, así como también a la propia dermis. Estas arterias alimentan arteriolas, capilares, vénulas y las venas. De particular importancia en

esta red vascular, es la presencia de anastomosis arteriovenosas en todos los niveles en la piel. Estas anastomosis arteriovenosas, permiten un flujo sanguíneo de la piel entre las arterias y las venas hasta del 60%, son críticas para las funciones de regulación del calor y control de los vasos sanguíneos en la piel. Los cambios en el flujo sanguíneo son más evidentes en la piel en relación con diversas respuestas fisiológicas e incluyen efectos psicológicos, como la ruborización en la piel, efectos de temperatura y respuestas fisiológicas a los ejercicios, las hemorragias y el consumo de alcohol.

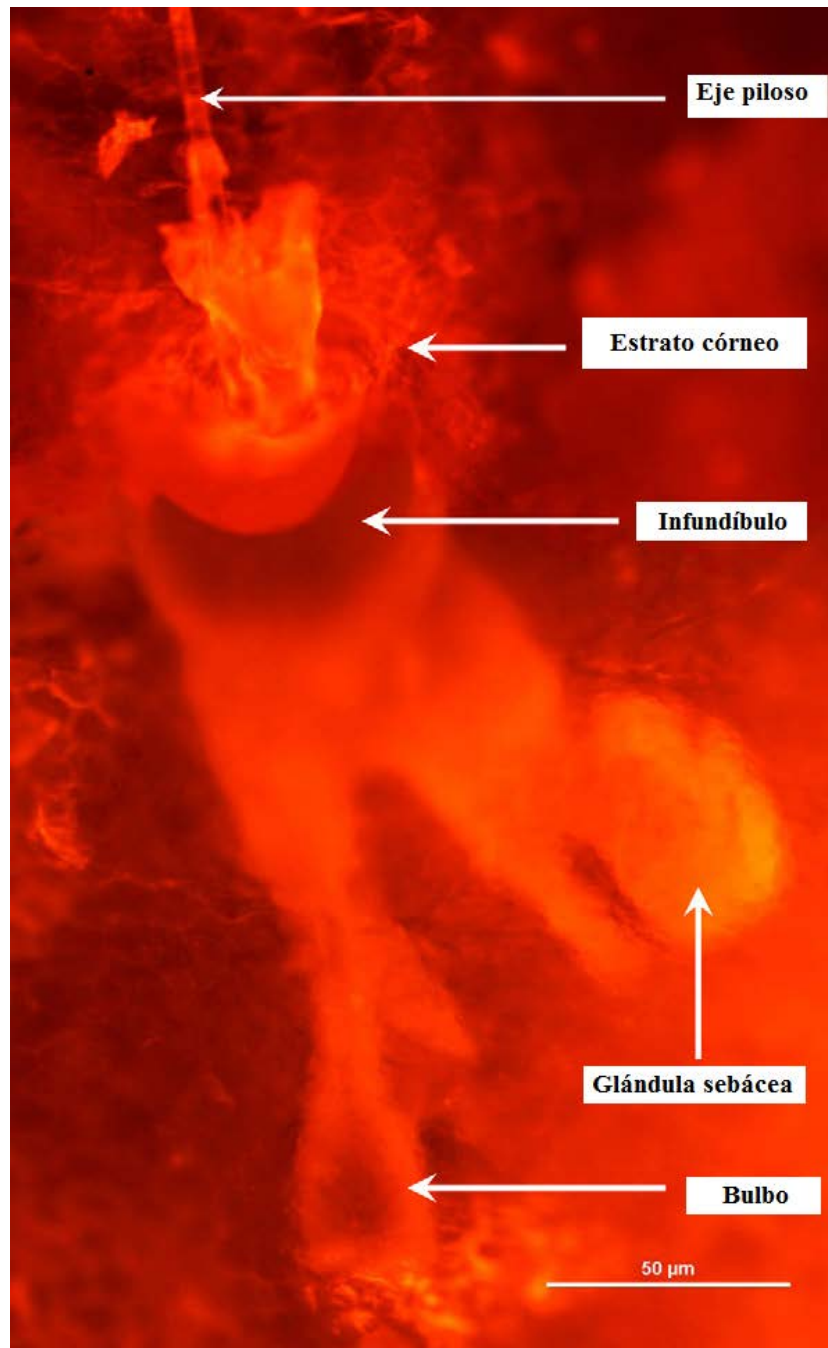
El sistema linfático es un componente importante de la piel en la regulación de la presión intersticial, la movilización de los mecanismos de defensa, y en la eliminación de desechos. Existe como una malla densa y plana en las capas papilares de la dermis y se extiende en las regiones más profundas de la dermis. En la dermis también están presentes una serie de diferentes tipos de fibras nerviosas, incluyendo las de la presión, el dolor y la temperatura. Apéndices epidérmicos tales como folículos pilosos y glándulas sudoríparas están incrustados en la dermis [26].

### 1.3 Hipodermis

La capa más profunda de la piel es el tejido subcutáneo o hipodermis. La hipodermis actúa como un aislante térmico, un amortiguador de choque, y una región de almacenamiento de energía. Esta capa es una red de células sebáceas dispuestas en lóbulos y enlazadas a la dermis por la interconexión de las fibras de elastina y el colágeno. Así como las células sebáceas (posiblemente 50% de la grasa del cuerpo), las otras células principales en la hipodermis son los fibroblastos y los macrófagos. Una de las principales funciones de la hipodermis es el transporte de los sistemas vascular y neural para la piel. Además de unir la piel al músculo subyacente. Los fibroblastos y adipocitos pueden ser estimulados por la acumulación de líquido intersticial y linfático dentro de la piel y del tejido subcutáneo. El espesor total de la piel es de aproximadamente 2-3 mm, pero el espesor del estrato córneo es sólo alrededor de 10-20  $\mu\text{m}$  [27].

### 1.4 Anexos cutáneos

Hay cuatro apéndices de la piel: los folículos pilosos con las glándulas sebáceas asociadas, las glándulas sudoríparas ecrinas y apocrinas, así como las uñas [16]. Los folículos pilosebáceos tienen aproximadamente 10 a 20% de la flora residente y no puede ser eliminada mediante lavado. Los folículos pilosos se distribuyen en la superficie de la piel con la excepción de las plantas de los pies, las palmas de las manos y los labios. Un músculo erector, une el folículo al tejido dérmico y permite que el pelo se erize en respuesta al miedo. Cada folículo está asociado con una glándula sebácea que varía en tamaño de 200 a 2000  $\mu\text{m}$  de diámetro (Figura 2, [28]). El sebo secretado por esta glándula se compone de triglicéridos, ácidos grasos libres y ceras que protege y lubrica la piel, manteniéndola a un pH de aproximadamente 5. Las glándulas sebáceas están ausentes en las palmas, plantas de los pies y las uñas.



**Figura 2. Micrografía fluorescente de un folículo piloso tomada a un ángulo de 45° (la barra del x-eje no es apta para estimar en el eje y). Piel teñida con rojo de nilo con una amplificación de 40 X [Modificada de 28].**

Las glándulas sudoríparas o glándulas eccrinas responden a la temperatura a través de los nervios parasimpáticos, excepto en palmas, plantas y axilas, en donde emiten respuestas a los estímulos emocionales a través de los nervios simpáticos. Las glándulas

ecrinas son estructuras epidérmicas simples, tubos enrollados derivados de un espiral en forma de bola, de aproximadamente 100  $\mu\text{m}$  de diámetro, situados en la dermis inferior. Éstas segregan una solución diluida de sal con un pH de aproximadamente 5, esta secreción se estimula mediante el control de la temperatura, tal como ejercicio y la temperatura ambiental alta, así como el estrés emocional. Estas glándulas tienen un área de superficie total de aproximadamente 1/10,000 de la superficie total del cuerpo. Las glándulas apocrinas se desarrollan en el folículo piloso de regiones limitadas del cuerpo (axila, la areola del pecho y la región perianal) y son también tubos enrollados que pueden secretar proteínas, lípidos, lipoproteínas y sacáridos que al ser metabolizados por las bacterias producen el olor del cuerpo característico. Estas glándulas son aproximadamente diez veces el tamaño de los conductos ecrinos, que se extienden desde el tejido subcutáneo a la misma altura que los folículos pilosos [26].

La función de las uñas es considerada como protección. Las uñas se componen de capas de células queratinizadas aplanadas fusionadas en una masa densa pero elástica. Las células de la uña se originan en la matriz de la misma y crecen distalmente a una velocidad aproximada de 0.1 mm/día. En el proceso de queratinización, las células cambian de forma, similar al experimentado por las células epidérmicas que forman el estrato córneo. Esto no es sorprendente debido a que la membrana basal de la matriz de la uña muestra muchas similitudes bioquímicas con la membrana basal epidérmica. Así, los componentes principales son proteínas de queratina altamente enrolladas con pequeñas cantidades de lípidos (0.1-1.0%). El plastificante principal de la uña es el agua, 7-12% [29].

## **2. VÍAS DE PENETRACIÓN DE LOS FÁRMACOS A TRAVÉS DE LA PIEL: NUEVOS CONCEPTOS**

Las vías de penetración de las sustancias aplicadas tópicamente en la piel es objeto de varias investigaciones recientes [30-50]. La permeación de los fármacos a través de la piel incluye la difusión a través de la epidermis intacta y a través de los apéndices de la piel. Estos apéndices de la piel son los folículos pilosos y glándulas sudoríparas que forman las vías de derivación a través de la epidermis intacta [30]. Es bien sabido que la permeación de los fármacos a través de la piel normalmente está limitada por el estrato córneo. Dos vías a través de la barrera intacta pueden ser identificadas, la ruta intercelular y transcelular (Figura 3):

### **2.1 La ruta transcelular:**

Se refiere al paso a través de los corneocitos y de los lípidos. La matriz macromolecular intracelular dentro del estrato córneo está compuesta de queratina, que contribuye a la estabilidad mecánica y a la integridad de la capa córnea. La difusión transcelular carece de importancia para el transporte transdérmico de fármacos [31, 32].

## 2.2 La ruta lipídica intercelular:

Se encuentra entre los corneocitos del estrato córneo, incluyendo las regiones de enlace, contienen menos lípidos ordenados y cadenas hidrófobas más flexibles. Esta es la razón de los espacios no planos entre los lípidos lamelares cristalinos y su membrana exterior adyacente a las células. Los lípidos fluidos de la piel son de crucial importancia para la difusión transepidérmica de las moléculas lipídicas y anfífilas, ocupando esos espacios para la inserción y la migración a través de las capas lipídicas intercelulares de tales moléculas. Las moléculas hidrófilicas, difunden predominantemente "lateralmente" a lo largo de las superficies o espacios interlamelares llenos de agua o a través de tales volúmenes. Las moléculas polares también pueden utilizar el espacio libre entre una estructura lamelar y una membrana de corneocitos con el mismo fin [33, 34].

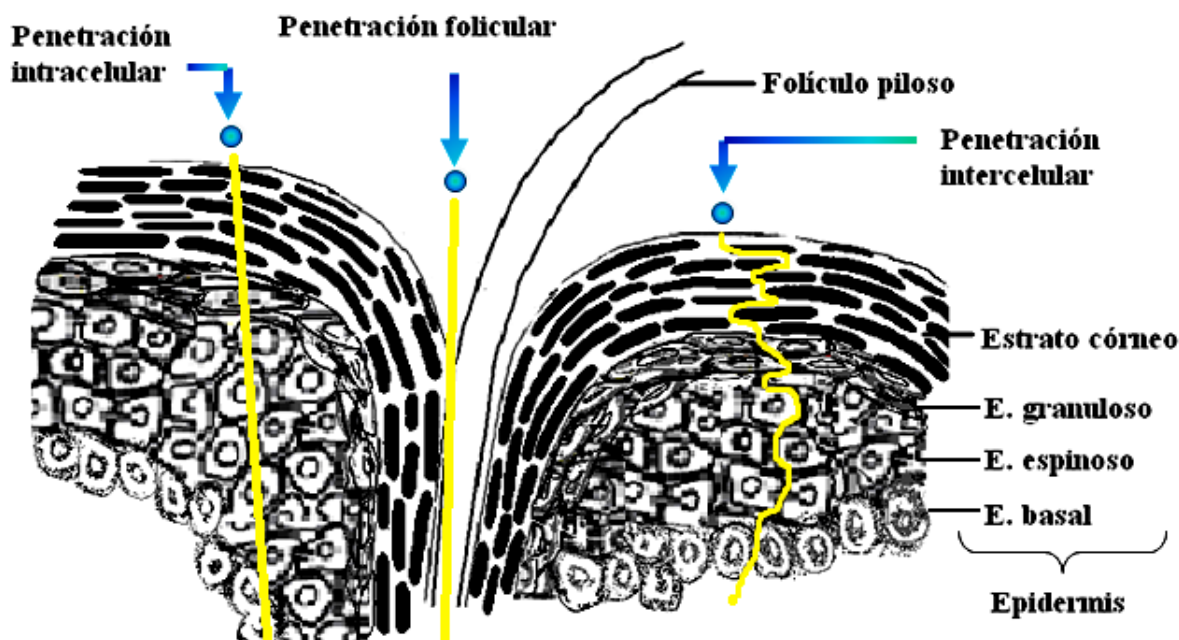


Figura 3. Esquema de un folículo piloso mostrando las vías de penetración en la piel.

Las vías transepidérmicas acuosas se han observado mediante microscopía confocal. De estos estudios se ha observado que algunas regiones pobres de empaquetamientos lipídicos intercelulares y de células coinciden con zonas de arrugas en la superficie de la piel y son simultáneamente los sitios de menor resistencia en la piel para el transporte de las moléculas hidrofílicas. Esta baja resistencia ha mostrado agrupaciones de corneocitos sin superposición lateral [34, 35]. El aumento del transporte transdérmico de fármacos puede llevarse a cabo por técnicas de ensanchamiento, por ejemplo la causada por la exposición de la capa córnea a una fuerza eléctrica (electroporación/iontoforesis), mecánica (sonoporación / sonoforesis), por un estímulo térmico, o por usar promotores de absorción en la piel [58]. De aquí, un estudio *in vitro* en piel de rata reveló que una irradiación de

ultrasonido de alta intensidad (1 a 2 W cm<sup>-2</sup>), provocó un daño irreversible a las estructuras cutáneas, aumentando la velocidad de transporte de los permeantes. En contraste, la integridad de la piel se mantuvo con un ultrasonido de baja intensidad (0.1 a 1 W cm<sup>-2</sup>), pero una liberación de sebo desde las glándulas sebáceas llenaron los folículos pilosos y se redujo significativamente la velocidad de transporte de moléculas hidrófilas [59].

La vía intercelular, por tanto, es ciertamente la de mayor penetración de fármacos, pero las vías a través de los apéndices de la piel (vía transperpendicular), puede ser muy importante en casos específicos [38]. Los conductos hidrofílicos tienen aberturas mayores a 5 μm (apéndices de la piel) y menores a 10 nm como en las uniones entre los grupos de corneocitos que están comprendidas en el rango (poros entre los corneocitos). Así, los conductos de las glándulas sudoríparas (≥ 50 micras), las unidades pilosebáceas (5-70 micras) y las glándulas sebáceas (5-15 micras) representan los sitios de mayor abertura y por tanto los de más baja resistencia al transporte de fármacos. [39]. Se ha determinado, que los conductos hidrófilos tienen una máxima abertura a través de la piel de aproximadamente 20-30 nm de ancho [35]. Otros estudios han demostrado que la anchura de los poros transepidérmicos hidrofílicos cargados negativamente se expanden por electroósmosis (22-48 nm) [40]. Un aspecto importante es que la barrera cutánea lipófila media el transporte de sustancias por su peso molecular y por el coeficiente de partición en lugar del tamaño molecular [39]. El transporte a través de la barrera cutánea lipófila, por consiguiente, disminuye con el aumento de la lipofilia del permeante así como también con las moléculas pesadas (400-500 Da), ya que son tan grandes permeantes para encontrar sitios suficientemente amplios en la matriz lipídica intercelular y consecuentemente para iniciar la difusión a través de las partes lipídicas de barrera cutánea [39, 41].

Se ha sugerido que por encima de un valor crítico de  $K_{o/w}$ , la lipofiliidad parece ser un importante modulador de la absorción de los fármacos dentro de los orificios foliculares y, por debajo del mismo, la lipofiliidad no influye aparentemente. La influencia de la lipofiliidad de permeantes sobre la penetración folicular se investigó, mostrando que para los fármacos más lipofílicos la penetración fue muy baja; sin embargo, para las moléculas con un cierto decremento en su lipofiliidad, la penetración se vio incrementada [42]. Se han propuesto que ciertas moléculas pueden formar un enlace de hidrógeno con los grupos presentes en las superficies de poros foliculares. Sin embargo, estudios detallados tienen que hacerse con el fin de determinar todas las propiedades moleculares que influyen en la penetración de los fármacos en los folículos pilosos.

Recientemente, la penetración folicular se ha convertido en un foco de interés importante debido a que una variedad de estudios han demostrado que los folículos pilosos podrían constituir rutas significativas de paso y vectorización de fármacos a través de la piel para tratamientos de enfermedades en la piel [38, 43-46]. Esta vía fue de mayor interés por que parecía ser la ruta predominante para el paso de nanopartículas, liposomas y para fármacos hidrofílicos como el manitol y moléculas esteroideas grandes y polares que no se esperaba que atravesaran la piel rápidamente [47-50]. En un estudio en piel porcina (modelo que es utilizado debido a que la penetración *in vitro* podría ser considerada similar a la humana) se reveló, que nanopartículas fluorescentes no biodegradables a base de poliestireno (20 y 200 nm de diámetro), se acumularon preferentemente en los folículos pilosos, esta distribución se incrementó de una manera tiempo-dependiente y la localización

folicular fue favorecida para partículas más pequeñas [48]. En otras investigaciones se ha descrito una influencia del tamaño de micropartículas sobre la penetración en la piel, actuando como acarreadores eficientes de fármacos o como bloqueadores en el folículo para detener la penetración de las sustancias aplicadas tópicamente [46]. Consideraciones teóricas sugieren que la vía folicular puede también ser la ruta predominante para biomoléculas de pesos moleculares altos, como el DNA [39].

Varios parámetros caracterizan a los orificios foliculares y a los ejes pilosos como la densidad de los vellos, el diámetro de los ejes pilosos y el área y volumen del infundíbulo (parte más externa del conducto piloso). En un principio se creía que la ruta folicular sólo ocupaba ~ 0,1% de la superficie total del área de la piel (valor aceptado en la mayoría de las investigaciones clínicas) y se asumió como una ruta no importante. Sin embargo, este valor se obtiene de la parte interna del antebrazo. En contraste el área superficial total en la piel para los folículos pilosos en la zona de la frente es de aproximadamente el 13 %, con un volumen correspondiente a los infundíbulos en esa zona del 20 % del estrato córneo. El infundíbulo es un componente clave en el proceso de penetración, desde que éste puede actuar como reservorio de las nanopartículas penetradas. Un período de almacenamiento diez veces mayor fue descrito en los folículos pilosos en comparación al estrato córneo [49]. La contribución de los folículos pilosos sobre la permeación de fármacos ha sido objeto de estudio en recientes investigaciones. De aquí, la difusión de hidrocortisona, cafeína, ácido *p*-niflumico y ácido *p*-aminobenzoico fue seguida a través de piel de rata intacta y resebrada sin folículos pilosos, durante 24 y 48 horas. Los resultados mostraron la importancia de los apéndices desde que los flujos fueron tres veces más bajos en la ausencia de los apéndices que a través de piel normal [9, 52]. Trauer y colaboradores utilizaron barniz de uñas, como técnica para ocluir los conductos pilosos y para determinar la penetración de cafeína, mostrando que la contribución de los folículos pilosos sobre la permeación de la cafeína fue del 50% [53, 54].

### 3. CLASIFICACIÓN DE LA PIEL

#### 3.1 De acuerdo a aspectos cosmetológicos

En la actualidad hay diferentes maneras de clasificar la piel. Entre las numerosas clasificaciones de la piel que se proponen, una que relaciona aspectos cosmetológicos distingue cuatro tipos diferentes: normal, grasa, seca y mixta. La piel puede tener diferentes apariencias directamente relacionada con el contenido de agua y de ácidos grasos de la capa hidrolipídica, ésta depende de su estado, actividad, y capacidad de defensa. Los ácidos grasos son indispensables para la retención de agua en los tegumentos, su deficiencia, por tanto, favorece su evaporación causando resecamiento en la piel, mientras que un exceso de componentes lípidos favorece un estado definido como piel grasa. Esta clasificación debe ser utilizada con cautela, ya que los criterios de selección para definir cada categoría son difíciles de estandarizar, por ejemplo, cambios severos en el contenido de agua epidérmica asociada a los cambios de pH de la piel, pueden modificar el aspecto de la piel visualizándose seca y ser en realidad una piel grasa [50].

La piel seca esta relacionada con modificaciones estructurales y funcionales de los componentes de la epidermis. En la piel normal, la capa córnea se compone de un conjunto de corneocitos, formando una estructura de cierto espesor con cualidades físicas únicas. Cada corneocito contiene sustancias naturales de hidratación, resultantes de la degradación enzimática de las filagrinas, que fijan una cierta cantidad de agua entre los corneocitos y ejercen una presión osmótica que disminuye a medida que emigran a la superficie. Cualquier disminución en la función enzimática, por lo tanto, juega un rol importante en el contenido de factores hidratantes naturales y, por consiguiente, en la presión osmótica y en la apertura de corneosomas, facilitando una descamación desorganizada, como es observada en la xerosis [56]. Esta disfunción depende en realidad de un cambio cualitativo y cuantitativo de las enzimas y/o en un cambio inadecuado del pH en el estrato córneo. La cohesión de los corneocitos también depende de una mezcla compleja de lípidos que constituyen la estructura lamelar (compuesta de ácidos grasos, esteroides y ceramidas procedentes de los queratinosomas) [57].

Se han determinado cuatro factores que predisponen una piel seca:

1. La falta de agua de los corneocitos, directamente en función de la presencia de factores humectantes naturales.
2. La hiperproliferación epidérmica resultante de una deficiencia en el proceso de renovación de los queratinocitos.
3. El cambio de la síntesis lipídica a nivel celular.
4. El deterioro de la funcionalidad de la barrera en la piel seguida por la degradación de la cohesión intercelular.

Los factores antes mencionados son interdependientes. Por lo tanto, la piel seca debe caracterizarse por su aspecto rugosa, sin hacer referencia a su nivel de hidratación. Recientes investigaciones han estudiado la influencia del proceso inflamatorio o del contenido de iones de calcio en las células epiteliales de piel seca determinando que el suministro de fármacos antiinflamatorios o de reguladores cálcicos no modificó el estado de la piel [58]. Por otro lado, el uso de inhibidores específicos de proteasas tríplicas y particularmente del "sistema de activación del plasminógeno", mostró una capacidad para restaurar el estado normal de la piel y para suprimir simultáneamente todos los cambios relacionados con la piel seca, en particular contra los mecanismos de regulación y diferenciación celular. Estos trabajos sugieren que la piel seca no corresponde con un estado irreversible, sino que implican una disfunción de la "teoría del balance de humectación" y la "teoría de la regulación de la proteasa". Su reparación implica la restauración de la barrera epidérmica, dañada por la pérdida de compuestos grasos y la deshidratación de las capas superficiales de la piel [77].

La piel grasa resulta de una producción seboreica excesiva, invadiendo la superficie de la piel y posiblemente la del cabello. La piel grasa y la piel seca corresponden a dos estados que no deben ser opuestos entre sí, ya que algunas pieles pueden ser "secas" o "grasas" y deshidratadas al mismo tiempo. Mientras que la piel seca refleja un cambio funcional de los diferentes componentes de la piel, la piel grasa resulta de una hiperactividad de las glándulas sebáceas, que conduce a una sobreproducción de sebo en la piel, dándole un aspecto grasoso y brillante. El sebo contiene escualeno, ceras, triglicéridos



y esteroides. El contenido en piel de bacterias residentes genera que una parte de los triglicéridos sea inmediatamente hidrolizada y la parte principal del colesterol sea esterificada. El sebo excretado contiene una cantidad significativa de ácidos grasos libres que contribuyen a la acidez del pH de la piel. Entonces esta mezcla de sebo con lípidos epidérmicos producida a partir de la destrucción de las células córneas descamadas que también contienen triglicéridos y colesterol, forma la película lipídica que cubre la superficie del estrato córneo. Los seres humanos tienen la particularidad de tener sus glándulas sebáceas en casi todo el cuerpo, pero su actividad no es la misma en todos los sitios anatómicos. La producción de sebo es más importante en la cabeza, la cara, el cuello, los hombros y el tórax, áreas donde una hiperseborrea puede ser la conjunción de una alta producción de las glándulas de un mayor número de glándulas [59]. El cambio de la velocidad de producción depende de factores genéticos, endocrinos y del medio ambiente. El opuesto de la piel grasa no sería la piel seca, ya que pueden coexistir. Por último, a nivel cosmetológico, debe establecerse que la piel grasa es a veces del color de la eritrosina, fácilmente irritable, y particularmente frágil [59].

Con lo que respecta a la piel normal, no existe una definición para este tipo, sin embargo se puede definir en comparación con los otros tipos de piel: una piel normal no es una piel seca, grasa, mixta, ni patológica. Una piel normal de acuerdo con su estructura y sus funciones, debe ser una piel suave, agradable al tacto debido a la cohesión de sus células más superficiales; una piel firme y flexible debido a la existencia de un tejido conectivo denso y de la presencia de numerosas fibras elásticas en buen estado; una piel mate debido a su producción seboreica balanceada. En realidad, una piel que cumpla con todas estas características sólo podría existir en los niños sanos antes de su pubertad [60]. A nivel cosmetológico, se puede considerar normal a la piel joven, estructuralmente y funcionalmente balanceada y que no requiere cuidados extras de los necesarios para su limpieza.

Por su parte, la piel mixta corresponde a una piel compleja en donde los diferentes tipos anteriormente descritos coexisten en las diferentes áreas del cuerpo o de la cara. El ejemplo característico es la cara, en donde la piel grasa con poros dilatados en la zona medio-facial puede coexistir con una piel frágil con poros finos en las mejillas.

Por otro lado, la piel sensible es un caso especial que ha sido reportado en los últimos años. Las diferencias raciales, individuales e intraregionales sobre la reactividad cutánea a una serie de estímulos externos han sido ampliamente documentadas durante los últimos 20 años. Esto sugiere que la reactividad específica, más frecuente en las poblaciones de piel clara, está relacionada a la conjunción de la barrera de la piel, la respuesta vascular y a una mayor respuesta neurosensorial, todas ellas relacionadas al componente genético [60].

### **3.2 Diferencias funcionales y morfológicas de la piel de acuerdo al género, edad, raza, especie y sitio anatómico**

Las características biofísicas de la piel también varían en función del género, de la edad y pueden variar en el mismo sujeto, según el sitio anatómico considerado. Así, la

distribución de estos diferentes tipos de piel varía ampliamente según el grupo étnico al que se refiera. Además, las variaciones interindividuales o aquellas que pueden resultar de la aproximación metodológica o a partir del material de medición utilizado, de la influencia de la raza, el sexo y la edad de las poblaciones observadas, incluso de los mismos sitios anatómicos han sido y son objeto de investigación. Los resultados de estas investigaciones son a veces contradictorias, pero hay algunas tendencias que se deben tomar en cuenta al llevar a cabo estudios en beneficio del ser humano. El conocimiento previo de estas diferencias es esencial sobre todo para conocer la eficacia, la aceptabilidad, e incluso la tolerancia de productos farmacéuticos o dermatológicos aplicados por vía tópica. Importantes diferencias funcionales existen entre las razas y corresponden a su necesaria adaptación al entorno en el que están destinados a vivir, ya que mientras que el espesor del estrato córneo es similar entre las diferentes razas, el número de capas celulares en el estrato córneo de la piel “de color negro” es mayor que el observado en pieles caucásicas o asiáticas. Las pieles “de color negro”, por tanto, tienen un estrato córneo más compacto con una mayor cohesión entre las células que los hace difíciles de remover [61]. Sin embargo, la superficie de los corneocitos es idéntica para todos los tipos de piel. En aparente contradicción con esta mayor cohesión celular, la descamación superficial espontánea es mucho más importante en las pieles “negras” que en las caucásicas o asiáticas.

Existen también diferencias interraciales sobre el sistema melanocítico. Básicamente, cada tipo de piel tiene el mismo número de melanocitos por unidad de superficie, pero no hay ninguna similitud con respecto a su estructura y su funcionalidad. Mientras que los melanosomas son pequeños y se concentran en los queratinocitos para ser luego degradados en las capas superficiales de la epidermis en las pieles caucásicas; ellos son mucho más grandes, ampliamente dispersos en todas las capas de los queratinocitos y no se degradan cuando llegan al estrato córneo en pieles “negras”, dándoles ese característico color. Estudios colorimétricos y espectrofotométricos han demostrado que las diferencias interindividuales e intersexuales de la coloración de la piel en las diferentes razas están relacionados principalmente con la concentración de la hemoglobina en sangre para el sujeto caucásico; tanto la hemoglobina como el contenido de melanina en el sujeto asiático, y sólo la concentración de melanina en el sujeto “de piel negra”. La pigmentación ofrece una mejor protección contra las radiaciones solares y el envejecimiento actínico. Esto puede explicar por qué el envejecimiento es un proceso más rápido en pieles asiáticas. Con respecto a los apéndices de la piel, no ha sido posible demostrar una incidencia racial sobre la secreción sebácea en pieles “negras” debido a que se han obtenido resultados contradictorios en estudios comparativos [62].

Algunas diferencias morfológicas han sido encontradas en la piel con respecto al género. Uno de ellos es el espesor de la piel, que es mayor en los hombres en la mayoría de los sitios utilizados habitualmente para mediciones biofísicas que para las mujeres. Otros autores reportan ninguna diferencia significativa en los antebrazos para los sujetos de ambos sexos [63]. Estudios realizados en sujetos asiáticos masculinos y femeninos muestran ninguna diferencia al número de capas de corneocitos, pero el grosor de la piel decreciente más rápidamente con la edad en las mujeres que en los hombres. El interés creciente en el estudio de las diferencias en la piel con respecto al género se ha formado para obtener más información acerca de las patogénesis de las enfermedades y para innovar tratamientos más eficaces [64]. En este sentido, un estudio ha revelado que la piel y los

apéndices de la piel son influenciados por las hormonas sexuales. La piel de los hombres y de las mujeres difieren en el metabolismo hormonal, el crecimiento del cabello, la velocidad de sudoración, la producción de sebo, el pH de la superficie de la piel, la acumulación de grasa, las leptinas en suero [65], etc. El conocimiento del espesor de la epidermis es de gran importancia en muchas áreas de la investigación médica y biológica, y puede ser influenciada por varios factores, tales como la edad, el sexo, el tipo de piel y el sitio anatómico. Con la técnica de tomografía de coherencia óptica *in vivo* se investigaron los factores mencionados antes sobre el espesor de la epidermis, en seis lugares diferentes del cuerpo de jóvenes (20-40 años de edad) y de adultos (60-80 años) caucásicos. Los resultados demostraron una disminución significativa del grosor de la epidermis con la edad en todos los sitios anatómicos investigados. El espesor de la epidermis evaluado en hombres y mujeres no difirió significativamente, a excepción de la piel en la frente, la cual fue significativamente más delgada en las mujeres que en los hombres, ambos adultos [66]. La edad tiene un impacto directo sobre la evolución de la mayor parte de los parámetros biofísicos de la piel. En la persona adulta, la velocidad de la proliferación epidérmica disminuye con la edad. Ésta puede ser 10 veces mayor en los jóvenes (segunda década) que en los adultos mayores (séptima década), y para una edad determinada, la disminución fue 10 veces más rápida en las zonas expuestas al sol que en las no expuestas. Estos parámetros parecen ser independientes del origen étnico y las estaciones del año [67].

Otros autores han encontrado diferencias significativas entre los sitios anatómicos. El grosor de la piel no es el mismo entre los sitios anatómicos según datos de diferentes mediciones instrumentales. Así, el espesor de la piel medido en el sujeto caucásico es menor en el antebrazo que en la frente, del orden de 0.9 y 1.7 mm, respectivamente [63]. Estos valores son ligeramente superiores a los descritos por otros, pero pueden ser tomados en cuenta como aproximaciones. En otro estudio, las mediciones en 22 sitios anatómicos de jóvenes caucásicos (hombres y mujeres) mostraron que la piel fue la más ecogénica por ser más delgada y que a cierto nivel acústico, la dermis reticular fue más densa que la de la dermis papilar. Esta densidad acústica fue inversamente proporcional al grosor de la piel y por consiguiente variable de acuerdo con el espesor de los sitios anatómicos medidos [68].

Diversas investigaciones también han sido realizadas sobre la penetración de sustancias en diferentes sitios anatómicos. En una de ellas, la comparación de la penetración de un fármaco lipofílico y uno hidrófilico a través de piel humana procedente del cuero cabelludo y de la zona abdominal, mostró que la permeación *in vitro* a través de la piel del cuero cabelludo fue 27 y 48 veces más alta para ambos fármacos respectivamente. Por lo tanto, la administración de fármacos a través de la piel del cuero cabelludo ofrecerá una liberación preferiblemente para fármacos con características hidrófilas [69]. Similares resultados fueron obtenidos con el compuesto VX, (un agente de guerra química), evaluando la densidad de los folículos, el diámetro de los mismos y la permeación de la piel para determinar un modelo conveniente para piel procedente del cuero cabelludo humano [70]. De particular interés son los estudios comparativos en piel porcina y humana en diferentes sitios anatómicos, debido a que la primera es ampliamente utilizada en estudios de permeación de diversos fármacos destinados para piel humana. La aplicación tópica del colorante fluoresceína de sodio sobre piel porcina mostró una similitud en la penetración del compuesto entre piel porcina y humana, en la mayoría de los folículos pilosos [45]. La comparación de los diámetros, de las densidades foliculares y de

las permeaciones en piel de un compuesto organofosforado utilizando piel porcina de oreja, cabeza, costado y muslo con muestras de piel humana del área abdominal y del cuero cabelludo, mostraron una correlación buena entre la piel procedente del cuero cabelludo humano y la de oreja de cerdo con respecto al diámetro folicular y la absorción en la piel; y entre la piel procedente del cuero cabelludo humano y la piel procedente de la cabeza del cerdo con respecto a la densidad folicular (Figura 4) [70]. La piel de cerdo también ha sido descrita como un modelo conveniente que correlaciona con la piel humana procedente del cuero cabelludo por Jacobi [71] y Lademann [72].

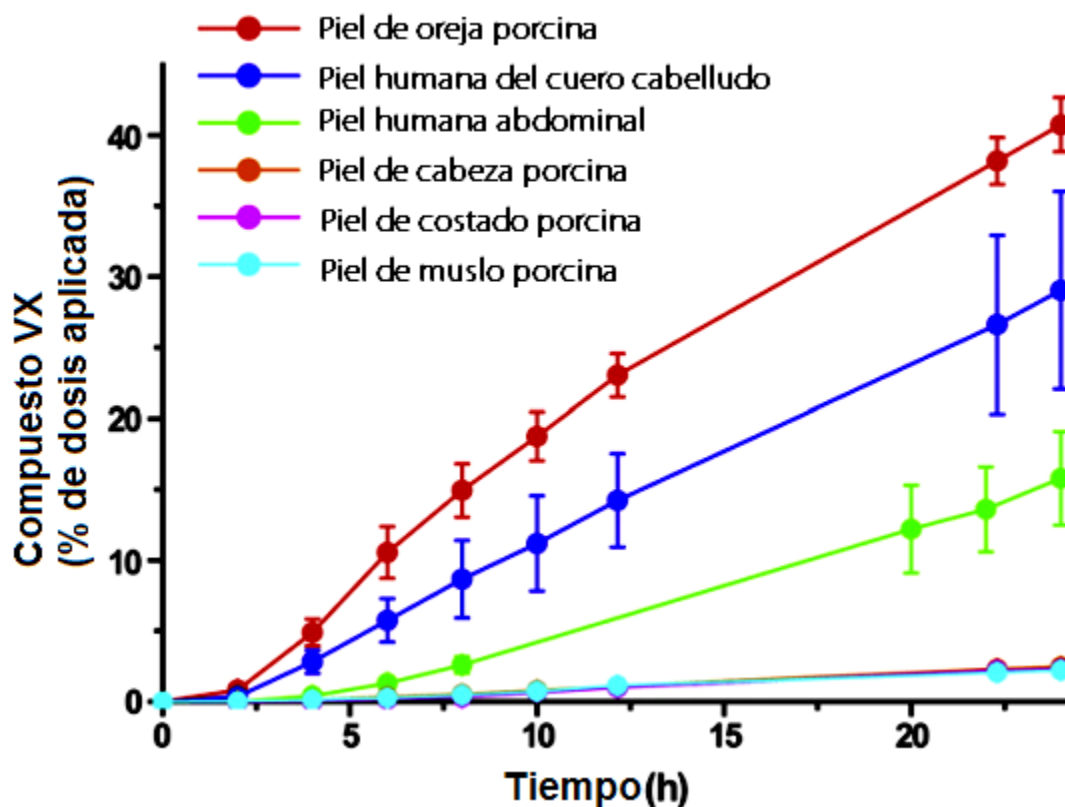


Figura 4. Permeación *in vitro* del compuesto VX ( $5 \text{ mg}\cdot\text{cm}^{-2}$ ) a través de piel completa manteniendo condiciones de exposición de 24 horas: de oreja, cabeza, costado y muslo de cerdo; y humana del área abdominal y cuero cabelludo [53,57]. Las cantidades acumuladas permeadas son expresadas como % de dosis aplicadas ( $n=6$ ). Los perfiles de permeación mostraron un clásico tiempo de latencia, seguido por una variación lineal a partir del cual un flujo estacionario es determinado [70].

Hay que subrayar que a pesar de las diferencias en los grosores de sitios dados, se puede predecir la respuesta para otros sitios en la misma persona. De esta manera, el antebrazo es considerado como representativo de la cara para medir la hidratación de la piel y las propiedades biomecánicas [73].

### 3.3 De acuerdo a su fotosensibilidad

Un aspecto importante por mencionar es que existen importantes variaciones naturales en el color de la piel entre los sitios anatómicos inducidos por la exposición solar. Esta es otra clasificación de la piel de acuerdo con su fotosensibilidad. El fototipo de piel fue propuesto primeramente por Fitzpatrick basado en la respuesta de la piel caucásica, mientras que el tipo de piel japonesa fue propuesto por Satoh y Kawada [74]. La clasificación del fototipo piel por Fitzpatrick sigue siendo la más usada. Actuales evaluaciones clínicas del color y la fotosensibilidad de la piel se basan en la evaluación visual de la pigmentación como un indicador de la respuesta de la piel a la luz solar. El clasificó la respuesta de la piel a los rayos UV en 4 tipos (I-IV) y los tipos de piel más pigmentada (V y VI) se incluyeron después de una revisión [75]; sin embargo, este sistema no puede predecir con exactitud las reacciones de la piel. El sistema de clasificación de la piel hecho por Roberts, es una herramienta para predecir la respuesta de la piel a las lesiones de los procedimientos cosméticos e identificar las secuelas posiblemente generadas en los trastornos inflamatorios de la piel. Con ello, se puede predecir una complicación inminente, tal como la hiperpigmentación y cicatrización, para ser evitada. Además, en la clasificación se incluye el fototipo de piel y el fotoenvejecimiento [76]. Las medidas de la pigmentación no correlacionan bien con la raza, mientras que la raza correlaciona moderadamente con un diagnóstico médico del fototipo de piel. Los métodos de análisis de color de la piel pueden servir para conocer la sensibilidad de la piel de acuerdo a la raza del individuo, reduciendo el riesgo potencial de contraer cáncer de piel [77].

Otra medida clínica usada para predecir la fotosensibilidad es la dosis de eritema mínimo, que se basa en la correlación de las curvas dosis-respuesta. La técnica de espectrometría se ha utilizado para evaluar tanto la dosis de eritema mínimo y la dosis melanogénica mínima como indicadores del eritema inducido por la radiación UV. El concepto de fototipo de piel es útil para predecir la sensibilidad del individuo a los rayos UV, los factores de riesgo y las medidas preventivas así como la elección de los filtros solares. En un grupo de 190 sujetos sanos blancos, el método de clasificación del tipo de piel fue valioso para diferenciar subgrupos con diversos grados de sensibilidad al sol. Los tipos de piel sensibles al sol I y II fueron significativamente más comunes entre las personas con color de cabello claro o pecas, o ambas cosas. En cada categoría del tipo de piel, la proporción de sujetos con una dosis mínima de eritema disminuyó significativamente con el incremento en el número del tipo de piel. El porcentaje de las pecas relacionado con la dosis de eritema mínima fue dependiente del tipo de piel. La edad, el sexo, o el color de los ojos no tuvieron ningún efecto sobre el porcentaje de la dosis de eritema mínima. La asociación de los tipos de piel I y II, el cabello rubio o rojo, las pecas con la disminución de la dosis de eritema mínima puede reflejar el predominio genéticamente controlado de feomelanina (una molécula fotosensibilizante) en la piel de los sujetos con estos fenotipos [78].

La comprensión y la cuantificación de las diferencias raciales sobre las funciones de la piel son importantes para el tratamiento y la prevención de enfermedades en la piel y el cuidado de la piel. Un aspecto clave que caracteriza a las razas es el color de la piel: la piel

pigmentada es diferente de la piel clara en cuanto a las respuestas químicas y a las condiciones ambientales y requiere un cuidado específico. La interpretación de los fenómenos fisiopatológicos debe tener en cuenta no sólo las características anatómicas y funcionales de los grupos étnicos, sino también las socioeconómicas y los factores nutricionales e higiénicos. La piel sensible es un problema complejo con implicaciones genéticas, individuales, ambientales, ocupacionales y étnicas [79].

Por otro lado, algunas evaluaciones han mostrado la influencia de la edad y la exposición al sol sobre el envejecimiento en pieles asiáticas [80]. En este sentido, un estudio con mujeres chinas y francesas de la misma edad (rango de edad: 20-60 años de edad) mostró para cada área de piel facial que la aparición de arrugas se retrasó alrededor de 10 años en las mujeres chinas, en comparación con las mujeres francesas. Sin embargo, la velocidad de aparición de arrugas faciales fue lineal en las mujeres francesas y no lineal en las mujeres chinas, quienes parecen experimentar un proceso de envejecimiento rápido entre los 40 y 50 años. La intensidad de las manchas pigmentadas fue una señal de envejecimiento mucho más importante en las mujeres chinas que en las mujeres francesas. El color de la piel de los asiáticos (de marrón claro a marrón oscuro), genera respuestas a la irradiación UV diferentes de las de piel blanca. Aunque los datos disponibles son limitados, se ha considerado que los europeos y los asiáticos tienen diferentes características de envejecimiento de la piel. Estos resultados requieren ser confirmados con un número adicional de estudios [80].

## 4. ACNE VULGARIS

### 4.1 Definición

El acné vulgaris es una enfermedad inflamatoria multifactorial común de los folículos pilosebáceos [5].

### 4.2 Clasificación:

- Con base a la severidad del desorden: Leve, moderado o severo.
- Con base al tipo de lesiones presentes: comedones, pápulas, pústulas y nódulos, así como la presencia o ausencia de cicatrices.

### 4.3 Incidencia:

La edad promedio para el inicio de acné en las mujeres es de 11 años y en los niños es de 12 años, lo cual se ha establecido por diversos estudios en varios países, con una tasa elevada de los 15 a 18 años [81,82]. La prevalencia del acné en la comunidad adolescente se estima en un 70% a un 87% [81]. En un estudio basado en una comunidad grande en el

Reino Unido, el acné facial fisiológico se observó en el 54% de la población adulta (en edades de 25 a 58 años), el acné clínico se estimó en un 3% en los hombres adultos y el 12% en mujeres adultas [83].

### 4.4 Costos en tratamientos de acné

Aproximadamente, \$100 millones de dólares al año se gastan en tratamientos sin receta para el acné, mientras que con receta probablemente supera un \$1 billón de dólares al año en los Estados Unidos [84].

### 4.5 Patogénesis

Cuatro factores han sido establecidos: Hiperproliferación epidérmica folicular, producción de sebo en exceso, inflamación en la piel, y una alta concentración y actividad de *Propionibacterium acnes* [85].

#### 4.5.1 Características generales de *Propionibacterium acnes*

El grupo *Propionibacterium* comprende bacilos no esporulados Gram-positivos anaeróbicos a facultativos, de morfología difteroidal típica. Estos organismos fueron clasificados dentro del género de *Corynebacterium*. De las ocho especies descritas, solo dos se encuentran comúnmente en material clínico, entre ellas *Propionibacterium acnes*. Esta bacteria es un organismo residente ampliamente distribuido en la piel y el cabello de los humanos, así como en el tracto gastrintestinal y en la faringe [86].

##### 4.5.1.1 Patogenicidad

El organismo se recupera comúnmente de cultivos anaeróbicos del material clínico proveniente del cuerpo humano como un contaminante incidental. La patogénesis del acné es multifactorial como ya fue discutida anteriormente, sin embargo *Propionibacterium acnes*, una bacteria Gram-positiva que coloniza los folículos con abundante sebo se encuentra asociada de manera importante en la inflamación de las lesiones del acné [6, 87]. Se ha sugerido que las lesiones del acné se inician por la obstrucción del ducto pilosebáceo y un efecto irritante local provocada por las cadenas de ácidos grasos derivadas de la hidrólisis bacteriana de los lípidos en el sebo. Dicho proceso comienza con la profusión de células y de sebo en el canal folicular que eventualmente forman una obstrucción que interfiere con la producción de la piel superficial, el proceso normal en el que las células muertas epiteliales son llevadas por el sebo al eje del pelo para ser liberado hacia la superficie de la piel. La bacteria *Propionibacterium acnes* miembro de la flora cutánea residente, crece en el ambiente anaerobio del comedón, aprovecha el atrapamiento de sebo como una fuente de alimentación y se reproduce. Se ha descrito que *P. acnes* libera quimioatrayentes que atraen a células del sistema inmunológico como los neutrófilos, monocitos y linfocitos, los cuales se acumulan dentro del epitelio folicular y se infiltran perifolicularmente estimulando a los neutrófilos a liberar enzimas, que rompen las paredes

del folículo, promoviendo una respuesta inflamatoria [3, 4]. Estudios previos también han encontrado que *P. acnes* estimula la producción de citocinas proinflamatorias tales como las interleucinas-1 $\beta$ , -8, -12, y el  $\alpha$ -factor de necrosis tumoral [88].

### 4.5.1.2 Morfología

*P. acnes* es un bacilo Gram-positivo, con un tamaño aproximado de 0.5 - 1.5 x 1<sup>-10</sup>  $\mu$ m. El organismo muestra un pleomorfismo difteroidal típico con asociaciones en formas alargadas, ramificadas y bífidas cortas en forma de cocos [86].

### 4.5.1.3 Características de cultivo

*P. acnes* es anaerobio a anaerobio facultativo en sus requerimientos atmosféricos. Una pequeña proporción de cadenas crecen aeróbicamente en su aislamiento primario. La mayoría de aislamientos frescos crecen sólo inicialmente en una atmósfera anaerobia, pero pueden mostrar crecimiento anaerobio facultativo después de varias transferencias. Aproximadamente una tercera parte de las cadenas han mostrado ser dependientes de dióxido de carbono en lugar de la anaerobiosis en el aislamiento primario. Las colonias en agar sangre de caballo tienen un tamaño aproximado de 0.5-2 mm después de 48 horas de incubación, circulares, enteras, convexas, blanco-grisáceas y opacas con una superficie brillante. Pocas cadenas son hemolíticas [86].

### 4.5.1.4 Características bioquímicas

*P. acnes* fermenta la glucosa, la fructosa, la galactosa, la manosa y el glicerol; la maltosa, la lactosa y la sacarosa no son fermentadas; y la esculina no es hidrolizada. El organismo es proteolítico produciendo una enzima gelatinasa y una caseinolítica. La bacteria produce indol y reduce nitratos. Cerca de dos terceras partes de las cadenas muestran actividad a la catalasa después de la exposición de la superficie de las colonias al aire por treinta minutos. La variabilidad en las reacciones puede reducirse adicionando 0.025 % de Tween 80 al medio (este tensoactivo estimula el crecimiento del organismo). Como otras propionibacterias los productos mayoritarios del metabolismo son ácido propiónico y acético. *P. acnes* produce un número de enzimas solubles como la lipasa, la cual es activa contra los triglicéridos, pero inactiva contra las grasas de la yema de huevo [86].

## 4.6 Tratamientos

El objetivo de las terapias es combatir los cuatro pasos que contribuyen a la patogenicidad del acné, seleccionando un tratamiento basado en el tipo de piel del paciente y la severidad del acné. Este desorden común en la piel puede afectar a ambos sexos de todas las edades. El tratamiento se basa en la severidad y aparición del acné, consistiendo de varios medicamentos tópicos y orales, así como algunos procedimientos médicos. Los fármacos más comúnmente utilizados para el tratamiento de acné se muestran en la Cuadro 1 [6, 9, 89, 90]. Diversos estudios han mostrado mediante ensayos clínicos o estudios observacionales, los posibles beneficios de diversos tratamientos tópicos y orales,



que son las principales clases de agentes terapéuticos para tratar el acné en todas sus etapas [91-93]. Los resultados para el peróxido de benzoilo como tratamiento de primera línea para el acné leve a moderado han mostrado una reducción en el recuento total de la lesiones. Si el acné persiste, tretinoína o adapaleno son las opciones de tratamiento, ya que ambos han mostrado una reducción en los recuentos de lesiones no inflamatorias e inflamatorias. Los antibióticos tópicos (clindamicina y la eritromicina) han mostrado ser un tratamiento eficaz para aquellos pacientes con predominio de las lesiones inflamatorias en acné de leve a severo, y se pueden combinar con un régimen que contiene peróxido de benzoilo tópico, tretinoína, y/o adapaleno. Para pacientes con acné moderado cuya severidad no se ha reducido adecuadamente por los tratamientos tópicos arriba mencionados, se recomiendan antibióticos orales. La eritromicina administrada oralmente demostró una eficacia similar en la reducción total recuento de lesiones a la tetraciclina administrada por la misma vía. La doxiciclina también mostró una eficacia similar a los otros antibióticos administrados oralmente. Un estudio reportó una reducción estadísticamente significativa ( $P = 0,001$ ) de las lesiones inflamatorias con respecto al placebo después de 4 semanas con 100 mg diarios de doxiciclina administrada oralmente.

Estudios comparativos de investigaciones hechas en 7309 pacientes utilizando tratamientos para acné moderado han mostrado que la combinación de tratamientos tópicos utilizando fármacos no retinoides con retinoides, ofrecen los resultados más favorables en la reducción de las lesiones de acné en comparación con las terapias individuales. Los resultados mostraron que el 5% de peróxido de benzoilo + ácido salicílico tuvo la más alta eficacia en la reducción de las lesiones en un período de 2 a 4 semanas en comparación con los otros tratamientos. Se ha reportado también que el peróxido de benzoilo + clindamicina fue igualmente tan eficaz que el peróxido de benzoilo + ácido salicílico después de 10 a 12 semanas. El porcentaje promedio de reducción en número lesiones inflamatorias y no inflamatorias después de 10 a 12 semanas fue: 51.8% y 47.8 % para el peróxido de benzoilo + ácido salicílico, 55.6 % y 40.3 % para el peróxido de benzoilo + clindamicina, 43.7 % y 30.9 % para el peróxido de benzoilo, 45.9 % y 32.6 % para la clindamicina, y para el placebo 26.8 % y 17 %, respectivamente [94].

En el acné moderado, por tanto, la terapia de combinación puede componerse de un régimen incluyendo peróxido de benzoilo, antibióticos tópicos, y un retinoide tópico (tretinoína, adapaleno, o tazaroteno). La tretinoína, adapaleno, y tazaroteno demuestran una eficacia similar en la reducción de las lesiones inflamatorias, no inflamatorias y el total de lesiones después de 12 semanas de tratamiento. El tratamiento más usado para los pacientes con acné severo es la isotretinoína administrada oralmente, la cual ha sido más eficaz en la reducción de las lesiones, que el placebo y que la tetraciclina durante un mes y 24 semanas, respectivamente. Cuando se comparó a la tetraciclina y a la isotretinoína a las 24 semanas, esta última redujo significativamente quistes de acné ( $P < 0.01$ ), pústulas y comedones ( $P < 0.01$ ). En los pacientes que no son candidatos a la isotretinoína administrada oralmente, los tratamientos tópicos y orales anteriormente mencionados para el acné leve a moderado pueden ser considerados [91, 93].

**Cuadro 1. Fármacos clasificados por su acción terapéutica y formulaciones utilizadas para el tratamiento de acné [6, 9, 89, 90].**

	Fármacos	Indicación	Formulaciones en el mercado
Antibióticos	Tetraciclinas (Doxiciclina y minociclina)	Para acné moderado a severo	Cápsulas, suspensión, comprimidos orales, solución.
	Macrolidos (Roxitromicina)		
	Sulfonamidas (Trimetoprima y sulfametoxazol)	Se consideran actualmente antibióticos de tercera línea para acnés moderados a severos.	Cápsulas, comprimidos orales.
	Clindamicina y Eritromicina (uso tópico)	Produce una disminución de los ácidos grasos libres y de la bacteria <i>P. acnes</i> , para acné moderado a severo.	Gel, solución, cápsulas y comprimidos orales y cremas
Hormonas	Anticonceptivos de acción antiandrogénica (Acetato de ciproterona y etinil estradiol)	De elección para pacientes femeninos con acné severo y síndrome de ovario poliquístico	Comprimidos orales
	Anticonceptivos monofásicos de última generación (gestodeno)		
Retinoides	Ácido retinoico 13 CIS o isotretinoína	De elección para acnés severos. Tienen la capacidad de aumentar la mitosis de las células epidérmicas y su recambio, produciendo una capa córnea menos cohesiva que se descama con mayor facilidad	Cápsulas de gelatina blanda, cremas y geles tópicos.
	Adapaleno	Puede utilizarse para acné leve hasta acné severo.	Geles y cremas para vía tópica
Antihistamínicos	Terfenadina y loratadina	De elección para el acné severo	Comprimidos y suspensiones orales
Corticoides	Prednisona	Se utiliza en el acné severo con formas nódulo-quísticas. Tienen acción antiinflamatoria, inmunodepresora y frenadora de andrógenos adrenales.	Comprimidos convencionales y de liberación prolongada orales
Queratolíticos	Azufre	Puede utilizarse en el acné leve hasta el severo	Comprimidos, pomadas y jabones
	Ácido salicílico	Puede utilizarse en el acné leve hasta el severo. Presenta un importante efecto queratolítico.	Comprimidos, cremas Soluciones en combinación con resorcina y/o azufre.
	Peróxido de benzoilo	Puede utilizarse en el acné leve hasta el severo (efecto bacteriostático).	Geles, lociones, cremas e incluso jabones.

Con lo que respecta a los tratamientos hormonales llevados a cabo en mujeres con acné moderado a severo o acné resistente a otros tratamientos, algunos autores han reportado evidencia de la efectividad de la espironolactona (200 mg administrados oralmente por día, durante 12 semanas) en comparación con placebo, para el tratamiento del acné vulgaris. Una reducción de las lesiones inflamatorias y de la percepción del paciente estadísticamente significativa ( $P < 0.001$ ) en los pacientes tratados con espironolactona fue observada. No obstante, los estudios en esta área son escasos y pequeños. Estudios individuales indican una superioridad de la espironolactona sobre otros fármacos, pero los resultados no pueden generalizarse [95]. Ensayos en pacientes administrados oralmente con anticonceptivos combinados fueron efectivos en la reducción de lesiones faciales inflamatorias y no inflamatorias con respecto al placebo. Pocas diferencias significativas entre los tipos de anticonceptivos y su eficacia para tratar el acné severo han sido encontradas. De estas, los anticonceptivos conteniendo acetato de clormadinona o acetato de ciproterona fueron más efectivos que aquellos con levonorgestrel, pero esta observación es basada en pocos estudios. En general, se necesitan más estudios para evaluar plenamente los beneficios potenciales de estas hormonas para el tratamiento de acné [96].

Tratamientos alternativos incluyen aplicación de luz azul y roja así como terapia fotodinámica, los cuales ofrecen alguna reducción de las lesiones inflamatorias del acné, especialmente con la terapia fotodinámica. Los fotosensibilizadores, ácido aminolevulínico y metil aminolavulínato pueden proporcionar efectividades similares. La terapia fotoneumática (Isolaz™) y las exfoliaciones químicas también ofrecen una mejora en las lesiones de acné, pero se necesitan más estudios para evaluar plenamente la eficacia de estos tratamientos médicos [97- 102].

#### **4.7 Análisis de los tratamientos convencionales y no convencionales (nanoparticulados) para acné**

La administración adecuada de un tratamiento para pacientes con acné debe ser llevada a cabo analizando las áreas involucradas del cuerpo (cara, cuello, pecho y/o espalda), el tipo y el número de lesiones de acné, la presencia/ausencia de cicatrices y la tendencia a su formación, la posible influencia hormonal en relación con el brote de acné y el estado psicológico que el acné pueda influir en la vida del paciente [6, 9]. Se debe obtener la historia detallada de los medicamentos utilizados en este desorden. En las mujeres con acné moderado a severo, una historia clínica de vello facial, pérdida de cabello, períodos irregulares y síndrome de ovario poliquístico se deben considerar tratamientos adecuados con modulación hormonal. En los hombres, el uso de esteroides anabólicos debe ser evaluado y relacionado a la aparición de acné. Los procedimientos adyuvantes también pueden ser considerados para todos los pacientes con acné. Comúnmente, la administración de un medicamento para tratamiento de acné se lleva a cabo administrando aquel con efectos secundarios más tolerables y se administran otros según sea necesario y tolerado por el paciente. Generalmente, los fármacos incluidos en las formulaciones convencionales pueden provocar algunos efectos adversos como

irritación, sequedad, eritema, comezón, picazón y quemaduras en la piel, puntos decisivos para evitar su uso. Estos efectos adversos son mostrados en la Cuadro 2 [103-105]. Así, se requiere una terapia específica en cada paciente, probando diferentes medicamentos y procedimientos hasta que se encuentre un régimen óptimo. Una guía de ayuda en el tratamiento de acné basada en el tipo de lesiones se muestra en la Figura 5 [9]. Es de relevancia señalar que todo tratamiento tópico de acné, especialmente con retinoides tópicos como la isotretinoína y las tetraciclinas debe ser detenido en caso de embarazo y no se debe administrar en pacientes lactantes. El único medicamento aprobado por la FDA para tratar el acné durante el embarazo es el ácido azelaico (categoría B) y debe utilizarse con precaución en mujeres en lactancia. Para las mujeres que van a empezar un tratamiento con isotretinoína administrada oralmente, deben realizarse pruebas de embarazo mensualmente, para no quedar embarazadas durante al menos un mes después de interrumpir el tratamiento, debido a los efectos teratogénicos del fármaco señalado [9].

Un aspecto importante es que los médicos deben analizar el tipo de piel del paciente para recetar la formulación más adecuada al paciente (cremas para piel seca; productos del ácido salicílico para piel aceitosa -soluciones/geles-; y lociones para pieles normales). No obstante, la elección de una formulación convencional (tópica u oral) con características de absorción y propiedades estéticas específicas, también presenta limitaciones importantes que no le permiten incrementar su eficacia en el tratamiento de acné (no penetran eficazmente a través de la unidad pilosebácea y la liberación de concentración efectiva de fármaco no es controlada).

En el mercado es posible encontrar formulaciones convencionales con diferentes antimicrobianos tópicos y combinaciones de ellos para tratar el acné como ya se ha señalado antes. Con este tipo de formulaciones, la inhibición de *P. acnés* puede suprimir la respuesta inflamatoria proviendo grandes beneficios a los pacientes con acné vulgaris. Sin embargo, diversos antimicrobianos han sido evaluados mostrando que dicho microorganismo generó cierta resistencia. Un fármaco del que ninguna resistencia ha sido demostrada es triclosán (2,4,4'-tricloro-2'-hydroxydiphenyl éter), agente lipofílico utilizado para el tratamiento de acné y extensamente utilizado en muchos productos de cuidado para la salud tópica, cosmética y productos para hogar [7, 8]. El Cuadro 3, muestra las formulaciones con triclosán que son comercialmente disponibles en México [106-110].

Actualmente, muchos sistemas nanoestructurados han sido desarrollados para incrementar la eficacia (control de la liberación), la vectorización (especificidad), la tolerabilidad y el índice terapéutico de fármacos, mostrando ser superiores a las convencionales [11, 12]. Varios de éstos han entrampado al fármaco triclosán para mejorar su eficacia, y tratando de disminuir el uso de una combinación de productos y otros efectos adversos causados con otros productos convencionales (Cuadro 4) [7, 8, 111-114]. Aunque muchos esfuerzos han sido realizados en este sentido, más estudios deben llevarse a cabo para comprobar su eficacia y seguridad.

**Cuadro 2. Efectos adversos de los fármacos comunmente utilizados para el tratamiento de acné, clasificados con base a su vía de administración [103-105].**

Tratamiento	Fármacos	Acción	Efectos Adversos
<b>Tópico</b>	Tretinoína	Agente comedolítico	Irritación y fotoirritación, eritema, descamación.
	Adapaleno		
	Ácido salicílico	Agente queratolítico	Exacerbación de las lesiones inflamatorias
	Nicotinamida	Antiinflamatorio	Poca eficacia
	Azufre	Queratolítico con propiedades antisépticas	Su uso está en declive por sus efectos irritativos, olor y color desagradables.
	Ácido azelaico	Queratolítico y bactericida	Irritación, enrojecimiento, descamación y dermatitis por contacto
Peróxido de benzoílo			
<b>Tópico u oral</b>	Isotretinoína	Agente comedolítico y queratolítico	Es hepatotóxico, teratogénico, produce xerosis, descamación, fotosensibilidad, prurito, irritación, conjuntivitis, irritación en membranas mucosales, dolores de cabeza, náuseas, pancreatitis, aumento de triglicéridos y colesterol. No disponible en E.U.
	Eritromicina	Antibiótico y antiinflamatorio	Resistencia a <i>P. acnes</i> e intolerancia gastrointestinal.
	Tetraciclina		Manchas amarillas en la piel y resistencia a <i>P. acnés.</i> . Mareos, vértigo, ataxia, vomito, diarrea, candidiasis vaginal, e hipertensión intracraneal, lupus y hepatitis. La minociclina es la que genera menor resistencia bacteriana a <i>P. acnes</i> .
	Doxiciclina	Antibiótico	
<b>Oral</b>	Minociclina		La minociclina es la que genera menor resistencia bacteriana a <i>P. acnes</i> .
	Co- trimoxazol		Reacciones de hipersensibilidad
	Clindamicina		Colitis pseudomembranosa
	Espironolactona	Antiandrogénico	Dolor en senos y períodos irregulares
	Estrogenos		
	Acetato de ciproterona		
	Etinil estradiol		
	Corticosteroides	Inmunosupresores	Puede inducir rosácea.

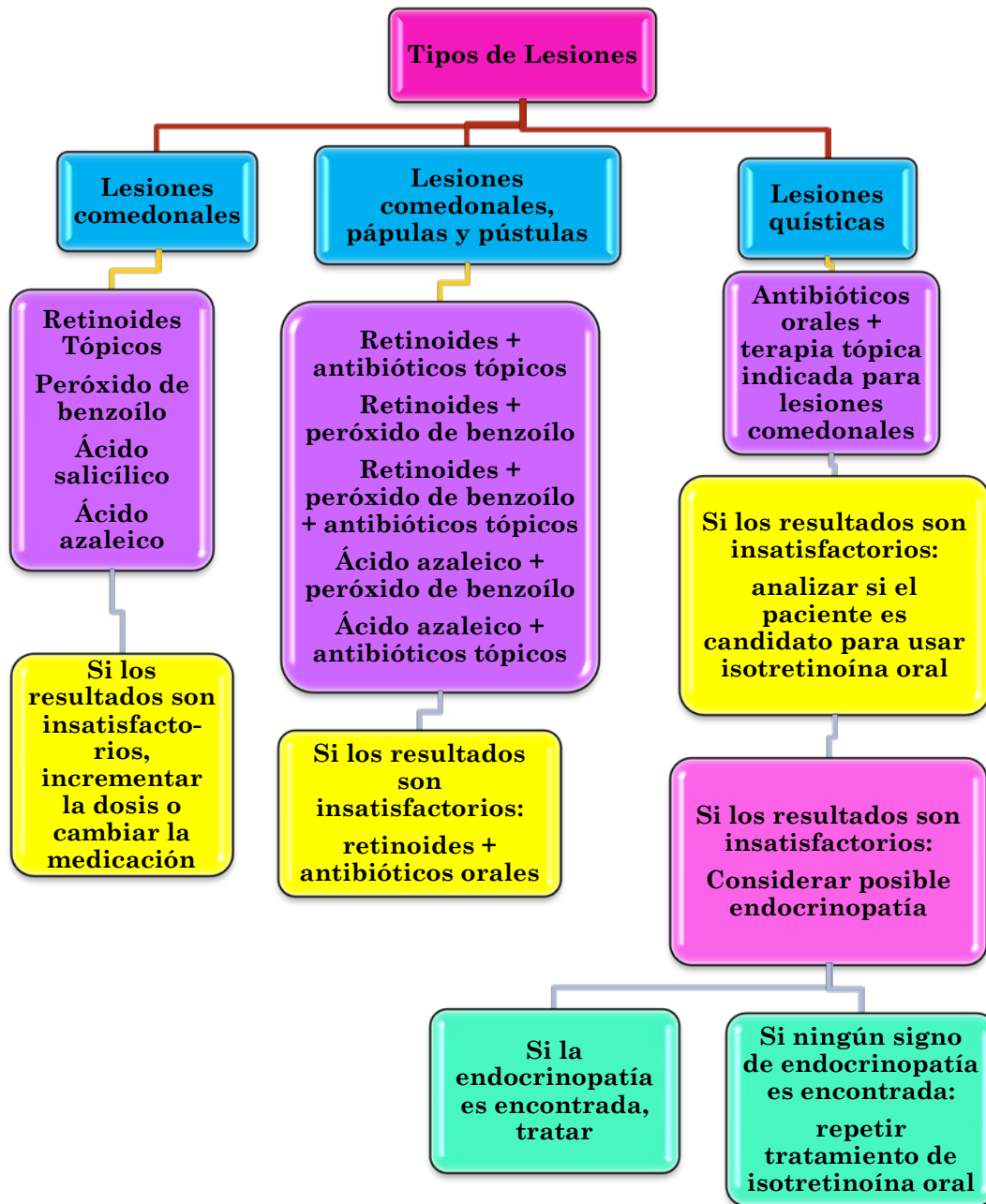


Figura 5. Guía para el tratamiento de acné basado en el tipo de lesiones [9].

**Cuadro 3. Desventajas de las formulaciones convencionales con triclosán disponibles comercialmente en México para el tratamiento de acné [106-110].**

Producto	Fármacos y excipientes (100g)	Desventajas
<p><b>Dermobras®</b></p> <p><i>Presentación:</i> Crema</p> <p><i>Fabricante:</i> Representaciones Méx-América</p>	<p>Oxido de Aluminio (25g), Triclosan (1g), Glicerina, Microesferas de polietileno, Agua desionizada, <b>Propilenglicol, Estearret-20</b>, Extracto de bacopa monniera, <b>Laurilsulfato de sodio</b>, Miristato de isopropilo, Sorbitol al 70%, Cera, <b>Emulsificante</b>, Cera blanca de Abeja y cloruro de benzalconio.</p>	<p>Se ha demostrado que algunos emulsificantes, ácidos grasos, glicoles y humectantes actúan como promotores de absorción:</p> <p>-Extracción de proteínas o lípidos induciendo una pérdida de la integridad de la membrana.</p>
<p><b>Clean &amp; Clear®</b></p> <p><i>Presentación:</i> Solución</p> <p><i>Fabricante:</i> Johnson&amp;Johnson</p>	<p>Triclosán (2.5mg/g), Agua, <b>Lauril éter sulfato de sodio, Lauril poliglucosa, condensado de ácido graso</b> y Colágeno, Monoetanolamida de coco, Cocoato de glicerilo, Polietilenglicol, Cloruro de sodio, Fragancia, EDTA, Quaternium-15, Ácido cítrico y Colorantes (CI 17200 y 16035).</p>	<p>-Modificación del empaquetamiento de la bicapa lipídica.</p> <p>-Desnaturalización de proteínas.</p> <p>El efecto promotor es directamente proporcional al grado de irritación que provocan, dejando la piel seca por pérdida de agua transepidermal, debilitando la propiedad de barrera del estrato córneo.</p>
<p><b>Cetaphil antibacterial®</b></p> <p><i>Presentación:</i> Barra sólida</p> <p><i>Fabricante:</i> Original Bradford Soap Work, Inc. Galderma México, S. A. de C. V.</p>	<p>Triclosán, cocoilisetionato de sodio, ácido esteárico, sebatato de sodio, agua, <b>estearato de sodio, dodecibenceno sulfonato de sodio, cocoato de sodio, PEG-20</b>, cloruro de sodio, fragancia, isetionato de sodio, petrolato, isoestearoil lactato de sodio, <b>laureato de sacarosa</b>, dióxido de titanio, pentetato de pentasodio, etidronato de tetrasodio, puede contener almendra de palma sódica.</p>	<p>El efecto promotor es directamente proporcional al grado de irritación que provocan, dejando la piel seca por pérdida de agua transepidermal, debilitando la propiedad de barrera del estrato córneo.</p>

\*Los promotores de absorción son las sustancias resaltadas para cada producto

**Cuadro 4. Novedosas formulaciones no convencionales con triclosán.**

Tipo	Ventajas	Desventajas	Ref.
<b>Complejos con Lisozima</b>	Mejora su solubilidad, aumenta la actividad antimicrobiana y le confiere protección.	Son estables a pHs alcalinos y los pHs en la piel son ligeramente ácidos. Su investigación es mínima.	[111]
<b>Complejos de inclusión con <math>\beta</math>-Ciclodextrinas (CDs)</b>	Mejora su solubilidad, estabilidad química, disolución y biodisponibilidad.	Cavidad relativamente pequeña (7 Å), para atrapar moléculas grandes. Misma actividad antimicrobiana que una solución	[112]
<b>Microcápsulas de chitosán /gelatina</b>	Buen atrapamiento de fármaco.	Tamaño de las micropartículas dependiente del pH: pH<5: 2-3 $\mu$ m pH >5: 25 $\mu$ m. Mostraron pronta liberación en 30 min.	[113]
<b>Nanopartículas de chitosán / CDs</b>		Destinada para vía oral, mostró una liberación del 60%. Se tiene que degradar al polímero para su liberación total.	[114]
<b>Parches de hidrogel</b>	Mejoran la permeabilidad y adhesividad en la piel.	Contienen Transcutol, agente promotor de absorción, que promueve un desordenamiento de los lípidos en la piel y es irritante. Utilizan agentes entrecruzantes tóxicos. No se asegura una completa reacción de polimerización.	[8]
<b>Liposomas</b>	Se puede vectorizar con estos sistemas.	La carga del fármaco y la estabilización de las partículas son dependientes del pH. Causa una pronta liberación del fármaco. Tienen un alto contenido de ingredientes lipofílicos.	[7]

## 5. SISTEMAS NANOACARREADORES

El objetivo de las nanomedicinas es diagnosticar y preservar la salud sin efectos secundarios con tratamientos no invasivos. La manipulación que la nanomedicina ofrece a los medicamentos y otros materiales son cambios sobre las propiedades básicas y la



bioactividad de los materiales. La solubilidad, el incremento en el área superficial, la liberación controlada y vectorizada son algunas características que la nanotecnología puede manipular en los sistemas de liberación de fármacos. Estas estructuras se pueden hacer de diversos materiales proveyéndoles diferentes propiedades en su estructura y naturaleza química. Los sistemas nanoacarreadores pueden dividirse en tres grandes grupos: vesiculares (liposomas, transfersomas, etosomas, niosomas y marinosomas), agregados de moléculas (ciclodextrinas, dendrímeros y micelas) y particulares (micrométricos o nanométricos). Estas estructuras necesitan ser evaluadas para demostrar que no tienen efectos tóxicos [115, 116]. Todas estas nanoestructuras se llaman nanoacarreadores y pueden ser administrados en los organismos por casi todas las vías, incluyendo la tópica/transdérmica, lo cual ofrece varias ventajas sobre otros sistemas de liberación, pero con sus propias limitaciones. Las más utilizadas e investigadas en el ámbito farmacéutico para la administración tópica/transdérmica de fármacos como una función del material usado para su preparación, son las nanopartículas sólidas (poliméricas, metálicas, etc), los liposomas flexibles, los dendrímeros y las nanoemulsiones.

### 5.1 Nanopartículas sólidas

Las nanopartículas son menores que 1000 nm [117]. Hoy en día, es posible insertar muchos tipos de materiales, tales como fármacos, proteínas, péptidos, ADN, etc., en las nanopartículas. Estas están diseñadas para resistir el pH, la temperatura, el ataque enzimático y otros problemas relacionados con la liberación del fármaco [115-116]. La tecnología de las nanopartículas se puede dividir en tres etapas: la primera generación está relacionada con las nanopartículas que contienen un sólo componente en su estructura. Los de segunda generación involucran nanopartículas hechas de un componente principal (polímero, lípido, etc.) y sustancias adicionales. La tercera generación está representada por las nanopartículas con un componente principal en combinación con un segundo componente, además de sustancias adicionales [118-119].

Las nanopartículas son coloides que pueden clasificarse como nanoesferas o nanocápsulas. Las nanoesferas son estructuras de núcleo sólido y las nanocápsulas son estructuras huecas con centro líquido. Los fármacos pueden cargarse en nanopartículas a través de la encapsulación, la unión superficial o el entrapamiento [120]. Las nanopartículas también pueden clasificarse según el material que las conforman por ejemplo a las formadas de lípidos, se les llama nanopartículas lipídicas. Las nanopartículas pueden estar compuestas de polímeros, lípidos, polisacáridos, proteínas, oro, plata, fosfatos, óxidos de hierro, sílica, [121-124] etc.

### 5.2 Liposomas

Los liposomas son estructuras de bicapa lipídica huecas que pueden transportar fármacos hidrófilos en el interior del núcleo y fármacos hidrofóbicos entre la bicapa. Son estructuras hechas de colesterol y fosfolípidos. Pueden tener diferentes propiedades dependiendo de los excipientes utilizados y el proceso de su elaboración. En los últimos años, muchos liposomas han sido aprobados para su uso en la clínica. Estudios sobre el

polimorfismo lipídico, los mecanismos fisiológicos de la disposición de los liposomas y las interacciones lípidos-fármacos y lípidos-proteínas se han llevado a cabo con el fin de encontrar una mayor estabilidad, un mayor tiempo de vida media y una mejor distribución de los liposomas [125]. Los liposomas tienen algunas propiedades interesantes. Pueden ser de superficie cargada neutra, negativa o positivamente, dependiendo de los grupos funcionales y el medio de pH en el que se encuentren. Los liposomas pueden encapsular fármacos tanto lipófilos como hidrófilos en una manera estable, dependiendo del polímero añadido a la superficie por ejemplo, PEG, poli (acrilamida), poli (vinilpirrolidona) y poli (acrilato morfolina).

Los liposomas pueden clasificarse en función del tamaño y el número de lamelas. Hay pequeñas vesículas unilamelares, medianas vesículas unilamelares, grandes vesículas unilamelares, vesículas gigantes unilamelares, vesículas oligolamelares, vesículas grandes multilamelares y vesículas multivesiculares. El diámetro de las pequeñas vesículas unilamelares es de 25 nm a 100 nm y las de tamaño medio es de entre 100 nm y 500 nm. Las vesículas grandes unilamelares, las vesículas gigantes unilamelares, las vesículas oligolaminares, las vesículas grandes multilamelares y las vesículas multivesiculares tienen un diámetro de unos pocos cientos de nanómetros a varios micrómetros. Las formas y tamaños dependen de la técnica de preparación, los lípidos utilizados y las variables de proceso. Dependiendo de estos parámetros, el comportamiento *in vivo* e *in vitro* puede cambiar los procesos de opsonización, los perfiles de liberación, la disposición en el cuerpo y el tiempo de vida en almacenamiento [125].

### 5.2.1 *Transfersomas*

Algunos liposomas pueden tener una estructura deformable y pueden atravesar el estrato córneo o pueden acumularse en las regiones del mismo, dependiendo de su composición. Estos liposomas se llaman transfersomas o liposomas transformables. La necesidad de alcanzar los surcos en la piel (folículos pilosos y espacios intercelulares entre lípidos) para liberar fármacos, es el objeto de la invención de los transfersomas. Estas estructuras son hechas de lípidos similares a las membranas biológicas, pero tienen una estructura rígida. La incorporación de elementos (tensoactivos) en la membrana lipídica para hacerlos más flexibles los ha hecho acarreadores exitosos para alcanzar ruta del transdérmica. El uso de estos tipos de nanoacarreadores parece ser más eficaz que con el uso de liposomas y su flexibilidad permite la posibilidad de usarlos como los vectores de vacunas vía transdérmica [126].

### 5.2.2 *Etosomas*

La idea de hacer otro tipo de liposomas flexibles ha sido el objetivo de muchos científicos. Los etosomas contienen alcoholes en la bicapa lipídica para hacerlos más flexibles y ser aptos para ser deformados cuando una presión es aplicada [127]. Estos sistemas permiten que los fármacos penetren en las capas más profundas de la piel, llegando a la circulación sistémica. Los etosomas son fáciles de preparar y se consideran seguros y eficaces, maleables y de textura suave, por lo que su uso podría tener muchas

aplicaciones. Estas estructuras pueden entrapar fármacos muy lipofílicos y catiónicos, y en el futuro estos sistemas ofrecen una oportunidad enorme para diseñar mejores terapias [128].

### 5.2.3 Niosomas

Los niosomas se preparan a base de lípidos (colesterol) y tensoactivos no iónicos para formar liposomas más estables que sean biodegradables y mínimamente tóxicos. Estos acarreadores fueron creados con la misma intención de los transfersomas y etosomas (liposomas menos rígidos y permitir su paso en la piel) [129]. Los niosomas fueron usados originalmente en la industria cosmética y su versatilidad ha permitido su uso en otras áreas tal como la farmacéutica (vía oral, parenteral, ocular, vaginal y transdérmica) para tratamientos antifúngicos y anti-arrugas [130].

### 5.3 Dendrimeros

Los dendrimeros son polímeros en forma de dendritas cuyas poblaciones monodispersas son estructuralmente y químicamente uniformes. Estos permiten la conjugación con numerosos grupos funcionales debido a la naturaleza de sus ramificaciones. La cantidad de ramificaciones aumenta exponencialmente y el crecimiento de los dendrimeros es típicamente de aproximadamente 1 nm por generación [131]. La clasificación de los dendrimeros se basa en el número de generaciones. Después de la creación de un núcleo, la síntesis por etapas se denomina primera generación, después de eso, cada adición gradual de monómeros crea la siguiente generación. Este proceso, proporciona la capacidad de controlar tanto el peso molecular como la arquitectura. El tipo de polímero elegido para construir el dendrimer mediante polimerización es muy importante con respecto a las características finales y su arquitectura. En particular, la arquitectura 3D, así como los grupos funcionales periféricos, proporcionan dendrimeros con importantes propiedades y características físicas y químicas. Además, los dendrimeros tienen una alta densidad de carga superficial debido a los grupos ionizables que les ayudan a unir los fármacos por fuerzas electrostáticas, independientemente de la estequiometría. Esta asociación dendrimer-fármaco proporciona al fármaco una mejor solubilidad, aumentando su transporte a través de membranas biológicas y aumenta la estabilidad del fármaco. El número de moléculas que pueden ser incorporadas en dendrimeros está relacionada con el número de grupos funcionales superficiales, por lo tanto, los dendrimeros de la última generación pueden incorporar más moléculas. No obstante, no todos los grupos funcionales están disponibles para la interacción debido al volumen estérico, la rotación de la molécula o los efectos estereoquímicos. Los dendrimeros pueden tener cargas positivas y negativas, lo cual les permite formar complejos con diferentes tipos de fármacos. Debido a su forma y tamaño, los dendrimeros pueden interactuar con los lípidos presentes en las membranas celulares, mostrando una mejor penetración en los cultivos celulares y membranas intestinales [132].

Los principales problemas con este tipo de partículas son su degradación pobre e inherente citotoxicidad. Con el fin de reducir su toxicidad, los dendrimeros han sido

vinculados a péptidos que se forman a partir de aminoácidos unidos a través de los enlaces amida en las ramificaciones de los dendrímeros ya sea en el núcleo o en la superficie. Así, cuando son biotransformados, estos sistemas producen derivados de aminoácidos. Finalmente, la síntesis de estas estructuras es menos costosa y su purificación no presenta ninguna dificultad [133, 134].

### 5.4 Nanoemulsiones

Las nanoemulsiones son sistemas dispersos isotrópicos de dos líquidos no miscibles, normalmente consisten de un sistema oleoso disperso en un sistema acuoso (o/w), o un sistema acuoso disperso en un sistema oleoso, pero formando gotitas de tamaños nanométricos (100 nm). Estos sistemas pueden ser estables (metaestables) durante tiempos largos debido a sus tamaños extremadamente pequeños y el uso de agentes tensioactivos adecuados. Las nanoemulsiones puede entrapar fármacos hidrofóbicos e hidrofílicos, ya que es posible realizar ambas nanoemulsiones w/o u o/w. Estos sistemas no son tóxicos ni irritantes y pueden ser utilizados para la administración en piel o en las membranas mucosales así como para la administración parenteral y no parenteral en general. Las nanoemulsiones se han utilizado en el área cosmética y farmacéutica debido a su tamaño de partícula y sus propiedades fisicoquímicas. Sin embargo, la administración transdérmica utilizando nanoemulsiones se ha reducido debido a los problemas de estabilidad inherentes a esta forma de dosificación [135].

## 6. TÉCNICAS DE PREPARACIÓN DE NANOPARTÍCULAS

Las técnicas de preparación se basan en las propiedades fisicoquímicas de los materiales en cuestión. Esas técnicas se derivan de los métodos de preparación de micropartículas. Pueden ser preparadas por emulsificación evaporación, nanoprecipitation (difusión de solvente), *salting out* y otras técnicas derivadas de éstas [136].

### 6.1 Emulsificación-evaporación

Esta técnica fue utilizada por primera vez para la preparación de nanoesferas. Se fundamenta en el procedimiento propuesto por Vanderhoff en 1979. Este método fue adoptado posteriormente para la producción de nanoesferas de diferentes polímeros incluidos PLGA, PCL, PHB (poli- $\beta$ - hidroxibutarato), copolímeros del ácido acrílico y derivados de celulosa, con diferentes solventes utilizados (eg., cloroformo y cloruro de metileno) y con diferentes agentes estabilizantes como los polisorbatos, poloxámeros, dodecil sulfato de sodio y polivinilalcohol [137].

Con esta técnica la producción de nanopartículas ocurre por la precipitación de un polímero formulado en una emulsión (o/w). El material polimérico o lipídico se disuelve en un disolvente parcialmente miscible o inmiscible en agua, éste es emulsificado en una fase acuosa con ayuda de un molino coloidal seguido de homogenización a alta presión. Posteriormente, se evapora el disolvente precipitando el polímero o lípido en la fase acuosa,

con ello se da la formación de nanopartículas. El diámetro promedio de las partículas dependerá de los materiales empleados. De este método se han reportado varias modificaciones como las siguientes [138, 139]:

- **Emulsificación-Difusión:** Involucra el uso de solventes parcialmente miscibles con agua, los cuales son previamente saturados en agua con el objeto de asegurar el equilibrio termodinámico entre ambos líquidos. La adición de agua a la emulsión (o/w) previamente formada causa que el solvente difunda hacia la fase externa, dando como resultado la formación de nanopartículas.
- **Emulsificación-*evaporación directa del solvente*:** En esta técnica, la emulsificación (producida con una homogenización de baja presión) es seguida por la remoción directa del solvente orgánico produciendo una dispersión fina de partículas poliméricas.

### 6.2 Técnica de homogenización a alta presión

En esta técnica la producción de nanopartículas es por medio de la homogenización a altas presiones de los lípidos o polímeros fundidos y una solución acuosa conteniendo el estabilizante. Las gotas del polímero o lípido solidifican y se forman las nanopartículas. Los dos métodos que con mayor frecuencia son utilizados para la producción de nanopartículas son la técnica de homogenización a alta presión caliente y fría. En ambos casos para cargar las partículas con fármaco, éste se disuelve en el polímero o lípido a una temperatura de aproximadamente 5 a 10 °C por encima del punto de fusión del lípido o polímero [140].

- **Homogenización en caliente:** El lípido fundido o polímero se dispersa bajo agitación en una solución acuosa conteniendo un estabilizante que se encuentra a la misma temperatura que la fase lipídica. La preemulsión obtenida se homogeniza con un homogenizador de pistón hueco abierto, entonces la nanoemulsión caliente formada se enfría hasta temperatura ambiente. De esta manera, cuando hay una recristalización se forman las nanopartículas.
- **Homogenización en frío:** El material fundido conteniendo al fármaco se enfría, lo que provoca la aparición de micropartículas (50-100 nm). Estas micropartículas se dispersan en una solución conteniendo un estabilizante frío y así se forma una presuspensión que se homogeniza a temperatura ambiente (o menor). La energía necesaria para producir nanopartículas por esta técnica es considerable.

### 6.3 Técnica de hidratación de película-Homogenización a alta presión

La preparación de nanopartículas consiste en disolver en una fase orgánica, el sustrato, los estabilizantes y/o el fármaco. Después de que se remueve la fase orgánica se forma una capa lipídica que es hidratada en una solución salina y agitada por 5 minutos a

50 °C. Finalmente, la emulsión obtenida (1-2  $\mu\text{m}$ ) se homogeniza por medio de un sistema a alta presión (60-70 ciclos a 15 00 psi) para obtener las nanopartículas [141].

### 6.4 Técnica de microemulsión

La preparación de nanopartículas consiste en dispersar una microemulsión caliente en un medio acuoso frío, bajo agitación mecánica [142]. La microemulsión esta comúnmente formada de un sustrato (ej. ácido esteárico), tensoactivo (ej. Polisorbato 20, polisorbato 60 y fosfatidilcolina de soya), cosurfactantes (ej. butanol) y agua. Con ello se forma un sistema transparente y termodinámicamente estable siempre y cuando los componentes se encuentren en las proporciones adecuadas para formar la microemulsión. A una temperatura de 65-70°C se adiciona la microemulsión a un medio acuoso frío (2-3 °C, a una proporción de 1:25 a 1:50) bajo agitación mecánica, lo que asegura que la reducción del tamaño de partícula se deba a la precipitación del material y no a un proceso mecánico [143, 144].

### 6.5 Técnica de membrana contráctil

La preparación de nanopartículas por medio de una membrana contráctil permite una producción a gran escala; la fase lipídica está a presión, a una temperatura por encima del punto de fusión del polímero o lípido, la cual pasa a través de una membrana con poros, permitiendo la formación de pequeñas gotas al momento del contacto con la fase acuosa que se encuentra circulando dentro del módulo de la membrana, misma que captura las gotitas formadas en los poros. Las nanopartículas son formadas por enfriamiento de la solución a temperatura ambiente, la influencia de los parámetros en el proceso (fase acuosa, temperatura de la fase oleosa, velocidad de flujo de la fase acuosa, presión del material y tamaño de poro) sobre el tamaño de las nanopartículas debe ser optimizada [145].

### 6.6 "Salting out"

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

### 6.7 Difusión de solvente en medio acuoso

En esta técnica el sustrato y el fármaco se disuelven en disolventes orgánicos (50 °C) miscibles con la fase acuosa, típicamente acetona aunque también puede emplearse

etanol o metanol. Este método permite la obtención de nanopartículas sin necesidad de formar previamente una emulsión. En este caso la precipitación del polímero es inducida directamente en un medio acuoso (conteniendo o no un surfactante) por la adición de la fase acuosa a la solución del polímero con agitación mecánica (a temperatura ambiente, 5 minutos). La aplicación de este método se limita a fármacos que son muy solubles en disolventes polares, pero ligeramente solubles en agua para evitar pérdida de fármaco durante la difusión del solvente. El pH de la fase acuosa se ajusta adicionando HCl 0.1 M (para ajustar el potencial zeta y coacervar las nanopartículas). Por último el sistema se centrifuga y se resuspende con agua destilada [146].

### **7. APLICACIONES DE SISTEMAS NANOACARREADORES PARA VÍA TÓPICA/ TRANSDERMICA**

Los nanoacarreadores fueron estudiados primeramente como sistemas de liberación de fármacos para vía parenteral y oral. Sin embargo, la aplicación en la piel de estos sistemas, y especialmente de liposomas, nanopartículas poliméricas y lipídicas, es importante cuando se consideran los efectos de superficie (formación de película y efectos oclusivos), los efectos locales en la piel (liberación de fármacos en la epidermis y la dermis) y los efectos sistémicos (permeación profunda de fármacos y administración transdérmica). Estas estructuras tienen que superar la barrera del estrato córneo con el fin de liberar el fármaco en las diferentes capas de la piel. Recientes avances en el estudio de los mecanismos de penetración muestran que la ruta a través de apéndices de la piel (la vía folicular) parece contribuir mucho más de lo que se pensaba anteriormente. Aplicaciones sobre la penetración en la piel de nano-y micropartículas han recibido especial atención, particularmente para las nanopartículas, que penetran en los folículos pilosos de manera muy eficiente llegando al sistema inmune, con el fin de desarrollar nuevas estrategias de vacunación, y nuevas estrategias para combatir enfermedades en la piel [9, 49]. Entre los nanoacarreadores para la administración tópica y transdérmica se encuentran las nanopartículas lipídicas sólidas (SLN) y acarreadores lipídicos nanoestructurados (NLC) [147]. Algunos fármacos como la triptolida, el acetato acetónido de triamcinolona y la ciclosporina A, se han utilizado para ser atrapados en SLN [148-150]. Estos sistemas se pueden mezclar en una formulación tópica disponible y establecida, por ejemplo, una crema cosmética de día. Esta mezcla, aumenta la oclusividad mientras que mantiene el carácter de la crema de día y evita el brillo de casi todas las cremas de noche oclusivas [147]. Las nanopartículas lipídicas son otra opción para entrapar los fármacos artemetro, nitrato de econazol [151, 152] y celecoxib [153]. Una comparación entre los NLC y una emulsión preparados con el mismo contenido de lípidos e incorporando la coenzima Q 10, mostró una mayor permeabilidad de la molécula y un efecto oclusivo más alto para los sistemas NLC. Diferentes estudios muestran que estos sistemas fueron capaces de mejorar la estabilidad química de compuestos sensibles a la luz, a la oxidación y a la hidrólisis. La estabilidad química fue mejorada para activos cosméticos como la coenzima Q10, palmitato ascórbico, tocoferol (vitamina E) y retinol (vitamina A) [154, 158]. Además, tres derivados de vitaminas, incluyendo la vitamina C (tetraispalmitato ascorbico), vitamina E (acetato de tocoferol) y vitamina A (palmitato de retinol) fueron entrapados en nanoesferas de PLGA, para tratamiento del desmanchamiento de la piel y el antienvjecimiento (la

vitamina C suprime las manchas por limitar la actividad de la tirosinasa, que promueve la producción de melanina, además, aumenta la formación de colágeno para reducir las arrugas, y previene la oxidación celular mediante la eliminación de oxígeno activo). La vitamina E y A actúan como antioxidante y promotora de colágeno, respectivamente. Estas moléculas fueron capaces de llegar a las zonas de destino en una forma estable, de mantener el efecto farmacológico durante un tiempo prolongado y ser eficaces para reducir las arrugas y producir un efecto de blanqueamiento en la piel [159]. En cierto sentido, la idea del diseño de nanopartículas para la liberación de fármacos en aplicaciones cosméticas es importante.

Como se describió antes, los folículos son invaginaciones profundas dentro de la piel, la vascularización es más densa, y hay varios sitios de interés a lo largo de la estructura del folículo desde ambos puntos de vista, el cosmético y farmacéutico [160]. Un ejemplo de ello, es el estudio de un bloque nanoestructurado de copolímero de poli ( $\epsilon$ -caprolactona)-polietilenglicol incorporando minoxidil (antihipertensivo que amplía los vasos sanguíneos y abre los canales de potasio permitiendo más oxígeno, sangre y nutrientes al folículo) para tratar el trastorno de la alopecia areata. Este trastorno de la piel está relacionado con la parte distal del sistema inmune del folículo piloso humano, especialmente con las células T intraepiteliales [161, 162]. La penetración de nanopartículas en el folículo piloso puede aprovechar la extensa red capilar y la permeabilidad de su epitelio para llegar a las células inmunes alrededor del epitelio infundíbulo. Esta aplicación también podría ser una opción para la vacunación tópica. Las glándulas sebáceas asociadas a los folículos pilosos son otro sitio potencial para la liberación de fármacos contra el acné, la alopecia androgenética y otras disfunciones de las glándulas sebáceas. Diferentes formulaciones de nanopartículas han sido preparadas con el fin de tratar el acné vulgaris, la cual es una enfermedad inflamatoria de las unidades pilosebáceas, más densamente concentradas en la cara y el torso [85]. Las formulaciones comúnmente incluyen antimicrobianos tópicos, solos o en combinación con otros fármacos [6, 87]. El uso de quitosán y ciclodextrinas ha permitido mejorar el entrapamiento del fármaco triclosán mediante la formación de complejos de inclusión con ciclodextrinas moleculares en medios acuosos [114]. Otro medicamento usado para tratar este trastorno es la tretinoína (ácido retinoico *trans*), que es la forma activa del producto metabólico de la vitamina A. Estudios con nanocápsulas han mejorado la fotoestabilidad de este fármaco independientemente del tipo de fase oleosa utilizada (cáprico/caprílico triglicéridos y aceite de semilla de girasol), representando un sistema potencial para ser incorporado en formas de dosificación tópica o sistémica [163].

Actualmente, algunas formulaciones de nanopartículas han sido estudiadas en combinación con promotores de absorción físicos y químicos para modificar el estado físico del estrato córneo e incrementar el grado de penetración transdérmica de los fármacos. Otras moléculas, incluyendo el ADN también han sido formuladas en nanopartículas de polisacáridos tales como quitosán/ ácido poly-  $\gamma$ -glutámico y en nanopartículas poliméricas de núcleos a base de PLGA con cubiertas de quitosán-glicol cargadas positivamente. Nanopartículas a base de propil-almidón han sido útiles para encapsular ácido flufenámico, testosterona y cafeína [164, 165]. La insulina, la clorhexidina



(para infecciones cutáneas), el fosfato de dexametasona y el fármaco 5-fluorouracilo también se han incluido en nanopartículas biodegradables de quitosan y PLGA [166-168].

Enfermedades inflamatorias en la piel como la psoriasis, dermatitis atópica y el eczema constituyen un problema de salud importante en todo el mundo. Estos trastornos son influenciados por el estrés oxidativo y la inflamación ha sido recientemente relacionada con la mediación de los linfocitos T, especialmente en la dermatitis de contacto [169]. En este sentido, formulaciones nanoparticuladas lipídicas incluyendo fármacos como glucocorticoides, retinoides, antiinflamatorios no esteroideos, inhibidores de COX-2 y antimicóticos se han investigado para mejorar los tratamientos de diversos trastornos en la piel, demostrando que es posible mejorar la absorción percutánea con estos sistemas. Estos acarreadores pueden permitir la penetración de los fármacos en sitios específicos de la piel o en sus subestructuras. La aplicación tópica, puede incluso disminuir los efectos secundarios gastrointestinales que los fármacos antiinflamatorios no esteroideos producen en la terapia antirreumática [170].

La dermatitis perioral se presenta con pápulas rojas que forman placas superficiales alrededor de la zona perioral, en los pliegues nasolabiales y/o el inferior de los párpados [171]. Los corticosteroides y el prednicarboato son los fármacos de primera línea para estos desordenes. Este último ha sido atrapado en nanopartículas lipídicas para tratar de evitar los efectos no deseados antiproliferativos. Los resultados mostraron una retención incrementada del prednicarboato por la piel humana *in vitro*, y que éste fue vectorizado a la epidermis, aplicando una dispersión de SLN o una crema conteniendo SLN ambos cargados de prednicarboato. La relevancia de la vectorización en la epidermis es para disminuir el proceso inflamatorio que es más pronunciado en esta zona, evitando una liberación en la dermis y una consecuente inducción en la atrofia irreversible de la piel [170].

La tretinoína, un metabolito de la vitamina A, se utiliza para el tratamiento tópico de enfermedades proliferativas e inflamatorias en la piel tales como la psoriasis, el acné, fotoenvejecimiento, linfomas epidermotrópicos de células T y cáncer epitelial en piel. Este fármaco ha sido incorporado en SLN para tratar de evitar problemas asociados a la aplicación tópica del fármaco, tales como irritación, eritema, descamación y sensación quemante, estas reacciones son aumentadas con la luz solar [172]. Estudios de penetración *in vitro* a través de piel de rata de un gel de tretinoína con SLN mostraron un perfil de permeación comparable al de la crema de tretinoína comercializada produciendo un menor grado de eritemas en comparación con la crema actualmente comercializada.

Los liposomas fueron una de las primeras estrategias para la administración transdérmica y se están utilizando con éxito en el tratamiento de cáncer [173]. Sin embargo, a la fecha, muchos acarreadores de este tipo, son estructuralmente inestables, específicamente cuando pasan a través de la piel, en donde se adhieren a las paredes interiores de las células de la piel causando el colapso de los cuerpos de asociación de fosfolípidos en el sistema y consecuentemente la liberación de sus ingredientes encapsulados. Así, el transporte de ingredientes activos a través de la piel en capas profundas no es una buena opción. Los transfersomas o liposomas transformables por su parte, son capaces de deformarse cuando se les aplica una presión en su aplicación mejorando su penetrabilidad [174-176].

En algunas investigaciones, los dendrímeros se utilizan para la administración transdérmica de fármacos. Algunos resultados prometedores se mostraron con fármacos, tales como la tamsulosina [177], la indometacina [178], el ketoprofeno, el diflunisal [179] y el 5-fluorouracilo [180]. Resultados interesantes con este último fármaco modelo hidrofílico utilizado para tratar enfermedades de la piel, han sido reportados utilizando muchas estrategias para aumentar la permeación de la piel (profármacos, terpenos, ácidos grasos, iontoforesis, sonoforesis, la ablación por láser y dendrímeros), mostrando un mejoramiento de la penetración de la piel, mediante la alteración de su estructura [170, 181, 182].

Actualmente, la liberación transdérmica de nanoemulsiones no es muy utilizada como con las nanopartículas o liposomas, debido a los problemas de estabilidad inherentes a esta forma de dosificación. Sin embargo, gamma tocoferol, cafeína, plásmido de ADN, aspirina, salicilato de metilo, insulina y nimesulida han sido incluidos en nanoemulsiones. El uso de estos nanovehículos se ha usado para liberar analgésicos, corticosteroides, agentes contra el cáncer, etc., aptos para actuar de inmediato y más rápido, ya que no necesitan cruzar las barreras adicionales y el fármaco es biodisponible fácilmente [183-188].

### **7.1 Ventajas y desventajas de nanoacarreadores para vía tópica/transdérmica**

En general, las principales ventajas de las micropartículas y las nanopartículas sobre las formulaciones convencionales, tales como cremas, soluciones, ungüentos, lociones, geles, espumas, es que las segundas tienen limitaciones importantes, tales como tener una penetración pobre en la piel y proveer una liberación no controlada de los fármacos. Diferentes sistemas acarreadores han sido propuestos para favorecer el transporte de fármacos a través de la piel, permitiendo la retención del fármaco y, en algunos casos, una liberación controlada. La penetración en la piel es esencial para un número de aplicaciones, por ejemplo, la administración de fármacos en tratamientos dermatológicos para combatir la contaminación por microorganismos y productos químicos, en tratamientos transdérmicos para liberación sistémica, y vía tópica para el cuidado de la piel y la protección de la piel [7, 114, 189, 190].

Con respecto a la tolerabilidad y seguridad de los productos convencionales es controversial debido a que pueden generar, irritación, sequedad, eritema, picor, escozor y ardor ya que la liberación de los fármacos en la piel a veces es rápida y las concentraciones plasmáticas o tópicas, pueden ocasionar efectos tóxicos. En contraparte, en las nanopartículas, una menor cantidad de fármaco es necesaria debida a la liberación del mismo en un sitio específico [103]. Ventajas adicionales de la administración tópica /transdérmica con respecto a las otras rutas de administración pueden ser citadas: un menor número de efectos secundarios, mayor comodidad del paciente, además de evitar el efecto del primer paso hepático.

La nanoencapsulación de fármacos (nano-medicinas) se ha descrito para aumentar la eficacia, la especificidad, la tolerabilidad y el índice terapéutico de los fármacos y para proveer una liberación controlada y dirigida, superior a la de los medicamentos tradicionales (Cuadro 5) [11, 12]. Las posibilidades de vectorización de estos sistemas están influenciadas por su tamaño de partícula, carga superficial, modificación de su superficie, y su hidrofobicidad. De éstos, la distribución del tamaño de las nanopartículas es un factor importante en la interacción con las membranas celulares y su penetración, siendo dependiente sobre el tejido, el sitio de destino y su circulación [130]. Ejemplo de ello son los acarreadores lipídicos nanoestructurados (NLC), que por su estructura (nanopartículas lipídicas con matriz sólida) aumentan su capacidad para entrapar fármacos, su estabilidad física y química a largo plazo, su liberación activada y son potencialmente formulaciones tópicas sobresaturadas en relación con las nanopartículas lipídicas sólidas (SLN). Otras ventajas de dichos sistemas incluyen una mayor estabilización de los compuestos incorporados, una liberación controlada, una mayor oclusividad por la formación de una película sobre la piel.

Las nanopartículas lipídicas se han observado como una buena opción para la administración transdérmica debido a que se pueden preparar de diferentes tamaños y es posible modificar la polaridad de su superficie con el fin de mejorar la penetración en la piel, pudiendo llegar a las regiones más profundas debido a que presentan flexión mecánica [191-193]. Adicionalmente, los nanoacarreadores transdérmicos son capaces de alcanzar órganos específicos por ocultar grupos funcionales o por protegerlos con otras moléculas, ya que se pueden unir a los anticuerpos, antígenos, vitaminas y otras moléculas más específicas. Las nanopartículas pueden viajar sin ser detectadas por el sistema inmune dependiendo su tamaño, del antígeno añadido, así como su composición. Consecuentemente, las nanopartículas pueden incluso viajar de la piel a los ganglios linfáticos representando una herramienta prometedora para la inmunomodulación [194].

Una de las primeras estrategias para la administración transdérmica fueron los liposomas como se mencionó anteriormente [173, 195, 196]. Sin embargo, algunos factores afectan el grado de penetración transdérmica de los fármacos, tales como la lamellaridad, la composición de los lípidos, la carga en la superficie del liposoma, el modo de aplicación y las concentraciones totales de los lípidos. Por esa razón, las vesículas flexibles llamadas transfersomas o liposomas transformables se han comparado con las vesículas rígidas en cuanto a la penetración en la piel [174, 175]. Los lípidos presentes en la bicapa de liposomas pueden interactuar con los lípidos presentes en el estrato córneo cambiando la estructura superior de la piel. Este cambio es beneficioso para la penetración de fármacos lipófilos en el estrato córneo. Algunos liposomas pueden tener una estructura deformable y pasar a través del estrato córneo cuando una presión es aplicada o se pueden acumular en las regiones del mismo, dependiendo de su composición [176, 199].

Con respecto a los dendrímeros, su multivalencia es de ayuda para controlar los grupos funcionales en su superficie particularmente con péptidos para obtener dendrímeros menos tóxicos, mejorando su biodegradación.

**Cuadro 5. Ventajas y desventajas de sistemas nanoacarreadores**

Nanoacarreador	Ventajas	Desventajas
<b>Nanopartículas</b>	<p>Pueden prepararse de muchos materiales biodegradables.</p> <p>Existen muchos métodos para prepararlas.</p> <p>Pueden adjuntarse anticuerpos a su superficie para llegar a un sitio específico.</p> <p>Pueden entramparse fármacos hidrofílicos como lipofílicos</p>	<p>No se han hecho suficientes pruebas toxicológicas.</p> <p>Es difícil desarrollar métodos analíticos para la liberación de fármacos.</p> <p>Algunos procesos de preparación son difíciles de escalar.</p> <p>Algunas veces su tamaño no es suficiente ára evitar el sistema inmune.</p>
<b>Nanoemulsiones</b>	<p>Pueden ser formulados como espumas, líquidos, cremas y sprays.</p> <p>Son no tóxicos y no irritantes.</p> <p>Son fácilmente aplicables a la piel y a las membranas mucosales.</p>	<p>Son susceptibles al fenómeno de Ostwald</p> <p>Su carga superficial tiene un marcado efecto sobre la estabilidad.</p> <p>Presenta cinética variables de los procesos de distribución y eliminación.</p>
<b>Liposomas</b>	<p>Liberación controlada basada en los lípidos naturales.</p> <p>Alta biocompatibilidad.</p> <p>Fabricación simple.</p> <p>Acarreadores de proteínas con buena estabilidad.</p> <p>Altas porcentajes de encapsulación en fármacos</p>	<p>Disminución de la estabilidad de las moléculas de alto peso molecular al utilizar una homogenización a alta presión.</p> <p>La cristalización de lípidos produce una gran cantidad de polimorfos.</p> <p>Presenta cinéticas variables en los procesos de distribución.</p> <p>Son susceptibles a inestabilidad física.</p>
<b>Dendrímeros</b>	<p>Aumentan la estabilidad de los agentes terapéuticos.</p> <p>Se preparan fácilmente y pueden ser funcionalizados.</p> <p>Incrementan la biodisponibilidad de los fármacos.</p> <p>Se asocian covalentemente a los fármacos.</p> <p>Pueden actuar como potenciadores de la solubilidad, incrementando la permeación de fármacos lipófilos.</p>	<p>Han mostrado toxicidad celular.</p> <p>Su eliminación y metabolismo peden ser un problema dependiendo de la generación y de los materiales usados.</p> <p>Los costos de síntesis son más altos que para otros nanoacarreadores.</p> <p>Se han encontrado efectos hemolíticos.</p> <p>No son buenos vehículos para fármacos hidrófilos.</p>
<b>Niosomas, transfersomas, y etosomas</b>	<p>Biodegradables y de baja toxicidad.</p> <p>Fácil de preparar.</p> <p>Presentan textura suave y maleable.</p> <p>Se pueden encapsular fármacos hidrófilos y lipófilos.</p> <p>Son aptos para vectorizar los fármacos.</p> <p>Son extremadamente flexibles de su membrana.</p>	<p>Predisposición a la degradación oxidativa.</p> <p>Pureza de fosfolípidos naturales debe ser comprobada.</p> <p>Las formulaciones son costosas.</p>

Entre las principales desventajas de los nanoacarreadores son aquellas relacionadas a su seguridad y eficacia. Pruebas y regulaciones importantes deben llevarse a cabo para garantizar una adecuada caracterización y evaluación analítica, toxicológica y farmacológica para determinar su eficacia en terapias debido a su pequeño tamaño, su alta energía superficial, su composición, su arquitectura, sus moléculas adsorbidas, etc. Futuras investigaciones en toxicología son necesarias para dilucidar las interacciones entre los nanoacarreadores y otras moléculas, así como las interacciones con las entidades biológicas. Un aspecto importante que se tiene que considerar es que los materiales se comportan de manera muy diferente cuando se reducen a escala nanométrica. Adicional a lo anterior las leyes tradicionales no funcionan a "meso-escala" de la misma manera como funcionan en la escala macro. En la escala macro, las propiedades a granel en un material predominan sobre las propiedades de superficie contrariamente a la escala micro. En la meso-escala, ambos tipos de propiedades desempeñan un papel importante [200, 201]. Por otra parte, los efectos de las nanoestructuras metabolizadas en el sistema biológico son difíciles de predecir. Organismos reguladores de nanoestructuras están tomando medidas para evaluar estos nuevos productos. Adicionalmente, la fabricación de estas estructuras a escala industrial es aún difícil en la mayoría de los casos.

### 8. TÉCNICAS MÁS UTILIZADAS PARA ELUCIDAR LAS VÍAS DE PENETRACIÓN DE FÁRMACOS A TRAVÉS DE LA PIEL

Diversas técnicas para elucidar las vías de penetración de fármacos dentro/a través de la barrera cutánea se han propuesto. En experimentaciones *in vitro* (ayudan a predecir la liberación y penetración de una molécula), una variedad de celdas de difusión de dos compartimientos separados por una membrana biológica o sintética, pueden utilizarse para este fin, simulando las condiciones reales de aplicación. Actualmente, los estudios de liberación tópica/transdérmica *in vitro* se realizan en celdas de difusión vertical tipo Franz en donde en el compartimiento donador se coloca la formulación conteniendo el principio activo (controlando la temperatura y evitando la evaporación de sustancias volátiles) y en el compartimiento receptor se coloca el solvente que recibirá al penetrante o soluto (condiciones sink, con temperatura y agitación controladas). Esta técnica ha sido una de las más utilizadas para cuantificar fármacos en la piel *in vitro* tanto para moléculas hidrofílicas como lipofílicas incluidas en formulaciones farmacéuticas convencionales o en nanopartículas [202, 203].

Otros métodos comúnmente utilizados para la cuantificación de fármacos localizados dentro de la piel o en varias capas de la piel, son las técnicas del *tape stripping* y de biopsias en la superficie de la piel en cianoacrilato, las cuales se han utilizado para remover parte de la capa córnea conteniendo las sustancias aplicadas tópicamente *in vivo* [204]. Un método relativamente nuevo es el *stripping diferencial* que se puede utilizar para estudiar la penetración de las sustancias aplicadas por vía tópica en el infundíbulo folicular de forma no invasiva y selectiva. Con esta técnica se puede determinar la cantidad de sustancia que penetró en el folículo. El método combina la técnica del *tape-stripping* (removiendo el estrato córneo capa por capa), seguida por la obtención de biopsias superficiales de la piel con cianoacrilato (removiendo el contenido del infundíbulo

folicular, el molde folicular consistiendo de una mezcla de material queratinizado, células dentríticas, lípidos y bacteria) [51, 205]. De lo anterior, se debe señalar la importancia de la penetración folicular, que se ha convertido en un importante foco de interés debido a que los fármacos (especialmente los cargados en micropartículas y nanopartículas) pueden ser liberados en el folículo piloso para el tratamiento tópico de enfermedades en la piel [37, 43-45, 48, 69]. Así mismo, con esta técnica (*stripping diferencial*) se ha podido determinar la influencia del tamaño de micropartículas para actuar como acarreadores eficientes de fármacos o como bloqueadores de los mismos en el folículo [46].

El uso de la microscopía óptica para examinar los sistemas biológicos al nivel celular ha ayudado al desarrollo de varios tipos de microscopios. Entre ellos, el microscopio confocal, que usa un filtro espacial enfrente del fotodetector, tiene una resolución axial incrementada que permite la visualización seccionada de tejidos de espesor grueso y células, así como su subsecuente reconstrucción tridimensional computarizada. Este microscopio se ha usado en muchas investigaciones para estudiar el transporte de los fármacos a través de la piel. En una de éstas, se visualizó en línea el proceso de difusión de un fluoróforo modelo a través del folículo piloso a diferentes profundidades en piel humana procedente del cuero cabelludo. Un rápido aumento de la fluorescencia fue observado hasta una profundidad de 500  $\mu\text{m}$ , además de una acumulación del colorante en la cutícula del cabello. La penetración del fluoróforo alcanzó profundidades superiores a los 2000  $\mu\text{m}$ , cuando se observó a través del estrato córneo y la epidermis [43]. Otros estudios realizados en piel porcina por microscopía confocal han revelado que las nanopartículas se acumularon preferentemente en los folículos pilosos de una manera tiempo y tamaño-dependiente [48].

Una técnica alternativa utilizada para estudiar imágenes de muestras biológicas es la microscopía multifotón (MPM). Éste es un término colectivo usado para varias técnicas de microscopía que incluyen excitación no lineal de una muestra usando dos o más fotones. Las modalidades normalmente usadas son la excitación de dos fotones, la excitación de tres fotones, generación armónica secundaria (SHG), y la generación armónica terciaria (THG). En particular, la microscopía de excitación de dos-fotones se ha usado ampliamente para examinar especímenes biológicos tratados con nanopartículas. La visualización por esta técnica de células y tejidos con espesor considerable, es obtenida con un láser del alto poder en el infrarrojo cercano para enfocar la luz en una mancha de difracción-limitada en la que ocurre la excitación de dos-fotones de los cromóforos. La dependencia cuadrática de la probabilidad de excitación produce secciones ópticas sin el uso de un filtro espacial [206-211]. La luz del infrarrojo cercano usada en el microscopio de dos-fotones puede penetrar más profundamente en los tejidos altamente compactos tales como la piel humana que los microscopios confocales operados con excitación ultravioleta. Además, la eficiencia de colección de luz de dos-fotones es más alta que la obtenida con el microscopio confocal examinando un punto estándar, debido a que la microscopía de excitación de dos-fotones no usa ningún “*pinhole*” ni examinador óptico. Las secciones ópticas se originan en el proceso de absorción no lineal. Por consiguiente un detector de área grande puede usarse para aumentar al máximo la eficiencia de colección de los fotones fluorescentes los cuales pueden ser examinados cuando ellos viajan a través de la muestra turbia. En lo que se refiere al daño del tejido, la radiación del infrarrojo cercano usado en la excitación de dos-fotones es menos fototóxica que la radiación ultravioleta. La localización del volumen de

excitación de dos-fotones del plano focal minimiza mucho más el volumen en que puede ocurrir daño al tejido [209]. Hoy en día, esta técnica proporciona información estructural tanto celular como extracelular con resolución subcelular, útil para diagnósticos dermatológicos clínicos, ambos *ex vivo* e *in vivo*. Conjuntamente, este microscopio puede ser utilizado para caracterizar estructuras del estrato córneo, visualizar y cuantificar la liberación transcutánea de fármacos, detectar cánceres en la piel (características morfológicas observadas en imágenes de microscopía multifotón de tumores en la piel son comparables a esas de histopatología tradicional), examinar las transiciones estructurales de colágeno y monitorear las interacciones láser-piel [212, 213].

### HIPÓTESIS

Estudios recientes estudios han mostrado que los folículos pilosos representan una vía importante para la penetración de fármacos, en particular de nanopartículas, acumulándose preferentemente en los folículos pilosos y generando un reservorio para la liberación de sustancias activas [47-51].

En estudios previos de permeación *in vitro* [202, 214], se determinó que el triclosán formulado en nanopartículas poliméricas penetra en la piel sin llegar al compartimento receptor favoreciendo la retención del activo en la piel y consecuentemente ofreciendo un aceptable efecto local. De este modo, en el presente trabajo, nanopartículas a base de Eudragit E<sup>®</sup> 100 se desarrollaron para estudiar el transporte del triclosán a través de piel *in vitro* e *in vivo*. Con ello, se espera mejorar la penetración del fármaco a través de la piel, incrementando la eficacia y disminuyendo la necesidad de usar una combinación de productos, con la finalidad de proponer una formulación tópica de liberación controlada y/o prolongada factible de retenerse en el sitio blanco (vectorización), para el tratamiento del acné.

De esta forma, la hipótesis planteada considera que sí las nanopartículas poliméricas cargadas con triclosán penetran en los folículos pilosos de la piel y se retienen en éstos, se logrará obtener un sistema vectorizado de liberación prolongada y/o controlada en el sitio blanco (*drug targeting*), factible de combatir con mayor eficacia a la bacteria *Propionibacterium acnes*, responsable de las lesiones inflamatorias del acné.



### OBJETIVOS

#### 1. OBJETIVO GENERAL

- Estudiar el transporte del triclosán a través de piel *in vitro/in vivo* formulado en una suspensión de nanopartículas con la finalidad de proponer una formulación tópica de liberación controlada y/o prolongada factible de retenerse en el sitio blanco para el tratamiento del acné.

#### 2. OBJETIVOS PARTICULARES

- Preparar nanopartículas mediante una variante del método de emulsificación–evaporación, empleando como polímero Eudragit® E 100 y como activo triclosán.
- Optimizar y validar el método para la cuantificación de triclosán en contacto con piel mediante la técnica de cromatografía en capa fina de alta resolución (HPTLC).
- Optimizar un método para estudiar la cinética de liberación de triclosán a partir de nanopartículas poliméricas que simule las condiciones *in vivo* y validar el método para la cuantificación de triclosán mediante la técnica de HPTLC.
- Evaluar y comparar la eficacia del triclosán incluido en una solución acuosa, en las nanopartículas poliméricas y en una emulsión comercial, contra la bacteria *Propionibacterium acnes*.
- Realizar estudios de permeación *in vivo* con la dispersión de nanopartículas y con la emulsión comercial, con la finalidad de evaluar y comparar su capacidad de penetración en la piel.
- Preparar nanopartículas cargadas con rojo de nilo mediante el mismo proceso utilizado para entrapar triclosán, empleando como polímero Eudragit® E 100 y alcohol polivinílico como estabilizante.
- Evaluar y comparar la distribución y capacidad de penetración en la piel del rojo de nilo contenido en una solución, en una emulsión y en una dispersión de nanopartículas, mediante las técnicas de microscopía confocal y microscopía de excitación de dos fotones.

## PARTE EXPERIMENTAL

### 1. MATERIAL Y REACTIVOS

- Triclosán (M.W. 289.5) Multiquim (Mexico D.F.),
- Polímero Eudragit<sup>®</sup> E100 grado USP (Helm, Mexico).
- Alcohol polivinílico, Mowiol<sup>®</sup> 4-88 (Glomarza, México).
- Etanol (grado analítico Fermont, Productos Químicos Monterrey, México)
- Metanol (grado analítico Fermont, Productos Químicos Monterrey, México)
- Metil etil cetona (grado analítico Fermont, Productos Químicos Monterrey, México)
- Fosfato monobásico de potasio (Fermont, Productos Químicos Monterrey, S.A. México)
- Hidróxido de sodio en hojuelas grado reactivo (J. T. Baker, México)
- Ácido clorhídrico (grado reactivo, J.T. Baker, México)
- Monolaureato de Polietilenglicol (Sigma-Aldrich, Inc. St. Louis, Estados Unidos de América)
- Nitrógeno líquido (Ginebra, Suiza)
- Hielo seco (Ginebra, Suiza)
- 2-metilbutano (isopentano, Fisher 03551-4, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, (Steinheim, Alemania))
- Infusión cerebro-corazón (BHI, Difco, Sparks, Estados Unidos de América).
- Rojo de nilo C20 H18N2O2 (N 059) TCI Europe N.V. Zwiwindrecht, Bélgica.
- Acetonitrilo (grado HPLC Fermont, Productos Químicos Monterrey, México)
- Agua (grado HPLC Fermont, Productos Químicos Monterrey, México)
- Agua Destilada (Milli-Q System, Millipore, Schwalbach, Alemania).

### 2. MUESTRAS BIOLÓGICAS

- *Propionibacterium acnes* NBRC 107605 fue obtenida del Centro de Investigación Biológica, National Institute of Technology and Evaluation (NITE, Chiba, Japón)
- Piel de oreja porcina fresca: La piel de la oreja fue recobrada extirpando el tejido graso y cortando con cuidado los pelos que la recubren.

- Piel humana:
  - La zona del antebrazo de 12 voluntarios dermatológicamente sanos fue utilizada para los estudios de permeación *in vivo*, sin la previa aplicación de algún producto farmacéutico/cosmético.
  - Secciones de piel abdominal fresca fueron extraídas de abdominoplastías (Clínica Vert-Pré, Ginebra, Suiza). La grasa subcutánea fue removida de la piel y esta última fue inmediatamente utilizada en los estudios de permeación *in vitro*.

### 3. APARATOS Y EQUIPOS

- Aplicador de Capa Fina de Alta Resolución, Automatic TLC Sampler III (Camag<sup>®</sup>, Suiza)
- Scanner 3 para Cromatografía de Capa fina (Camag<sup>®</sup>, Suiza)
- Cámaras cromatográficas de fondo plano (Camag<sup>®</sup>, Suiza)
- Placas de sílica gel C18, fase reversa (Macherey-Nagel, Alemania)
- Zetasizer (Malvern Systems<sup>®</sup> ZEN 3600, Estados Unidos de América)
- Filtros normales y estériles ( Millex<sup>®</sup> - GV de 2.5cm de diámetro y poro de 0.22µm, 0.1µm, y 0.45µm (Millipore<sup>®</sup>, Estados Unidos de América)
- Termómetro digital
- Balanza analítica (BBC 32, Boeco, Alemania)
- Parrilla eléctrica con agitación (Cimarec<sup>®</sup>, Thermoline, Estados Unidos de América)
- Agitador magnético Magnestir<sup>®</sup> (Lab-Line instruments, Estados Unidos de América)
- Agitador de velocidad variable (RZR-1; Caframo<sup>®</sup>, Alemania)
- Rotavapor (Laborota<sup>®</sup> 4000, Heidolph, Alemania)
- Ultracentrífuga Óptima<sup>®</sup> LE-80K (Beckman, Estados Unidos de América)
- Ultrasonicador Branson<sup>®</sup> (3200, Estados Unidos de América)
- Celdas de difusión tipo Franz (Ginebra, Suiza)
- Celdas de perfusión (Estado de México, México)
- Cintas adhesivas (Scotch 3M, Estados Unidos)
- Recirculador de líquidos con termostato (termostato VWR Scientific, Estados Unidos de América)
- Vortex (Mixer, modelo M 16715, Estados Unidos de América)
- pH metro (Modelo 430)
- Micrómetro electrónico digital (Digitrix II, Japón)
- Microscopio electrónico de barrido (JSM-25SII; JEOL, Japón)

- Láminas portaobjetos SuperFrost Ultra Plus® slides (Gerhard Menzel GmbH, Saarbrückener, Alemania)
- Láminas cubreobjetos (Gerhard Menzel GmbH, Saarbrückener, Alemania)
- Contenedor metálico térmico (Dewar)
- Lector de Microplacas (HiperVion Micro Read 4 Plus).
- Campana para recubrimiento con oro (JFC-1100; JEOL, Japón)
- Micrótopo (Thermo Scientific Microm HM 560 Cryostat-Series, Walldorf, Alemania)
- Microscopio laser de dos fotones Zeiss 710 NLO (690-1040 nm, Carl Zeiss, Alemania)
- Microscopio Confocal Zeiss LSM 700 (Carl Zeiss, Alemania).

#### 4. PRODUCTO COMERCIAL UTILIZADO EN EL ESTUDIO

**Crema Dermobras®** (Representaciones Méx-América)

Oxido de aluminio (25g), triclosán (1g), glicerina, microesferas de polietileno, agua desionizada, propilenglicol, estearat-20, extracto de bacopa monniera, laurilsulfato de sodio, miristato de isopropilo, sorbitol al 70%, cera, emulsificante, cera blanca de abeja y cloruro de benzalconio.

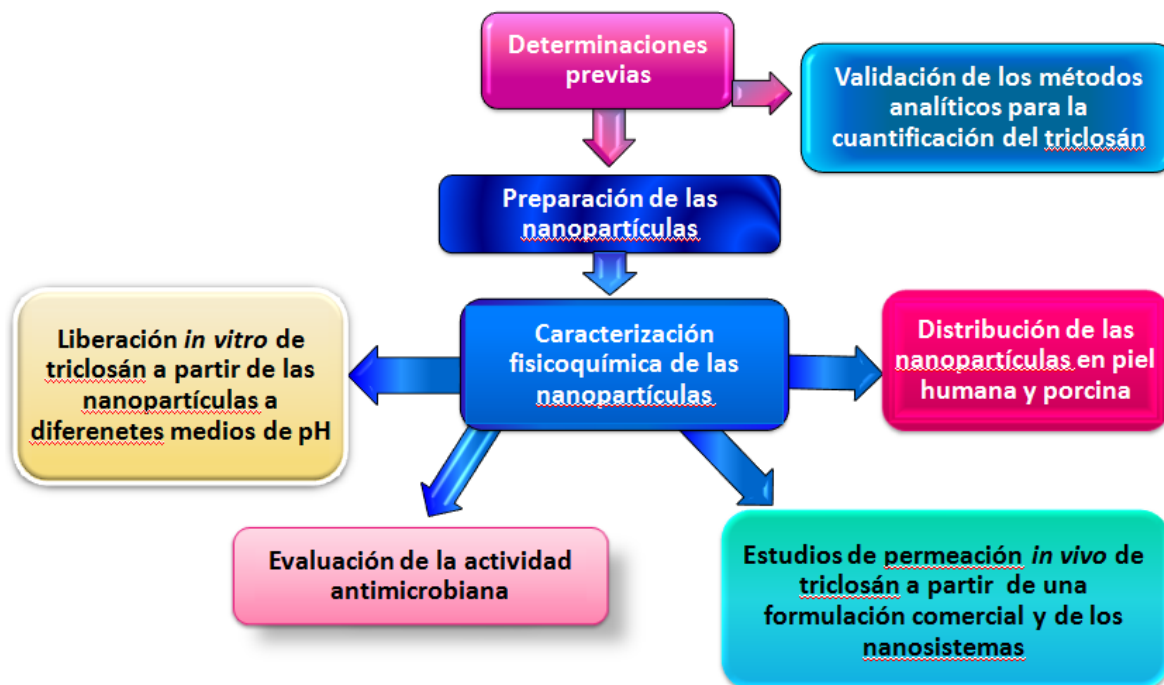


Figura 6. Diagrama general de la metodología seguida en este trabajo.

## 5. METODOLOGÍA

### 5.1 Determinaciones previas

- a) Determinación de las condiciones óptimas para los estudios de permeación. Selección de los materiales y las condiciones para la realización del *tape stripping* como el tipo de cinta a emplear, número de *strippings*, disolvente a utilizar para la extracción entre otras características.
- b) Selección de las condiciones para los estudios de liberación: Disolventes a emplear, tipo de celdas, tipo de membrana, número de muestreos, etc.
- c) Selección de las condiciones óptimas para los estudios de microscopía: espesor en las muestras de piel, tiempos de permeación.

### 5.2 Determinación de las condiciones óptimas y validación de los métodos analíticos para la cuantificación del triclosán mediante la técnica de HPTLC

- a) Determinación de las fases móviles y estacionarias para la cuantificación de triclosán en los estudios de permeación y de liberación.
- b) Selección de las condiciones apropiadas en el Automuestreador Automatic TLC Sampler III (Camag<sup>®</sup>, Suiza), como el ancho de banda y la velocidad de aplicación de las muestras, etc.
- c) Selección de las condiciones adecuadas en el densitómetro (Scanner 3 HPTLC, Camag<sup>®</sup>, Suiza):  $\lambda$  óptima de lectura, tamaño del slit, etc.
- d) Validación de los métodos para la cuantificación del activo determinando:
  - i. Selectividad
  - ii. Linealidad
  - iii. Precisión:
    - a. Repetibilidad
    - b. Precisión intermedia
  - iv. Exactitud
  - v. Límite detección
  - vi. Límite de cuantificación

### 5.3 Validación de los métodos analíticos para la cuantificación de triclosán

El método para la cuantificación de triclosán en medio metanol-miristato de isopropilo (90:10) utilizado en los estudios de liberación se validó de acuerdo a los parámetros establecidos por la Guía para la validación de procedimientos analíticos ICH Topic Q2 B de

la International Conference on Harmonisation (ICH) [215]. Por otro lado, el método analítico utilizado para la cuantificación de triclosán en muestras con piel humana, se validó de acuerdo a los parámetros y criterios establecidos por la guía para la validación de métodos bioanalíticos, propuesta por la Food and Drug Administration de Estados Unidos de América [216]. Ambos métodos se llevaron a cabo de la siguiente manera:

### 5.3.1 *Selectividad*

Para evaluar la selectividad en ambos métodos, se analizaron seis muestras de medios conformados de la siguiente manera:

- Metanol-miristato de isopropilo (90:10)
- Metanol-miristato de isopropilo (90:10) con cada componente de la formulación utilizada en los estudios de liberación (Eudragit E<sup>®</sup> 100, PVAL).
- Componentes anteriores adicionados de triclosán.
- Metanol con piel equivalente a la utilizada en las permeaciones (4 h de extracción, 25°C).
- Metanol con piel equivalente a la utilizada en las permeaciones (4 h de extracción, 25°C), con cada componente de la formulación y de las cintas utilizadas en los estudios de permeación (Eudragit E<sup>®</sup> 100, PVAL, adhesivo de las cintas)
- Componentes anteriores adicionados de triclosán.

Cada muestra fue examinada para asegurarse de una aceptable cuantificación de triclosán, libre de interferencias provocadas por el resto de los componentes contenidos en las formulaciones.

### 5.3.2 *Linealidad*

Para determinar la linealidad de los métodos, se prepararon por triplicado dos curvas de calibración de triclosán. Los medios empleados para preparar las curvas fueron en medio metanol-miristato de isopropilo (90:10, medio de disolución del triclosán en los estudios de liberación) y en metanol en contacto con piel equivalente a la utilizada en los estudios de permeación (medio con el que se extrajo el triclosán remanente en las muestras con piel). Con ambos medios, se prepararon soluciones de concentraciones conocidas de triclosán y a partir de éstas se aplicaron en las placas un mínimo de seis cantidades adecuadas. Los sistemas se leyeron por HPTLC bajo las condiciones óptimas previamente obtenidas. Se determinó la relación matemática entre la concentración y la respuesta obtenida, verificando que fuera continua y reproducible a lo largo del intervalo.

Para el método en medio metanol-miristato de isopropilo (90:10), la linealidad debe ser evaluada por métodos estadísticos apropiados en el rango de concentraciones mínimo

especificado. El rango fue considerado como se especifica para una prueba de disolución de liberación controlada ( $\pm 20\%$ ) [215].

Para el método de metanol con piel, el método se considera lineal si  $r^2$  es igual o mayor a 0.98 para la relación concentración–respuesta. Además el porcentaje de desviación absoluta para cada nivel de concentración debe ser menor o igual a 15%, excepto para el nivel de concentración más bajo (límite de cuantificación), pues para este nivel el porcentaje debe ser igual o menor a 20 %. La concentración recuperada se calculó tratando las respuestas analíticas de las curvas como desconocidas e introduciéndolas en la ecuación derivada del análisis de regresión lineal. El porcentaje de desviación absoluta fue calculado con la siguiente ecuación [216]:

$$\% \text{ Desviación absoluta} = \left| \frac{\text{Concentración nominal} - \text{Concentración recuperada}}{\text{Concentración nominal}} \right| \times 100 \quad \text{Ec. 1}$$

### 5.3.3 Precisión

#### 5.3.3.1 Repetibilidad (Intra-día)

Este parámetro se evaluó en un mismo día, a las mismas condiciones (analista, equipo y laboratorio). Para ello se aplicaron un mínimo de 3 réplicas de las muestras en metanol-miristato de isopropilo (90:10) y un mínimo de 5 réplicas de las muestras de metanol en contacto con piel equivalente a la utilizada en las permeaciones, a tres diferentes niveles de concentración de triclosán que fueron 60, 600 y 1400 ng para el primer sistema y 100, 500 y 2000 ng para el segundo sistema respectivamente.

#### 5.3.3.2 Precisión intermedia (Inter-día)

La precisión intermedia fue estudiada en dos días diferentes a las mismas condiciones de equipo y laboratorio. Se aplicaron muestras de triclosán por sextuplicado en el medio metanol-miristato de isopropilo (90:10), y por dodecaplicado en el medio metanol con piel humana, a tres diferentes niveles de concentración de triclosán que fueron 60, 600 y 1400 ng para el primer sistema y 100, 500 y 2000 ng para el segundo sistema respectivamente.

El método se considera repetible y reproducible si el coeficiente de variación para cada nivel de concentración no excede el 2 % para el primer sistema [215], considerado para un método cromatográfico; y que no exceda del 15 % para el segundo sistema, a excepción de la concentración considerada como el límite de cuantificación donde puede ser del 20 %, de acuerdo a la Guía para la Validación de Métodos Bioanalíticos (FDA) [216].

### 5.3.4 *Exactitud*

La exactitud se determinó con 6 réplicas a 3 niveles de concentración de triclosán en el medio metanol en contacto con piel humana, dichas aplicaciones fueron de 100, 500 y 2000 ng. El método se considera exacto, si el valor promedio en cada nivel de concentración está dentro del 15 % del valor nominal de concentración, excepto para el valor de límite de cuantificación, donde puede ser del 20 % [216].

### 5.3.5 *% de Recobro del triclosán extraído de la piel*

Para esta determinación se transfirieron a un vaso de 20 ml las muestras con la piel (equivalente a la utilizada en las extracciones). La determinación se llevó a cabo en 5 ml de metanol a 3 diferentes niveles de concentración de triclosán: 10, 20 y 30 mg (nivel bajo, nivel intermedio y nivel alto respectivamente) que fueron añadidas a las muestras con la piel. Subsiguientemente, dichas muestras se llevaron a sequedad, para después ser reconstituidas con 5 ml de metanol. Posteriormente los sistemas se mantuvieron en extracción continua durante 4 horas, pasado este tiempo fueron filtrados y diluidos para finalmente ser analizados mediante la técnica de HPTLC. Se calcularon los porcentajes de recobro para cada nivel de concentración. El porcentaje de recuperación del triclosán no debe ser necesariamente del 100 %, pero debe ser consistente y preciso ( $\% CV \leq 15\%$ ) en todo el rango de concentración [216].

### 5.3.6 *Límite de cuantificación*

Esta determinación se efectuó experimentalmente para ambos sistemas. Se analizó la concentración más baja del intervalo de trabajo por un mínimo de 3 réplicas para el sistema metanol-miristato de isopropilo (90:10) y por un mínimo de 6 réplicas para el sistema metanol en contacto con piel humana, y se verificó que se obtuviera una respuesta analítica por lo menos cinco veces mayor que la respuesta del blanco. Si el  $\% CV$  no es mayor del 2% para el sistema metanol-miristato de isopropilo (90:10) [215], y si el valor promedio cae dentro del 20 % del valor nominal y el  $\% CV$  no es mayor del 20 % para el sistema metanol en contacto con piel humana, se considera que esa concentración tiene validez como límite de cuantificación [216].

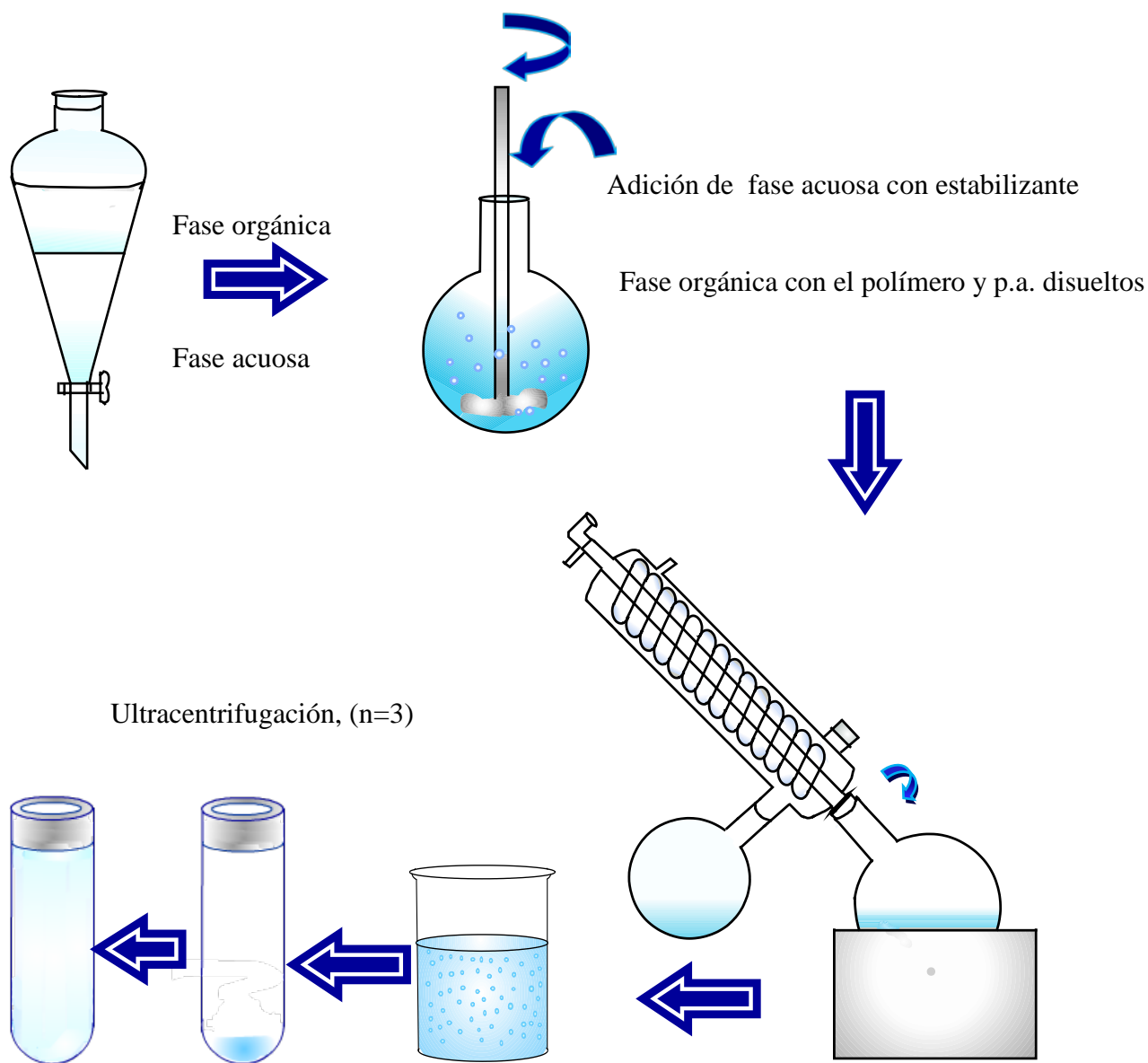
### 5.3.7 *Límite de detección*

Al igual que el límite de cuantificación, este parámetro se determinó experimentalmente. Para ello se aplicaron muestras diluidas de ambos sistemas adicionados de triclosán. Se determinó la concentración a la cual la señal de las muestras puede distinguirse de los niveles de ruido o de una muestra placebo. La respuesta debe ser tres veces la señal de ruido de fondo, esta concentración será el límite de detección [215, 126].



### 5.4 Preparación y caracterización de las nanopartículas

Las nanopartículas poliméricas se prepararon utilizando una variante del método de emulsificación- evaporación que ha sido reportada para obtener altos rendimientos (Figura 7). La preparación consistió en saturar mutuamente el disolvente orgánico (metil etil cetona) y agua destilada hasta asegurar el equilibrio termodinámico. Posteriormente, el polímero Eudragit E<sup>®</sup> 100 y el fármaco triclosán (31.03%) fueron disueltos en la fase orgánica saturada previamente con agua y este sistema fue emulsificado con la fase acuosa conteniendo alcohol polivinílico al 5%. La subsiguiente remoción del solvente orgánico a la emulsión indujo la agregación del polímero para obtener nanopartículas. Por último la dispersión fue purificada mediante ultracentrifugación ( $n = 3$ ).



**Figura 7. Representación esquemática de la preparación de nanopartículas a base de Eudragit E 100 y cargadas con triclosán.**

### 5.5 Caracterización fisicoquímica de las nanopartículas poliméricas

El tamaño promedio de partícula, índice de polidispersidad, distribución de la talla de partícula y análisis del potencial Z de las nanopartículas poliméricas se midió por la técnica de espectroscopía de correlación fotónica utilizando un Zetasizer Malvern Systems ZEN 3600. Para la medición del tamaño y su distribución, las dispersiones se diluyeron con agua destilada para asegurar que la señal de dispersión de la luz estaba dentro del rango de sensibilidad del instrumento. Dichas mediciones se realizaron a 25 ° C para todos los lotes ( $n = 3$ ). El potencial Z se determinó a la viscosidad y a la constante dieléctrica del agua, con una corriente eléctrica de 150 V, utilizando agua desionizada como medio de dispersión ( $n = 3$ ). La movilidad electroforética se convirtió en potencial zeta mediante la ecuación de Helmholtz-Smoluchowski ( $n = 3$ ) [217].

La tasa y eficiencia de encapsulación de las nanopartículas poliméricas se determinó pesando una cantidad conocida de las mismas previamente liofilizadas, para ser disueltas en etanol. La solución resultante fue filtrada y leída contra un placebo de nanopartículas en un espectrofotómetro UV-visible. Después de determinar la cantidad de triclosán presente en las nanopartículas, se calculó el porcentaje de fármaco contenido en las nanoesferas y la eficiencia de encapsulamiento.

La morfología de las nanopartículas poliméricas se observó por la técnica de microscopía electrónica de barrido (SEM). Una dispersión acuosa concentrada de nanopartículas se extendió sobre una placa y se secó a vacío. La muestra se recubrió con una capa de oro de espesor de 20 nm ~ (1200 V, 5 mAmp y 0.15 Torr durante 6 min). Las nanopartículas también se observaron por microscopía electrónica de transmisión (TEM). Las muestras se diluyeron con agua destilada como medio de dispersión y se colocaron en rejillas de cobre, con una tensión de 200 kV y con una resolución de 1,9 Å. (40 000 X).

### 5.6 Liberación de triclosán a partir de nanopartículas poliméricas

Los estudios de liberación del fármaco triclosán se llevaron a cabo de la siguiente manera. La dispersión de nanopartículas previamente purificada, se tamponó con una solución amortiguadora de ftalatos a pH 5.0, 5.7 y 6.0 (que simula el pH de la piel acnéica). La suspensión resultante se colocó en un vial con miristato de isopropilo (4 ml). Posteriormente, estos sistemas se incorporaron en un baño de agua (37 ° C), bajo agitación continua ( $n = 6$ ). Dichos experimentos se llevaron a cabo en condiciones sink, de acuerdo con la solubilidad del fármaco.

A intervalos predeterminados, se tomaron muestras de miristato de isopropilo contenido en los viales, las cuales fueron disueltas con metanol para su cuantificación. El volumen fue continuamente reemplazado con miristato de isopropilo. La cantidad de fármaco en las muestras se determinó por cromatografía en capa fina de alta resolución (HPTLC), siguiendo el procedimiento que se describe a continuación:

Las muestras de triclosán fueron colocadas sobre placas de aluminio recubiertas con sílica gel C18 (20 × 10 cm) en bandas de 6 mm, con un espacio de 10 mm entre las bandas utilizando un automuestreador automático TLC III. Posteriormente a la aplicación de las muestras, la elución ascendente de las cantidades aplicadas se llevó a cabo en una cámara de vidrio (20 × 10 cm) previamente saturada con la fase móvil. El análisis densitométrico se realizó en un TLC Scanner III en el modo de Refl-Abs y operado por el software winCATS (versión 1.2.0). La cuantificación fue realizada por análisis de regresión lineal de las áreas obtenidas de los picos.

### 5.7 Evaluación de la eficacia de las nanopartículas contra la bacteria *p. Acnés*

#### 5.7.1 Técnica de mtt (bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolio)

La actividad antimicrobiana contra *P. acnes* de una solución acuosa de triclosán, una dispersión de nanopartículas placebo, una dispersión de nanopartículas cargadas con triclosan y una emulsión (o/w) conteniendo triclosán (disponible en el mercado) fue determinada utilizando microplacas de 96 pozos. Se realizaron diluciones dobles en serie de cada muestra en los pozos que contenían caldo BHI y después cada pozo se inoculó con colonias frescas de *P. acnes*.

Las suspensiones bacterianas fueron ajustadas al estándar de McFarland No. 0.5 (suspensión celular de aproximadamente  $1.5 \times 10^6$  CFU/ml, estandarizado con una densidad óptica de 0.1 a 600 nm). También, se prepararon para el ensayo un blanco (conteniendo agua destilada estéril y medio de crecimiento), un control negativo (solución de concentración conocida de triclosán esterilizada por filtración usando una membrana de 0.22  $\mu\text{m}$ ) y un control celular (conteniendo las bacterias y el medio de crecimiento) usado como un control positivo. Después de incubar las microplacas con las muestras a 37 ° C durante 72-96 horas en condiciones anaerobias, se añadió el reactivo bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) en una concentración de 5 mg/ml y posteriormente se obtuvieron lecturas de densidad óptica a A560 nm con un lector de microplacas (Elisómetro). La concentración mínima inhibitoria (MIC) se determinó como la concentración en donde la inhibición del crecimiento comenzó a ocurrir. Todos los ensayos se repitieron al menos 3 veces para obtener reproducibilidad.

### 5.8 Estudios de permeación in vivo de la dispersión de nanopartículas

El protocolo experimental *in vivo*, la naturaleza y el propósito del estudio fueron explicados a los voluntarios de quienes se obtuvo el consentimiento informado por escrito. Los estudios de penetración *in vivo* se llevaron a cabo utilizando la técnica del *tape stripping*, en 12 voluntarios sanos, 23-30 años, quienes no recibieron medicación y no tenían historial de enfermedades en la piel. Durante el estudio, se requirió que los voluntarios se abstuvieran de aplicar cualquier producto para el cuidado de la piel en la parte interna del antebrazo, destinada a la experimentación. La piel fue limpiada suavemente con agua y secada usando una gasa. Para dicha técnica, 2 celdas de perfusión

(11.5 × 4.5 cm) fueron fijadas con una película oclusiva, en la parte interna de cada antebrazo de los voluntarios, estas celdas se llenaron ya sea con la dispersión de nanopartículas o con la emulsión, colocando el volumen necesario a fin de tener una cantidad equivalente de fármaco para ambas formulaciones. A cada sujeto se le aplicaron todas las formulaciones. Después de 1 h de contacto, el exceso de formulaciones se removió con una gasa de algodón, se lavó la piel con agua destilada y se secó suavemente con una gasa. Inmediatamente después, dieciséis cintas adhesivas (Scotch 3M, EE.UU.) fueron removidas de la piel de manera subsecuente y el triclosán se extrajo de las cintas con metanol (4 h, 25 ° C) bajo agitación constante. El contenido de triclosán se determinó por cromatografía en capa fina de alta resolución (HPTLC), asegurándose que su concentración estuviera comprendida en el rango de concentraciones de la curva de calibración) por el procedimiento descrito anteriormente en los estudios de liberación.

La profundidad de penetración del triclosán en la piel, se calculó considerando un área de muestreo constante y una densidad de 1 g/cm<sup>3</sup> para el estrato córneo removido. De esta forma, la masa del estrato córneo removido (determinado por el peso de las cintas antes y después del stripping), se convirtió en profundidad del estrato córneo (masa del estrato córneo = área × profundidad × densidad). El grado de penetración *in vivo* se comparó con los resultados *in vitro* previamente obtenidos [214].

### **5.9 Estudio de la distribución de nanopartículas en la piel mediante microscopía láser de dos fotones y confocal**

#### **5.9.1 Preparación de formulaciones conteniendo rojo de nilo**

Se preparó una dispersión de nanopartículas cargadas con rojo de nilo utilizando el mismo procedimiento para preparar las nanopartículas cargadas con triclosán anteriormente mencionado.

También se preparó una solución saturada con rojo de nilo utilizada como control para efectos de comparación en los estudios de permeación. Para esta solución se colocó un exceso del compuesto en cuestión en monolaurato de polietilenglicol añadiendo lentamente una solución amortiguadora de fosfatos pH 7.4 (25°C, 24 h). Las muestras se centrifugaron a 4000 rpm durante 10 min, y los sobrenadantes fueron subsecuentemente filtrados a través de una membrana de nylon (tamaño de poro de 0.22 µm).

Por último la emulsión (o/w) disponible en el mercado, se usó como una referencia. El mismo colorante fue mezclado en la emulsión.

#### **5.9.2 Estudios de permeación *in vitro***

Después de que el tejido subcutáneo fue extirpado de las secciones de piel humana y porcina, ésta fue colocada entre el compartimento donador y el receptor de las celdas de difusión tipo Franz (area=0.8 cm<sup>2</sup>) colocadas a su vez en un baño de agua termoregulado a

34 °C. En el compartimento donador se colocaron cada una de las formulaciones conteniendo rojo de nilo (suspensión de nanopartículas, emulsión (o / w) disponible en el mercado o una solución). Los estudios de penetración en la piel se mantuvieron durante 1, 8 y 24 h ( $n = 3$ ), utilizando un blanco para cada intervalo de tiempo en dichos estudios.

### 5.9.3 Estudios de microscopía confocal de dos fotones

Una vez terminado el período de aplicación en los estudios de permeación, la piel fue desmontada y se removió de la superficie el exceso de las formulaciones, se lavó tres veces con solución amortiguadora de fosfatos (pH 7.4) y se procedió a secarla suavemente con una compresa de algodón. Posteriormente, la piel sin procesamiento adicional sobre el tejido, se montó inmediatamente con el lado del estrato córneo hacia arriba sobre un portaobjetos de vidrio para analizarlas con un microscopio de dos fotones que fue usado para visualizar la distribución de rojo de nilo contenido en la zona folicular.

Las condiciones de lectura fueron optimizadas para la examinación de las muestras de piel. La configuración fue seleccionada para tener una alta detección sobre un amplio rango (690-1040 nm). El origen de la luz de excitación fue de un láser de titanio-zafiro (Ti:Sa). El láser fue escaneado de 690 a 810 nm con pulsos típicos. La luz láser (810 nm a un 40% de la potencia del láser) fue enfocada en la muestra por los lentes del objetivo W Plan-Apochromat 20X/1.0 DIC M27 75 mm, y la emisión de fluorescencia fue colectada por los mismos lentes del objetivo. Se utilizaron dos filtros por separado con rangos de 494-549 nm y 567-674 nm para analizar la autofluorescencia de la piel y la correspondiente al rojo de nilo, respectivamente. Se utilizó un *pinhole* de 599  $\mu\text{m}$ . Las imágenes resultantes fueron codificadas por colores, así la fluorescencia emanante de la autofluorescencia de la piel fue de color verde y la procedente del rojo de nilo contenido en las formulaciones fue de color rojo; estas imágenes se superpusieron para proporcionar imágenes de dos colores. Las muestras de piel se examinaron también en ausencia de emisiones fluorescentes.

Para visualizar la distribución de las formulaciones fluorescentes, las imágenes fueron obtenidas primeramente en el plano xy (paralelo al plano de la superficie de la piel) con el fin de enfocar folículos pilosebáceos. La dimensión x de la imagen es medida desde la superficie de la piel. Así, la dimensión z es la medida a partir de la capa más superficial de la piel de las imágenes espectrales en 3D que definen la profundidad. Por lo tanto, la superficie de la piel ( $z = 0$ ) fue definida como el plano de la imagen con la fluorescencia más brillante y con una morfología característica de la superficie del estrato córneo. Asimismo, se generó una sección-xyz en la región de interés para obtener datos de imágenes digitalizadas de las secciones sucesivas xy cada 10 micras.

Todas las imágenes fueron el promedio de tres análisis de regiones de diferentes folículos para cada muestra de piel y fueron obtenidas con la misma apertura óptica, lentes, y velocidad de escaneo para cada una de las condiciones de experimentación en los estudios de permeación. El procesamiento de los datos y la visualización de los resultados fueron analizados por el software Image J. Estos resultados se obtuvieron promediando los espectros de las zonas xy seleccionadas en las imágenes obtenidas.

Adicionalmente, también se obtuvieron imágenes en 3D usando el software Zen 2009 Light Edition, bajo cada una de las condiciones de tratamiento y de control durante la experimentación en los estudios de permeación.

### **5.9.4 Estudios de microscopía confocal**

#### **5.9.4.1 Método de congelación de muestras con piel**

Una vez finalizado el período designado en los estudios de penetración, el exceso de formulación se retiró de la superficie de la piel y ésta se lavó tres veces con una solución amortiguadora de fosfatos (pH 7.4) para después ser secada suavemente con una compresa de algodón. Posteriormente, la muestra de tejido fue manejado con cuidado sin ser sumergida en ninguna solución acuosa, para ser cortada de manera perpendicular a la superficie de la piel en trozos pequeños (rebanadas). Inmediatamente después, una pequeña cantidad de goma de tragacanto al 5% se añadió en un soporte adecuado y estos trozos pequeños de tejido fueron colocados sobre la goma, eligiendo una posición vertical con respecto a la superficie de la piel. Dichas muestras de piel fueron embebidas con la goma tragacanto al 5%, evitando burbujas de aire y cubriendo completamente el espécimen.

Con el fin de congelar las muestras de piel, se utilizó como medio de soporte isopentano, el cual fue colocado en un vaso de vidrio resistente a temperaturas bajas, cubriendo una altura de 5 cm. Dicho vaso fue colocado en un recipiente Dewar (contenedor metálico con cubierta aislante) previamente llenado con nitrógeno líquido (2-4 cm de altura). Una vez que la periferia del vaso que contenía isopentano comenzó a congelarse (supercooled), se introdujeron en este contenedor, las muestras de piel cubiertas con goma tragacanto hasta obtener muestras blanquecinas con formas de una pequeña nariz en la parte central (~2-4 min). Después de este intervalo de tiempo, las muestras fueron removidas con pinzas metálicas asegurando que el solvente se evaporara de los especímenes. En seguida, las muestras fueron guardadas dentro de cajas de plástico conteniendo hielo seco para ser almacenadas en un congelador a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Es importante señalar que las muestras fueron rápidamente guardadas para evitar un posible aumento en la temperatura y un posible derretimiento en las muestras.

#### **5.9.4.2 Obtención de muestras de piel seccionadas transversalmente y su visualización por microscopía confocal**

Las muestras congeladas por el método descrito con anterioridad, se cortaron con un microtomo Thermo Scientific Microm HM 560 Criostato-Series, a un espesor óptimo de  $320\text{ }\mu\text{m}$ , colocando los cortes de piel en un portaobjetos de vidrio con adherencia positiva (SuperFrost Plus adhesión diapositivas-Gerhard Menzel GmbH) para proporcionar a la superficie del portaobjetos, una carga positiva permanente y garantizar una atracción electrostática firme de las muestras ( $n \geq 4$ ). En seguida, cada portaobjetos conteniendo las muestras se tiñó con una de solución de colorante azul de Hoechst a una concentración de  $1\mu\text{m/ml}$  durante 5 min y subsiguientemente a esto, los portaobjetos fueron lavados con una solución amortiguadora de fosfatos pH 7.4 después del periodo establecido de tinción. Los

cubreobjetos fueron montados en los portaobjetos colocando agua destilada en la superficie de las muestras y aplicando una pequeña presión para proporcionar la fijación de las muestras y para evitar la formación de burbujas en el interior del compartimiento.

Las muestras fueron analizadas en el plano de escaneo X, Y y Z y en algunos de los casos un escaneo de varias regiones de una zona fue utilizada (tile scanning) utilizando un microscopio confocal Zeiss LSM 700. Las condiciones de lectura para la examinación de las muestras fueron optimizadas. Se utilizaron longitudes de onda de excitación láser de 405 nm (30% de la potencia del láser) y 555 nm (8% de la potencia láser) para analizar por separado azul de Hoechst y rojo de nilo, respectivamente. Además, se utilizó un pinhole de 32  $\mu\text{m}$ . Las imágenes fueron visualizadas en una posición perpendicular al plano de la superficie de la piel usando un objetivo EC Plan-Neofluar 10X/0.30 M27. Las imágenes resultantes fueron entonces codificadas con colores. Por lo tanto, la fluorescencia emanante del azul de Hoechst fue de color azul y esa procedente del rojo de nilo contenida en las formulaciones fue de color rojo; estas imágenes fueron superpuestas para proporcionar imágenes de dos colores. Las muestras de piel se examinaron también en la ausencia de fluoróforos. Las condiciones de análisis en el microscopio se mantuvieron constantes con el fin de comparar las imágenes. Todas las muestras fueron analizadas al menos 3 veces y las imágenes son necesariamente representativas de lo que se observó bajo cada una de las condiciones de tratamiento y de control realizadas durante los estudios de permeación.

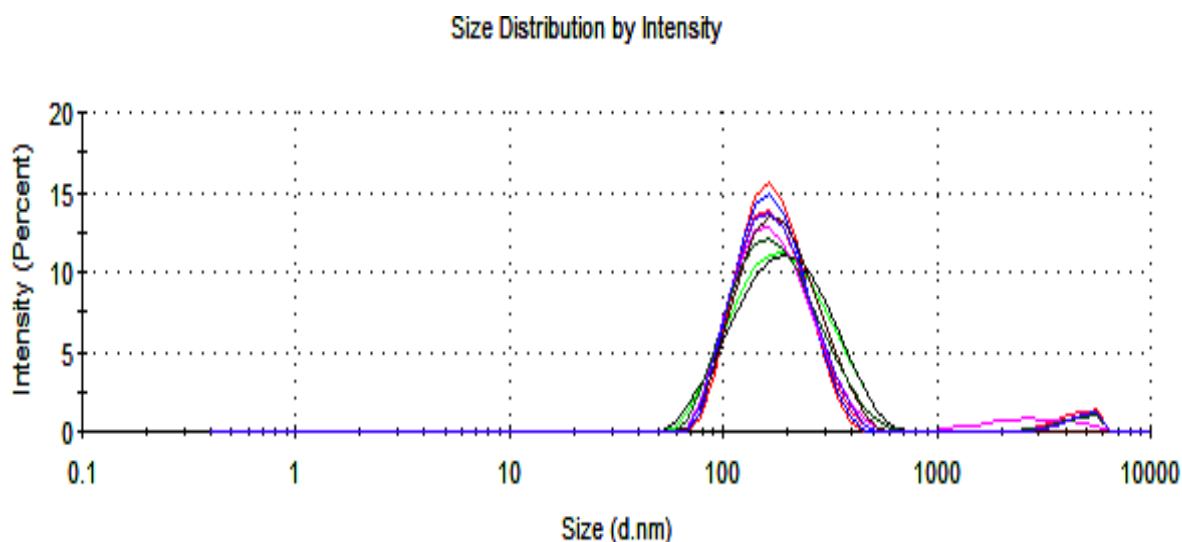
### 5.10 Análisis estadístico

Los resultados se evaluaron estadísticamente por medio de un análisis de varianza (ANOVA). Comparaciones *a posteriori* de grupos de medias individuales se realizaron con la prueba de Duncan. Las diferencias se consideraron significativas si  $P < 0.05$ .

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 1. CARACTERIZACIÓN DE NANOPARTÍCULAS

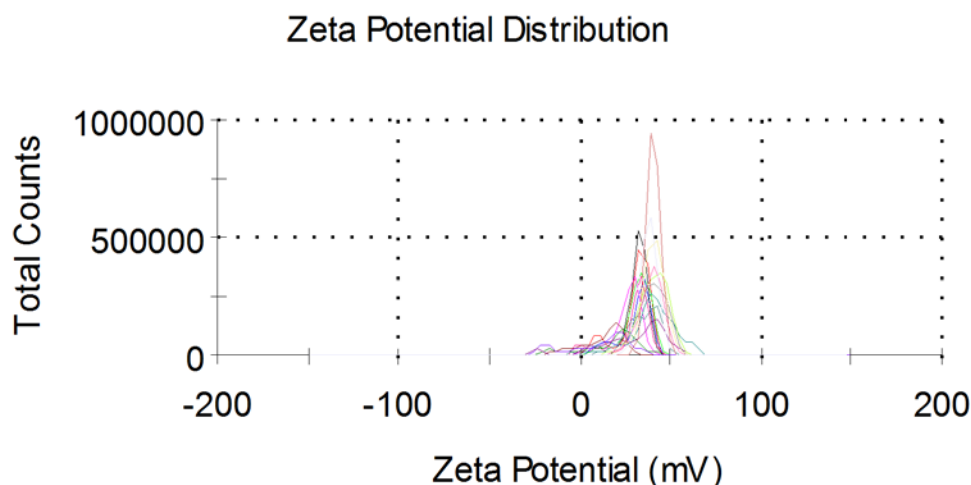
Los resultados de la caracterización de nanopartículas cargadas con triclosán muestran que el tamaño de las mismas estuvo por debajo de los 200 nm como se observa en el Cuadro 6. Los datos son similares a los reportados previamente para nanopartículas utilizando el mismo polímero y diferentes cantidades de fármaco [214]. Algunas diferencias se encontraron con respecto a la amplitud de la distribución del tamaño de partículas, cuantificada por el índice de polidispersión (IP). La dispersidad es una medida de la heterogeneidad de los tamaños de las moléculas o partículas en una mezcla. Una colección de partículas se denomina monodispersas si las partículas tienen el mismo tamaño, forma, o masa. Una muestra de partículas que tienen una distribución inconsistente de su tamaño, forma y masa se denomina polidispersa. Los rangos del índice de polidispersión varían desde un valor teórico de 0.000 para una población de gotitas idealmente monodispersa a 0.500 para las distribuciones relativamente amplias. En la práctica, los valores del índice de polidispersión de 0.030-0.050 se encuentran para las dispersiones de látex estándares consideradas como monodispersas. Considerando esto, las nanopartículas cargadas con triclosán presentaron un índice de polidispersidad relativamente bajo, indicando una dispersión monodispersa para la mayoría de las partículas (Figura 8 y Cuadro 6).



**Figura 8. Distribución del tamaño de nanopartículas cargadas con triclosán de tres lotes con 3 réplicas cada uno.**



A fin de asegurar una estabilidad física aceptable en dispersiones coloidales por una buena repulsión electrostática se requiere un potencial Z de entre  $|Z| > 30-50$  [217]. El potencial Z encontrado en la dispersión de nanopartículas cargadas con triclosán fue positivo debido a la carga catiónica del polímero Eudragit® E 100 y fue lo suficientemente alto como para proporcionar una suspensión estable (Cuadro 6 y Figura 9).



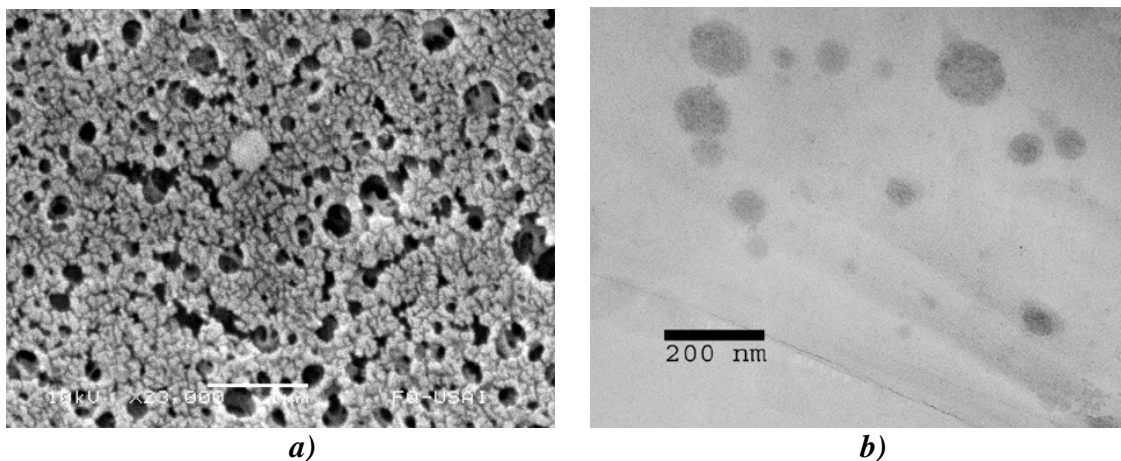
**Figura 9.** Distribución del potencial Z de la dispersión nanoparticular cargada con triclosán de tres lotes con 3 réplicas de cada lote.

**Cuadro 6.** Parámetros de caracterización por tamaño y carga de la dispersión de nanopartículas poliméricas cargadas con triclosán

Prueba	Promedio $\pm$ D.E.	% C. V.
Tamaño (nm)	192.10 $\pm$ 5.27	2.74
I.P.	0.23 $\pm$ 0.01	4.18
Potencial Z (mV)	48.63 $\pm$ 0.32	0.66

**I.P.= Índice de Polidispersión**

Debido a la dificultad para observar la dispersión por la técnica de SEM, debido a que el polímero utilizado en la preparación de nanopartículas (Eudragit® E 100) tiene la tendencia a formar películas y promover la fusión de las nanoesferas. La visualización de las partículas también se llevó a cabo mediante la técnica de TEM. Los resultados obtenidos con ambas técnicas fueron similares (Figura 10), mostrando nanopartículas con un tamaño menor a los 200 nm. De acuerdo a los estudios de microscopía, se observó que la morfología de las nanopartículas cargadas con triclosán, tenían una forma esférica y una superficie sólida. Asimismo, el tamaño de partícula concordó con el determinado por espectroscopía de correlación fotónica.



**Figura 10. Micrografías de la dispersión de nanopartículas poliméricas cargadas con triclosán; a) SEM (bar = 1  $\mu$ m) and b) TEM (bar = 200 nm).**

### 2. OPTIMIZACIÓN DE LOS MÉTODOS ANALÍTICOS PARA LA CUANTIFICACIÓN DEL TRICLOSÁN

La optimización de las condiciones para la cuantificación de triclosán, obtenido a partir de los estudios de liberación y permeación, se determinó mediante cromatografía en capa fina de alta resolución (HPTLC). Los estudios de liberación fueron llevados a cabo en medio metanol-miristato de isopropilo (9:1), mientras que los estudios de permeación se llevaron a cabo en metanol en contacto con muestras de piel extraídas con cintas adhesivas.

Para los estudios de liberación *in vitro* de triclosán incluido en la matriz polimérica de las nanopartículas se utilizó una composición de fase móvil acetonitrilo-agua (7:3), el volumen máximo aplicado fue de 700 nl y una dimensión del láser de lectura (slit)  $3 \times 0.45$  mm a una longitud de onda de 284 nm.

Con lo que respecta a los estudios de permeación *in vivo* de triclosán para la cuantificación del mismo, se preconcentraron las muestras a 2 ml y se incrementó el volumen de muestra aplicado de 35000 a 70000 nl, además, se utilizó una composición de acetonitrilo-agua (67:33) como fase móvil. La longitud de onda máxima para el triclosán es de 233 nm. Sin embargo, las muestras fueron leídas a 285 nm (segundo máximo de absorción), para evitar interferencias de contaminantes en el mismo Rf del triclosán, pudiendo cuantificar al triclosán adecuadamente. La dimensión del láser de lectura fue de  $4 \times 0.45$  nm. El Cuadro 7 muestra todas las condiciones finales a las que se llegaron para la cuantificación del triclosán en los estudios ya señalados.

**Cuadro 7. Condiciones óptimas de los 2 métodos analíticos para la cuantificación del triclosán en los estudios de liberación y en los de permeación por HPTLC.**

	<b>Penetración <i>in vivo</i></b>	<b>Liberaciones <i>in vitro</i></b>
<b>Fase móvil</b>	Acetonitrilo: agua (67:33)	Acetonitrilo: agua (7:3)
<b>Fase estacionaria</b>	Placas de sílica gel fase reversa C18 (Macherey-Nagel, Alemania)	
<b>Ancho de banda</b>	6 mm	
<b>Velocidad de aplicación</b>	200 nl/s	200 nl/s
<b>Volumen de muestra máximo de aplicación</b>	70000 nl	700 nl
<b>Tiempo de lavado</b>	40 s	60 s
<b>Longitud de onda</b>	285 nm	284 nm
<b>Tamaño del slit de lectura</b>	4 × 0.45 mm	2 × 0.45 mm

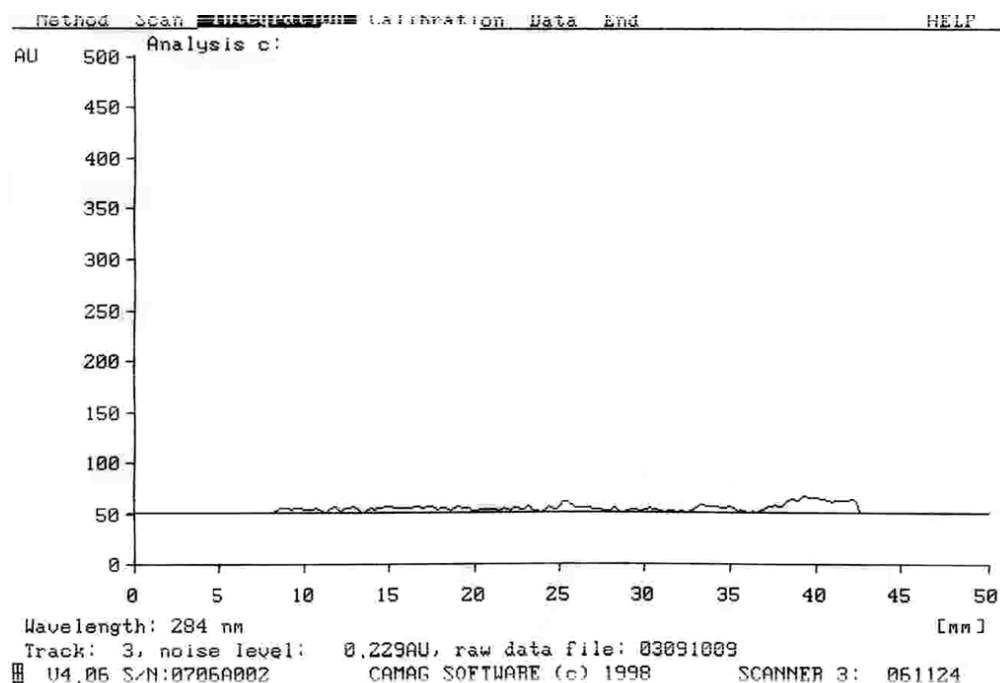
### 3. VALIDACIÓN DEL MÉTODO PARA LA CUANTIFICACIÓN DE TRICLOSÁN UTILIZADO EN LOS ESTUDIOS DE LIBERACIÓN

Este método se validó de acuerdo a los parámetros establecidos por la guía para la validación de procedimientos analíticos ICH Topic Q2 B de la International Conference on Harmonisation (ICH) [215].

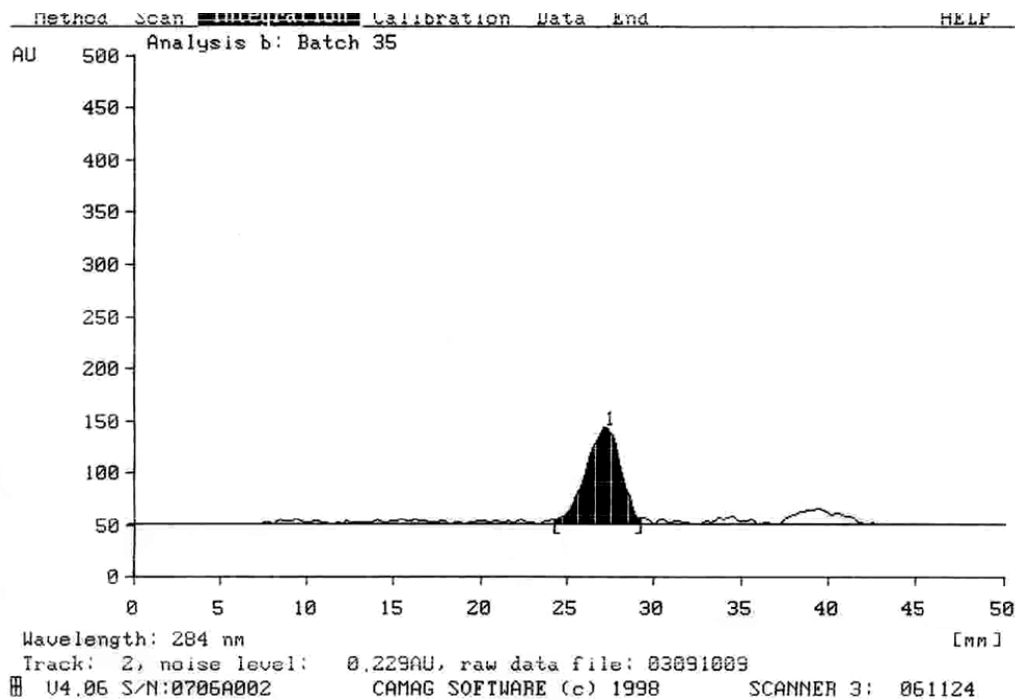
En las Figuras 11 y 12 se presentan los cromatogramas correspondientes a un blanco de solución de metanol-miristato de isopropilo (90:10) y un cromatograma de una muestra de dicho medio adicionado de triclosán, respectivamente. Como se puede observar en los cromatogramas, no se presenta ningún pico cromatográfico cercano al del triclosán que pudiera interferir con el análisis. Es importante señalar que se analizaron muestras con cada componente de las nanopartículas en los cuales no se aprecian interferencias para la cuantificación del triclosán (datos no mostrados). Dado lo anterior, el método analítico se considera selectivo.

Para evaluar la linealidad de la curva de calibración, las muestras se prepararon por triplicado con el fin de validar el método analítico y se determinó la respuesta analítica, área bajo la curva (ABC) para cada cantidad de principio activo analizada en medio metanol-miristato de isopropilo (9:1).

El conjunto de puntos obtenidos para la curva de calibración (n = 11) se puede mostrar en la Figura 13. Con ayuda del programa Statgraphics centurión XVI (v 16.1.11) se realizaron la mayoría de los análisis estadísticos, el resto se obtuvo mediante la hoja de cálculo Excel.

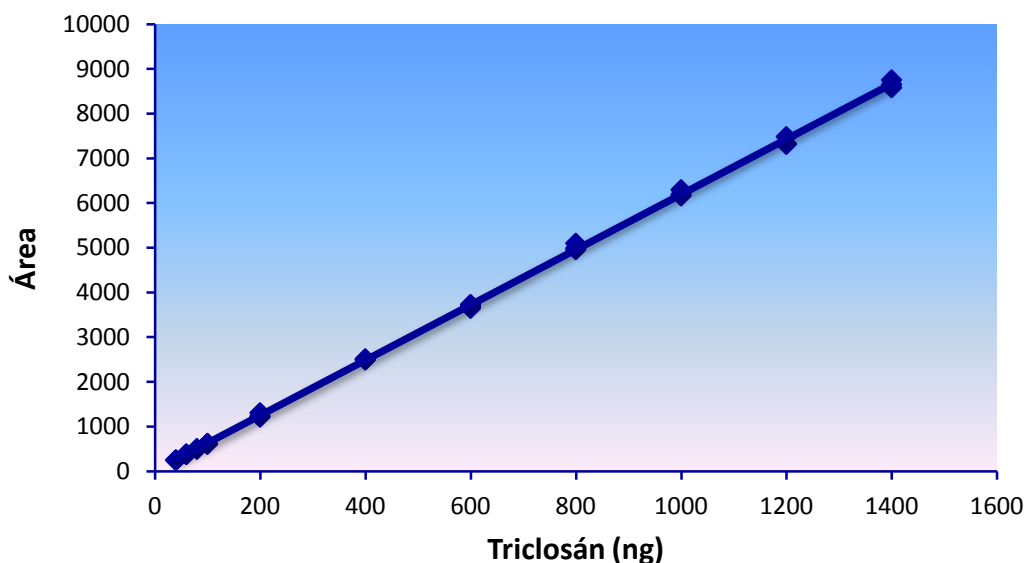


**Figura 11. Cromatograma de una muestra blanco en la solución de metanol-miristato de isopropilo (90:10).**



**Figura 12. Cromatograma de una muestra de triclosán en la solución de metanol-miristato de isopropilo (90:10).**

Los parámetros de regresión obtenidos para la curva de calibración ( $r^2 = 0.999$ ) se ajustaron a un modelo lineal (Cuadro 8). Un análisis de varianza se realizó con los resultados obtenidos, confirmando una relación lineal estadísticamente significativa entre la cantidad de triclosán y su área con el 95 % de confianza (Cuadro 9,  $P < 0.05$ ).



**Figura 13. Curva de calibración de triclosan en medio metanol-miristato de isopropilo (90:10),  $n=3$ .**

**Cuadro 8. Parámetros obtenidos para la curva de calibración de triclosán en metanol-miristato de isopropilo (90:10)**

Sistema	m	b	$r^2$	% C. V
Metanol-miristato de isopropilo (90:10)	6.180	13.10	0.999	1.7381

m: pendiente, b: intercepto,  $r^2$ : coeficiente de determinación, c.v: coeficiente de variación

Asimismo, la  $r^2$  y el coeficiente de correlación indican una fuerte relación entre las variables  $x$  y  $y$ . El error estándar y el error absoluto medio de los residuales se ilustran en la Figura 14. Por último, el estadístico de Durbin-Watson indicó que no hubo correlación serial en los residuales en el 95 % del nivel de confianza ( $P > 0.05$ ). En el Cuadro 10, se presenta la prueba  $t$  de Student con un nivel de significancia del 95%. Desde que el valor de  $P$  es mayor que 0.05, se puede decir que la ordenada al origen es igual a cero. Por todo lo anterior, se considera que la curva obtenida puede emplearse sin problema para los cálculos debido a su buena linealidad.

**Cuadro 9. Análisis de varianza para la curva de calibración de triclosán en metanol-miristato de isopropilo (9:1)**

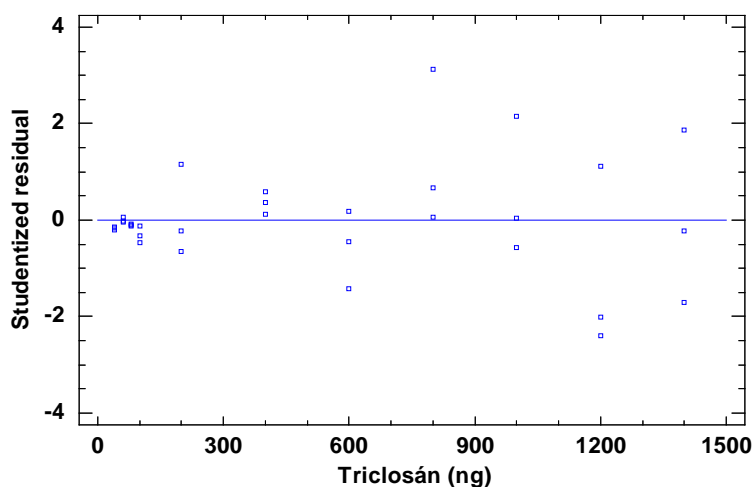
Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Model	2.83995E8	1	2.83995E8	100811.16	0.0000
Residual	87330.1	31	2817.1		
Total (Corr.)	2.84082E8	32			

Correlation Coefficient = 0.999846  
 R-squared = 99.9693 percent  
 R-squared (adjusted for d.f.) = 99.9683 percent  
 Standard Error of Est. = 53.0764  
 Mean absolute error = 34.2275  
 Durbin-Watson statistic = 1.89113 (P=0.3068)  
 Lag 1 residual autocorrelation = 0.0155872  
 Statgraphics centurion XVI (v 16.1.11)

**Cuadro 10. Coeficientes obtenidos del modelo de regresión de la curva de calibración de triclosán en metanol-miristato de isopropilo (9:1)**

Parameter	Least Squares Estimate	Standard Error	T Statistic	P-Value
Intercept	13.1008	13.915	0.941494	0.3537
Slope	6.1802	0.0194647	317.508	0.0000

Statgraphics centurion XVI (v 16.1.11)



**Figura 14. Residuales estudentizados de las cantidades de triclosán en medio metanol-miristato de isopropilo (9:1) obtenidos de curva de calibración.**

Con lo que respecta a la precisión, se trabajó con tres niveles de concentración (bajo, medio y alto). El Cuadro 11 muestra los datos obtenidos para la repetibilidad del método. Como se observa, el coeficiente de variación (C.V.) fue menor al 2%, indicando una variabilidad aceptable en los resultados al aplicar el método bajo las mismas condiciones analíticas. Como las muestras obtenidas de los estudios de liberación no podían ser analizadas en el mismo día por cuestión de tiempo, se evaluó la precisión intermedia en dos días diferentes por un mismo analista, encontrando que el método es preciso en las condiciones analizadas (Cuadro 12).

De acuerdo con la guía para la validación de procedimientos analíticos ICH Topic Q2 B de la International Conference on Harmonisation (ICH) [215], el coeficiente de variación en los resultados de precisión debe ser menor a dos, por lo que se puede decir que el método analítico para cuantificar triclosán en los estudios de liberación es preciso.

**Cuadro 11. Repetibilidad intra-día de triclosán en el medio metanol-miristato de isopropilo (90:10),  $n=3$**

Cantidad (ng)	Promedio de área	D.E. (+/-)	% C.V.
1400	8664.0333	86.0896	0.9936
600	3692.3667	41.6970	1.1293
60	383.9667	2.4664	0.6424

**Cuadro 12. Precisión intermedia en dos días diferentes de triclosán en el sistema metanol-miristato de isopropilo (90:10),  $n = 3$ .**

Cantidad (ng)	Promedio de área	D.E. (+/-)	% C.V.
1400	8638.2333	77.1615	0.8933
600	3696.4333	67.5740	1.8281
60	384.3833	3.8825	1.0101

Los límites de detección y cuantificación encontrados experimentalmente para el sistema metanol-miristato de isopropilo (9:1) fueron 20 y 40 ng respectivamente. El límite de cuantificación es la mínima concentración de principio activo que puede ser determinada con precisión y exactitud aceptables bajo condiciones normales de operación. Los límites de detección y cuantificación encontrados para ambos sistemas cumplen con lo anterior, e indican que el método es apto para cuantificar el triclosán en los estudios de liberación. El Cuadro 13, se muestran los resultados (coeficientes de variación obtenidos de las respuestas analíticas) para el límite de cuantificación. El coeficiente de variación es menor al 2 % cumpliendo con lo establecido [215], por lo que se considera que es identificable y preciso.

**Cuadro 13. Límite de cuantificación de triclosán en medio metanol-miristato de isopropilo (90:10), n=3**

<b>C<sub>nominal</sub> (ng)</b>	<b>Promedio de área</b>
<b>40</b>	251.7667
<b>D.E. (+/-)</b>	1.4742
<b>% C.V.</b>	0.5856

Con base en los resultados anteriores, se puede decir que el método analítico desarrollado para la cuantificación de triclosán en medio metanol-miristato de isopropilo (9:1) para los estudios de liberación cumple con los parámetros establecidos para la validación de procedimientos analíticos de la ICH [215].

#### 4. ESTUDIOS DE LIBERACIÓN *IN VITRO*

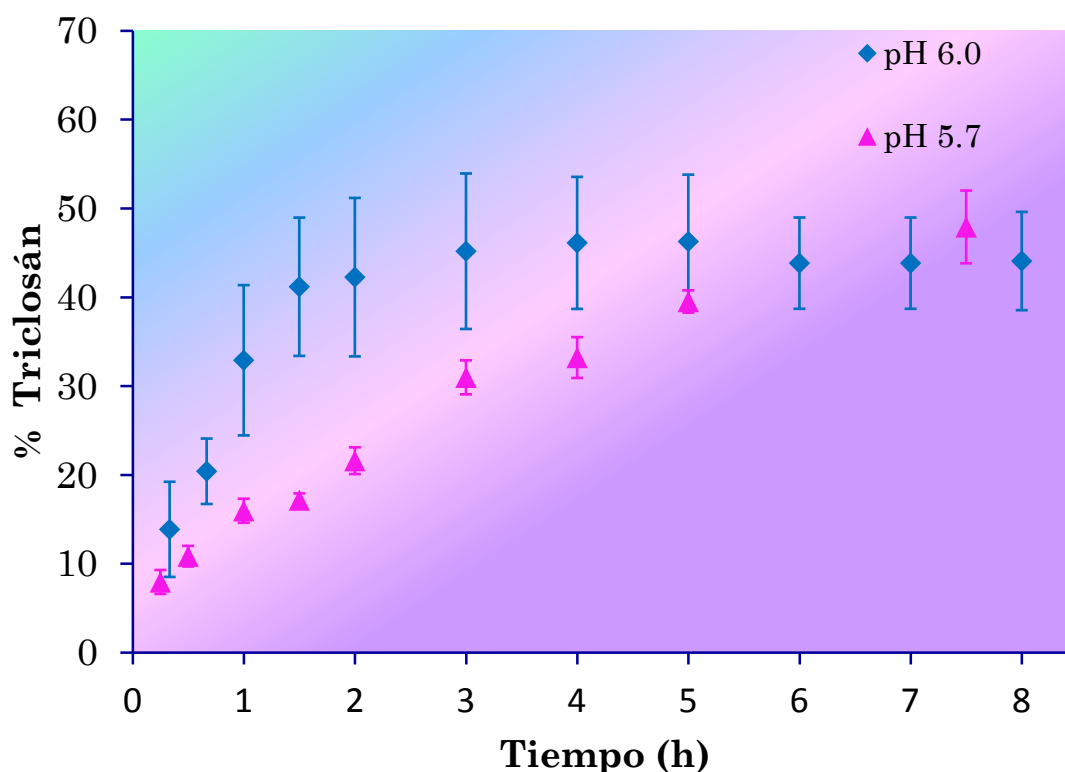
Los estudios de liberación *in vitro* fueron realizados en tres medios diferentes de pH. Para analizar adecuadamente los perfiles de liberación, se realizó un tratamiento estadístico de las cantidades de triclosán liberadas a partir de la dispersión de nanopartículas en cada intervalo de tiempo en dos diferentes medios de pH. Una vez asumida la probabilidad normal en los valores, se realizó una prueba formal para determinar razonablemente si las observaciones obtenidas con variabilidad alta en ambos medios de pH provenían de la misma distribución normal y así poder descartar valores anómalos, antes de estimar cualquier estadística adicional (ver Anexo II). De acuerdo con la prueba de Grubbs todos los datos analizados pertenecieron a los mismos conjuntos de distribuciones normales (valores no significativos para ser anómalos u *outliers*), excepto tres cantidades de triclosán obtenidas a la sexta, séptima y octava hora en el medio de pH 6. La remoción de esos datos, así como un análisis estadístico de los restantes demostraron que éstos provenían de distribuciones normales y de las mismas poblaciones (ver Anexo II).

En términos generales los resultados obtenidos en las cinéticas de liberación muestran que el triclosán se liberó gracias a que el medio penetró en la matriz polimérica relajando las cadenas y/o disolviéndolas, permitiendo con ello la difusión y la liberación del fármaco hacia el medio exterior. Así, una liberación inmediata del fármaco triclosán se produjo en el medio a pH 5.0, mostrando el fármaco se liberó aproximadamente en un 90% en menos de 30 min (datos no mostrados). Esos resultados mostraron que el triclosán se libera inmediatamente debido a la penetración de la solución amortiguadora de ftalatos dentro de la matriz polimérica disolviendo la mayor parte de las cadenas poliméricas que constituyen a las nanopartículas, lo que produjo una rápida difusión y liberación del fármaco al medio.

Por otro lado, cuando los estudios de liberación se realizaron en un medio de pH mayor (pH 5.7), el fármaco triclosán se liberó gradualmente, alcanzando aproximadamente el 48% del mismo en 7.5 h, como puede ser observado en la Figura 15. Para este caso, el



estudio *in vitro* sugiere que el triclosán es liberado debido a la penetración del medio dentro de la matriz polimérica de las nanopartículas, relajando sus cadenas y generando una matriz hinchable permitiendo la difusión y la liberación gradual del fármaco al medio. Ningún efecto “burst” inicial fue apreciado en la cinética de liberación a pH 5.7; sin embargo, este efecto fue observado a pH 6.0. El perfil de liberación del triclosán a partir de nanopartículas a un pH 6.0 se puede dividir en zonas: (i) período de efecto “burst” inicial, durante el cual el fármaco entrampado o adsorbido en la zona superficial de la matriz polimérica de las nanopartículas, es descargado al medio de liberación, (ii) período de inducción, durante el cual el fármaco fue liberado a una velocidad rápida que disminuye gradualmente; (iii) período de liberación lento, durante el cual el fármaco se liberó a una velocidad lenta y sostenida; (iv) período de liberación final, durante el cual la partícula ha liberado el fármaco restante o remanente en la matriz polimérica (esta etapa no fue observada, debido a que la experimentación no fue seguida a tiempos mayores). No obstante, es importante mencionar que la velocidad de liberación depende fuertemente del pH, debido a que el polímero Eudragit® E100 es soluble a pH's por debajo de 5 y tiende a ser hinchable y permeable por encima de este valor. De acuerdo a lo anterior y a los resultados obtenidos, a pH's cercanos o por debajo de 5 (pH normal de la piel), la velocidad de liberación y la cantidad de triclosán liberado fue mayor que a pH's por encima de 5 (pH de piel afectada).



**Figura 15. Cinéticas de liberación *in vitro* de triclosán a partir de nanopartículas en medios con diferente pH (5.7 y 6.0).**

Esto confirma la relevancia del pH sobre las cinéticas de liberación de triclosán a partir de nanopartículas. Además, la velocidad de liberación podría ser más lenta para fármacos no ionizados dentro de los medios, como es el caso del triclosán incluido en la nanopartículas poliméricas. Algunas propiedades importantes que también afectan al comportamiento del perfil de liberación han sido estudiadas recientemente, como la hidrofobicidad del polímero y del fármaco, el tamaño y la forma de las partículas. El tiempo de humectación del polímero para que sea hinchable o permeable y/o la lipofilia del fármaco pueden reducir o modificar el efecto “burst” inicial, así como también prolongar el período de liberación. Un proceso de liberación prolongado del fármaco, es influenciado por la proporción del polímero en la matriz, ya que el proceso es controlado por la velocidad de permeabilidad del polímero. Lo anterior fue observado ya en varios estudios. En uno de ellos se observó una liberación de haloperidol mayor y más rápida para nanopartículas más hidrofílicas que menos hidrofílicas utilizando como polímeros PLGA y PLA respectivamente, y el mismo efecto fue obtenido para triclosán cuando se incorporó en microesferas preparadas a partir Gantrez MS-955, 974P Carbopol, policarbofilo o chitosan. El incremento de la hidrofobicidad en el polímero disminuye la velocidad en la cual el frente de difusión (del medio de liberación) se mueve desde la superficie hasta el núcleo de la partícula, lo cual hace menos disponible al fármaco para ser difundido en un mayor tiempo y así se extienda el período de inducción [218-220].

Para saber si había diferencias entre las cantidades de triclosán obtenidas en las cinéticas de liberación en medio de pH 5.7 y 6.0, se procedió a realizar un análisis de varianza tipo III (la contribución de cada factor es medida habiendo removido los demás factores, Cuadro 14) mostrando una diferencia estadísticamente significativa entre las cantidades obtenidas en cada intervalo de tiempo para un mismo medio de pH y entre ambos medios (valores de P menores a 0.05 para cada uno de los factores). Estas diferencias entre las cantidades de triclosán con un nivel de confianza del 95 % resultó ser evidente en las primeras horas de liberación en cada medio de pH; sin embargo, la cantidad total de triclosán liberada al final de la experimentación en ambos medios de pH resultó ser la misma (ver Anexo II para mayor información).

**Cuadro 14. Análisis de varianza (suma de cuadrados tipo III) del triclosán (mg) liberado por intervalos de tiempo en 2 diferentes medios de pH**

<i>Source</i>	<i>Sum of Squares</i>	<i>Df</i>	<i>Mean Square</i>	<i>F-Ratio</i>	<i>P-Value</i>
<b>MAIN EFFECTS</b>					
<b>A:Tiempo (h)</b>	5640.01	13	433.847	34.24	0.0000
<b>B:pH del medio</b>	1640.57	1	1640.57	129.50	0.0000
<b>RESIDUAL</b>	1292.23	102	12.669		
<b>TOTAL (CORRECTED)</b>	8670.4	116			

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

Statgraphics centurion XVI (v 16.1.11)

Para investigar la liberación del principio activo a partir de las nanopartículas, los datos de liberación fueron analizados con los siguientes modelos matemáticos: modelo de orden cero (Ec. 2), modelo de orden uno (Ec. 3), modelo de Higuchi (Ec. 4), modelo de Korsmeyer-Peppas (Ec. 5), modelo de Hixson-Crowell (Ec. 6) y modelo de Baker and Lonsdale (Ec. 7) [221-226].

$$Q = k_0 \times t \quad \text{Ec. 2}$$

$$\ln(100 - Q) = \ln Q_0 - k_1 \times t \quad \text{Ec. 3}$$

$$Q = k_H \times t^{1/2} \quad \text{Ec. 4}$$

$$Q = k_P \times t^n \quad \text{Ec. 5}$$

$$Q_0^{1/3} - Q^{1/3} = k_{HC} t \quad \text{Ec. 6}$$

$$3/2 (100 - (100 - Q)^{2/3}) - Q = k_{BL} t \quad \text{Ec. 7}$$

En donde  $Q$  es el porcentaje de fármaco disuelto a tiempo  $t$ .  $k_0$ ,  $k_1$ ,  $k_H$  y  $k_{BL}$  son las constantes de velocidad de los modelos de orden cero, uno e Higuchi, respectivamente. Así mismo,  $k_{HC}$  ( $\kappa$ ) es una constante que incorpora la relación volumen superficie del sistema. Por último,  $k_P$  es una constante que incorpora características estructurales y geométricas del sistema, y  $n$  es el exponente que indica, de acuerdo al valor numérico que tome, cual es el mecanismo de liberación.

Para aplicar el modelo semi-empírico de Korsmeyer-Peppas se considera hasta el 60% de principio activo liberado. En esta ecuación se combinan dos procesos aparentemente independientes, uno debido al transporte de fármaco que obedece a las leyes de Fick y el otro a la expansión dinámica del sistema, que involucra la transición de un estado rígido (*glass*) a otro más flexible (*rubber*), llamado transporte caso II.

Peppas, usa el valor de  $n$  para caracterizar los diferentes mecanismos de liberación. Para sistemas esféricos, si  $n = 0.43$  indica que el mecanismo principal de la liberación es la difusión de tipo fickiana. En tanto que si  $n = 0.85$ , la ecuación corresponde a una cinética de liberación de orden cero (difusión no fickiana denominada transporte caso II, la velocidad de liberación del fármaco es controlada por la relajación de las cadenas poliméricas). En este caso, el agua que penetra en el sistema actúa como plastificante, ya que disminuye la temperatura de transición vítrea ( $T_g$ ) del polímero. Cuando la  $T_g$  es igual a la temperatura del sistema de liberación, las cadenas del polímero sufren la transformación de un estado cristalino a uno más flexible, con un incremento del volumen de expansión y un aumento de la movilidad del sistema. Cuando los valores de  $n$  se encuentran entre 0.43 y 0.85 la difusión es una combinación de tipo fickiana y transporte caso II, que se denomina difusión anómala. Para valores mayores a 0.85 tendremos un proceso de difusión no fickiano denominado transporte súper caso II (incremento en el

proceso de plastificación en la capa gel del sistema como resultado de una disminución en las fuerzas atractivas entre las cadenas poliméricas que incrementa la movilidad de las macromoléculas). Para que el principio activo difunda por la matriz, las cadenas poliméricas primero deben relajarse para permitir el proceso de difusión. De esta manera, la movilidad de las cadenas poliméricas es decisiva para la cinética de transferencia del fármaco. Por lo tanto, la velocidad de difusión aumenta con el incremento en la velocidad de relajación de las cadenas del polímero [224].

En el Cuadro 15 se muestran los parámetros obtenidos de los modelos matemáticos señalados anteriormente para las cinéticas de liberación en medio a pH 6 y 5.7. Como se puede observar, los correspondientes a pH 6 no se ajustan de una forma aceptable, a ningún modelo matemático propuesto, por lo que la liberación del fármaco en el sistema fue provocada por fenómenos físicos y químicos tanto del fármaco como del polímero que no se pueden describir de manera correcta con los modelos matemáticos aquí propuestos. No obstante, en términos generales, los datos obtenidos en la cinética de liberación en medio de pH 5.7, se ajustaron mejor a todos los modelos matemáticos aquí propuestos. Los mejores ajustes se obtuvieron al tratar los datos con los modelos de primer orden, de Higuchi, y el de Korsmeyer-Peppas (Cuadro 15). Lo anterior indica que el sistema liberó al fármaco de forma dependiente de la concentración del mismo, mostrando un perfil de liberación dependiente también del tiempo. De acuerdo a los supuestos de Higuchi para sistemas esféricos, el tiempo requerido para liberar el 50 % del fármaco sería el 10 % del tiempo requerido para disolver la última traza de fármaco sólido en el centro del sistema, siendo por tanto para el caso de la cinética de liberación en medio de pH 5.7, un tiempo total de 64 horas (2.6 días) aproximadamente para que el fármaco sea liberado en su totalidad del sistema [227]. En este sentido, se sugiere prolongar el tiempo de la cinética de liberación en futuros estudios experimentales.

**Cuadro 15. Parámetros obtenidos de diferentes modelos matemáticos utilizados para describir la liberación del triclosán (mg) liberado a partir de las nanopartículas poliméricas**

<i>Modelos matemáticos</i>	<i>Liberación de triclosán a partir de Nps en medio:</i>			
	<i>pH 6.0</i>		<i>pH 5.7</i>	
<i>Modelo de Orden cero (<math>r^2</math>)</i>	0.4556		0.964	
<i>Modelo de Orden uno (<math>r^2</math>)</i>	0.4719		0.985	
<i>Modelo de Higuchi (<math>r^2</math>)</i>	0.6161		0.988	
<i>Modelo de Korsmeyer-Peppas</i>	$r^2 =$ 0.7544	$n =$ 0.3312	$r^2 =$ 0.9879	$n =$ 0.5405
<i>Modelo de Hixson-Crowell (<math>r^2</math>)</i>	0.4667		0.9792	
<i>Modelo de Baker and Lonsdale (<math>r^2</math>)</i>	0.4818		0.9612	

Teniendo en cuenta los resultados y las consideraciones arriba mencionadas, el modelo de Korsmeyer-Peppas, el cual se utiliza para describir la liberación de fármacos a

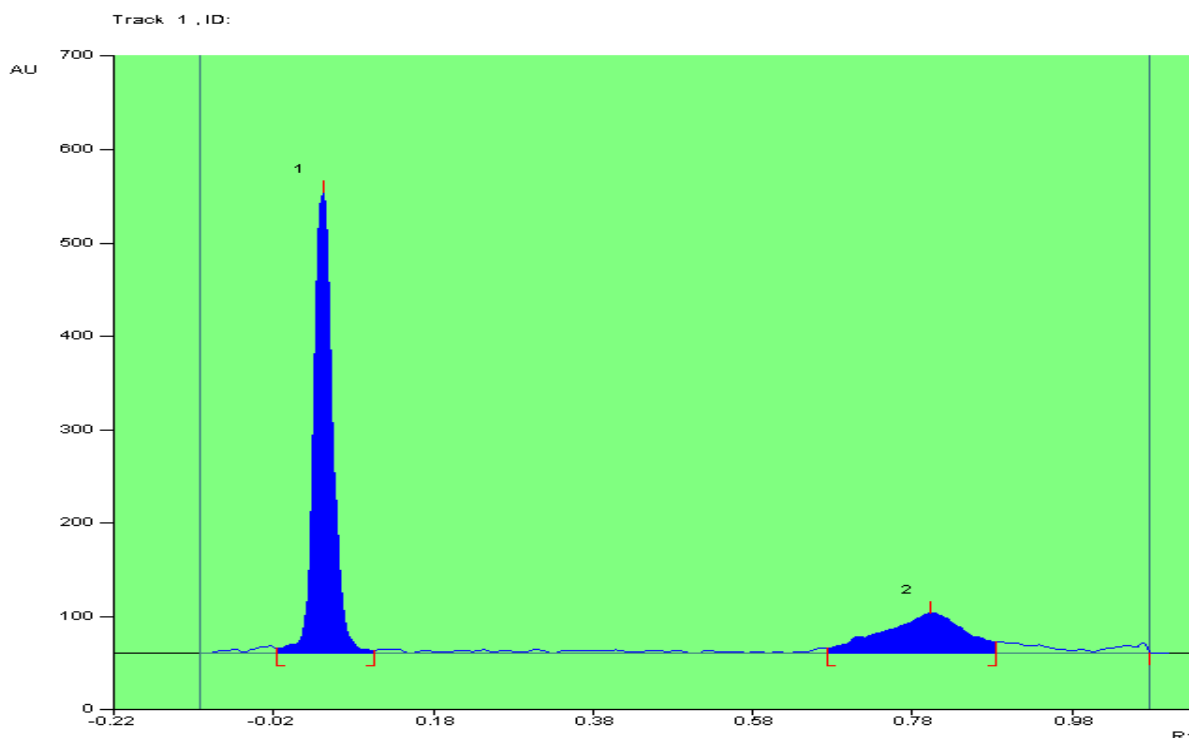
partir de sistemas poliméricos, involucra varios procesos como la difusión de agua dentro de la matriz y su consecuente hinchamiento, la formación de una capa de gel y su disolución (el cambio en el volumen es considerado) [228]. Así, el mecanismo de liberación del fármaco para la cinética de liberación a pH 5.7 ( $r^2 = 0.9879$ ,  $n=0.5405$ ) fue debido a una combinación de la difusión del fármaco y la permeabilidad del polímero. En este caso, la velocidad de difusión y la velocidad de relajación del polímero fueron del mismo orden de magnitud y se observó por tanto, un fenómeno denominado anómalo. No obstante se puede decir que hay un ligero predominio del proceso de difusión y éste es confirmado con el buen ajuste al modelo de Higuchi. Lo anterior pudo reducir o eliminar el efecto “burst” y prolongar el período de inducción. Estos resultados son similares a los reportados para complejos de triclosan-ciclodextrinas, en los cuales el fármaco puede ser fácilmente liberado por difusión simple a través de la red polimérica y la cantidad adicional remanente indica una posible interacción de fármaco y el polímero [114]. Dicha interacción en este sistema entre el triclosán y Eudragit® E 100 se describió anteriormente en estudios de calorimetría [214]. Sin embargo, se sugiere que la cantidad remanente de fármaco puede liberarse ya sea por difusión lenta, fuerzas mecánicas que destruyen las partículas o cuando la matriz se disuelve.

Es de suma importancia comentar que muchos sistemas se basan en los polímeros, que forman una capa alrededor del ingrediente activo o éste es atrapado sobre las cadenas del polímero [229, 230]. Dichos sistemas permanecen relativamente estables en una formulación, durante el almacenamiento. La liberación del ingrediente activo se controla ya sea por las fuerzas de difusión o las mecánicas que rompen las paredes poliméricas de las partículas como se ha mencionado antes. Sin embargo, esas formulaciones se fundamentan en las leyes de difusión durante el almacenamiento y, por lo tanto, resulta ser una estabilización moderada que podría ser insuficiente. Además de la encapsulación y la protección del ingrediente activo durante el almacenamiento para esos sistemas, la liberación del mismo sobre la piel es de mayor importancia. Dicha liberación controlada por difusión ocurre tanto durante el almacenamiento, como después de la aplicación sobre la piel. Lo anterior, podría disminuir la estabilidad ya que en el caso de una liberación por fuerzas mecánicas, sólo la cantidad de moléculas incluidas dentro de las nanopartículas será liberada, lo cual puede no ser igual a la dosis completa.

El sistema propuesto en este trabajo, tiene la gran ventaja de poseer un mecanismo de liberación específico *in situ*, la liberación del ingrediente activo inicia como una respuesta al contacto con la piel. Así, la protección durante el almacenamiento y una liberación controlada completa del fármaco debido a un mecanismo de liberación inherente, es basada en el manto ácido o pH natural de la piel. Lo antes mencionado, ha sido probado para micropartículas preparadas con el mismo copolímero de metacrilato sensible al pH (Eudragit® E 100) en otro estudio. Los resultados obtenidos mediante un microscopio láser confocal, mostraron que la superficie del polímero se modificó para iniciar la liberación del componente encapsulado en las micropartículas, después de la adición de una solución amortiguadora de fosfatos a pH 5 [231].

### 5. VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO PARA LA CUANTIFICACIÓN DE TRICLOSÁN EN MUESTRAS OBTENIDAS CON PIEL DE LOS ESTUDIOS DE PERMEACIÓN IN VIVO

Este método se validó de acuerdo a los parámetros establecidos por la guía para la validación de métodos bioanalíticos emitida por la Food and Drug Administration (FDA) de Estados Unidos [216]. En las Figuras 16 y 17 se presentan dos cromatogramas correspondiente a un blanco de metanol en contacto con piel y un cromatograma del mismo medio en contacto con piel adicionado de triclosán. Para el caso del metanol en contacto con piel se presentan dos picos cromatográficos, el primero se atribuye a los adhesivos de la cinta utilizada para extraer la muestra de piel y el segundo pico se atribuye a los componentes de la piel, ambos con un  $R_f$  considerablemente diferente al del triclosán. Es importante señalar que se analizaron muestras con cada componente de la formulación en el medio biológico con estrato córneo (datos no mostrados), en los cuales no se aprecian interferencias para la cuantificación del triclosán. Dado lo anterior, el método analítico se considera selectivo.



**Figura 16. Cromatograma de una muestra blanco en metanol con estrato córneo (cinta adhesiva Scotch 3M).**

Para evaluar la linealidad de la curva de calibración que se preparó por triplicado, se determinó la respuesta analítica, área bajo la curva (ABC), para cada cantidad de principio activo analizada en metanol en contacto con piel, como lo muestra la Figura 18.

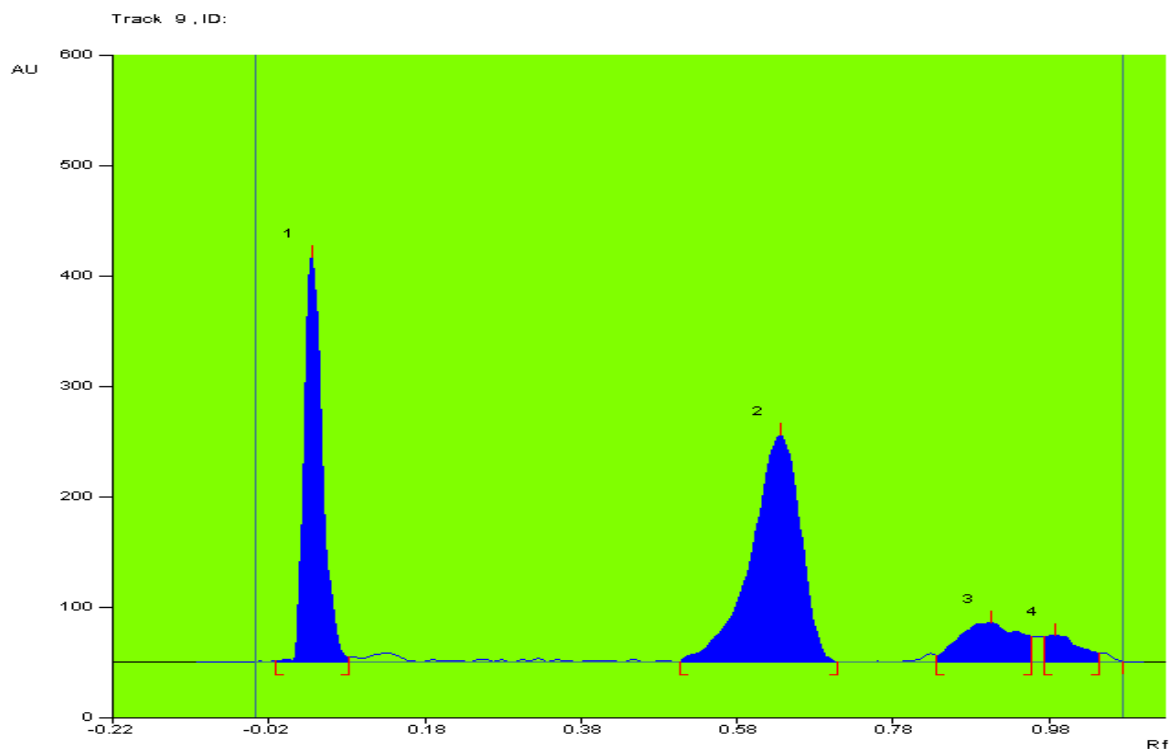


Figura 17. Cromatograma de una muestra de triclosán en metanol con estrato córneo (cinta adhesiva Scotch 3M, pico correspondiente al triclosán:  $R_f = 0.6$ , 500 ng aplicados).

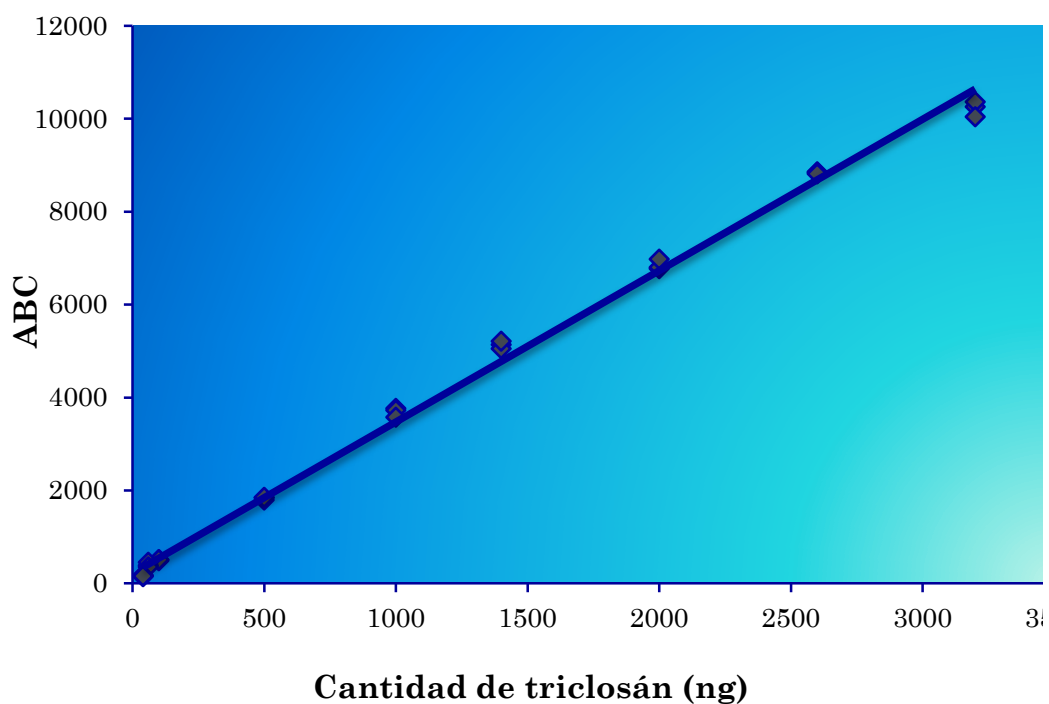


Figura 18. Curva de calibración de triclosán en metanol, en contacto con muestras con piel humana ( $n = 3$ ).

Los parámetros de regresión obtenidos para la curva de calibración ( $n = 8$ ) se ajustaron a un modelo lineal ( $r^2 = 0.996$ ), indicando una relación proporcional entre la cantidad de triclosán y su área (Cuadro 16).

**Cuadro 16. Parámetros obtenidos para la curva de calibración de triclosán en metanol con estrato córneo**

Sistema	m	b	$r^2$
Metanol	3.256	214.4	0.996

m: pendiente, b: intercepto,  $r^2$ : coeficiente de determinación

El Cuadro 17 muestra los datos de cantidad recuperada y el porcentaje de desviación absoluta de cada nivel de concentración, calculados como se indica en la parte experimental. Dichos porcentajes son menores al 15 %, indicando que el modelo lineal seleccionado es adecuado para la interpretación de los datos, de acuerdo con la Guía de Validación de Métodos Bioanalíticos emitida por la Food Drug Administration (FDA) de los Estados Unidos [216]. Adicionalmente a lo requerido por la guía ya mencionada, un análisis de varianza se realizó de los resultados obtenidos, confirmando una relación lineal estadísticamente significativa entre la cantidad de triclosán y su área con el 95 % de confianza (Cuadro 18,  $P < 0.05$ ). El error estándar, el error absoluto medio de los residuales, el estadístico de Durbin-Watson (indicando una tendiente correlación serial en los residuales en el 95 % del nivel de confianza  $P < 0.05$ ) y un análisis al intercepto fueron también realizados (Figura 19). La prueba t de Student con un nivel de significancia del 95% ( $P < 0.05$ ), sugiere que la ordenada al origen es diferente de cero, lo cual suele ser común en análisis de cromatografía en capa fina (Cuadro 19). No obstante, por todo lo anterior, se considera que la curva obtenida puede ser empleada sin problema para los cálculos debido a su buena linealidad.

**Cuadro 17. Porcentajes de desviación absoluta para cada nivel de concentración de triclosán en metanol en contacto con muestras con piel humana obtenidas para la curva de calibración ( $n=3$ ).**

$C_{\text{nominal}}$ (ng)	Promedio de $C_{\text{recuperada}}$ (ng)	Promedio del % Desviación absoluta
<b>3200</b>	3072.3690	3.9885
<b>2600</b>	2647.7273	1.8357
<b>2000</b>	2037.5717	1.8786
<b>1400</b>	1510.1863	7.8705
<b>1000</b>	1066.7383	6.6738
<b>500</b>	495.4238	0.9152
<b>100</b>	88.2166	11.7834
<b>60</b>	56.3165	6.1391



**Cuadro 18. Análisis de varianza para la curva de calibración de triclosán en metanol-en contacto con estrato córneo humano**

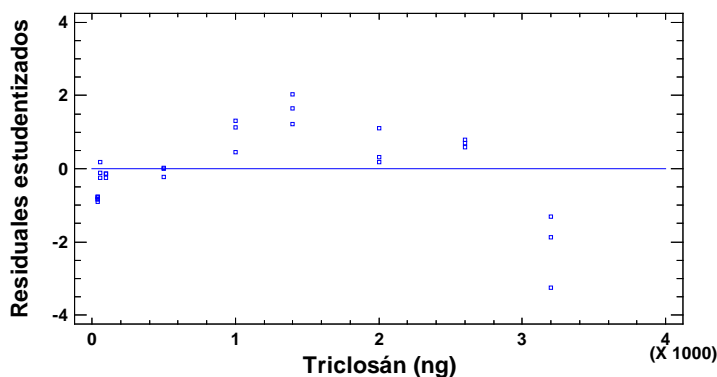
Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Model	3.89989E8	1	3.89989E8	7320.62	0.0000
Residual	1.49164E6	28	53272.7		
Total (Corr.)	3.91481E8	29			

Correlation Coefficient = 0.998093  
 R-squared = 99.619 percent  
 R-squared (adjusted for d.f.) = 99.6054 percent  
 Standard Error of Est. = 230.809  
 Mean absolute error = 173.46  
 Durbin-Watson statistic = 0.669641 (P=0.0000)  
 Lag 1 residual autocorrelation = 0.609362  
 Statgraphics centurion XVI (v 16.1.11)

**Cuadro 19. Coeficientes obtenidos del modelo de regresión de la curva de calibración de triclosán en muestras de metanol-estrato córneo humano**

Parameter	Least Squares Estimate	Standard Error	T Statistic	P-Value
Intercept	214.417	59.241	3.6194	0.0012
Slope	3.25648	0.0380605	85.5606	0.0000

Statgraphics centurion XVI (v 16.1.11)



**Figura 19. Residuales estudentizados de las cantidades de triclosán en medio metanol-con estrato córneo humano, obtenidos de curva de calibración.**

Con lo que respecta a la precisión, se trabajó con tres niveles de concentración (bajo, medio y alto). El Cuadro 20 muestra los datos obtenidos para la repetibilidad del método. Como se observa, los coeficientes de variación (C.V.) fueron menores al 15 %,

indicando una variabilidad aceptable en los resultados al aplicar el método bajo las mismas condiciones analíticas. Así mismo, se evaluó la precisión intermedia en dos días diferentes por un mismo analista, encontrando que el método es preciso a las condiciones de operación analizadas (Cuadro 21). De acuerdo con la Guía de Validación para Métodos Bioanalíticos emitida por la FDA, el coeficiente de variación deber ser menor al 15% para medios biológicos, por lo que se puede decir que el método analítico es preciso [216].

**Cuadro 20. Repetibilidad intra-día de triclosán en metanol en contacto con muestras con piel humana (n=6)**

Cantidad (ng)	Promedio de área	D.E. (+/-)	% C.V.
2000	6965.7333	171.0844	2.4561
500	1956.9500	113.6700	5.8085
100	498.2333	12.1451	2.4376

**Cuadro 21. Precisión intermedia en dos días diferentes de triclosán en metanol en contacto con muestras con piel humana (n=12).**

Cantidad (ng)	Promedio de área	D.E. (+/-)	% C.V.
2000	7018.7667	165.7741	2.3619
500	2010.7333	143.2405	7.1238
100	492.1333	39.9449	8.1167

En lo que se refiere a la exactitud, en el Cuadro 22 se puede observar que los porcentajes de desviación absoluta de las concentraciones recuperadas de triclosán desde el medio de metanol en contacto con piel humana son menores al 15%. Aplicando el criterio anterior, el método analítico se considera exacto, indicando concordancia entre los valores obtenidos experimentalmente y los valores reales.

**Cuadro 22. Exactitud del método analítico para la cuantificación de triclosán en metanol en contacto con muestras con piel humana (n=6).**

C <sub>nominal</sub> (ng)	Promedio de C <sub>recuperada</sub> (ng)	Promedio del % Desviación absoluta
2000	2073.5053	3.6753
500	535.1812	7.0362
100	87.1724	12.8276

Se realizaron pruebas para determinar el porcentaje de recuperación del triclosán remanente en las muestras con piel que contenían las cintas y extraído con metanol, encontrando un porcentaje global aceptable de 102.29 % (Cuadro 23). Es importante mencionar que el cálculo de los porcentajes fue obtenido utilizando la curva de calibración debido a que no se cuenta con un estándar de referencia, como lo indica la guía. Sin embargo los datos son confiables debido a los parámetros aceptables que se obtuvieron de la curva de calibración. Además se obtuvieron coeficientes de variación menores al 15 % en los niveles de concentración, cumpliendo con los criterios de precisión establecidos por la guía para la validación de métodos bioanalíticos emitida por la FDA [216].

**Cuadro 23. Porcentaje de recobro de triclosán en medio de metanol con muestras de piel humana (n=6).**

<b>Cantidad (mg)</b>	<b>Promedio del % de recobro</b>	<b>D.E. (+/-)</b>	<b>% C.V.</b>
<b>10</b>	115.4825	9.3944	8.1349
<b>20</b>	92.7524	6.1965	6.6807
<b>30</b>	98.6475	5.0058	5.0744
<b>Global</b>	102.2941	11.7957	11.5312

En términos generales, el límite de detección de un analito se puede describir como aquella concentración que proporciona una señal en el instrumento significativamente diferente de la señal del blanco o ruido de fondo. El límite de cuantificación es la mínima concentración de principio activo que puede ser determinada con precisión y exactitud aceptables bajo condiciones normales de operación [232]. Los límites de detección y cuantificación estimados experimentalmente para el sistema de metanol con estrato córneo fueron 40 y 60 ng, respectivamente (Cuadro 24). Dichos valores cumplen con los criterios establecidos por la guía para la validación de métodos bioanalíticos emitida por la FDA, indicando una adecuada sensibilidad del método [216]

**Cuadro 24. Límite de cuantificación de triclosán en medio de metanol con muestras con piel humana (n=6)**

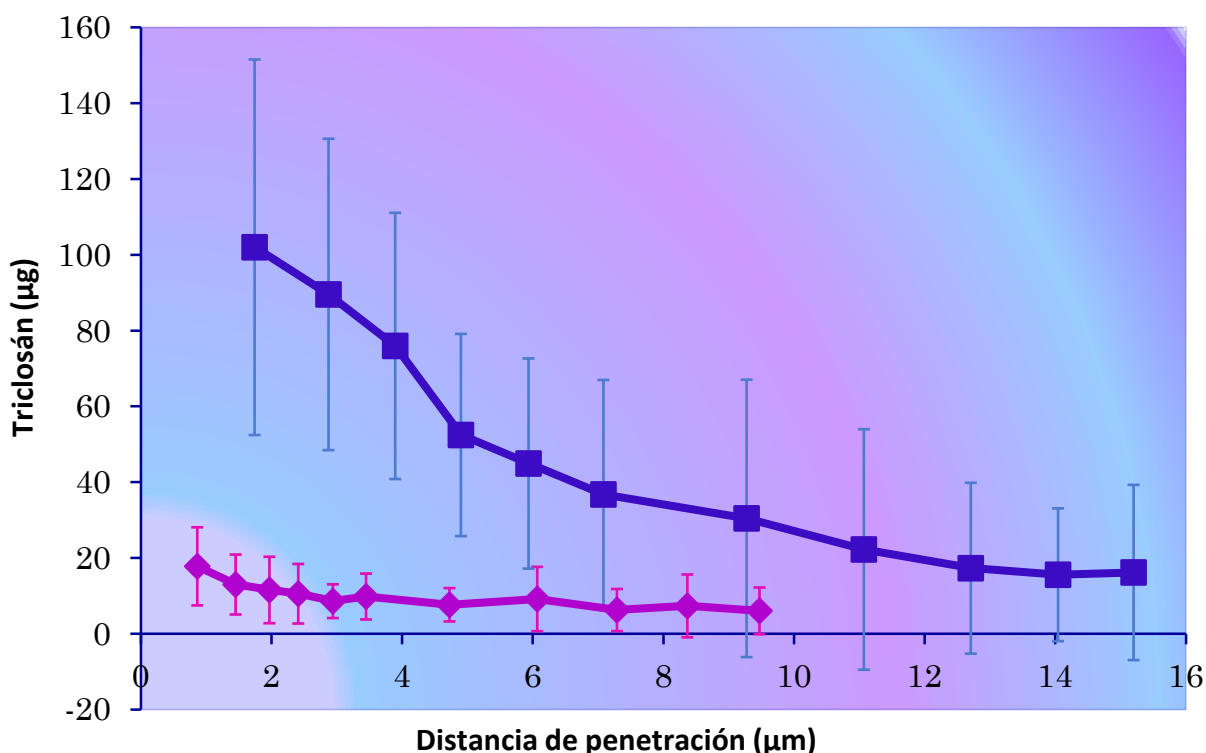
<b>C<sub>nominal</sub> (ng)</b>	<b>Promedio de C<sub>recuperada</sub> (ng)</b>	<b>Promedio del % Desviación absoluta</b>
<b>60</b>	56.3165	6.1391

Con base en los resultados que se tienen, se puede decir que el método analítico desarrollado para la cuantificación de triclosán, en metanol con estrato córneo, cumple con

los parámetros establecidos para la validación de métodos bioanalíticos establecida por la FDA (selectividad, linealidad, precisión, exactitud, sensibilidad y porcentaje de recobro), por lo que puede ser utilizado para la cuantificación de triclosán en los estudios de permeación [216].

### 6. ESTUDIOS DE PERMEACIÓN *IN VIVO* DE TRICLOSÁN

Los estudios de permeación *in vivo* mostraron que el fármaco fue capaz de penetrar en la piel. Como se ilustra en las Figuras 20 y 21, la cantidad de triclosán permeada en cada cinta o stripping en los voluntarios tratados con las dos formulaciones (emulsión y dispersión de nanopartículas) es significativamente diferente. Un análisis de varianza tipo III (la contribución de cada factor es medida habiendo removido los demás factores) se elaboró para verificar dicha diferencia. El Cuadro 25 muestra que los valores de P son menores a 0.05 para cada uno de los factores mostrando un efecto estadísticamente significativo de los mismos sobre la cantidad de triclosán (hay diferencia entre cintas, entre formulaciones y entre estos dos factores), con un nivel de confianza del 95 %.



**Figura 20. Distancia de penetración *in vivo* de triclosán incluido en a) ◆ una emulsión (o/w) y b) ■ en una dispersión de nanopartículas (n=12)**

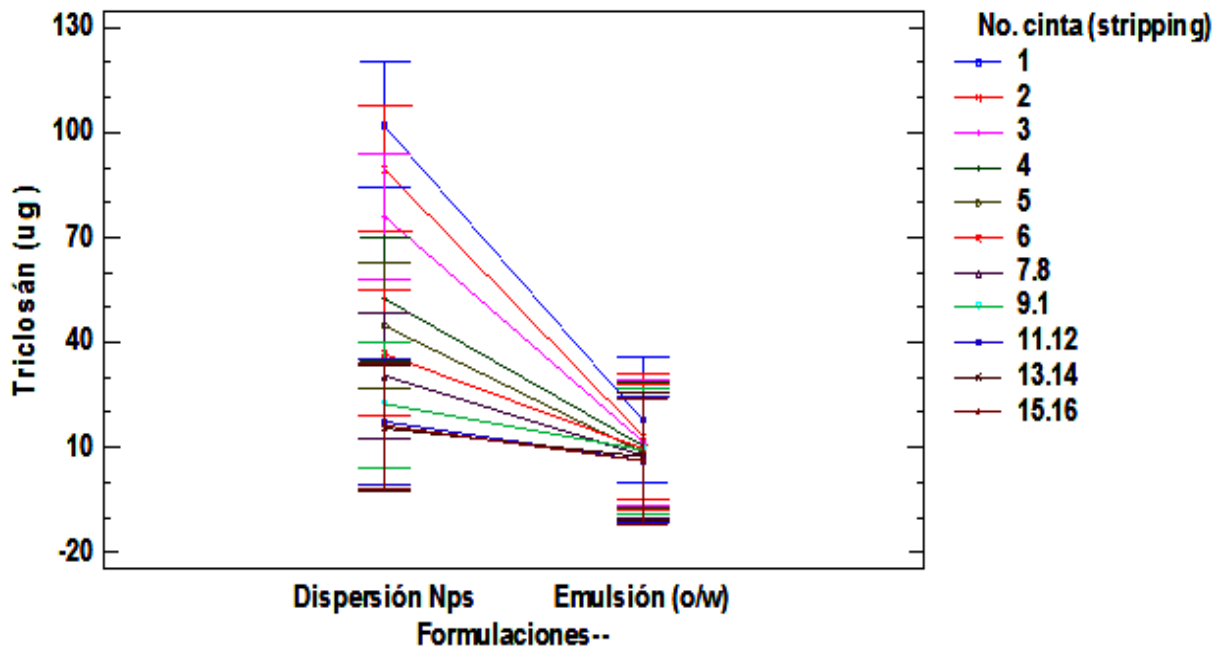
De acuerdo a los resultados obtenidos, la cantidad de triclosán penetrada en la piel resultó ser mayor para la dispersión de nanopartículas en las primeras cintas con respecto a

las últimas de la misma formulación y a todas las obtenidas de la emulsión (o/w) (ver Anexo II para mayor información).

**Cuadro 25. Análisis de varianza (suma de cuadrados tipo III) de las cantidades de triclosán ( $\mu\text{g}$ ) obtenidas en cada cinta (stripping) para cada formulación probada en los estudios de permeación.**

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
<b>MAIN EFFECTS</b>					
<b>A:No. cinta (stripping)</b>	69510.5	10	6951.05	12.68	0.0000
<b>B:Formulaciones--</b>	85363.0	1	85363.0	155.68	0.0000
<b>INTERACTIONS AB</b>	45940.7	10	4594.07	8.38	0.0000
<b>RESIDUAL</b>	132693.	242	548.318		
<b>TOTAL (CORRECTED)</b>	333507.	263			

All F-ratios are based on the residual mean square error.  
Statgraphics centurion XVI (v 16.1.11)



**Figura 21. Cantidad de triclosán obtenida en cada cinta removida de la piel en voluntarios tratados con la emulsión (o/w) y con la dispersión de nanopartículas.**

Estos resultados concuerdan con los reportados previamente en estudios de permeación *in vitro*, en los cuales el flujo de triclosán fue cinco veces mayor cuando se incluyó en las nanopartículas que cuando se incluyó en la emulsión (misma formulación utilizada), durante las dos primeras horas [214]. Esto sugiere que las nanopartículas pueden penetrar rápidamente dentro de los folículos pilosos, y saturar gradualmente esta vía, disminuyendo el flujo del fármaco.

Un análisis estadístico fue realizado a las cantidades totales de triclosán para cada voluntario, asumiendo que los datos siguieron una tendencia de probabilidad normal (ver Anexo II). Además, se realizó una prueba formal para determinar razonablemente si todas las observaciones obtenidas, utilizando ambas formulaciones venían de la misma distribución normal y así poder descartar valores anómalos, antes de estimar cualquier estadística adicional.

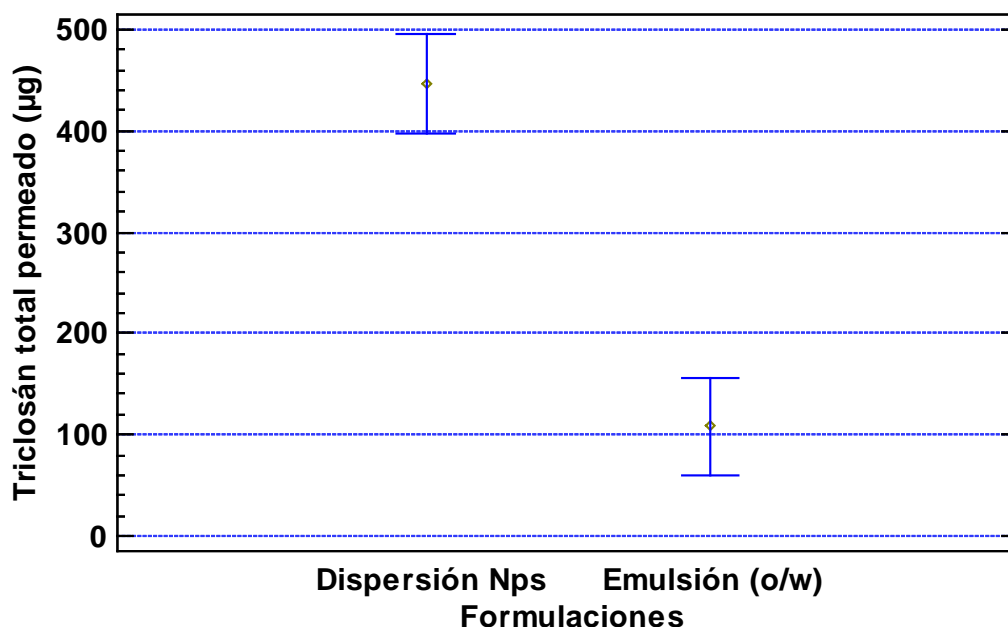
De acuerdo con la prueba de Grubbs, todos los datos analizados resultaron pertenecer al mismo conjunto de distribución normal para el caso de la emulsión, no obstante, para el caso de la dispersión de nanopartículas, una cantidad total de triclosán resultó ser anómala y ese valor fue removido de la distribución normal. Se realizó un análisis estadístico a los datos restantes, resultando provenir de la misma población (ver Anexo II). Dada la remoción del dato anómalo en el conjunto de datos provenientes de la dispersión de nanopartículas, la media así como su desviación estándar resultaron ser de 446.758 y 155.878  $\mu\text{g}$  respectivamente. Así mismo, la media y la desviación estándar de las cantidades totales de triclosán para la emulsión fueron de 107.96 y 40.6539  $\mu\text{g}$ , respectivamente. Para determinar si esas cantidades totales de triclosán obtenidas de los voluntarios en los estudios de permeación diferían, se realizó un análisis de comparación de medias (Cuadro 26). Como el intervalo de confianza para la diferencia entre medias no contiene el valor de cero y el valor de P de la prueba de t es menor a 0.05, se puede decir que hay una diferencia significativa estadísticamente entre las medias de las dos muestras con un 95% de nivel de confianza como se ilustra en la Figura 22.

Por lo tanto, en los estudios de permeación *in vivo* realizados en este trabajo, se encontró una cantidad total mayor permeada de triclosán cuando se utilizó la dispersión de nanopartículas que cuando se utilizó la emulsión (o/w). En contraste, la prueba ANOVA no mostró diferencias significativas para la cantidad total permeada de triclosán obtenidas al utilizar las mismas formulaciones con las que se trabajaron en este estudio, en los estudios de permeación *in vitro* (utilizando piel de oreja porcina) realizados en previos estudios ( $P > 0.5$ ) [214].

**Cuadro 26. Análisis de comparación de medias de las cantidades totales de triclosán obtenidas para cada voluntario tratados con las formulaciones estudiadas.**

Comparison of Means
95.0% confidence interval for mean of Emulsión (o/w): 107.962 +/- 25.8303 [82.1316, 133.792]
95.0% confidence interval for mean of Dispersión Nps: 446.758 +/- 104.721 [342.038, 551.479]
95.0% confidence interval for the difference between the means not assuming equal variances: -338.797 +/- 106.337 [-445.133, -232.46]
<b><u>t test to compare means</u></b>
Null hypothesis: mean1 = mean2 Alt. hypothesis: mean1 NE mean2 not assuming equal variances: t = -6.99384 P-value = 0.0000203775 Reject the null hypothesis for alpha = 0.05.

Statgraphics centurion XVI (v 16.1.11)



**Figura 22. Cantidad total permeada de triclosán contenida en las formulaciones probadas en los estudios de permeación *in vivo*.**

Cabe señalar, que la piel humana es el sustrato ideal para pruebas de absorción percutánea, pero su limitada disponibilidad fuerza a los investigadores a utilizar modelos alternativos. Actualmente, se han descrito en la literatura numerosos estudios en este

sentido, por lo que se ha utilizado piel de cerdo (ésta ha sido promovida sobre la base de su equivalencia estructural a la piel humana), modelos de piel humana reconstituidos, o membranas sintéticas para reemplazar la piel humana en estudios de permeación y penetración [233-235]. De aquí, diferentes resultados se han obtenido dependiendo de diversos factores, como los sitios anatómicos de la piel, la presencia de folículos pilosos, y las diferentes características físicoquímicas de los permeantes. Otros han concluido que la diferencia entre los resultados *in vitro* e *in vivo* es generalmente mayor para las moléculas más lipofílicas. Históricamente, comparaciones que involucran compuestos lipofílicos se han caracterizado por una subestimación *in vitro* del grado de absorción *in vivo* y existe la inquietud de que el reservorio de tales compuestos medidos *in vitro*, utilizando el estrato córneo y/o las capas inferiores de la epidermis y de la dermis no fueron un verdadero reflejo de la situación *in vivo* para algunas sustancias químicas. Por el contrario, medidas *in vitro* de los compuestos más hidrofílicos han sido ya sea muy parecidos a los resultados *in vivo* o muestran una absorción sobrestimada, mientras que los resultados de la absorción de compuestos volátiles *in vitro*, en algunos casos, muestran resultados sobrestimados comparados a los resultados *in vivo*, debido a la pérdida diferencial de la dosis del material desde la superficie de la piel. Por lo anterior, la elección de un diseño correcto de los estudios *in vitro* puede reducir algunos de los problemas asociados con la subestimación de la absorción de algunos compuestos lipofílicos utilizando fluidos receptores de mezclas de etanol:agua o de tensoactivo: agua, para mejorar la solubilidad del fármaco y por ende la absorción percutánea [236-238]. No obstante, los resultados *in vivo* en este estudio y los resultados *in vitro* previamente obtenidos para el fármaco triclosán atrapado en nanoestructuras de la misma composición, muestran una pobre correlación *in vitro/in vivo*, aún usando una fase receptora con una mezcla de agua y de agente tensoactivo, para los estudios *in vitro*. Esto pudo haberse debido probablemente a que no fue suficiente la cantidad o eficiencia del agente tensoactivo en el medio.

Aunque, la cantidad del triclosán a partir de la emulsión en los estudios de permeación *in vivo* es menor que la obtenida con la dispersión de nanopartículas, la cantidad de fármaco permeada para la formulación disponible en el mercado puede atribuirse al alto contenido de tensoactivos en dicha forma de dosificación. Por lo general, éstos se añaden a las formulaciones con el fin de estabilizar las emulsiones y suspensiones o para solubilizar los ingredientes activos lipofílicos. Los agentes tensoactivos lauril sulfato de sodio y estearéth 20 se utilizaron como emulsificantes para preparar la emulsión comercial. Sin embargo, ellos pueden fungir como promotores o potenciadores de la absorción en la piel.

El lauril sulfato de sodio, el cual contiene una cadena alquílica lineal de 12 átomos de carbono y una solubilidad intermedia aceite/agua, es capaz de penetrar la bicapa lipídica y promover la fluidización los lípidos dentro del estrato córneo [106, 239]. Estos tensoactivos han demostrado tener influencia sobre la permeabilidad de la piel en un número considerable de maneras: actuando directamente sobre los componentes de la piel; induciendo una pérdida de la integridad de la membrana, ya sea por extracción de lípidos o proteínas o por la desnaturalización de las proteínas [106]. Conjuntamente, los tensoactivos son conocidos por tener propiedades irritantes sobre la piel (usuarios sienten su piel seca) causando una disminución de los lípidos del estrato córneo por su solubilización en micelas; tal extracción de los lípidos del estrato córneo debilita la propiedad de barrera del



estrato córneo, afectando el transporte de materiales hidrofílicos y causando una pérdida de agua transepidermal considerable en la piel. Por lo tanto, una desventaja de utilizar la emulsión disponible en el mercado, es el daño potencial que podría ser generado a partir de la formulación sobre la piel de los pacientes con acné, por la irritación causada en la piel como un efecto secundario de los promotores o potenciadores de absorción contenidos en dicha formulación [109, 110].

En lo que respecta a la distancia total de penetración del fármaco obtenida cuando los voluntarios fueron tratados con ambas formulaciones, una prueba formal (prueba de Grubbs) fue realizada determinando razonablemente que todas las observaciones obtenidas en los estudios de permeación venían de la misma distribución normal de procedencia (asumiendo que los datos siguen una distribución normal, ver Anexo II). Las medias de las muestras y las desviaciones estándares de las distancias de penetración de triclosán a partir de la emulsión (o/w) y de la dispersión de nanopartículas resultaron ser de  $9.482 \pm 5.578$  y  $15.2 \pm 9.932$   $\mu\text{m}$ , respectivamente. Esas distancias de penetración totales del fármaco en cuestión no fueron diferentes al utilizar las dos formulaciones (dispersión de nanopartículas y emulsión (o/w)), de acuerdo al análisis de comparación de medias ( $P > 0.05$ , 95% de nivel de confianza, Figura 23, Cuadro 27).

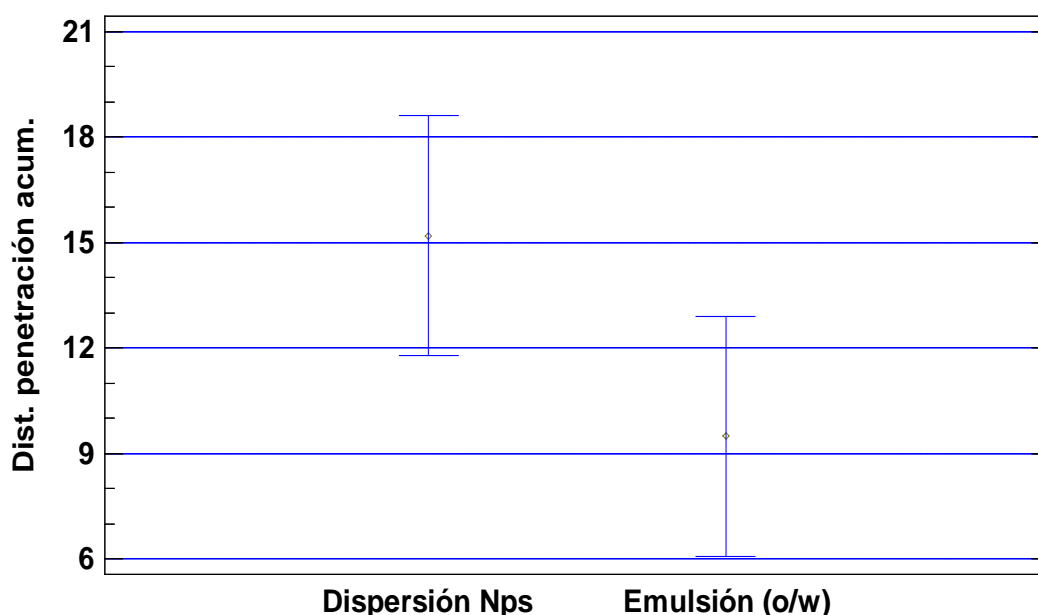
**Cuadro 27. Análisis de comparación de medias de las distancias totales de penetración obtenidas para cada voluntario tratados con las formulaciones estudiadas**

<b>Comparison of Means</b>
95.0% confidence interval for mean of Emulsión: $9.48225 \pm 3.54404$ [5.93821, 13.0263]
95.0% confidence interval for mean of Dispersión Nps: $15.1997 \pm 6.3106$ [8.88911, 21.5103]
95.0% confidence interval for the difference between the means assuming equal variances: $-5.71746 \pm 6.81968$ [-12.5371, 1.10222]
<b>t test to compare means</b>
Null hypothesis: mean1 = mean2 Alt. hypothesis: mean1 NE mean2 assuming equal variances: $t = -1.73869$ P-value = 0.0960664 Do not reject the null hypothesis for alpha = 0.05.

Statgraphics centurion XVI (v 16.1.11)

Aunque las distancias de penetración totales de triclosán no fueron significativamente diferentes al utilizar tanto dispersión de nanopartículas como la emulsión (o/w), los resultados sugieren que el fármaco encontrado en la piel a partir de las nanopartículas fue mayor debido a una posible penetración de las nanoesferas en zonas foliculares. Este supuesto, podría ser atribuido al tamaño de partícula y al tipo de partícula (rígida), incapaz de penetrar a través del estrato córneo, pero capaz de penetrar y formar un depósito en el folículo piloso. Recientemente, se ha reportado que el tamaño y la

distribución de las nanopartículas son importantes para determinar su interacción con la membrana celular y su penetración a través de las barreras fisiológicas [9, 12]. La interacción entre las nanopartículas y el estrato córneo, en particular de la estructura lipídica y la integridad de los nanoacarreadores ha sido investigada, mostrando que, las vesículas rígidas (polímeros y nanopartículas lipídicas sólidas) o en estado de gel no penetran en la piel intacta, contrario a las vesículas más elásticas y deformables, tales como los transfersomas y ethosomas, los cuales son capaces de pasar a través de la nanoporosidad (espacios intercelulares) del estrato córneo, pero, si ellas no penetran como partículas intactas, entonces los nanoacarreadores lipofílicos pueden interactuar con los lípidos del estrato córneo y actuar como promotores o potenciadores de absorción alterando la estructura lipídica [34, 240]. No obstante, hay evidencia de la penetración y la acumulación de nanoacarreadores rígidos en las capas más externas de la piel (estrato córneo) y en los surcos de la misma. Lo anterior, se ha demostrado a partir de diversos estudios para mejorar la penetración de los fármacos en la piel [47, 49, 241].



**Figura 23. Distancia total de penetración *in vivo* de triclosán ( $\mu\text{m}$ ) contenida en las formulaciones probadas en los estudios de permeación.**

Actualmente, la ruta a través de los folículos pilosos se considera como una vía importante para el paso de fármacos, especialmente para las nanopartículas, las cuales han mostrado que penetran en los folículos pilosos muy eficientemente [49]. Aunque muchos estudios han demostrado que hay un aumento en la penetración folicular cuando se utilizan partículas más pequeñas a 300 nm, por encontrarlas en mayor cantidad en las regiones foliculares, varios autores en cambio, están en desacuerdo con esas guías aceptadas, en relación a la penetración en la piel con un cierto tamaño de partícula. Algunos resultados recientes, demostraron que las nanopartículas de 20 nm penetraron tan profundamente en los folículos pilosos como esas de 400 nm [48-50, 242, 243]. Esas guías aceptadas

propusieron en un inicio que, las partículas menores de 3 nm de diámetro podrían penetrar a través de la vía intercelular del estrato córneo, partículas de entre 3 y 10  $\mu\text{m}$  podían entrar en los folículos pilocebeos, mientras que las partículas mayores de 10  $\mu\text{m}$ , no podrían penetrar la piel [244]. Esos datos sugieren que puede haber diferencias sustanciales entre la penetración y las interacciones de las partículas, que dependen en gran medida del tipo de piel y de la formulación utilizada. La influencia de la química de la superficie de las partículas y sus interacciones con la piel fue investigado en estudios recientes, y parece ser de mucho mayor interés que el tamaño de partícula. La influencia de la cubierta superficial y la forma de las nanopartículas fue reportada en un experimento ex vivo, utilizando piel fresca de cerdo y nanopartículas de sulfuro de cadmio (CdS). Dichas nanopartículas fueron recubiertas ya sea con el polímero PEG-amina de carácter catiónico o PEG de carácter neutro, quienes alcanzaron la epidermis viable y dermis después de 8 h de contacto, sin importar la forma que presentaban. En contraste, las nanopartículas de CdS esféricas cargadas negativamente se acumularon en la epidermis viable, mientras que esas elipsoidales permanecieron en el estrato córneo. Este ejemplo indica que una mejor comprensión de las cuestiones fundamentales y de muchos parámetros fisicoquímicos se requieren para llevar a cabo experimentos sistemáticos realizados bajo un control estrecho tanto de las propiedades físicoquímicas de las partículas, como de modelos de la piel [245]. Por lo tanto, la carga de la partícula es un parámetro importante a considerar en este estudio y sugiere que las nanopartículas poliméricas encapsulando triclosán, con una carga superficial positiva fueron atraídas por la piel (con carga negativa).

También un análisis de las cantidades totales de triclosán para cada voluntario por género también se realizó (asumiendo normalidad), determinando que todas las observaciones obtenidas resultaron ser valores no anómalos (outliers), excepto para una cantidad total de triclosán proveniente de un voluntario hombre tratado con la dispersión de Nps. Dado lo anterior, se eliminó ese dato anómalo desde la población y se realizó nuevamente un análisis estadístico que demostró que la población restante seguía una distribución normal y todos los datos procedían de la misma población (ver Anexo II). Las medias de las muestras y las desviaciones estándares de las cantidades totales de triclosán para cada voluntario por género se muestran en el Cuadro 28.

**Cuadro 28. Cantidades totales promedio de triclosán ( $\mu\text{g}$ ) obtenidas de voluntarios agrupados por género**

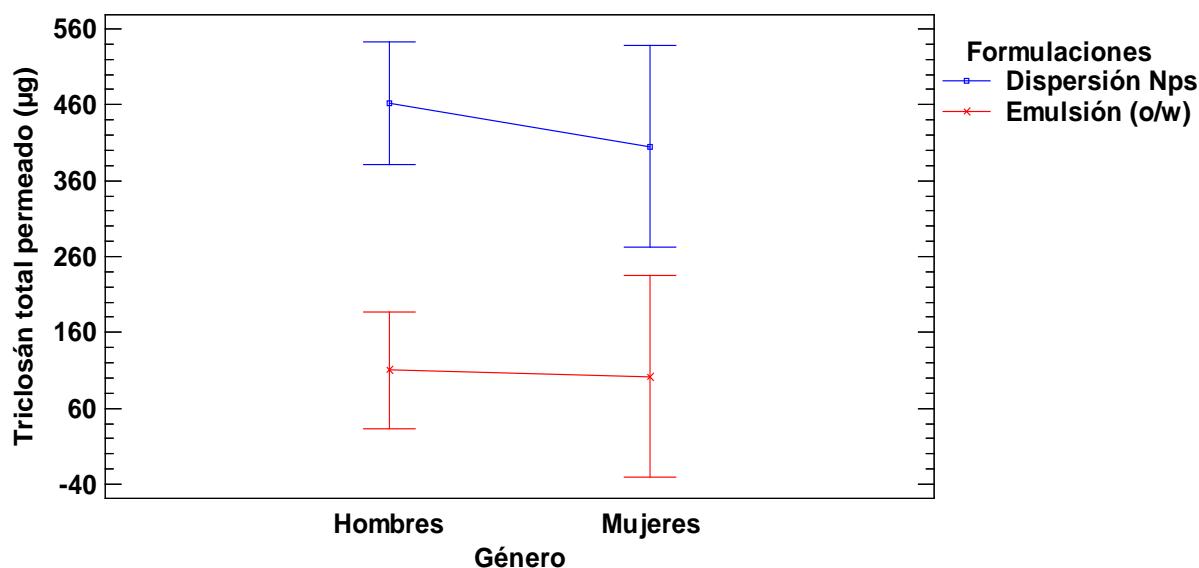
Género	Formulaciones	
	Emulsión (o/w)	Dispersión Nps
Hombres	110.009 $\pm$ 44.9351	536.319 $\pm$ 257.738
		462.31 $\pm$ 139.931 (removiendo dato anómalo)
Mujeres	101.82 $\pm$ 30.6258	405.286 $\pm$ 222.286

Analizando la cantidad de triclosán total permeada en los voluntarios por género, se puede concluir que ésta penetró igualmente tanto en las mujeres como en los hombres para cada una de las formulaciones (emulsión y dispersión de nanopartículas) como lo muestra el Cuadro 29 y la Figura 24 ( $P < 0.05$ , con un nivel de confianza del 95 %).

**Cuadro 29. Análisis de varianza (suma de cuadrados tipo III) para las cantidades totales de triclosán ( $\mu\text{g}$ ) obtenidas de cada voluntario por género en los estudios de permeación**

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
<b>MAIN EFFECTS</b>					
<b>A:Formulaciones</b>	476343.	1	476343.	35.64	0.0000
<b>B:Género</b>	4710.84	1	4710.84	0.35	0.5597
<b>INTERACTIONS AB</b>	2641.62	1	2641.62	0.20	0.6616
<b>RESIDUAL</b>	253915.	19	13363.9		
<b>TOTAL (CORRECTED)</b>	919916.	22			

All F-ratios are based on the residual mean square error.  
Statgraphics centurion XVI (v 16.1.11)



**Figura 24. Cantidad de triclosán total penetrada *in vivo* en los voluntarios por género tratados con las formulaciones probadas en los estudios de permeación.**

Asimismo, un análisis de las distancias totales de penetración de triclosán para cada voluntario por género se realizó (asumiendo normalidad), determinando que todas las

observaciones obtenidas venían de la misma distribución normal, excepto para las distancias totales de triclosán provenientes de un voluntario hombre y de una mujer tratados con la dispersión de Nps. Esos valores fueron removidos del conjunto de datos y un análisis estadístico se realizó con el resto de los datos para ambos casos. Los datos restantes resultaron provenir de la misma distribución normal (ver Anexo II). Las medias de las muestras y las desviaciones estándares de las distancias totales de penetración de triclosán en cada voluntario por género se incluyen en el Cuadro 30. Igualmente, el Cuadro 31 incluye un análisis de varianza en el cual la suma de cuadrados es de tipo III (la contribución de cada factor es medida habiendo removido los demás factores). Como los valores de P son mayores a 0.05, ninguno de los factores e interacciones tienen un efecto estadísticamente significativo sobre las distancias totales de penetración de triclosán con un nivel de confianza del 95 %. De aquí, se puede decir que la distancia total de penetración de triclosán en los voluntarios por género fue estadísticamente la misma tanto en las mujeres como en los hombres y en ambas formulaciones (emulsión y dispersión de nanopartículas) como lo muestra la Figura 25.

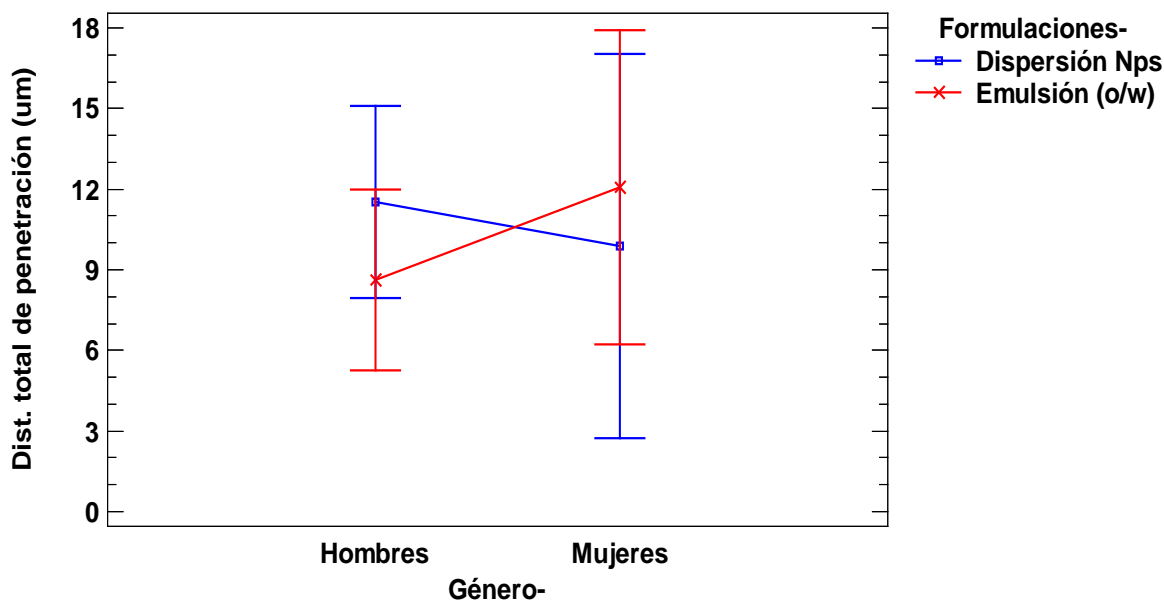
**Cuadro 30. Distancias totales de penetración de triclosán ( $\mu\text{m}$ ) en voluntarios agrupados por género**

Formulaciones		
Género	Emulsión (o/w)	Dispersión Nps
<b>Hombres</b>	$8.619 \pm 4.217$	$14.441 \pm$ and $9.467$
		$11.5237 \pm 3.859$ (removiendo dato anómalo)
<b>Mujeres</b>	$12.071 \pm 9.306$	$17.475 \pm 13.179$

**Cuadro 31. Análisis de varianza (suma de cuadrados tipo III) para las cantidades totales de triclosán ( $\mu\text{g}$ ) obtenidas de cada voluntario por género en los estudios de permeación**

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
<b>MAIN EFFECTS</b>					
<b>A:Formulaciones-</b>	0.45844	1	0.45844	0.02	0.8900
<b>B:Género-</b>	3.01237	1	3.01237	0.13	0.7234
<b>INTERACTIONS AB</b>	24.402	1	24.402	1.05	0.3198
<b>RESIDUAL</b>	419.665	18	23.3147		
<b>TOTAL (CORRECTED)</b>	466.815	21			

All F-ratios are based on the residual mean square error.  
Statgraphics centurion XVI (v 16.1.11)



**Figura 25. Distancia total de penetración de triclosán en los voluntarios por género tratados con las formulaciones probadas en los estudios de permeación.**

Los resultados anteriores indican que el fármaco utilizado penetró de igual manera tanto en hombres como en mujeres, siendo concordante, debido a que el pH es similar en ambos, y en consecuencia, la liberación del activo fue la misma [246]. Aunque ninguna diferencia fue observada por género sobre la permeabilidad de triclosán en este estudio, la alta cantidad del mismo obtenida en los estudios de permeación cuando se utilizó la dispersión de nanopartículas puede explicarse debido al pH natural de la piel. Esto se debe a que después de la aplicación de las nanopartículas en la piel, el fármaco pudo liberarse en forma gradual a partir de las nanopartículas al interior de la piel, cuando el polímero pudo equilibrarse con el pH. Esto es una ventaja sobre los mecanismos de liberación que se basan en fuerzas mecánicas o del control de la difusión, como ya fue explicado con anterioridad. De aquí, se puede decir que las nanopartículas cargadas con triclosán, pueden ser potencialmente eficaces para el tratamiento del acné, por acumularse en el sitio blanco (folículos pilosebáceos), por liberar el triclosán directamente en el sitio afectado y por evitar posibles efectos adversos, como los causados por agentes tensoactivos contenidos en la emulsión (o/w).

## 7. ESTUDIOS DE LA EFICACIA DEL TRICLOSÁN CONTRA LA BACTERIA “P. ACNES”

Para realizar los estudios de eficacia, se utilizó una cepa liofilizada de la bacteria *Propionibacterium acnes* NBRC 107605, misma que fue reactivada en caldo de agar cerebro corazón (BHI) y posteriormente fue sembrada en tubos de conservación con agar BHI y en placas con agar sangre de bovino hasta su uso, aislándola cuidadosamente en los subsecuentes cultivos (condiciones de incubación del cultivo en anaerobiosis, CO<sub>2</sub>, 37 °C

de 72-96 horas, Figura 26). Sin embargo, antes de determinar la actividad antimicrobiana de las formulaciones conteniendo triclosán contra *Propionibacterium acnes*, se identificaron las características coloniales, tintoriales, y morfológicas (tinción Gram, prueba de catalasa, prueba de indol, prueba de reducción de nitratos, prueba de hidrólisis de la gelatina y fermentación de carbohidratos) bacterianas. La identificación también propuso su análisis mediante el equipo Vitek 2-Compact (Biomerieux); sin embargo, es importante mencionar que debido a que la bacteria *Propionibacterium acnes* necesita condiciones especiales para su crecimiento como se mencionó anteriormente, no se pudo identificar por dicho equipo.



**Figura 26. Sembrado e incubación de la bacteria *P. acnes* en tubos de conservación bajo condiciones anaerobias.**

Los resultados obtenidos de la caracterización de la bacteria *Propionibacterium acnes* mediante pruebas bioquímicas primarias y secundarias son mostrados a continuación:

- *Características coloniales*

Con lo que respecta a las características coloniales, las colonias resultantes fueron pequeñas, de color blanco grisáceo, ligeramente mucosas, de bordes enteros, consideradas como *Propionibacterium* (Figura 27) [86].

- *Gram: (+)*

Se realizó la coloración Gram de los cultivos y se observaron bacilos delgados Gram positivo y cocos Gram positivo en pares, en agrupaciones de V y Y que se consideraron tentativamente como *Propionibacterium*. El cristal violeta actúa como un colorante primario, que se une a la pared bacteriana luego de un tratamiento con una solución de yodo (lugol); las bacterias Gram positivo por su naturaleza química retienen el cristal violeta aún después de una decoloración con alcohol-acetona y aparecen de color azul intenso (Figura 28). Las bacterias Gram negativo no son capaces de retener el cristal violeta debido a un mayor contenido lipídico en su pared después de la decoloración y se contracolorean de rojo con la safranina [86].

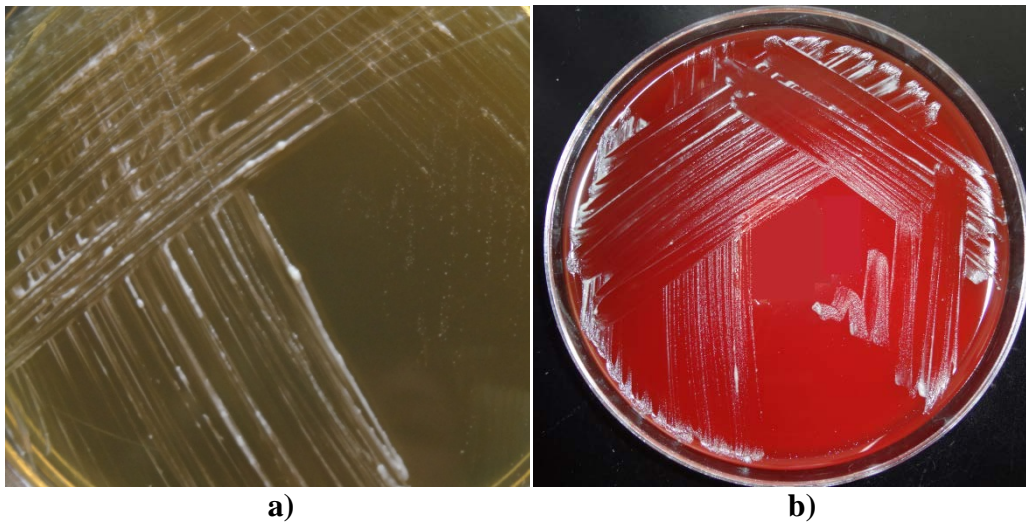


Figura 27. *P. acnés* en medio de cultivo; a) agar cerebro corazón (BHI) y b) agar sangre de bovino

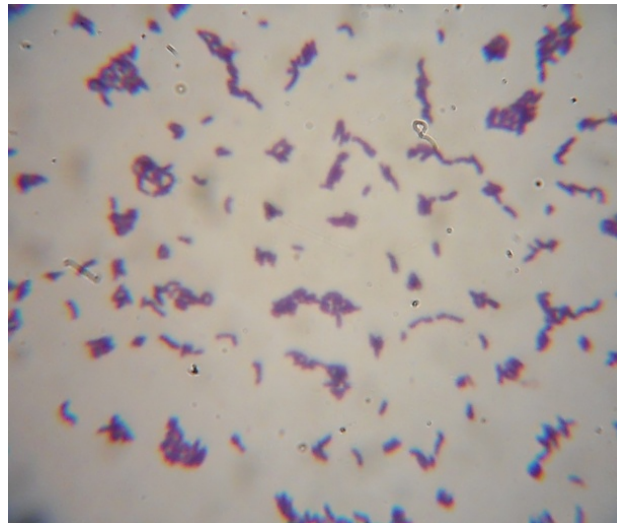


Figura 28. Morfología bacteriana. Tinción Gram para *Propionibacterium acnes*

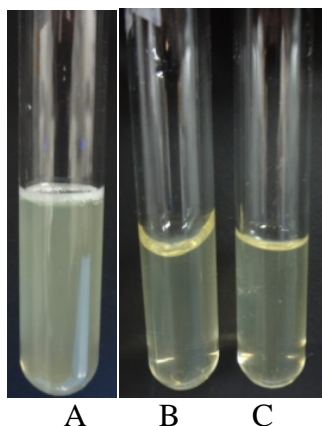
- *Catalasa*: (+)

En esta prueba, se determinó la transformación del peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno por la acción de la enzima catalasa contenida en la bacteria *P. acnes*, dando como resultado una prueba positiva [86].



- *Gelatina (+)*

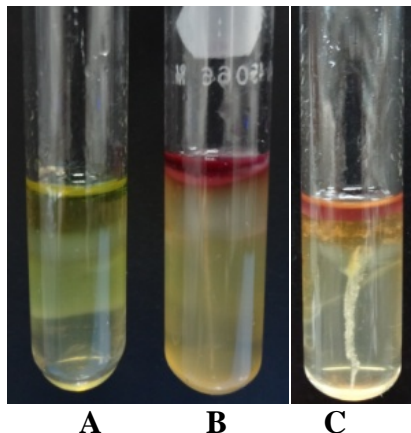
Para esta determinación, se inoculó en medio de gelatina una cepa de *Pseudomona aeruginosa* (utilizada como control positivo) y *Propionibacterium acnes*. También, se utilizó un blanco (medio de gelatina sin bacterias). Los resultados mostraron que la bacteria *Pseudomona aeruginosa* utilizó la enzima hidrolasa, produciendo una fuerte reacción de hidrólisis de la gelatina. Con lo que respecta a *Propionibacterium acnes*, esta bacteria también la utilizó, pero el grado de reacción fue menor (Figura 29) [86].



**Figura 29. Prueba de licuefacción de la gelatina: A) *Pseudomona aeruginosa*, B) *P. acnes* y C) Blanco.**

- *MIO:*
  - *Indol: (+)*
  - *Motilidad: (-)*
  - *Descarboxilación de la ornitina: (-)*

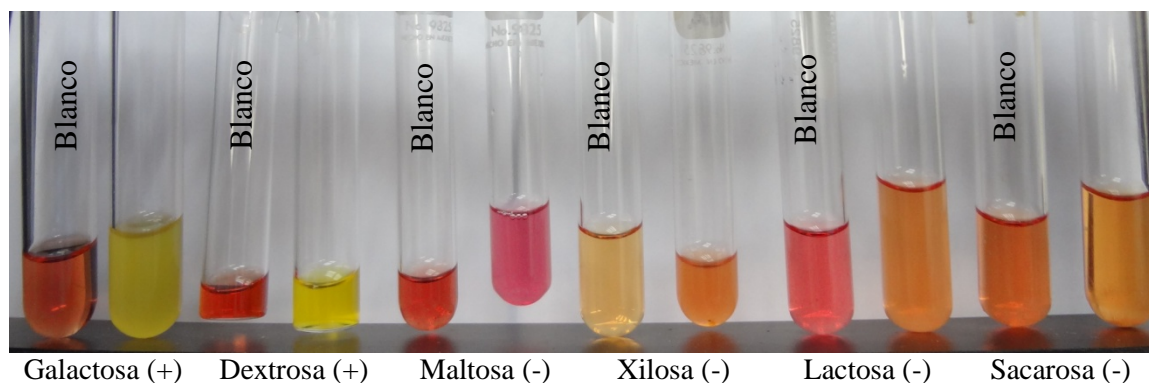
En esta prueba, se determinó la producción de indol a partir del aminoácido triptófano mediante la enzima triptofanasa; el indol se detectó por la reacción entre éste y el *p*-dimetilaminobenzaldehído (Reactivo de Kovac o Erlich) formando un complejo rojo como se ilustra en la Figura 30 [86]. Para esta prueba también se utilizó un control positivo (bacteria *E. coli*) y un blanco.



**Figura 30. Prueba de indol: A) Blanco, B) Control positivo (*E. coli*) y C) *P. acnes*.**

- *Fermentación de carbohidratos*

En este ensayo se determinó si la bacteria *P. acnes* era capaz de fermentar los carbohidratos contenidos en tubos de forma individual, detectando la formación de ácidos con la correspondiente disminución del pH. Los medios de cultivo contenían rojo de fenol el cual viró a amarillo con la acidulación del medio. La bacteria fermentó la galactosa y la dextrosa de forma determinante (Figura 31). En tanto que, la bacteria no fermentó la xilosa, la maltosa, la lactosa y la sacarosa, concordando con lo descrito en la literatura [86].

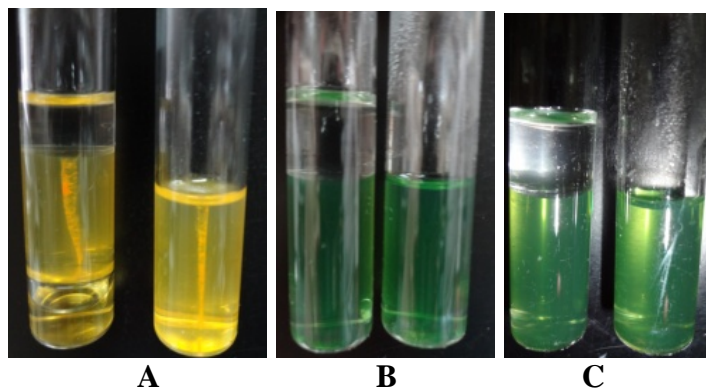


**Figura 31. Fermentación de carbohidratos.**

- *OF (Óxido-Fermentación)*

En esta prueba se determina si la glucosa es metabolizada por la bacteria por vía oxidativa o fermentativa, ya que se detecta la producción de ácidos en medios aerobio y anaerobio con la correspondiente disminución del pH y el vire del indicador azul de bromotimol de verde a amarillo.

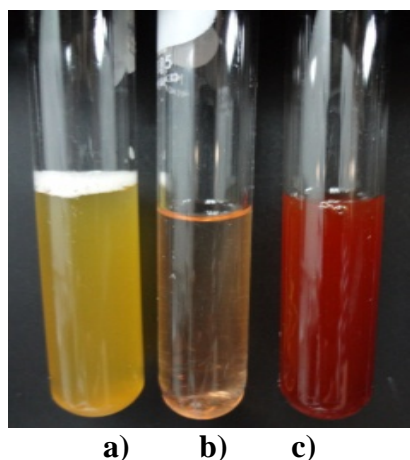
Como se observa en la Figura 32, se muestra un tubo conteniendo aceite mineral representando la atmosfera anaerobia y otro sin dicho aceite representando la atmosfera aerobia. En esta determinación se utilizó un control positivo que fue la bacteria *E. coli*, del cual se observó un cambio de color en ambos tubos, indicativo que la bacteria utiliza la glucosa en las dos atmósferas y se considera un microorganismo anaerobio facultativo. Con lo que respecta a la bacteria *P. acnes*, se observó una ligera disminución de la tonalidad, pero no hay evidencia que indique que la bacteria utilizó la glucosa en medio anaerobio. Lo anterior puede deberse a que la prueba no fue incubada por más tiempo, ya que la bacteria es de lento crecimiento o a que después de varios traspasos la bacteria se va adaptando a condiciones aérobicas como se indica en la literatura [86].



**Figura 32. Prueba de óxido-fermentación: A) *E. coli*; B) Blanco (medio sin bacterias); y C) *P.acnes*.**

- *Nitratos*: (+)

Este ensayo se utiliza para determinar si la bacteria es capaz de reducir los nitratos a nitritos o a nitrógeno molecular obteniendo oxígeno. Así, la obtención de un color rojo tras la adición de alfa naftilamina y ácido sulfanílico, ambos en ácido acético, indica la reducción de nitratos a nitritos por la formación de un colorante diazonio (p-sulfobenceno-azo-alfa-naftilamina), este resultado fue obtenido cuando se inoculó la bacteria *P. acnes* (Figura 33). Es importante mencionar que si después de la adición de dichos reactivos no hay cambio de coloración, no se debe descartar un resultado positivo, por lo cual es preciso adicionarle zinc. Si una vez que se ha adicionado zinc no hay cambio de coloración, el resultado es positivo debido a que la bacteria redujo los nitratos a nitrógeno molecular, este resultado se obtuvo cuando se inoculó en el medio la bacteria *E. Coli* usada como control positivo. Si después de la adición de zinc hay un cambio de coloración a rojo el resultado es negativo, debido a que el zinc redujo a los nitratos y no la bacteria en cuestión [86].

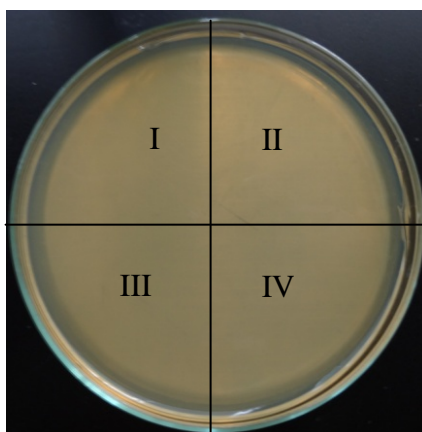


**Figura 33. Prueba de reducción de Nitratos. a) Control positivo con *E. coli* (medio adicionado de ácido sulfanílico y alfa naftilamina en ácido acético, además de zinc), b) Blanco adicionado de reactivos utilizados en el control positivo y c) *P. acnes* (medio adicionado de ácido sulfanílico y alfa naftilamina en ácido acético).**

De acuerdo a los resultados obtenidos en las pruebas de identificación bioquímicas, se puede decir que se confirmó que la bacteria utilizada fue *Propionibacterium acnes*. Una vez identificada la bacteria se procedió a determinar la eficacia de las formulaciones. Para ello se utilizó una microplaca estéril de 96 pozos, la cual se dosificó horizontalmente (12 pozos) de la siguiente manera:

- Pozo 1: 100µl de formulación (triclosán a 100, 20, 10 y 5 ppm) + 100µl de la bacteria.
- Pozos 2-9: Diluciones dobles consecutivas de la formulación+ 100µl de la bacteria.
- Pozo 10: Control de crecimiento (+): 100 µl de solución estéril + 100 µl de la bacteria en BHI
- Pozo 11: Blanco: 100 µl de solución estéril + 100 µl de caldo BHI. Control de esterilidad.
- Pozo 12: Control (-): 100 µl de solución estéril + 100 µl de formulación.

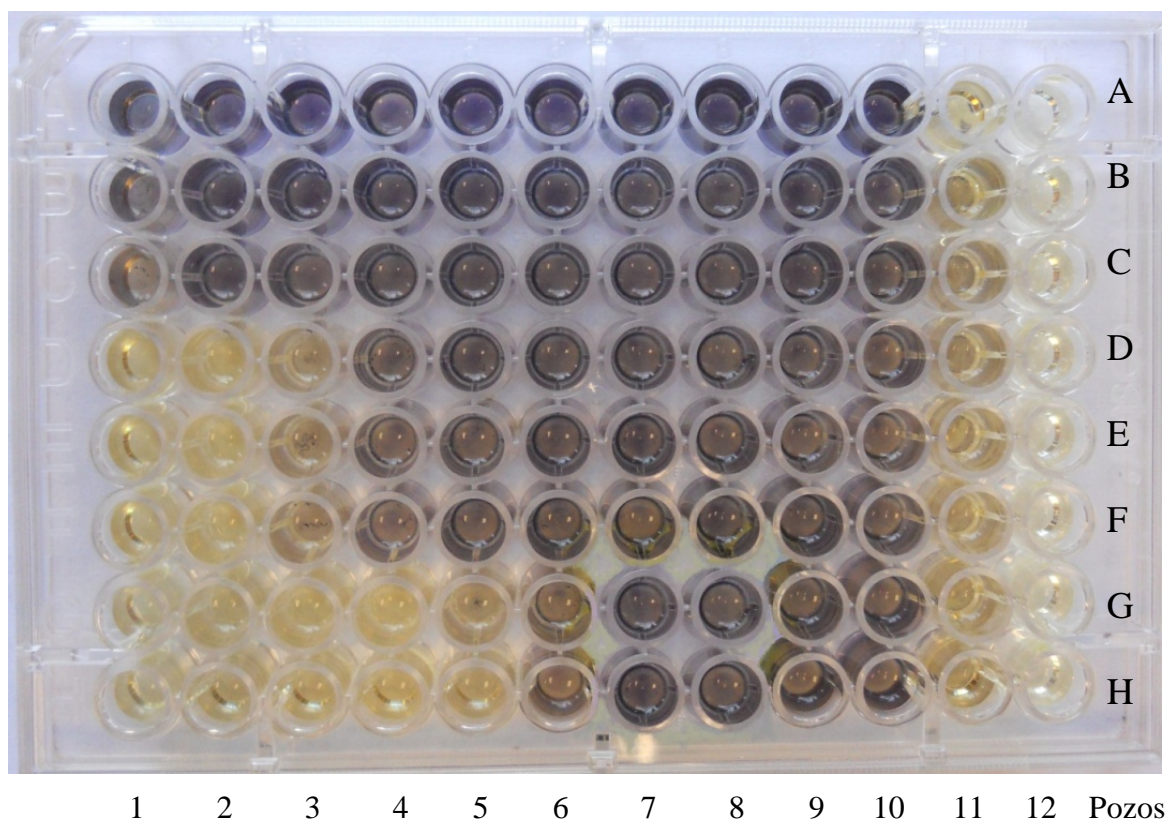
Para la determinación de la concentración mínima inhibitoria de las formulaciones conteniendo triclosán contra la bacteria antes mencionada ( $n \geq 4$ ), se realizaron pruebas de esterilidad en cada experimento (Figura 34).



**Figura 34. a) Prueba de esterilidad: I) Agua estéril; II) Solución de triclosán 100 ppm; III) Solución de triclosán 40 ppm y IV) Solución de triclosán 20 ppm.**

Los resultados para la determinación antimicrobiana de una solución acuosa de triclosán utilizando microplacas de 96 pozos se muestran en la Figura 35 y 36. Una vez que la solución del reactivo MTT (amarillenta) en su forma oxidada (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo) -2,5-difenil tetrazol) se añadió en los pozos, el reactivo se redujo en algunas muestras (color violeta) debido a la escisión del anillo tetrazol, que realizan las enzimas deshidrogenasas mitocondriales activas de células vivas. Las células muertas no causan este cambio. El cambio del material disuelto se midió espectrofotométricamente determinando la absorbancia como una función de la concentración del reactivo reducido y la MIC se determinó como aquella concentración en donde el crecimiento/inhibición y el cambio de color comenzaron a ocurrir [247]. Estos cambios pueden distinguirse claramente

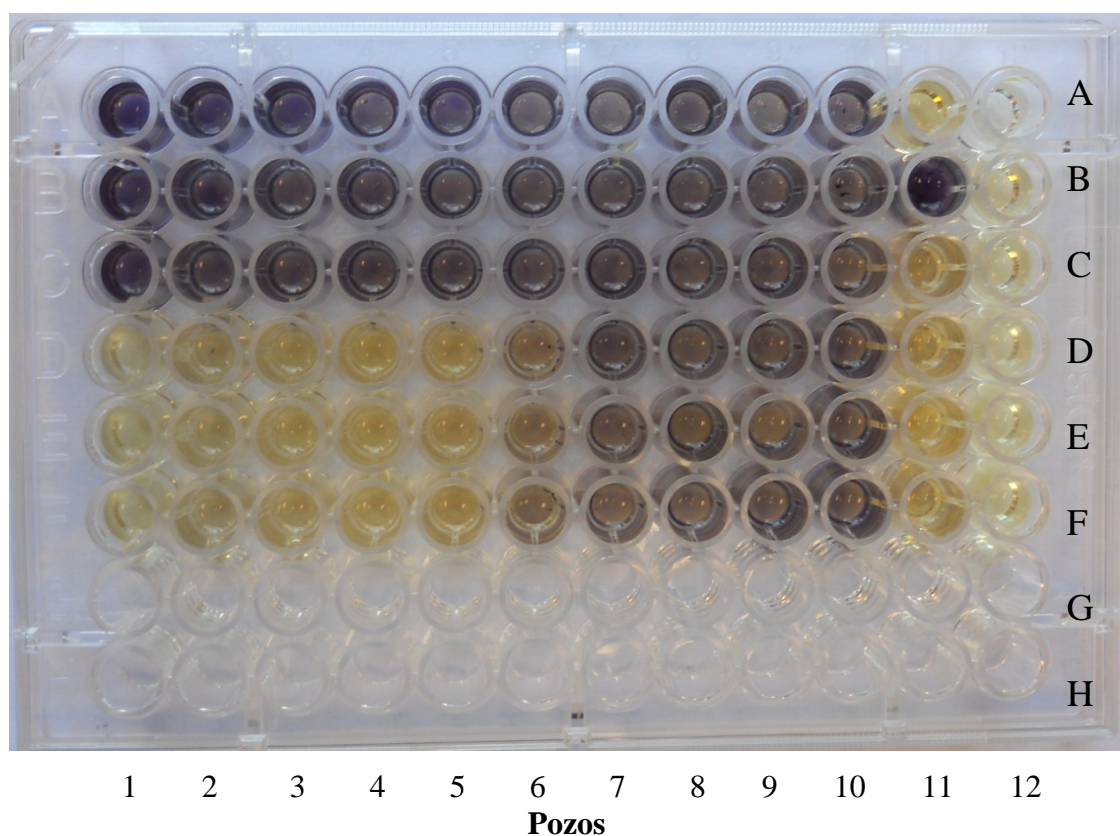
en los pozos de las microplacas, para la solución de triclosán de 50 ppm (pozos 4-5). Para dicha solución de concentración conocida, el valor MIC resultó ser de 6.25 ppm, como puede observarse en la Figura 37. Así, esta solución acuosa exhibió una actividad antimicrobiana contra *P. acnes* similar o mayor que la reportada en otros estudios utilizando un medio acuoso o disolviendo el fármaco con etanol [7, 8, 248].



**Figura 35. Actividad antimicrobiana contra *P. acnes* de una solución acuosa de triclosán realizada en microplacas de 96-pozos. La MIC fue determinada como la concentración en donde el crecimiento/inhibición empezó a ocurrir. A-C, pozo 1, solución de triclosán de 10 ppm con 2 % Transcutol (MIC-no determinada); D-F, pozo 1, solución de triclosán de 20 ppm con 3 % Transcutol (MIC-pozo 2); G-H, pozo 1, solución de triclosán de 50 ppm con 4 % Transcutol (MIC-pozo 4).**

Como es bien sabido, el fármaco triclosán es un compuesto insoluble en agua y con frecuencia se ha disuelto en etanol para determinar las actividades antimicrobianas ya sea de triclosán incluido en nanoacarreadores o de otros compuestos [7, 249]. No obstante, se ha reportado que el etanol tiene algunos efectos antimicrobianos sobre algunos microorganismos. En un estudio, se investigó la actividad del etanol sobre el crecimiento de *L. monocytogenes*, encontrando que para una concentración de 2.5% de etanol, se presentó una ligera inhibición del crecimiento, pero la bacteria fue casi completamente inhibida en la presencia del 5% de etanol. Ello sugiere que el etanol tiene el potencial como un agente

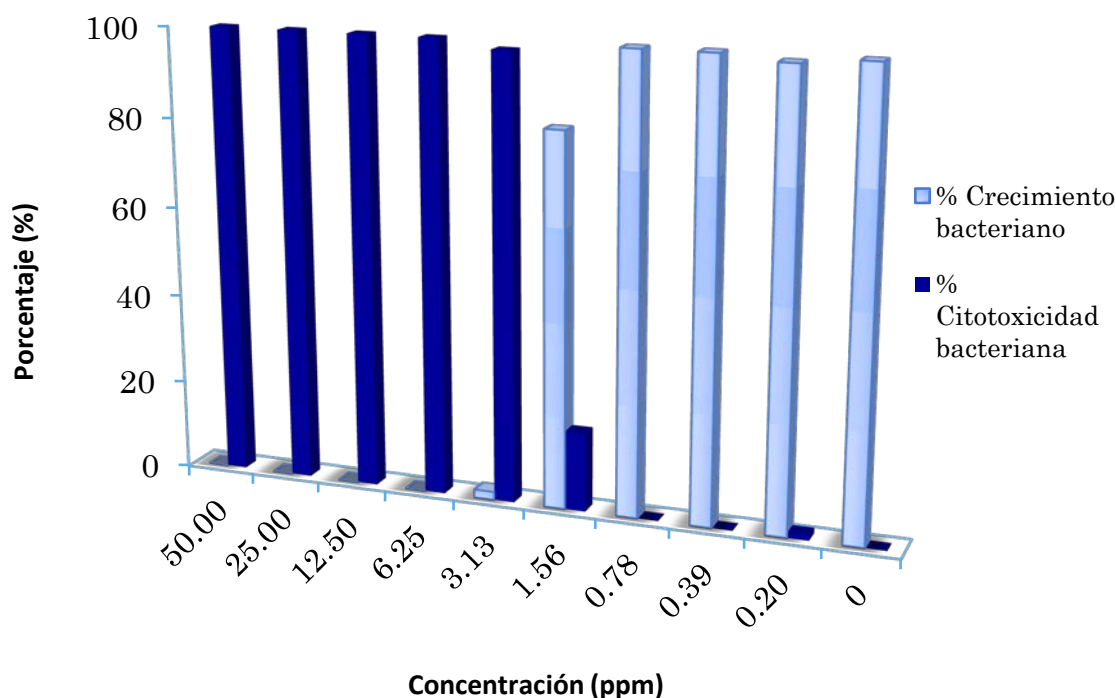
antimicrobiano [250]. También se ha encontrado, que otros alcoholes poseen propiedades deseables de desinfección, pero sólo unos pocos, tales como etanol y alcohol isopropílico, tienen algunas aplicaciones prácticas reales como tal. Los efectos inhibitorios sobre el crecimiento de muchas bacterias, levaduras y mohos requieren concentraciones de entre 4-8% de etanol en condiciones ordinarias de laboratorio. Además, en otro estudio se reportó, que el etanol exhibió una actividad antimicrobiana débil contra *Staphylococcus aureus subsp. Aureus*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* y *Proteus vulgaris* [251]. Dado lo anterior, la ventaja de utilizar Transcutol GC como solubilizante de triclosán, es que no se ha reportado tener actividad antimicrobiana y puede ser utilizado a fin de evitar alguna posible interferencia de la misma por otros componentes o disolventes en lugar de únicamente el fármaco. Con ese mismo fin, en este estudio se utilizó Transcutol GC al 2, 3 y 4% de concentración.



**Figura 36. Actividad antimicrobiana contra *P. acnes* de una solución acuosa de triclosán realizada en microplacas de 96-pozos. La MIC fue determinada como la concentración en donde el crecimiento/inhibición empezó a ocurrir. A-C, pozo 1, solución de triclosán de 5 ppm con 2 % Transcutol (Ninguna inhibición); D-F, pozo 1, solución de triclosán de 50 ppm con 4 % Transcutol (MIC-pozo 4).**

Es importante mencionar que muchas moléculas hidrofóbicas han sido incluidas dentro de nanopartículas poliméricas para entramparlas en ellas o para mejorar su solubilidad. En este sentido, la actividad antibacteriana de complejos de poloxamina

cargados con triclosán al 1% se investigó en un estudio. Los resultados mostraron que la solubilidad acuosa de triclosán se mejoró (hasta 4 órdenes de magnitud) por la incorporación del fármaco dentro de las micelas poliméricas de poloxamina, y un claro aumento de la actividad antibacteriana (expresada por una zona de inhibición más grande) de los complejos contra bacterias de un amplio espectro también se observó, mientras que la solución acuosa de triclosán no presentó ninguna actividad antibacteriana [252]. Resultados similares se obtuvieron para complejos de lisozima-triclosán, los cuales mostraron una fuerte actividad bactericida en una forma dependiente de la dosis, con un aumento en la proporción molar de triclosán con respecto a la lisozima. El triclosán sin estar complejado, también mostró nula actividad en cualquier proporción molar contra la bacteria [248]. Los resultados obtenidos en este estudio concuerdan con los reportados en literatura, ya que las soluciones de triclosán de concentraciones 5, 10 y 20 ppm realizadas solubilizando el fármaco con 2 y 3% de Transcutol CG (porcentaje menor que en la solución de 50 ppm), presentaron valores de MIC mayores que para la solución de triclosán (50 ppm) en donde se utilizó un 4% del cosolvente (Figura 37). Lo anterior sugiere que el triclosán no fue solubilizado en su totalidad y consecuentemente la actividad antimicrobiana fue menor en aquellas soluciones con menor cosolvente.



**Figura 37. Porcentajes de crecimiento/inhibición bacteriana contra *P. acnes* de una solución acuosa de triclosán de 50 ppm con 4 % Transcutol, después de la adición del reactivo MTT. La MIC fue determinada como la concentración en donde el crecimiento /inhibición empieza a ocurrir (MIC-6.25 ppm).**

Con el fin de mostrar actividad farmacológica, el fármaco debe ser liberado desde el reservorio al medio. A simple vista, una interacción del fármaco-núcleo polimérico podría reducir la actividad antibacteriana si el fármaco permanece secuestrado en el núcleo del reservorio. Este tipo de interacción del triclosán y del polímero (Eudragit® E 100) mencionada previamente, probablemente se produjo en las nanopartículas cargadas con triclosán, ya que no se observó ninguna actividad antimicrobiana contundente contra *P. acnes* (datos no mostrados). Adicionalmente, las condiciones de los medios contenidos en los pozos no simulaban del todo a las de la piel para permitir una aceptable liberación del fármaco a partir de las nanoesferas y su subsecuente actividad y solubilidad en los medios de cultivo. Las condiciones que son controladas por la piel, muestran un pH específico oscilante entre 4-6 dependiendo del estado del cuerpo, y de las condiciones ambientales. Este manto ácido natural de la piel está dado por las diferentes fuentes de ácidos que la componen: (1) ácido láctico y aminoácidos a partir de productos de la descomposición del sudor, (2) ácidos grasos formados de la descomposición del sebo, y (3) aminoácidos a partir de la queratinización. Estos componentes estuvieron ausentes en los medios de cultivo y, por tanto, resultaron ser, un medio no adecuado para la liberación del fármaco desde los nanosistemas y su subsecuente solubilización, con el fin de obtener una actividad antimicrobiana [246, 253].

Resultados similares se obtuvieron para la emulsión (o/w) conteniendo triclosán (disponible en el mercado), la actividad antibacteriana escasa o nula podría ser atribuible a la alta viscosidad y lipofiliidad de la crema que fue difícil de mezclar en los medios de cultivo, así como la pobre liberación y disolución del fármaco en los mismos, como se explicó anteriormente.

Algunos estudios han reportado tener buena actividad antibacteriana de sus fármacos o formulaciones, pero han utilizado ya sea etanol para disolver el triclosán y los excipientes de los acarreadores. Esto genera controversia puesto que se sugiere el uso de soluciones acuosas para dispersar las formulaciones convencionales en la determinación de actividades antimicrobianas de fármacos o formulaciones, para evitar posibles interferencias de otros compuestos.

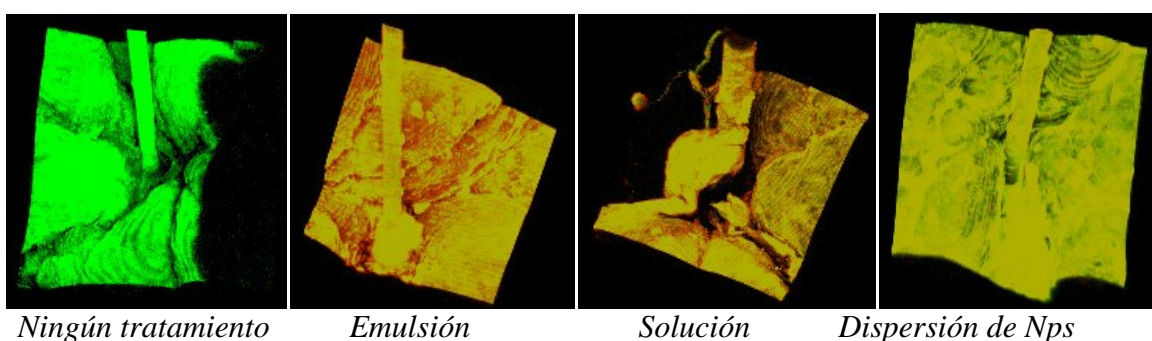
### **8. ESTUDIO DE LA DISTRIBUCIÓN Y LA LOCALIZACIÓN DE LAS NANOPARTÍCULAS EN LA PIEL**

Un tratamiento eficiente para el acné requiere de la localización del sistema acarreador en el sitio blanco (unidad pilosebácea), por lo tanto, la visualización de las nanopartículas poliméricas en la piel porcina y humana se estudió por microscopía confocal y multifotónica. Estas técnicas son las herramientas más comunes usadas para evaluar la penetración de las nanopartículas, la liberación de fármacos, la toxicidad o la localización de los mismos.

Los resultados obtenidos mediante microscopía de dos fotones cuando la piel abdominal humana fue tratada con las formulaciones (solución, emulsión y dispersión de nanopartículas) conteniendo el colorante rojo de nilo (similar al triclosán en cuanto a



lipofilia) durante 1, 8 y 24 horas de tiempo de contacto son mostrados en las Figuras 38, 40-44. De estos estudios se obtuvieron imágenes tridimensionales de la superficie de la piel específicamente en la zona folicular, en la que se observó una tinción verde en las muestras blanco (sin tratamiento), correspondiente a la autofluorescencia de la piel. Del mismo modo, se observó una tinción amarillenta de intensidad variable en la piel que fue tratada con las diferentes formulaciones, procedente de la combinación de los colores verde y rojo (color emanante del colorante rojo de nilo que fue incluido en las formulaciones, Figuras 38, 43). Esta coloración amarillenta se apreció mayoritariamente alrededor de los canales foliculares de la piel y su intensidad fue mayor cuando ésta fue tratada con la emulsión y con la dispersión de nanopartículas para todos los tiempos de contacto en los estudios de permeación, indicativo de que existe una buena afinidad del colorante y/o los excipientes de las formulaciones señaladas con los componentes más superficiales de la piel.



**Figura 38. Imágenes tridimensionales xyz de secciones de piel humana con la localización en la zona folicular, tratadas con diferentes formulaciones conteniendo rojo de nilo durante 1 hora de tiempo de contacto en los estudios de permeación. Las micrografías fueron obtenidas mediante la técnica de microscopía dos fotones (filtros de autofluorescencia de la piel: 494-549 nm (919) y de rojo de nilo: 567-674 nm (878)).**

La capacidad de penetración del colorante rojo de nilo se determinó con la ayuda de imágenes ortogonales en las cuales se pudo observar y determinar la entrada del folículo piloso en la piel, como se muestra en la Figura 39. Así, la fluorescencia emitida del canal rojo procedente de cada muestra de piel tratada con las formulaciones fue semicuantificada, mostrando que dicho colorante incluido en la dispersión nanoparticulada logró penetrar con mayor intensidad a una mayor profundidad, que cuando fue incluido en el resto de las formulaciones. No obstante, estos resultados son una aproximación de dicha capacidad, puesto que los resultados pueden variar al analizar folículos en diferentes fases de crecimiento, las cuales no fue posible distinguir por este procedimiento (Figuras 40, 42 y 44). Además, es importante señalar, que las micrografías obtenidas para cada tiempo de contacto durante los estudios de permeación utilizando piel humana, fueron adquiridas con un potencial del láser diferente, para reducir la hipersaturación de color en algunas muestras y obtener imágenes con mejores resoluciones.

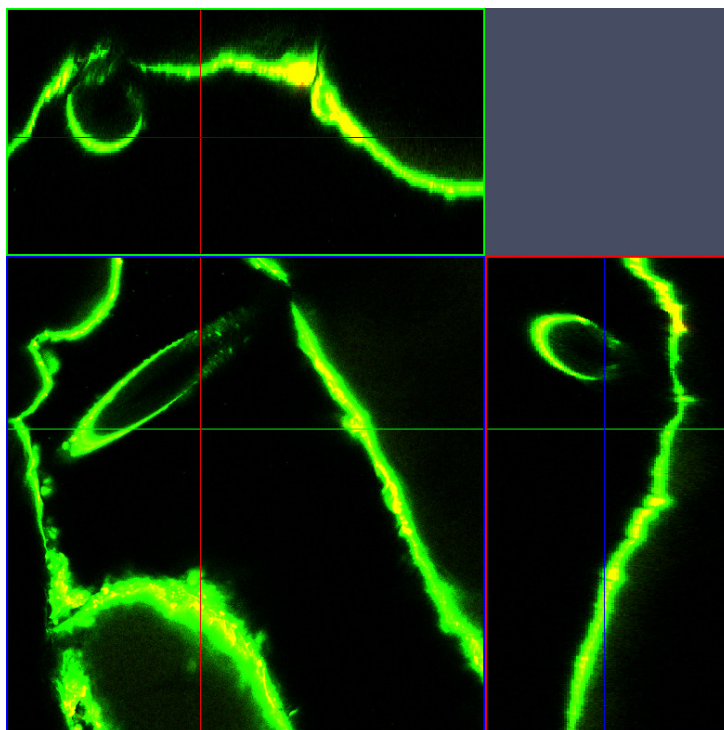


Figura 39. Imagen ortogonal de piel de oreja porcina tratada con la dispersión nanoparticular conteniendo rojo de nilo durante 8 horas de tiempo de contacto en los estudios de permeación. La micrografía obtenida mediante la técnica de microscopía de dos fotones muestra el inicio del folículo en los cortes transversales de la piel (filtros de autofluorescencia de la piel: 494-549 nm (797) y de rojo de nilo: 567-674 nm (490)).

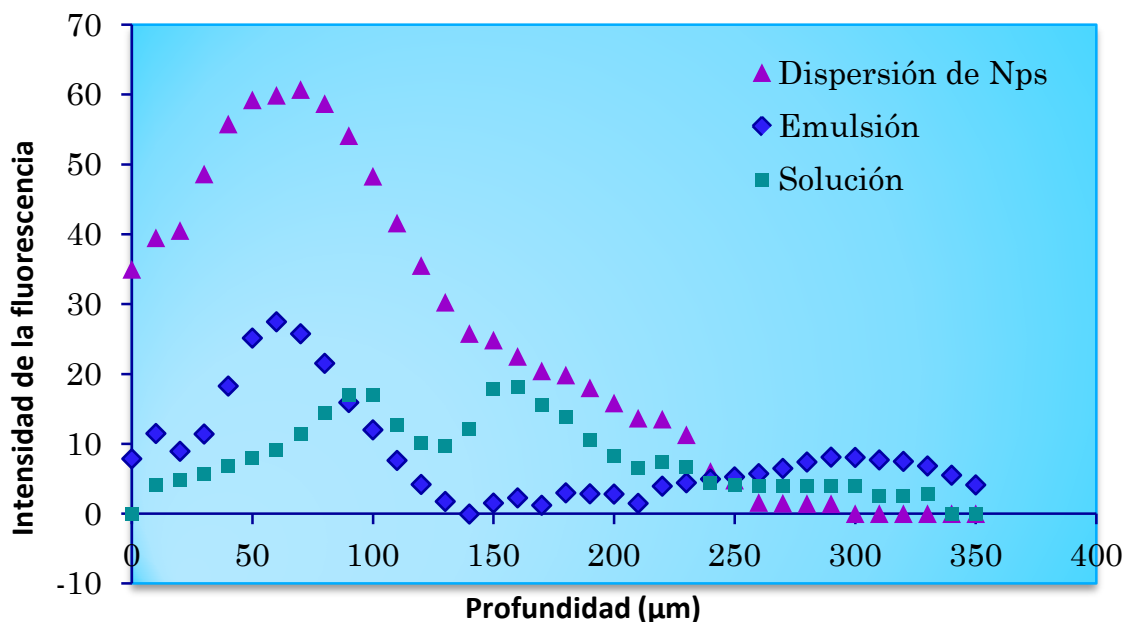
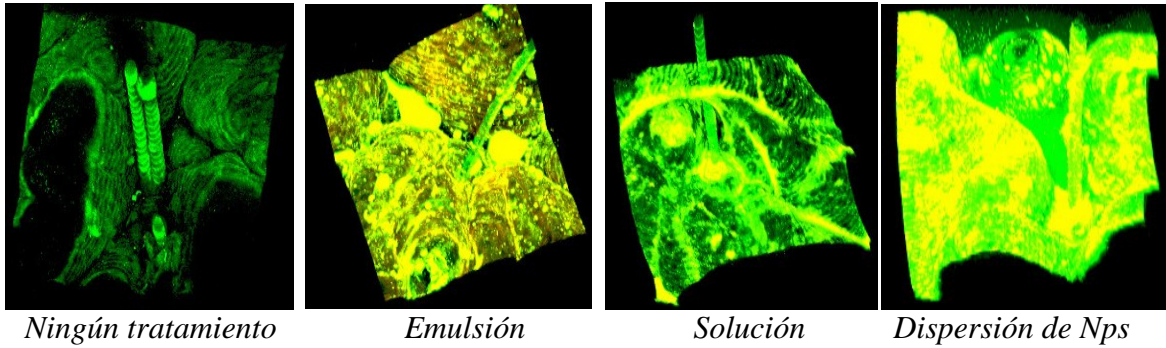
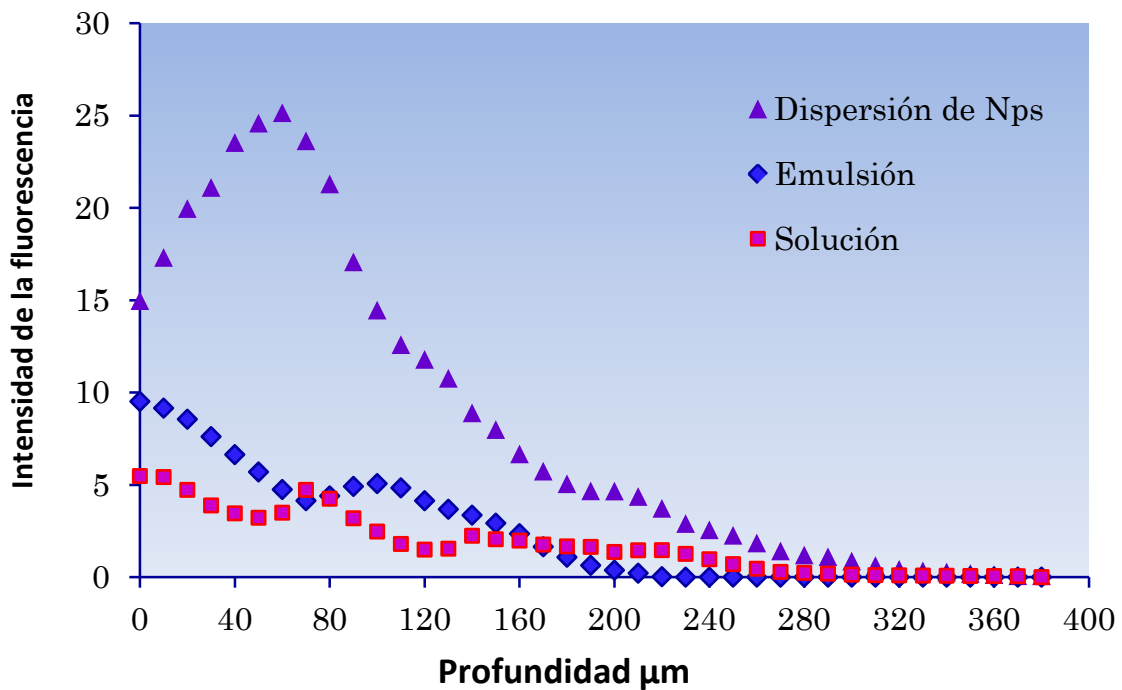


Figura 40. Intensidad de la fluorescencia del colorante rojo de nilo contenido en las formulaciones a diferentes intervalos de profundidad en la zona folicular de la piel humana (Tiempo de contacto en los estudios de permeación: 1 hora).



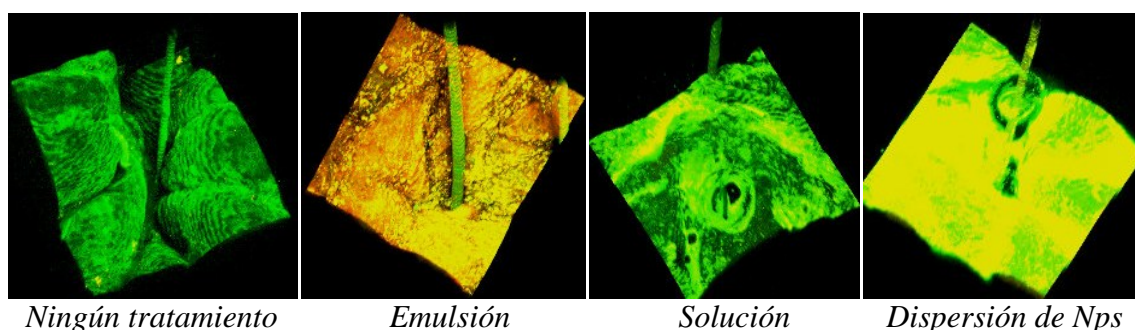
**Figura 41.** Imágenes tridimensionales xyz de secciones de piel humana con la localización en la zona folicular, tratadas con diferentes formulaciones conteniendo rojo de nilo durante 8 horas de tiempo de contacto en los estudios de permeación. Las micrografías fueron obtenidas mediante la técnica de microscopía de dos fotones (filtros de autofluorescencia de la piel: 494-549 nm (797) y de rojo de nilo: 567-674 nm (490)).



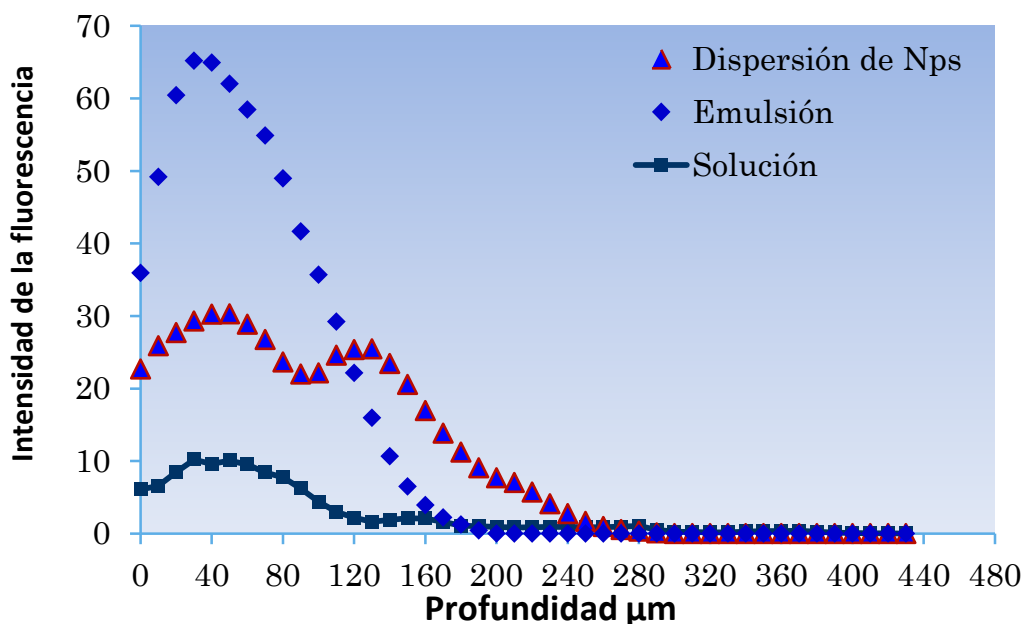
**Figura 42.** Intensidad de la fluorescencia del colorante rojo de nilo contenido en las formulaciones a diferentes intervalos de profundidad en la zona folicular de la piel humana (Tiempo de contacto en los estudios de permeación: 8 horas).

A pesar de haber obtenido semicuantificaciones de fluorescencia debida al colorante encapsulado o incluido en las formulaciones, resultados interesantes se obtuvieron mediante la técnica de microscopía de dos fotones cuando la piel abdominal humana fue

tratada durante 24 horas en los estudios de permeación. En la Figura 43 se aprecia que el rojo de nilo se concentró en la superficie de la piel cuando ésta fue tratada con la emulsión (o/w), mostrando una coloración ligeramente rojiza. Este resultado se corrobora en la gráfica de la Figura 44, en la cual se apreció que la fluorescencia del colorante rojo de nilo incluido en la emulsión (o/w) fue más alta solo en las primeras capas de la piel mientras que la fluorescencia procedente de la dispersión nanoparticulada se distribuyó más homogéneamente en la piel y fue mayor en capas más profundas de la misma.



**Figura 43.** Imágenes tridimensionales xyz de secciones de piel humana con la localización en la zona folicular, tratadas con diferentes formulaciones conteniendo rojo de nilo durante 24 horas de tiempo de contacto en los estudios de permeación. Las micrografías fueron obtenidas mediante la técnica de microscopía de dos fotones (filtros de autofluorescencia de la piel: 494-549 nm (797) y de rojo de nilo: 567-674 nm (500)).



**Figura 44.** Intensidad de la fluorescencia del colorante rojo de nilo contenido en las formulaciones a diferentes intervalos de profundidad en la zona folicular de la piel humana (Tiempo de contacto en los estudios de permeación: 24 horas).

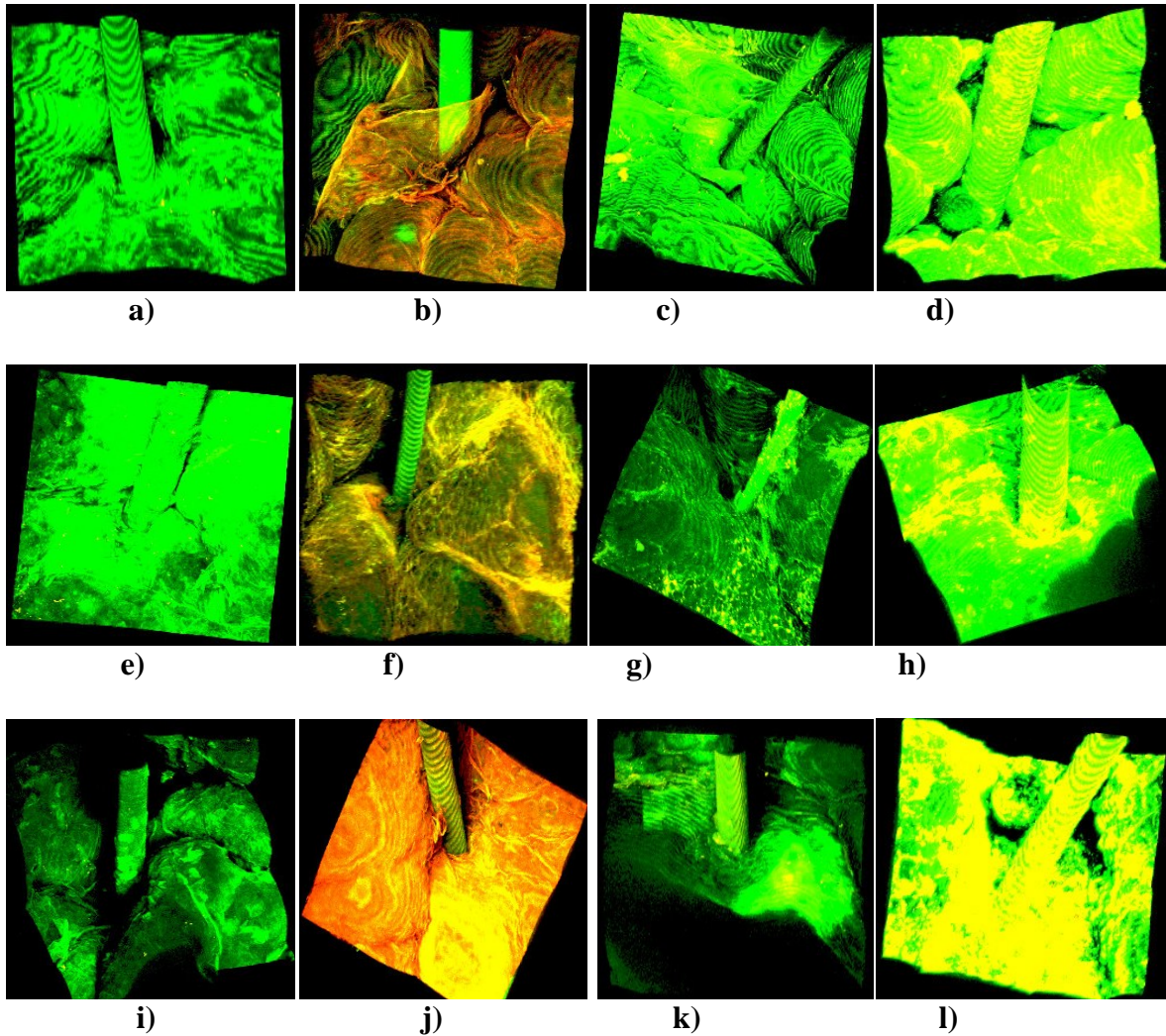
Los resultados anteriores para piel abdominal humana concuerdan con los obtenidos utilizando piel porcina mediante la técnica de microscopía de dos fotones. Estos últimos se llevaron a cabo utilizando tres diferentes potenciales del láser para el canal del rojo de nilo en todas las muestras. Para efectos de comparación las Figuras 45 y 46 sólo muestran los resultados utilizando el poder del láser más alto.

Una tendencia evidente puede observarse en las micrograffías de la Figura 45 para todos los tiempos de contacto en los estudios de permeación, en donde el colorante rojo de nilo se retuvo mayoritariamente en la superficie de la piel porcina (epidermis) cuando éste fue incluido en la emulsión (o/w). Una concentración del colorante más homogénea en la superficie de la piel se observó cuando se utilizó la dispersión de las nanopartículas y la solución, aunque esta última en mucho menor proporción. Al igual que en los estudios con piel abdominal humana, se semicuantificó la intensidad de fluorescencia para todas las muestras utilizando piel de oreja porcina mediante microscopía de dos fotones.

La Figura 46 muestra que la emulsión (o/w) conteniendo el colorante rojo de nilo liberó el fluoróforo a través del estrato córneo hacia el estrato granuloso durante la primera y las 8 horas de una manera constante, liberando una cantidad mayor a las 24 horas. Esta fue la mayor cantidad de fluorescencia encontrada y semicuantificada en las capas más superficiales de la piel porcina en imágenes en el plano Z, seguida por la dispersión de nanopartículas y por la solución saturada con rojo de nilo. Esta penetración intercelular también se observó y confirmó en las micrograffías de las Figura 47, 48 y 49.

Una explicación razonable a este comportamiento puede ser obtenida al analizar el fluoróforo. El colorante rojo de nilo es conocido por tener afinidad a los lípidos intercelulares y a los disolventes lipofílicos; por lo tanto, éste fue capaz de teñir e introducirse en los componentes hidrófobos de la emulsión y de la piel. La alta fluorescencia obtenida de las capas superiores de la piel cuando ésta fue tratada con la emulsión, pudo deberse a la distribución de la emulsión intacta, o más probablemente a la difusión del rojo de nilo fuera de la emulsión, durante su paso a través del estrato córneo.

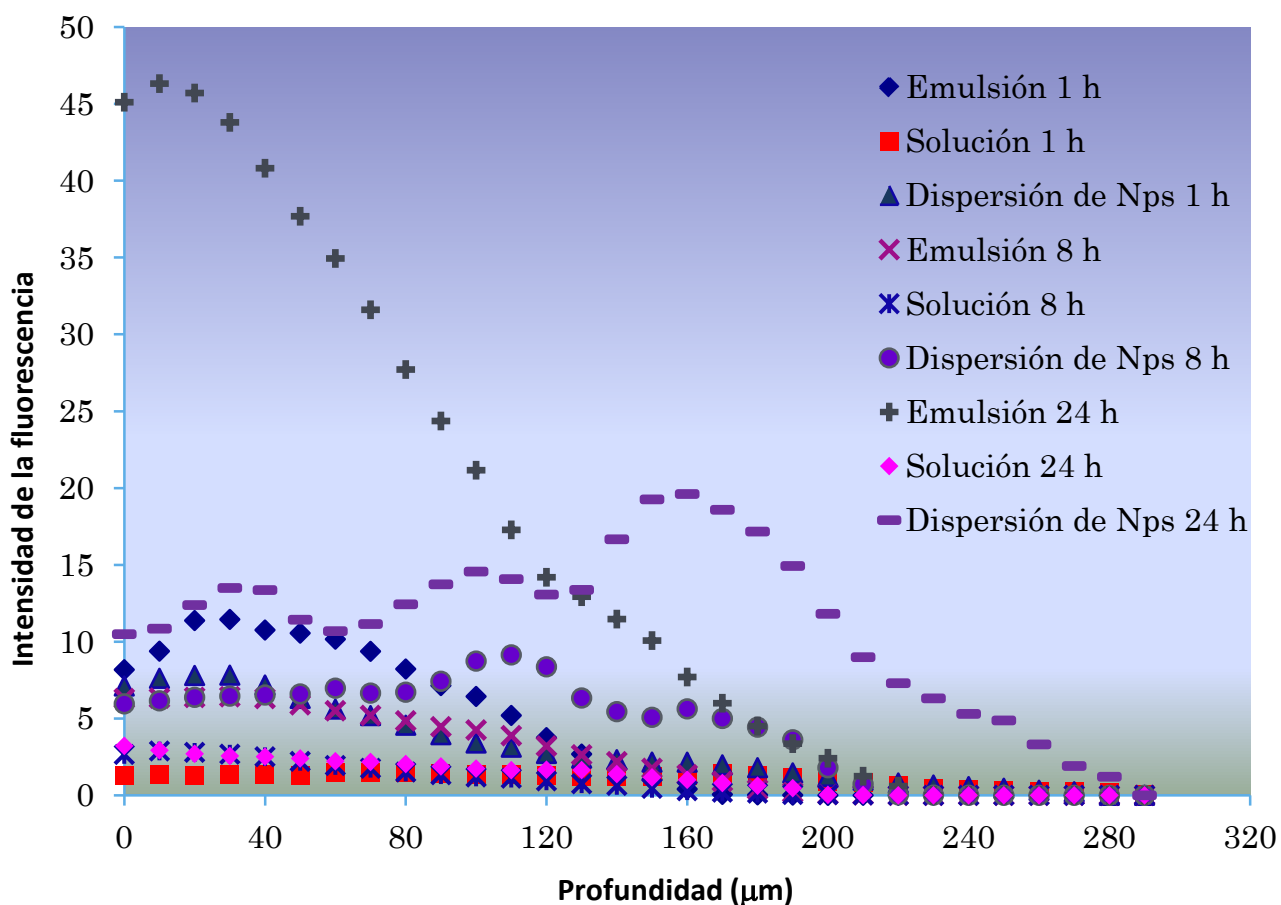
Como se discutió anteriormente, los excipientes de la emulsión también pudieron actuar como promotores o potenciadores de la penetración, aún cuando no se tiene la intención de que actúen como tal. Los promotores de la penetración tales como los tensoactivos contenidos en la emulsión, pudieron mezclarse con el colorante o con los lípidos del estrato córneo y/o alterar su organización. También, éstos pudieron extraer parte de los lípidos del estrato córneo de la piel, modificando la barrera del estrato córneo [254]. Ésto sugiere que las vías lipídicas fueron las principales vías de penetración para la emulsión (o/w). Además del efecto promotor de la absorción generado por los tensoactivos, la crema probada en este trabajo, contuvo un limpiador dermoabrasivo con partículas de óxido de aluminio, que también pudieron contribuir a la penetración del fluoróforo.



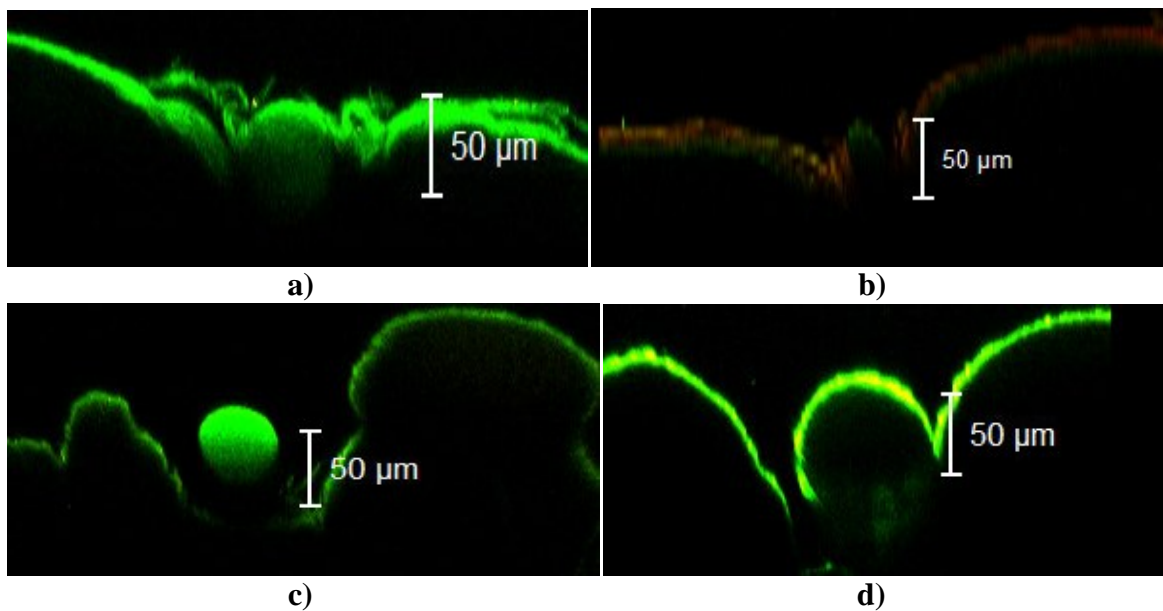
**Figura 45. Imágenes tridimensionales xyz de secciones de piel de oreja porcina con la localización en la zona folicular, tratadas con diferentes formulaciones conteniendo rojo de nilo durante 1(a-d), 8 (e-h) y 24 (i-l) horas de tiempo de contacto en los estudios de permeación. Muestras de piel a), e), i): ningún tratamiento; b), f), j): emulsión (o/w) *Dermobras*; c), g), k): solución saturada; y d), h), l): dispersión de nanopartículas). Las micrografías fueron obtenidas mediante la técnica de microscopía de dos fotones (filtros de la autofluorescencia de la piel: 494-549 nm (753) y de rojo de nilo: 567-674 nm (490)).**

La actividad de los ingredientes activos se realiza cuando alcanzan el sitio de acción, en muchos casos, los ingredientes activos son capaces de tener un efecto en la piel y entrar en las capas superiores, como lo que se obtuvo con el rojo de nilo contenido en la emulsión probada en este estudio. Sin embargo, en este caso, el sitio de acción ideal para que el fármaco tenga un efecto, es la zona folicular. De aquí que muchos sistemas de

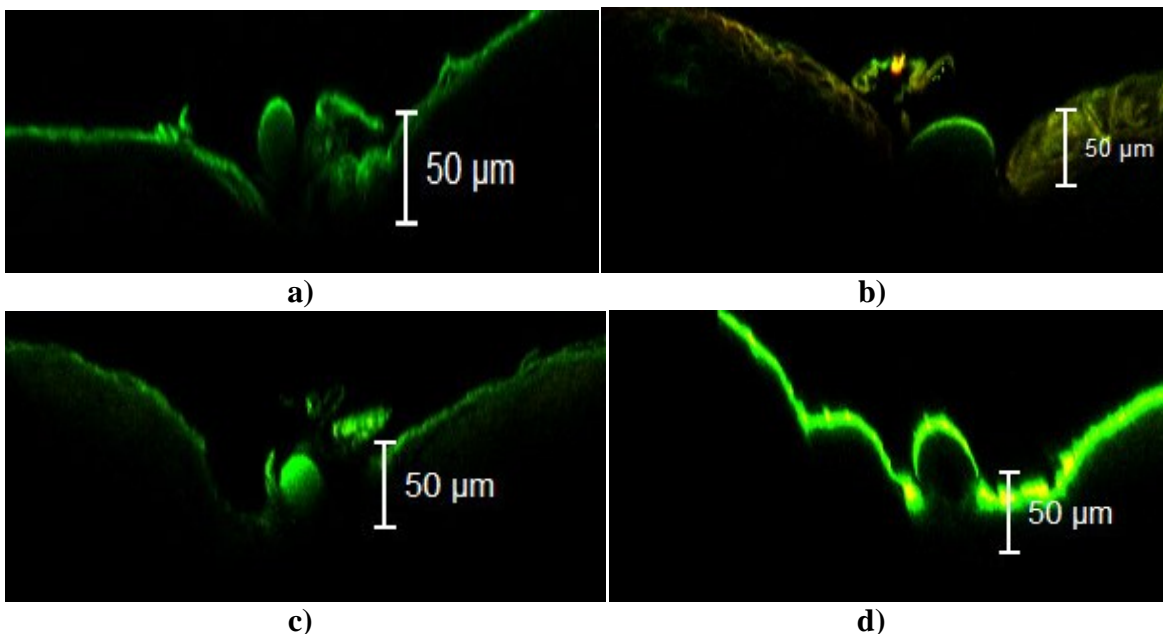
encapsulación se han desarrollado para influir sobre el perfil de penetración de los ingredientes activos. Analizando los promedios de las intensidades de fluorescencia contra la profundidad de los planos z (Figura 46), es evidente que la más alta fluorescencia del rojo de nilo determinada en las zonas más profundas de la piel porcina (zona folicular), se encontró cuando ésta fue tratada con la dispersión de nanopartículas. Esta capacidad de penetración del sistema de encapsulación con rojo de nilo (sensible al pH), fue claramente observada en los folículos de la piel porcina y humana (micrografías tomadas por la técnica de microscopía confocal) principalmente a las 24 horas (Figuras 47-51).



**Figura 46.** Intensidad de la fluorescencia del colorante rojo de nilo contenido en las diferentes formulaciones a diferentes intervalos de profundidad en la zona folicular de la piel porcina (Tiempos de contacto en los estudios de permeación: 1, 8 y 24 horas).

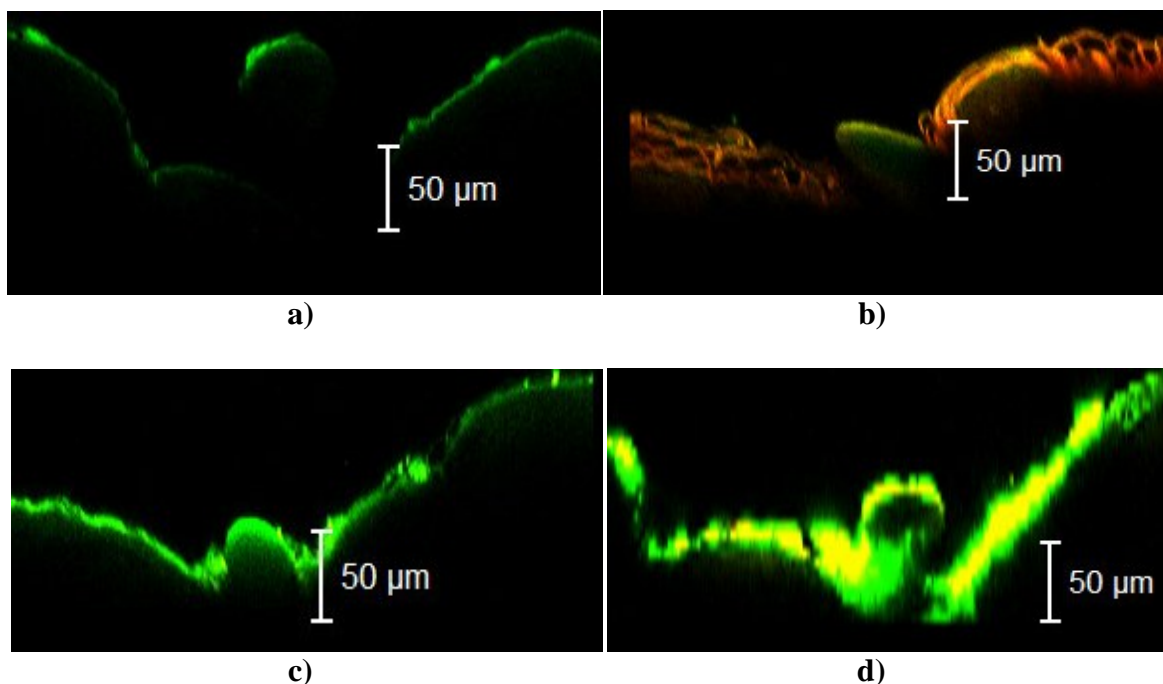


**Figura 47.** Imágenes de secciones ortogonales xz de piel de oreja porcina tratada con las formulaciones conteniendo rojo de nilo y subsecuentemente teñidas con azul de Hoechst. Tratamientos aplicados en el tejido durante 1 hora en los estudios de permeación: a) sin ningún tratamiento, b) emulsión (o/w), c) solución y d) dispersión de nanopartículas. Micrografías tomadas mediante microscopía de dos fotones.



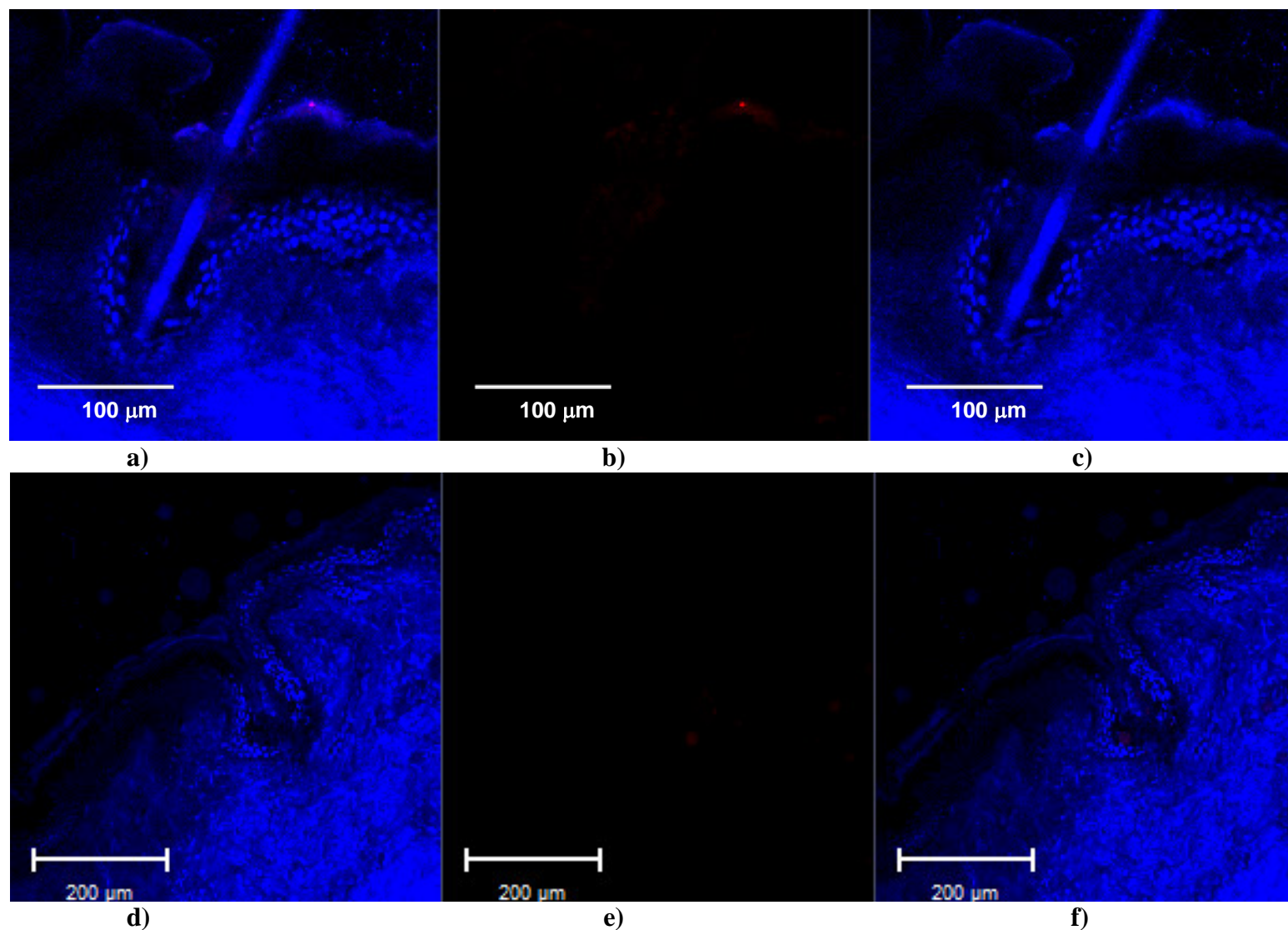
**Figura 48.** Imágenes de secciones ortogonales xz de piel de oreja porcina tratada con las formulaciones conteniendo rojo de nilo y subsecuentemente teñidas con azul de Hoechst. Tratamientos aplicados en el tejido durante 8 horas en los estudios de permeación: a) sin ningún tratamiento, b) emulsión (o/w), c) solución y d) dispersión de nanopartículas. Micrografías tomadas mediante microscopía de dos fotones.



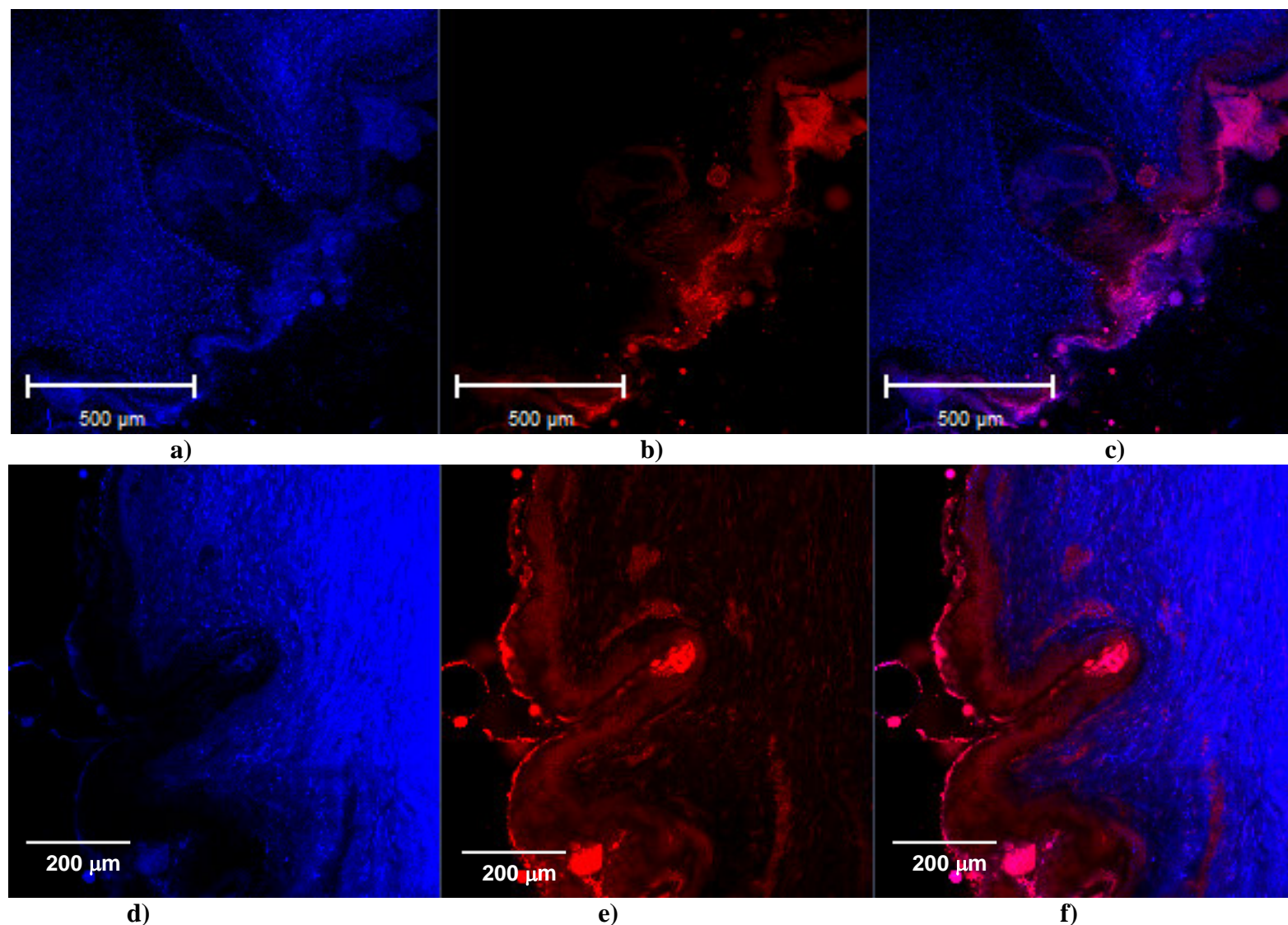


**Figura 49. Imágenes de secciones ortogonales xz de piel de oreja porcina tratada con las formulaciones conteniendo rojo de nilo y subsecuentemente teñidas con azul de Hoechst. Tratamientos aplicados en el tejido durante 24 horas en los estudios de permeación: a) sin ningún tratamiento, b) emulsión (o/w), c) solución y d) dispersión de nanopartículas. Micrografías tomadas mediante microscopía de dos fotones.**

Para analizar el grado de penetración del fluoróforo en los folículos pilosos humanos es preciso señalar que la estructura de éstos se divide en: el infundíbulo (la parte entre la superficie de la piel y el punto de la abertura del conducto de la glándula sebácea, en el canal folicular); el istmo (entre la apertura del conducto de la glándula sebácea y la región que se ensancha); la zona de suprabulbar, en donde varias capas de folículos en fase anágena comienzan a diferenciarse; y el bulbo del folículo piloso, con la papila dérmica conectada a los vasos sanguíneos [255]. El colorante rojo de nilo incluido en las nanopartículas poliméricas fue encontrado en el acroinfundíbulo (la parte superficial del infundíbulo del folículo piloso) y en la parte inferior del infundíbulo, llamado el infrainfundíbulo a partir de las 8 horas de los estudios de permeación (Figura 51), en donde ya se ha reportado una pérdida continua de la diferenciación epidérmica hacia el istmo, creando el punto de entrada principal de muchas sustancias que han sido probadas en otros estudios [256-258].



**Figura 50.** Imágenes de secciones transversales xy de piel humana abdominal tratada con la dispersión de nanopartículas cargadas con rojo de nilo y teñidas con azul de Hoechst: (a y d) del azul de Hoechst; (b y e) del rojo de nilo y (c y f) de la combinación de ambos colorantes. Duración de los estudios de permeación: (a, b, c) piel sin tratamiento o blanco; (d, f, e) piel tratada con la dispersión nanoparticular durante 1 hora. Micrografías tomadas mediante microscopía confocal.



**Figura 51.** Imágenes de secciones transversales xy de piel humana abdominal tratada con la dispersión de nanopartículas cargadas con rojo de nilo y teñidas con azul de Hoechst. Imágenes tomadas mostrando la fluorescencia: (a y d) del azul de Hoechst; (b y e) del rojo de nilo y (c y f) de la combinación de ambos colorantes. Piel tratada con la dispersión nanoparticular durante: (a, b, c) 8 y (d, f, e) 24 horas en los estudios de permeación. Micrografías tomadas mediante microscopía confocal.

En general, las muestras de piel seccionadas transversalmente obtenidas para analizarse por microscopía confocal mostraron folículos con variaciones significativas, tal como la densidad y el tamaño de los orificios foliculares, el diámetro del folículo piloso, así como el volumen y la superficie del infundíbulo, que dificultan la comparación entre las formulaciones.

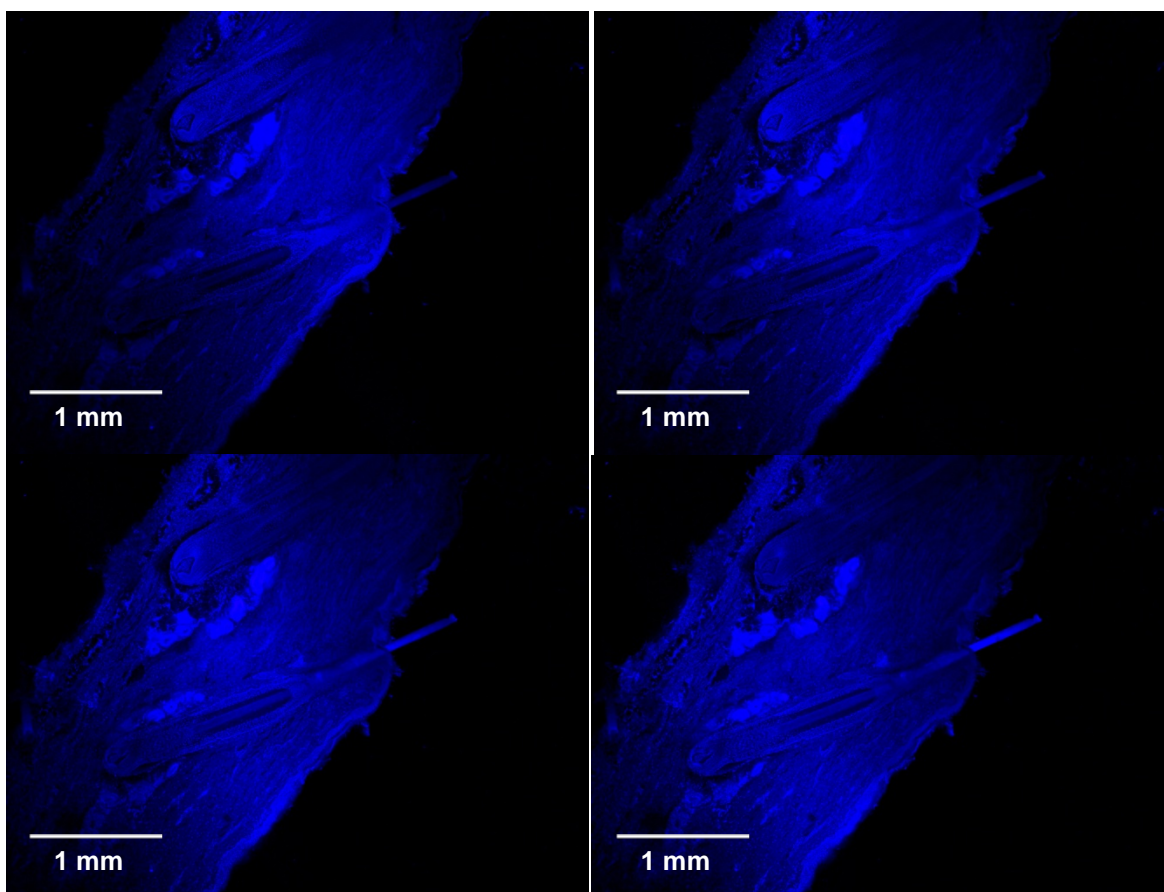
Estudios han reportado que algunas regiones del cuerpo humano (cejas, pestañas, la región del cuero cabelludo, la barba, el pecho, las axilas y la región púbica) y de la piel de oreja de cerdo tienen las terminales de los folículos mayores a 2 cm, con un espesor considerable ( $> 60 \mu\text{m}$  de diámetro) y las terminales foliculares normalmente son mayores de 3 mm dentro de la hipodermis; y el resto (vello) en el cuerpo humano, tales como los encontrados en la piel humana abdominal utilizada en este estudio (Figuras 50 y 51), son cortos ( $< 2 \text{ cm}$ ), delgados ( $< 30 \mu\text{m}$  de diámetro), normalmente no pigmentados y ocupan sólo 1 mm dentro de la dermis [258, 259]. De acuerdo con lo anterior, diferencias en cuanto al diámetro folicular son evidentes en las muestras de piel abdominal humana y porcina mostrados en las Figuras 50-54. Por otro lado, dependiendo del tamaño y la fase de crecimiento del folículo, la cavidad en donde se encuentra el mismo puede rebasar los  $400 \mu\text{m}$ , por lo que en los estudios de microscopía confocal fue necesario hacer tomas a diferentes profundidades para poder visualizar el fluoróforo de estudio, pues el colorante de contraste sólo fue capaz de teñir la piel en la superficie de los cortes (Figuras 52-54).

La comparación de los diámetros foliculares, la penetración en la piel y las densidades foliculares en piel porcina utilizando piel de la oreja, contra la piel humana de la zona abdominal también han sido estudiadas por otros autores, obteniendo una permeación menor con piel abdominal humana que con piel de oreja de cerdo [70]. Esos resultados concuerdan con los obtenidos en este trabajo, en el cual cierto nivel de fluorescencia emanante de todas las formulaciones conteniendo rojo de nilo (dispersión de nanopartículas, emulsión (o/w) y la solución saturada) pudo ser observada desde la primera hora en los estudios de permeación utilizando piel de oreja de cerdo (Figuras 52-54), mientras que cuando se utilizó piel abdominal humana, la fluorescencia fue observada hasta las ocho horas de los estudios de permeación (tiempo necesario para que el polímero interactúe con la piel y pueda liberar el activo desde los reservorios). Este comportamiento de acumulación del colorante de manera tiempo-dependiente, en los folículos pilosos de piel humana tratada con la dispersión de nanopartículas cargadas con rojo de nilo puede ser observado en la Figura 51.

Otro parámetro observado en los folículos pilosos mediante la técnica de microscopía confocal fue un crecimiento diferente de los mismos. Las fases de folículos son: anágena (*fase de crecimiento* – en la cual las células proliferan rápidamente y de modo continuo para formar la vaina interna de la raíz, y migran hacia arriba para formar el pelo folicular), catágena (*involución* – es la etapa final de la mitosis, la reabsorción y la muerte celular del segmento folicular inferior) y telógena (fase de reposo antes de la caída del cabello) [38]. Además, otras dos etapas del ciclo folicular han sido descritas: exógena (liberación de las fibras de la fase telógena a partir de los folículos pilosos) y kenogena

(tiempo de retardo entre la fase exógena y el desarrollo de las fibras nuevas de la fase anágena) [261].

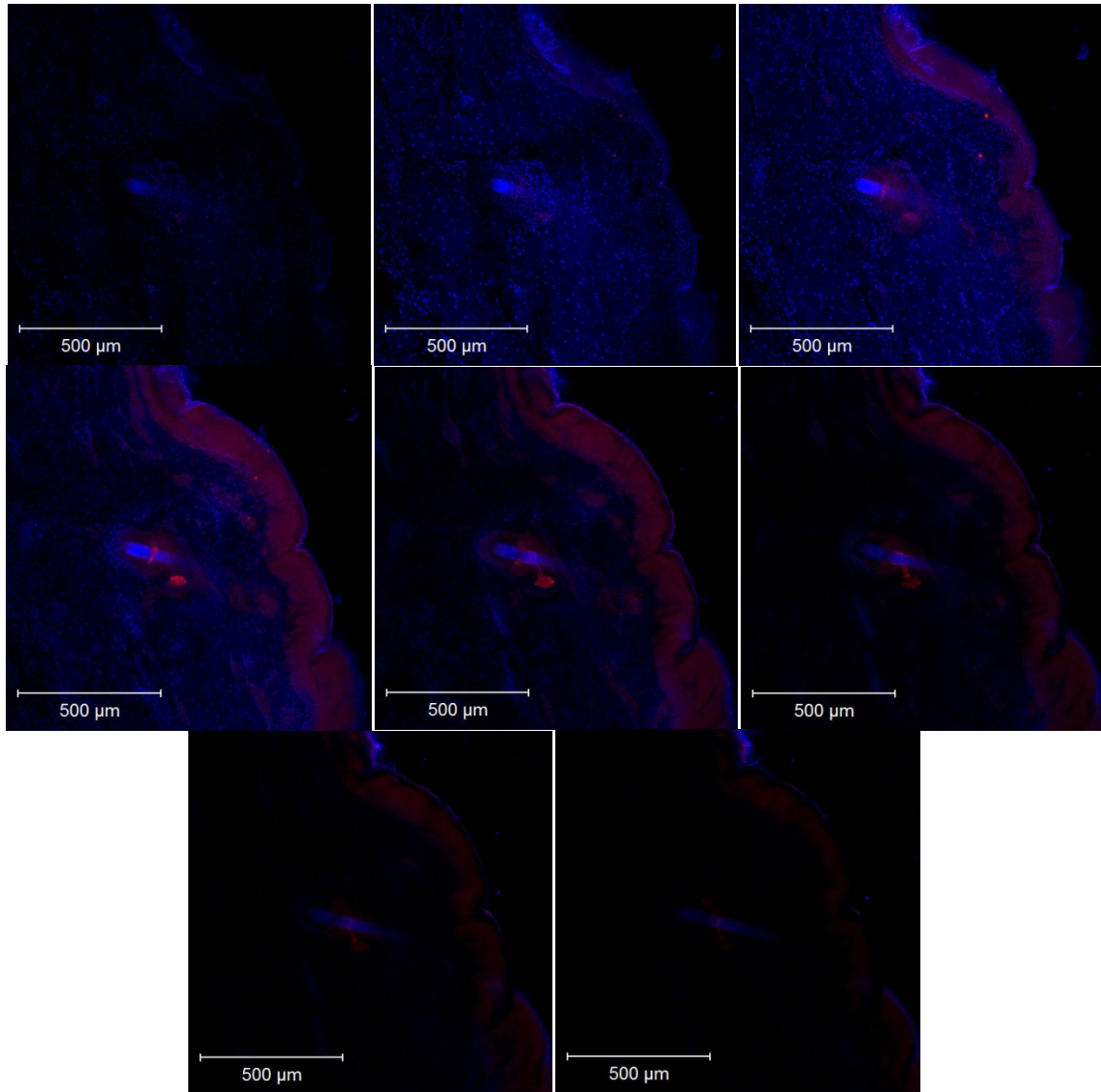
Aunque, por lo general un porcentaje de 85-90% de los folículos pilosos están en la fase anágena en la piel humana (duración de 2-6 años), algunas diferencias con respecto al crecimiento (espesor y longitud) fueron observadas en general en los folículos encontrados en las muestras analizadas en este estudio. Por ello fue necesario en algunas ocasiones, hacer varias tomas en la región de la zona folicular para obtener una imagen compuesta por varias micrografías mostrando grandes folículos (Figuras: 52 a y d; 53 c y e).



a)

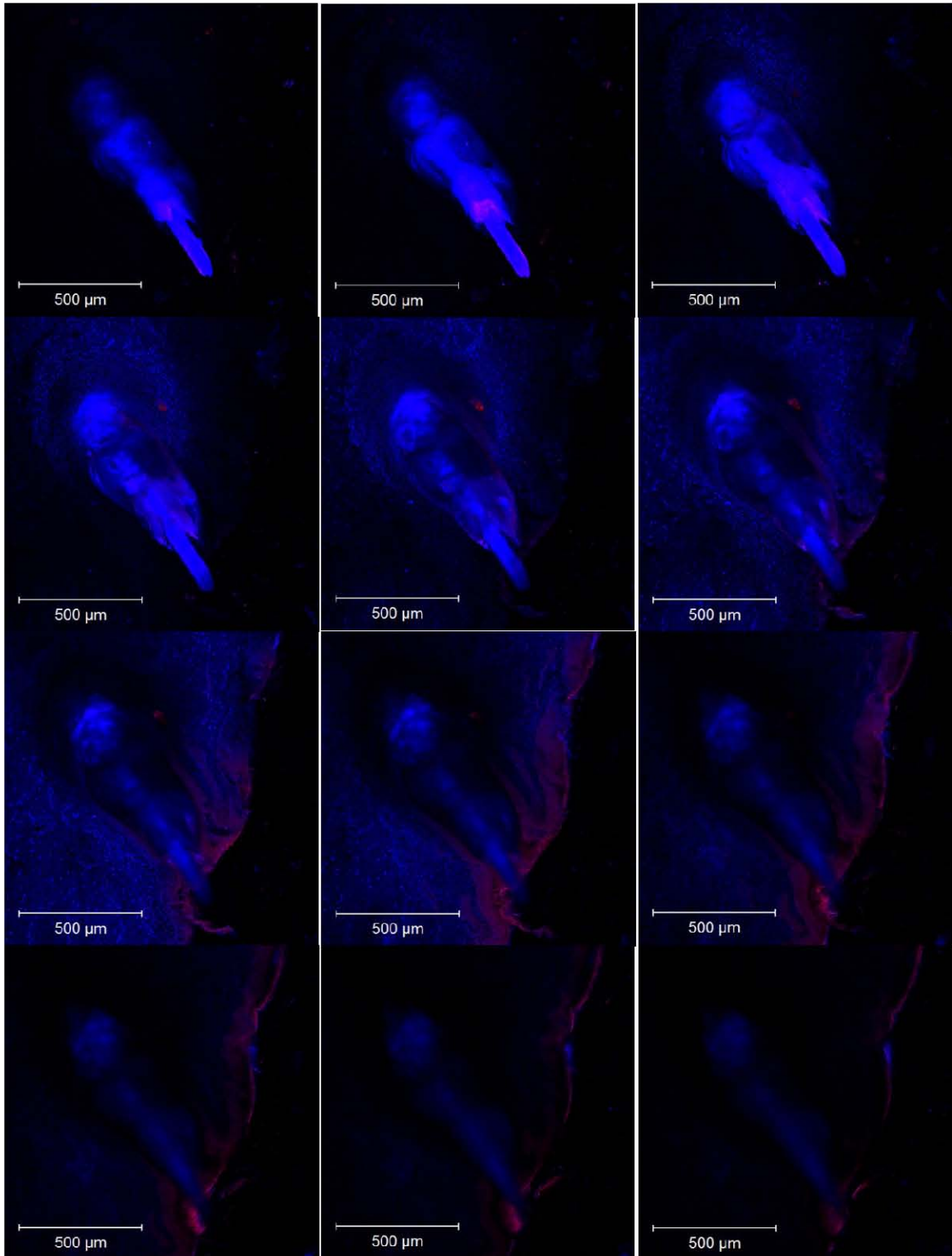
**Figura 52. Imágenes transversales xy de muestras de piel de oreja porcina tratadas durante 1 h, con las diferentes formulaciones conteniendo rojo de nilo y subsecuentemente teñidas con azul de Hoechst. Las imágenes fueron seccionadas a través del plano z, a una proyección de ángulo de 90° con incrementos subsecuentes (con secuencia de izquierda a derecha y de arriba hacia abajo) de: (a) 10  $\mu\text{m}$ , ningún tratamiento; (b) 15  $\mu\text{m}$ , solución; (c) 15  $\mu\text{m}$ , emulsión; d) 15  $\mu\text{m}$ , dispersión de nanopartículas. Micrografías obtenidas por microscopía confocal.**

Continuación de la Figura 52....



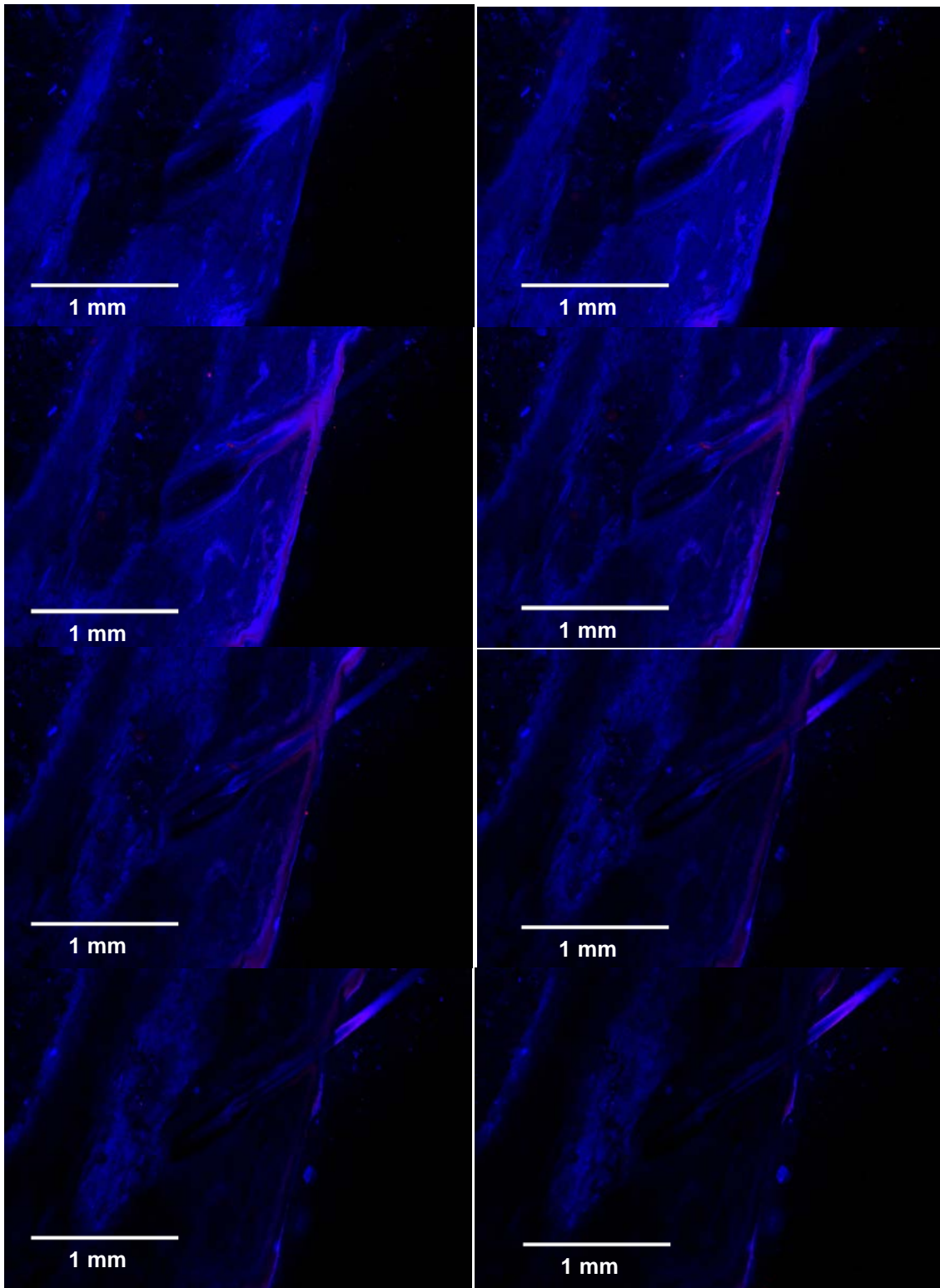
b)

Continuación de la Figura 52....



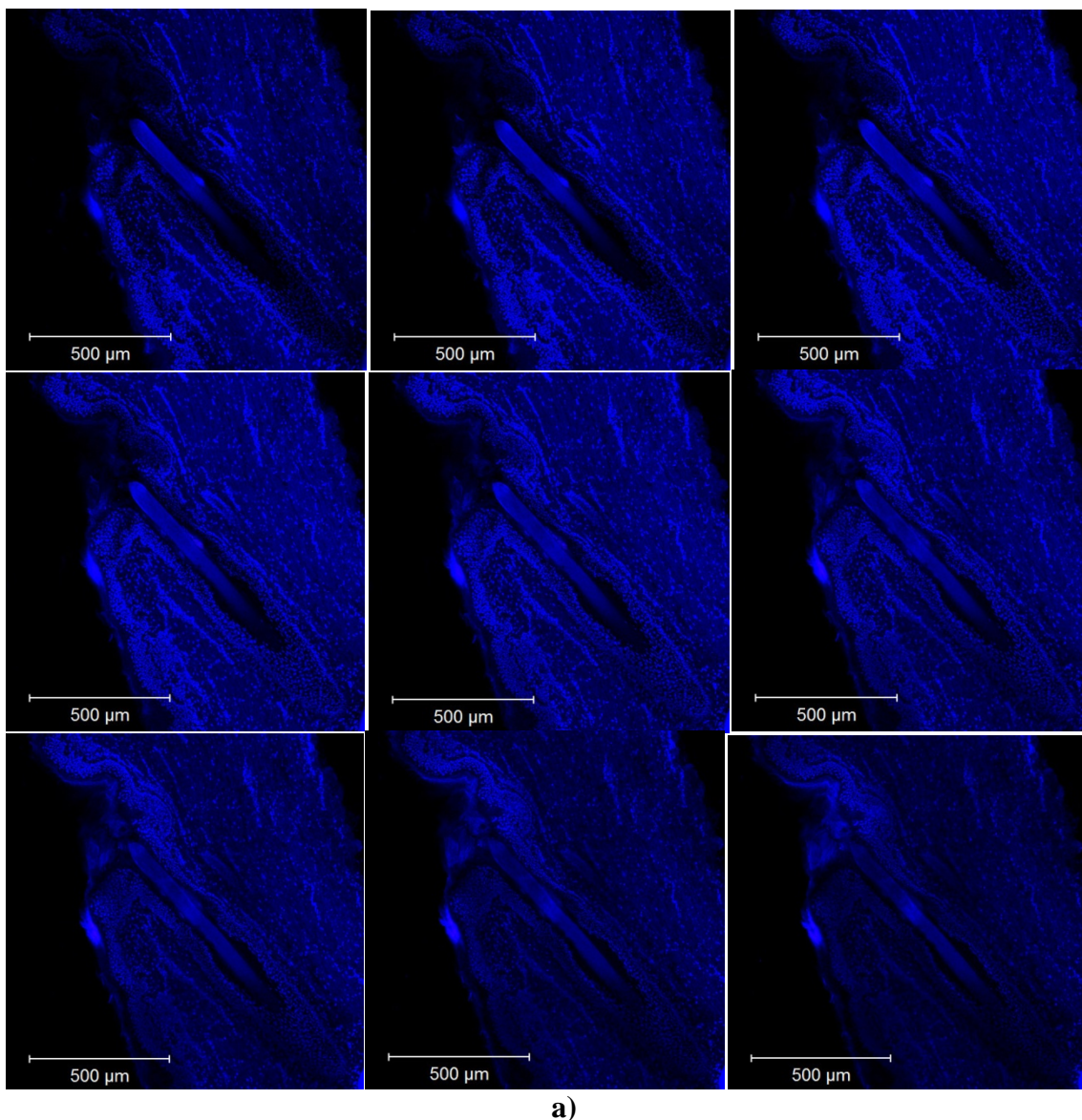
c)

Continuación de la Figura 52....



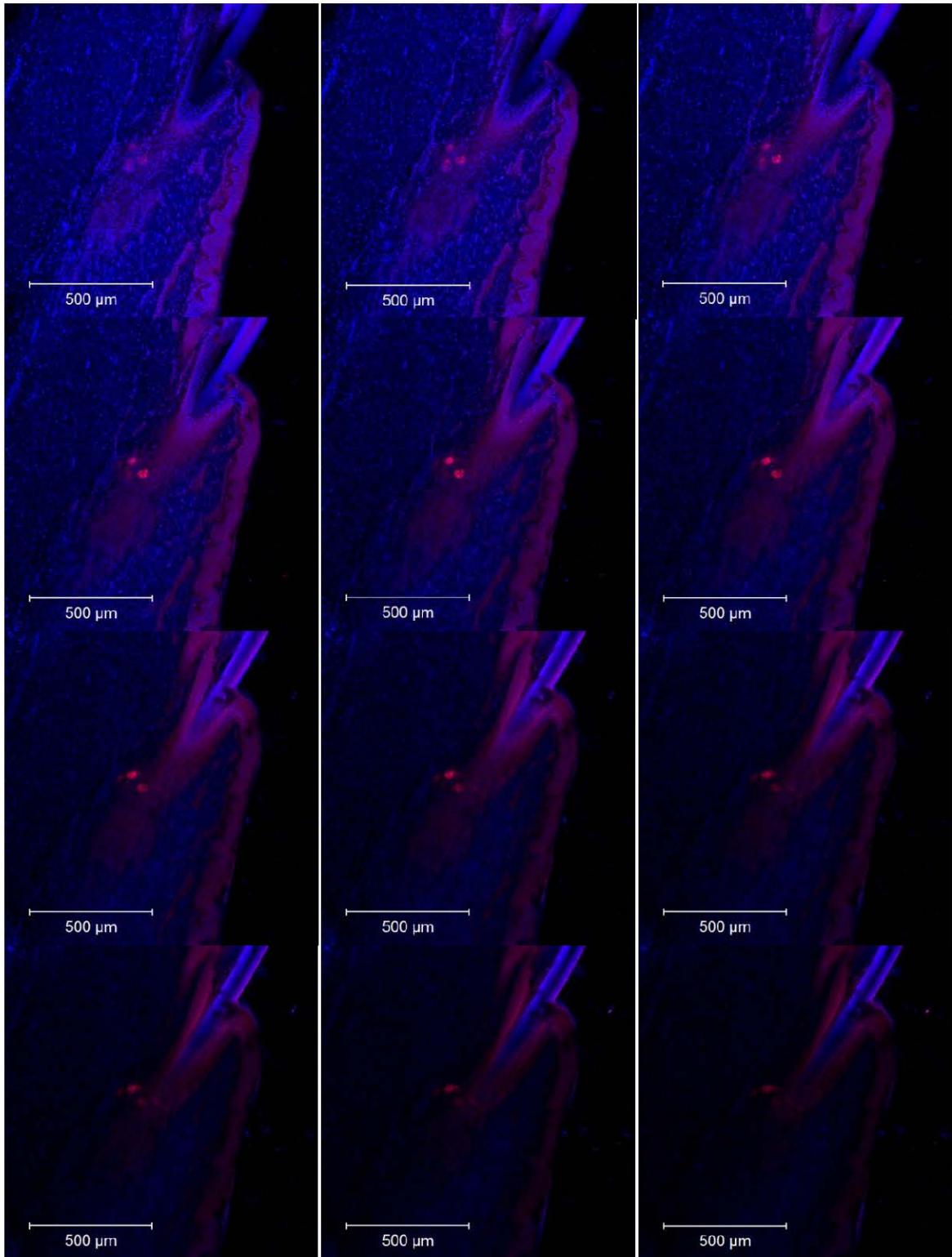
d)





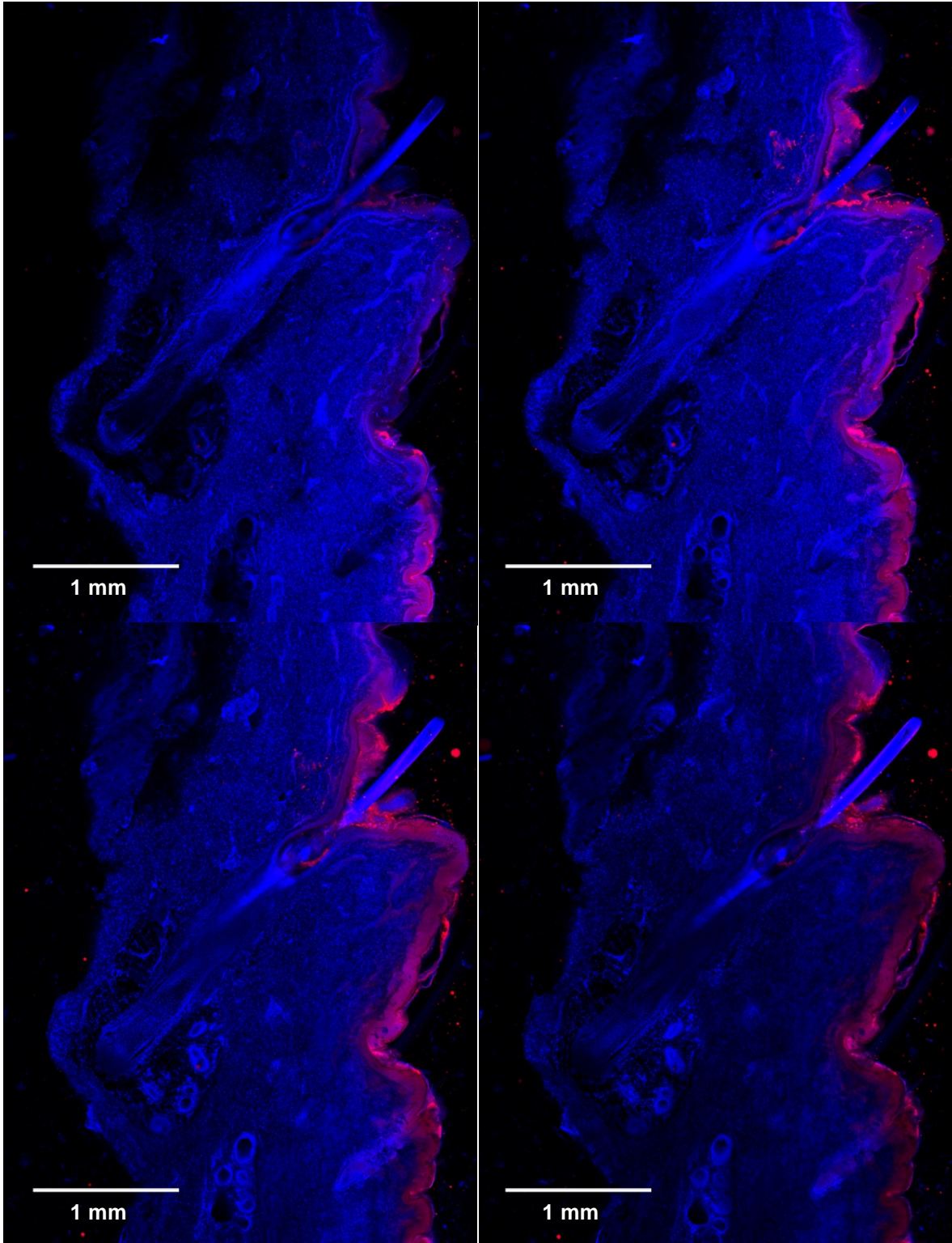
**Figura 53. Imágenes transversales xy de secciones de piel de oreja porcina tratadas durante 8 horas con las diferentes formulaciones conteniendo rojo de nilo y subsecuentemente teñidas con azul de Hoechst. Las imágenes de la piel fueron seccionadas a través del plano z, usando una proyección a un ángulo de 90° con incrementos subsecuentes (con secuencia de izquierda a derecha y de arriba hacia abajo) de: (a) 5 μm, aplicando ningún tratamiento; (b) 5 μm, aplicando un tratamiento con la solución; (c) 15 μm, aplicando un tratamiento con la emulsión (o/w); d) 5 μm y e) 60 μm, aplicando un tratamiento con la dispersión de nanopartículas. Micrografías obtenidas por microscopía confocal.**

Continuación de la Figura 53....



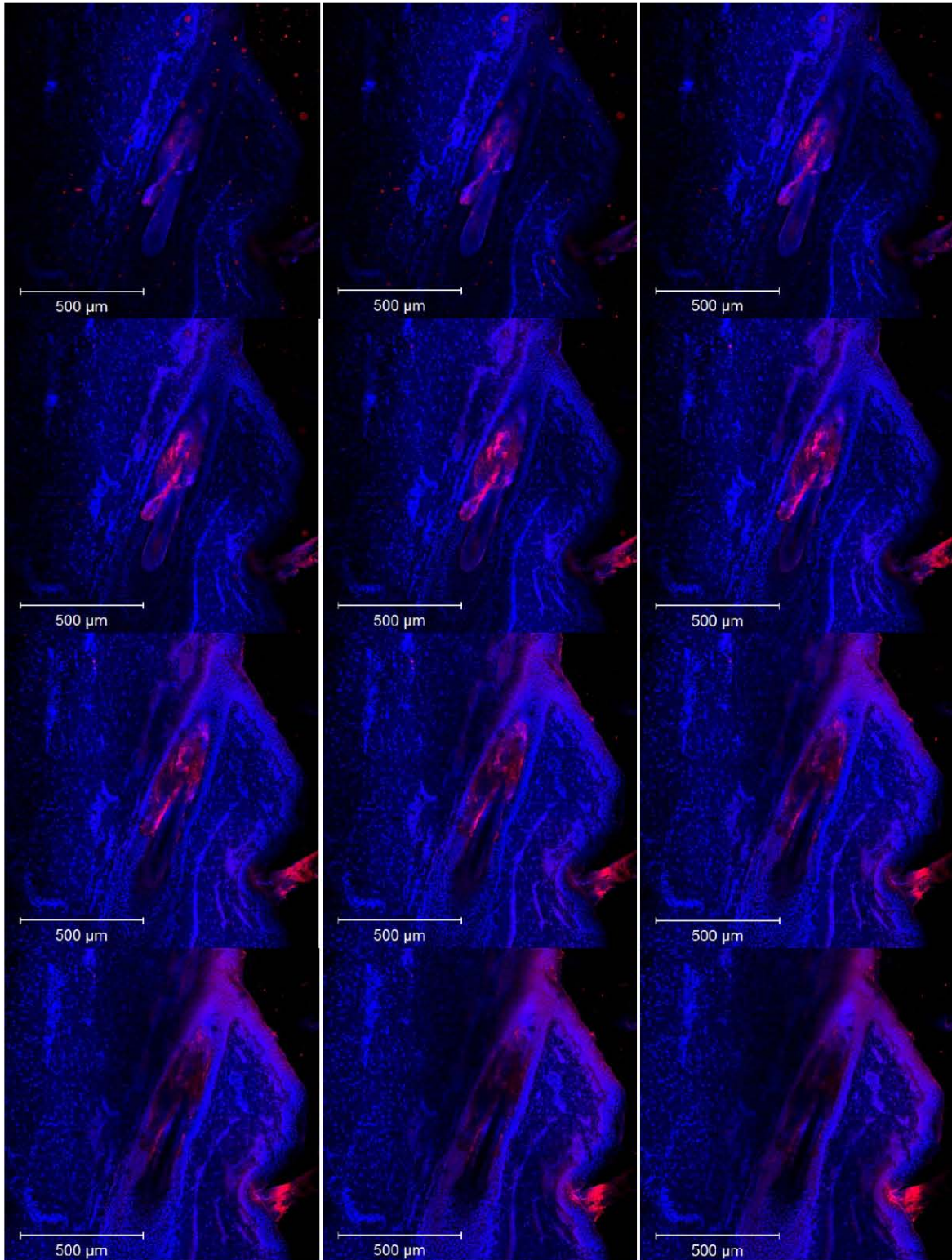
b)

Continuación de la Figura 53....



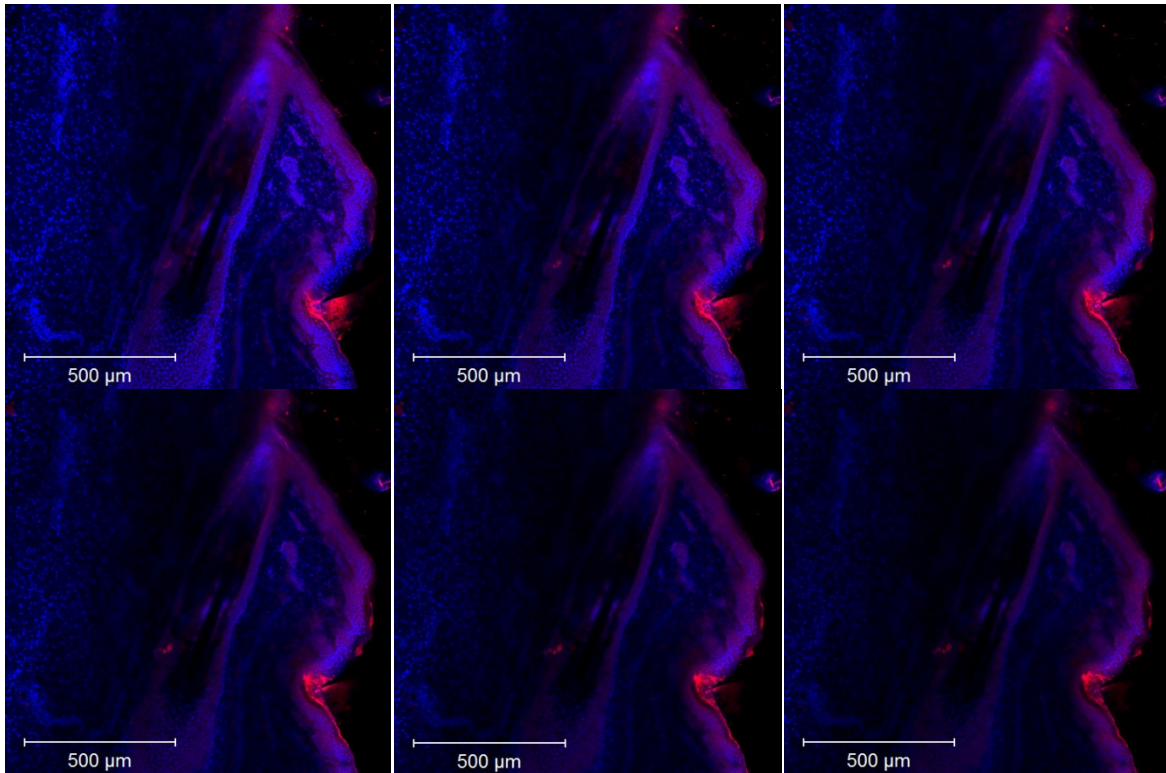
c)

Continuación de la Figura 53....

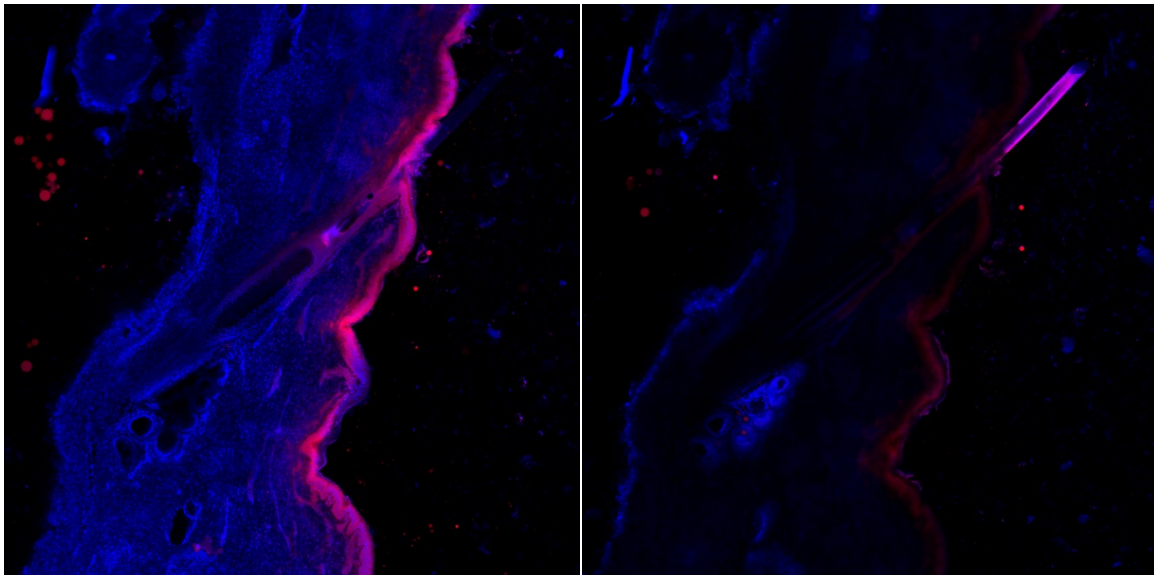


d)

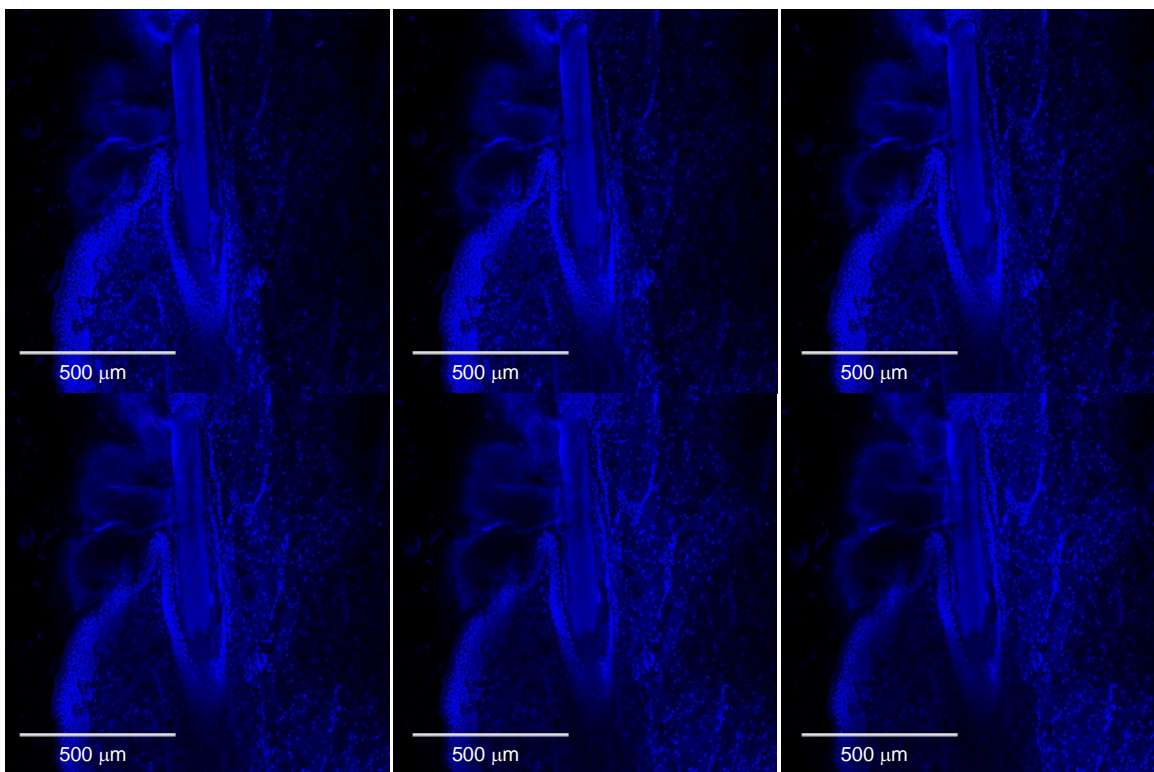
Continuación de la Figura 53....



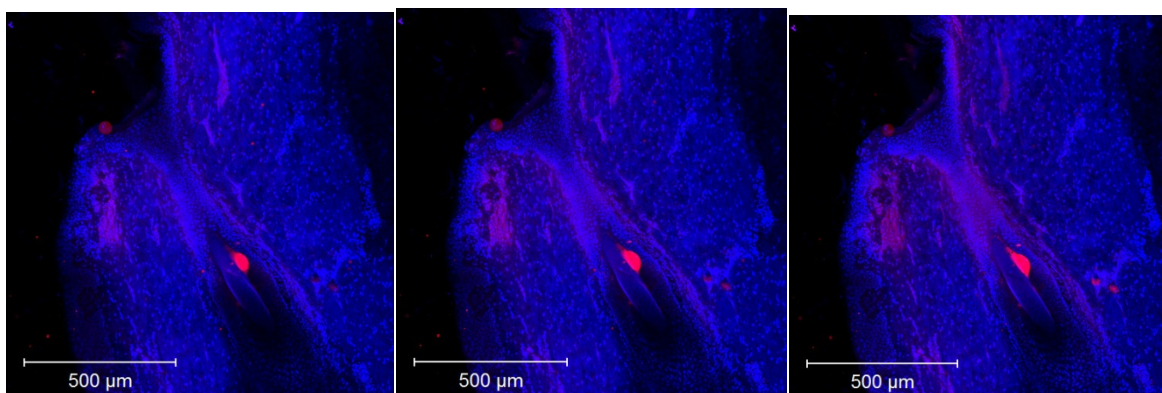
Continuación de la secuencia de 53 d)...



e)



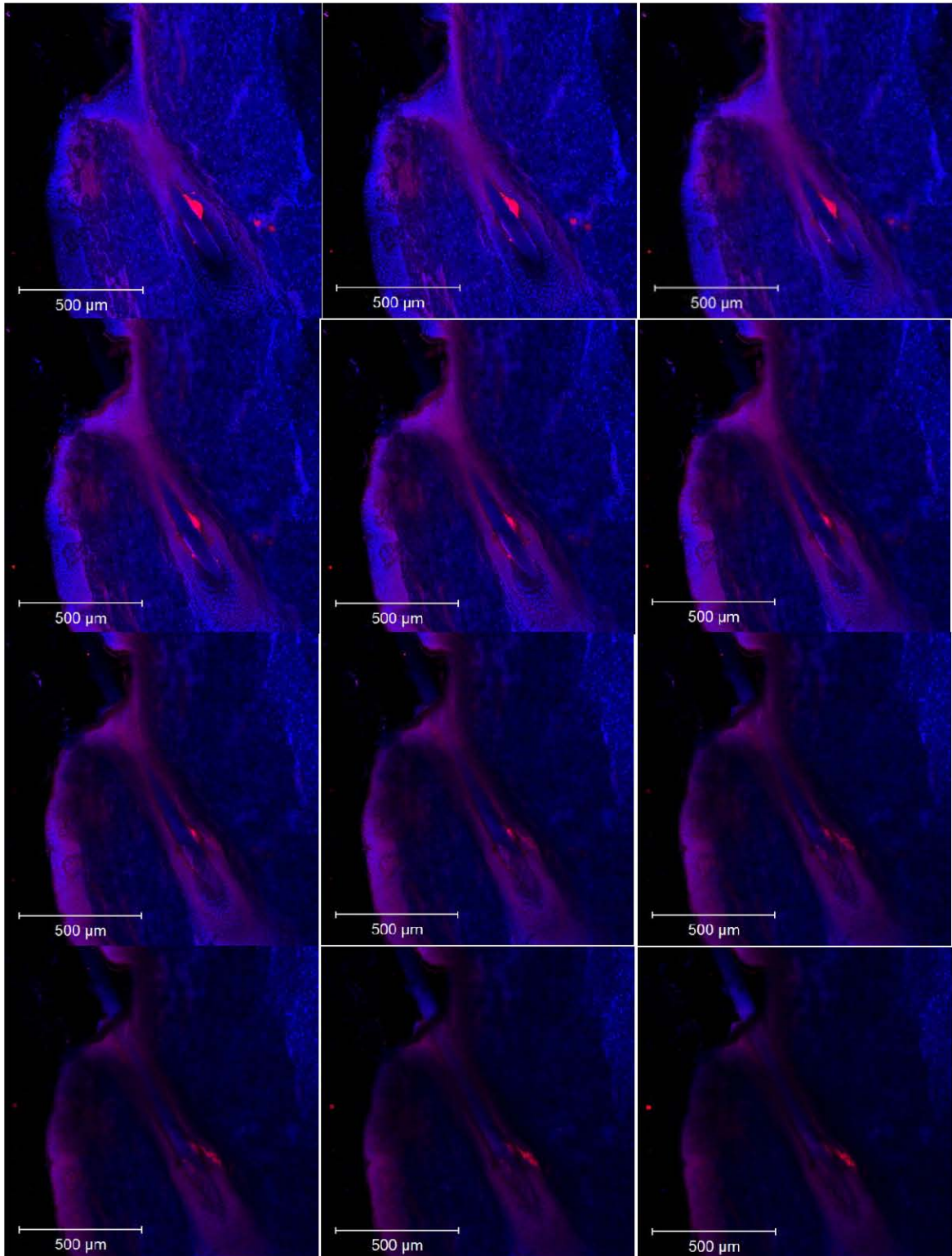
a)



b)

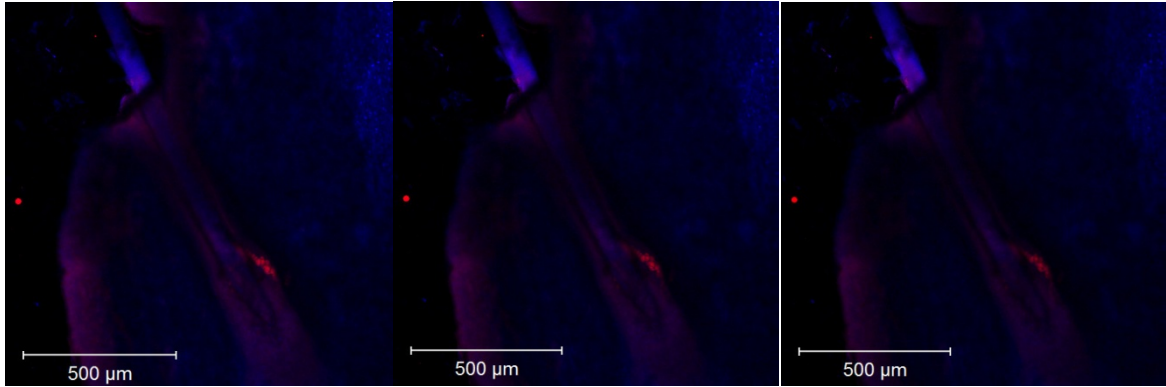
**Figura 54.** Imágenes xy de secciones transversales de piel de oreja porcina tratada con las diferentes formulaciones conteniendo rojo de nilo y subsecuentemente teñidas con azul de Hoechst. Las imágenes de la piel con la localización en la zona folicular fueron seccionadas a través del plano z, usando una proyección a un ángulo de 90° con incrementos subsecuentes de 5 μm (con secuencia de izquierda a derecha y de arriba hacia abajo), en las que se aplicó: (a) ningún tratamiento; (b) un tratamiento con la solución; (c) un tratamiento con la emulsión (o/w); d) un tratamiento con la dispersión de nanopartículas. Las micrografías fueron obtenidas mediante la técnica de microscopía confocal después de los estudios de permeación durante 24 horas.

Continuación de la Figura 54...

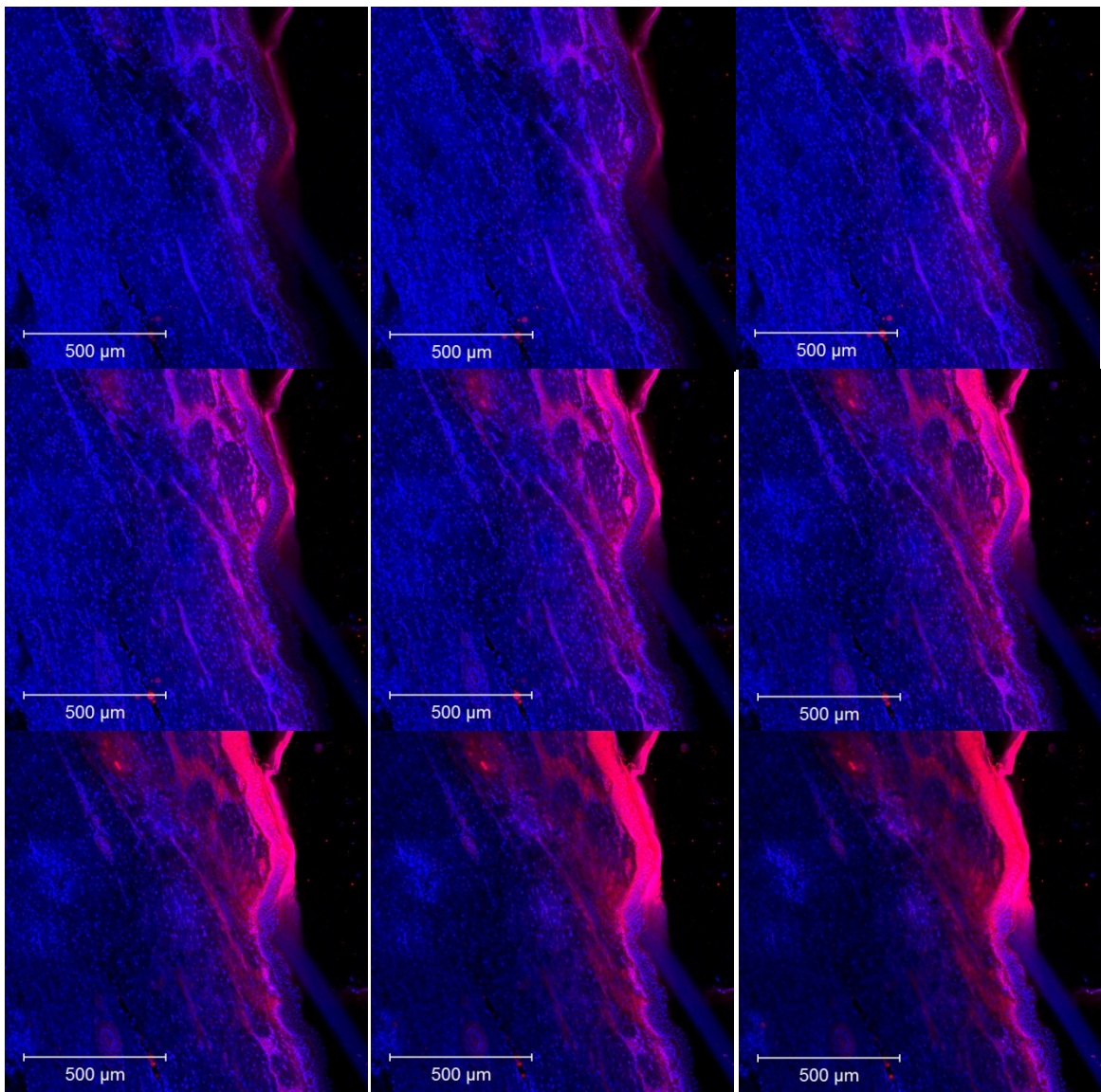


Continuación de la secuencia de 54 b)...

Continuación de la Figura 54....



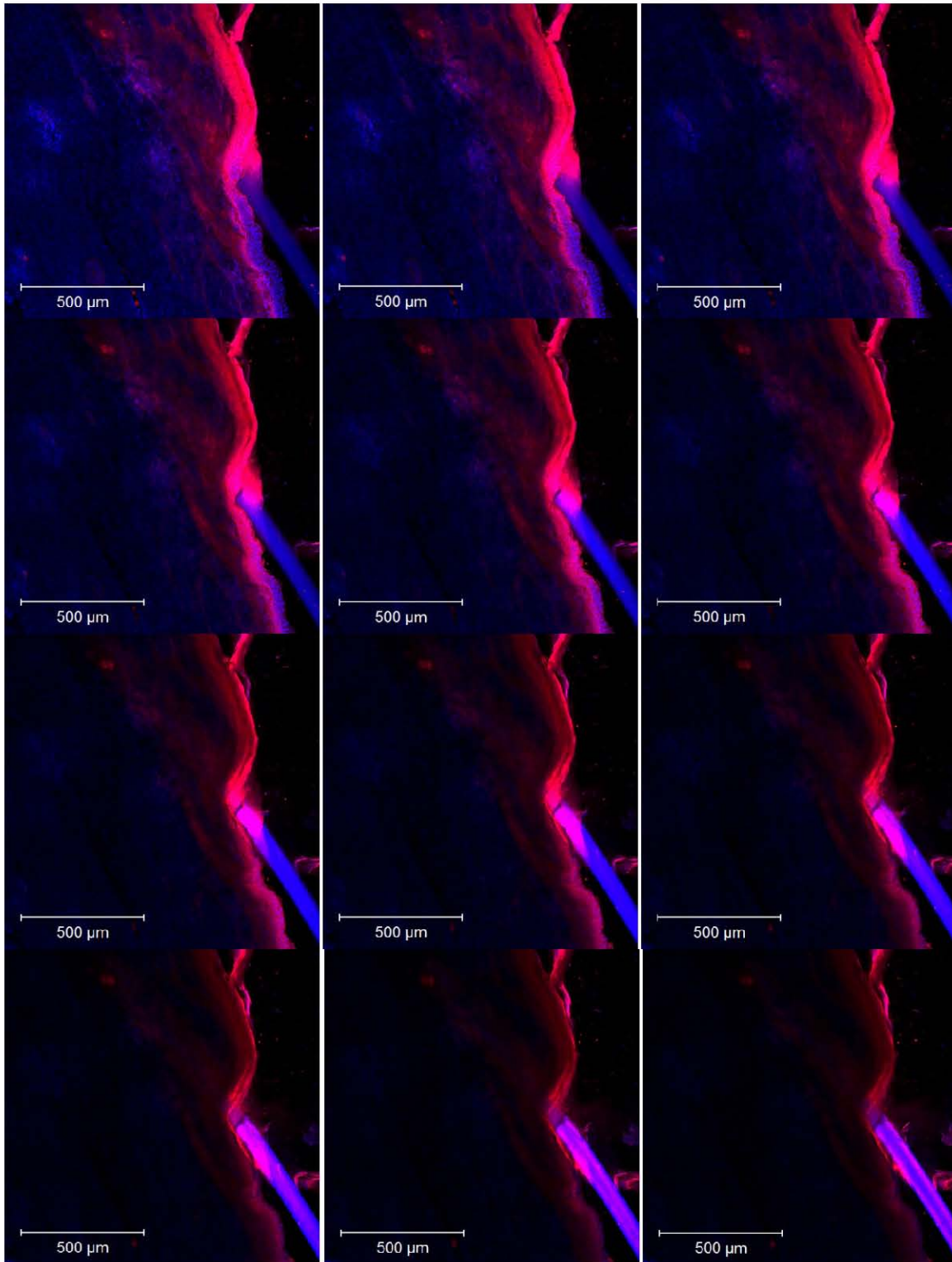
Continuación de la secuencia de 54 b)...



c)

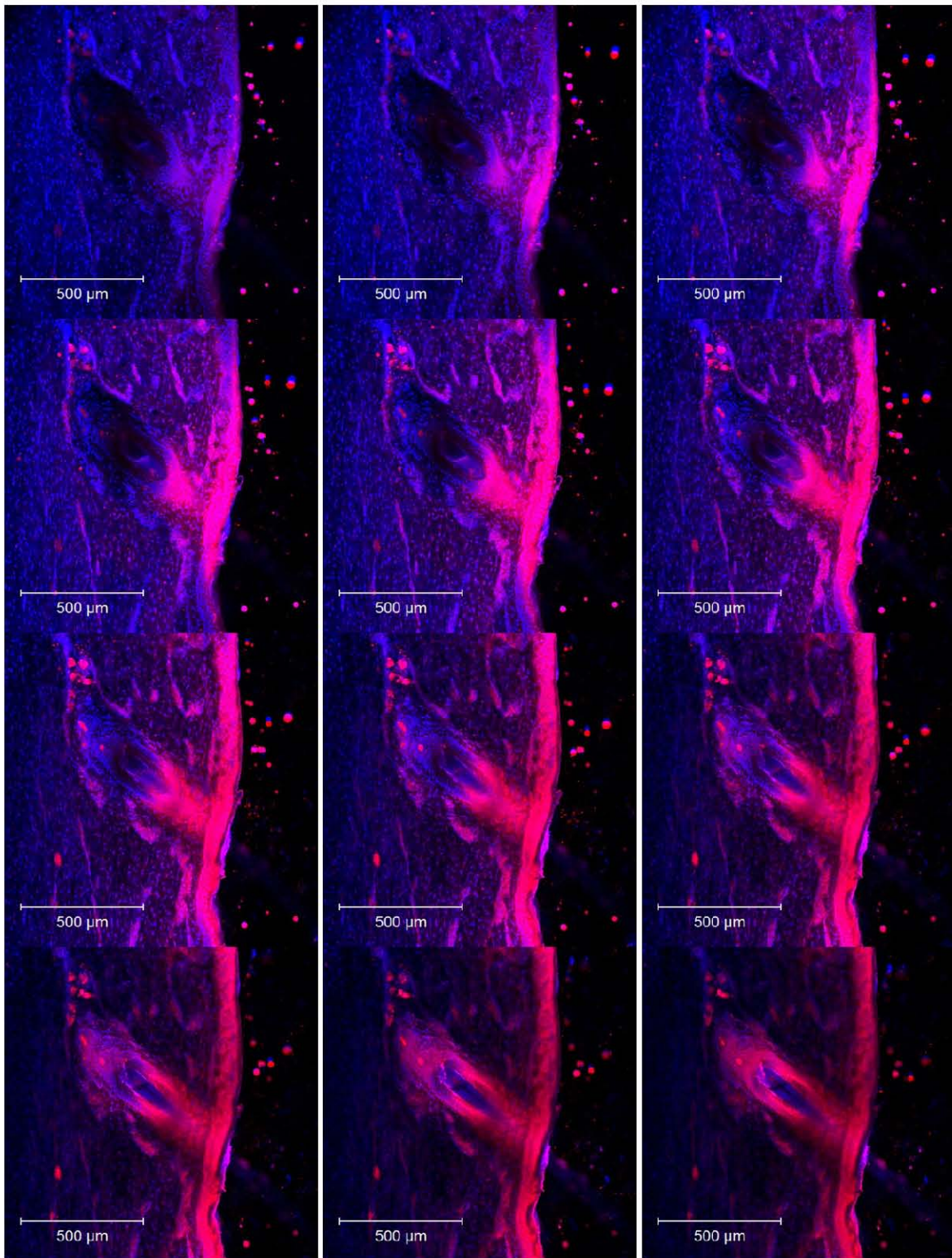


Continuación de la Figura 54....



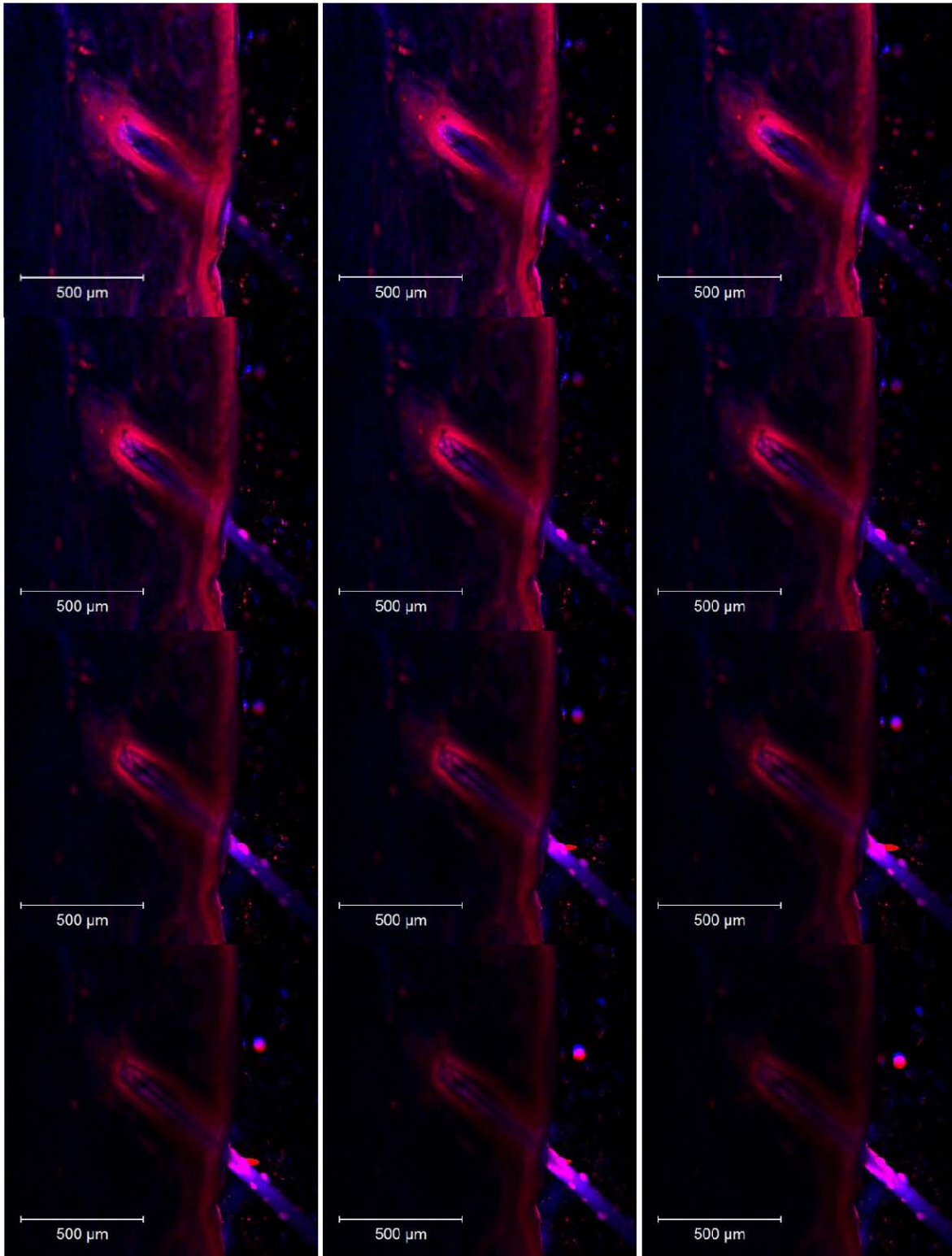
Continuación de la secuencia de 54 b)...

Continuación de la Figura 54...



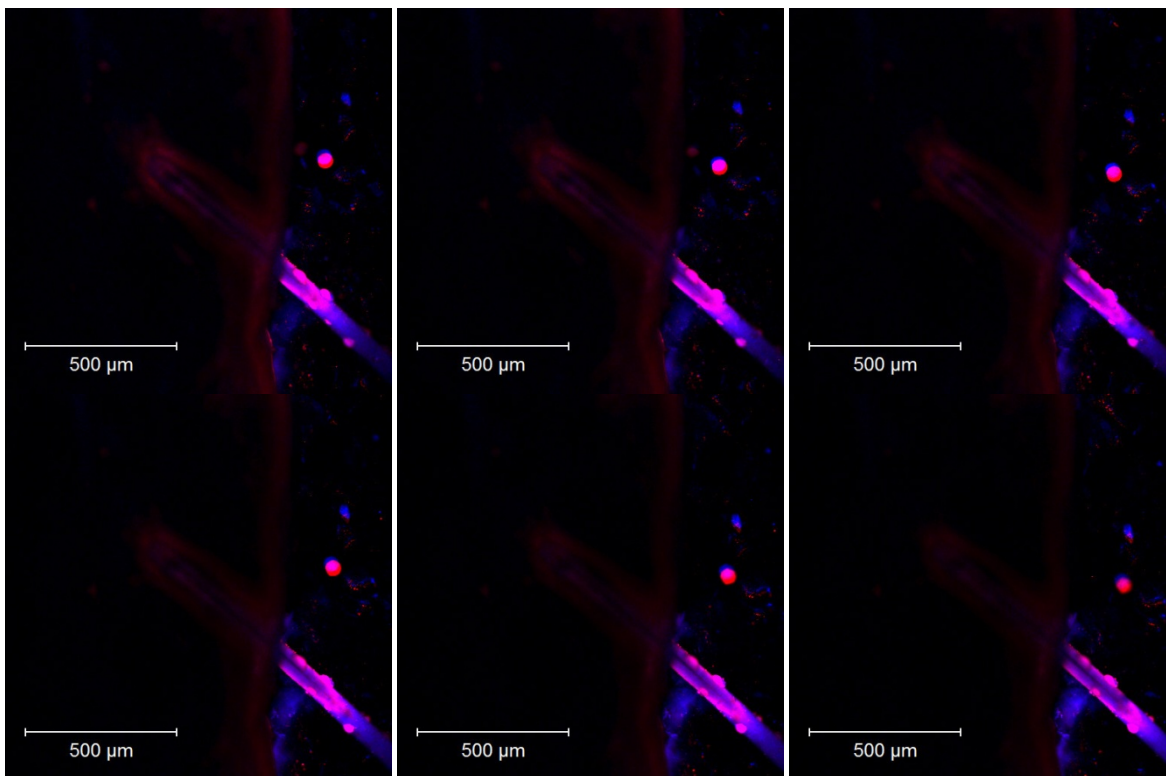
d)

Continuación de la Figura 54....



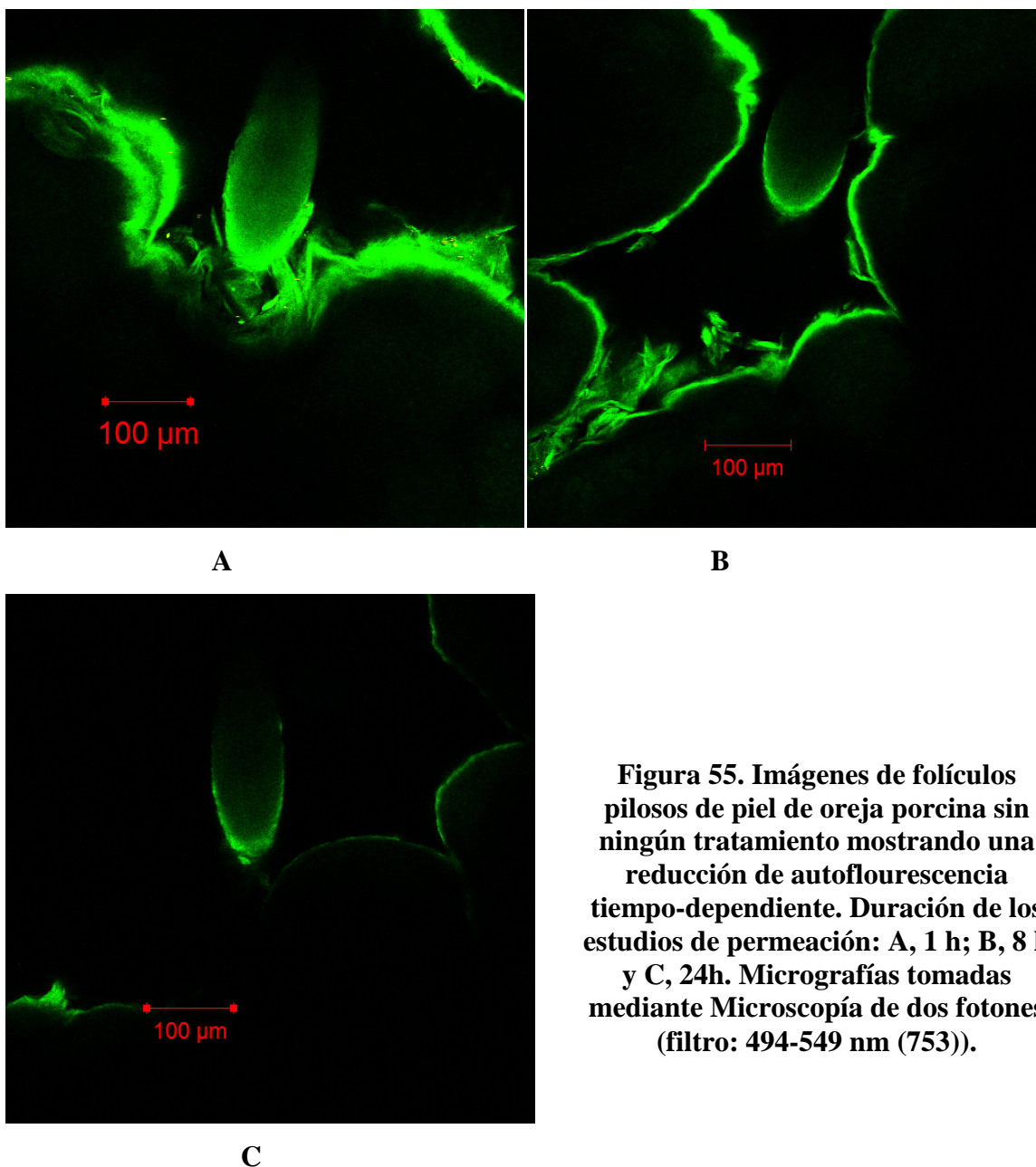
Continuación de la secuencia de 54 d)...

### Continuación de la Figura 54....



### Continuación de la secuencia de 54 d)...

Otro fenómeno observado en los estudios de microscopía fue el de la reducción de la autofluorescencia de folículos pilosos en la piel porcina sin ningún tratamiento (quenching) con respecto al tiempo de exposición al ambiente. Lo anterior puede ser observado en la Figura 55, en la cual se muestran micrografías de piel porcina sin ningún tratamiento utilizadas en los estudios de permeación. Dichas imágenes revelan que aquellas muestras menos expuestas al ambiente (1 y 8 horas) mostraron niveles mayores de autofluorescencia que las utilizadas en dichos estudios, mayormente expuestas a las condiciones ambientales (24 horas). Esto sugiere que a una mayor pérdida de agua transepidérmica la piel no es capaz de mantener los niveles de autofluorescencia. Sin embargo, estudios adicionales deben llevarse a cabo a este respecto.



**Figura 55. Imágenes de folículos pilosos de piel de oreja porcina sin ningún tratamiento mostrando una reducción de autofluorescencia tiempo-dependiente. Duración de los estudios de permeación: A, 1 h; B, 8 h y C, 24h. Micrografías tomadas mediante Microscopía de dos fotones (filtro: 494-549 nm (753)).**

Aún con las diferencias mencionadas anteriormente y con algunas decoloraciones de las muestras o la disminución de la fluorescencia del colorante por los componentes de la piel, es claro que el rojo nilo incluido en las nanopartículas poliméricas, penetró preferentemente en los folículos pilosos llegando hasta el bulbo de los mismos. Además, este colorante penetró mayormente en la glándula sebácea cuando fue incluido en los nanosistemas, mostrando una fluorescencia más alta, que cuando se incluyó en la emulsión (en donde la fluorescencia se concentra mayoritariamente alrededor de las células anucleadas poligonales del estrato córneo y también en pequeñas cantidades dentro de los

corneocitos) y en la solución. Por lo tanto, esta formulación de nanopartículas representa una excelente opción para liberar el triclosán en el sitio blanco para el tratamiento de acné.

Es importante señalar, que en estudios recientes se ha encontrado que la contribución folicular en la piel humana del cuero cabelludo, la cara y en la piel de oreja porcina puede ser de aproximadamente el 10% de la superficie total de la piel (áreas combinadas de aperturas foliculares) [9, 70]. Por tanto los estudios en piel de oreja porcina pueden servir como una aproximación del comportamiento de los nanoacarreadores aquí propuestos, que se tendría en la piel de la zona de la cara en pacientes con acné. Además, las características fisicoquímicas de los nanosistemas probados en este estudio, parecen ser las adecuadas para penetrar en los folículos pilosos. Resultados similares fueron encontrados para nanopartículas lipídicas sólidas (SLN) en otro estudio, mostrando que la lipofilidad del acarreador mejora la penetración en la zona folicular [262].

El control de la profundidad de la penetración es esencial para asegurar la eficiente liberación del fármaco en el sitio afectado. Aunque existe controversia acerca de la dependencia del tamaño de las nanopartículas para la penetración en los folículos pilosos, al parecer, todos los nanoacarreadores pueden al menos alcanzar el infundíbulo, en donde se pueden acumular y constituir un reservorio del fármaco [51]. Recientemente, se ha reportado que un masaje mecánico puede mejorar la penetración de nanopartículas en la piel, lo que proporcionaría otra ventaja a la formulación propuesta aquí, pues los pacientes pueden imitar dichos masajes con el fin de administrar la formulación en la cara [49, 160, 242].

Adicionalmente, las partículas como vehículos de fármacos en este estudio parecen ser seguras debido a que algunos estudios afirman que las partículas mayores de 100 nm se pueden mover hacia la superficie de la piel después de algún tiempo (y después de haber liberado la sustancia activa), esto debido a que la producción de sebo y la excreción es un proceso lento en comparación con el de la penetración [49]. Por todo lo anterior, se puede decir que la vía folicular es una vía potencial para la administración de fármacos, y ésta se ve favorecida con formulaciones nanoparticulares. Además se puede decir que la formulación nanoparticular propuesta en este trabajo llega al sitio blanco mayoritariamente, indicativo de que es ideal para tratamiento de acné.

### CONCLUSIONES

- Las nanopartículas cargadas con triclosán (31.03 %), a base del polímero pH-sensible, Eudragit E 100, presentaron una forma esférica con un tamaño inferior a 200 nm, un potencial Z de 48 mV que indica una buena estabilidad física, un índice de polidispersión relativamente bajo (indicando una dispersión de partículas monodispersa) y una alta tasa de encapsulamiento y de rendimiento.
- Se optimizaron y validaron dos métodos para la cuantificación de triclosán mediante la técnica de cromatografía en capa fina de alta resolución (HPTLC). Dichos métodos cumplieron con los parámetros establecidos para la validación de procedimientos analíticos de la ICH para cuantificar el fármaco a partir de muestras provenientes de los estudios de liberación y por la Guía de Validación para Métodos Bioanalíticos emitida por la FDA para la cuantificación de triclosán contenido en muestras en contacto con piel provenientes de los estudios de permeación *in vivo*.
- La cinéticas de liberación *in vitro* de triclosán a partir de las nanopartículas realizadas a diferentes medios de pH, mostraron que la cantidad de fármaco liberado a partir de nanopartículas fue dependiente del pH. La cantidad de fármaco liberado y la velocidad de liberación aumentaron, con la disminución del pH del medio hasta 5. Así, una cantidad adecuada de triclosán liberado puede conseguirse en medios con un pH de entre 6.0 a 5.7, que son pH's encontrados ampliamente en pacientes con acné.
- Los estudios de permeación *in vivo* mostraron una mejor penetración del fármaco (mayor cantidad de fármaco total), cuando el triclosán fue incluido en la dispersión de nanopartículas que en la emulsión (o/w) disponible en el mercado.
- La actividad antimicrobiana de triclosán contra la bacteria *Propionibacterium acnes* fue determinada en una solución acuosa, mostrando una actividad similar a la reportada en otros estudios utilizando etanol; No obstante, los cultivos no fueron aptos para determinar ésta a partir de la dispersión de nanopartículas ni de la emulsión.

- Los estudios de microscopía láser de dos fotones y confocal revelaron que el colorante rojo de nilo incluido en las nanopartículas fue encontrado dentro de los folículos pilosos de la piel humana y porcina llegando a las glándulas sebáceas, mejorando la penetración del colorante, en relación a la piel tratada ya sea con la emulsión (o/w) o la solución.
- La suspensión de nanopartículas puede ser potencialmente eficaz en el tratamiento del acné formando probablemente un depósito para controlar la liberación de triclosán directamente en el sitio afectado. La dispersión de nanopartículas también evita algunos efectos secundarios tales como algunos efectos irritantes y de deshidratación en la piel que producen los tensoactivos incorporados dentro de la emulsión.



## PERSPECTIVAS

- Estudiar y comparar la dispersión de nanopartículas directamente en pacientes con acné. Realizar pruebas de hidratación y nivel de sebo de la piel antes y después de aplicar el sistema nanoparticulado propuesto.
- Evaluar la irritabilidad *in vitro* en conejos.
- Desarrollar nuevos sistemas de liberación enfocados a tratar desordenes de la piel para mejorar su eficacia y evitar posibles efectos adversos.
- Proponer nuevas estrategias para favorecer la penetración de las nanopartículas a través de la piel.

## REFERENCIAS

- [1] R. S. Stern. Medication and medical service utilization for acne. *J. Am. Acad. Dermatol.* 43 (2000) 1042–8.
- [2] H. E. Knaggs, D.B. Holland, C. Morris, E.J. Wood, W. J. Cunliffe. Quantification of cellular proliferation in acne using the monoclonal antibody Di-67. *J. Soc. Invest. Dermatol.* 102 (1994) 89–92.
- [3] D.Thiboutot, G.Harris, V. Iles, G. Cimis, K. Gilliland, S. Hagari. Activity of the type 1 5 $\alpha$ -reductase exhibits regional differences in isolated sebaceous glands and whole skin. *J. Invest. Dermatol.* 105 (1995) 209–14.
- [4] D. F. Bloom, Is acne really a disease?: a theory of acne as an evolutionarily significant, high-order psychoneuroimmune interaction timed to cortical development with a crucial role in mate choice. *Med. Hypotheses.* 62, (2004) 462–469.
- [5] K. M. Whitney and C. M. Ditre. Management strategies for acne vulgaris. *Clin Cosmet Investig Dermatol.* 4 (2011) 41–53.
- [6] H. Gollnick, W. Cunliffe, D. Berson, B. Dreno, A. Finlay, J. J. Leyden, A. R. Shalita, D. Thiboutot. Management of acne: a report from the global alliance to improve outcomes in acne. *J. Am. Acad. Dermatol.* 49 (2003) S1-S37.
- [7] J.-C. Kim, M.-E. Song, M.-J. Kim, E.-J. Lee, S.-K. Park, M.-J. Rang and H.-J. Ahn. Preparation and characterization of Triclosan-containing vesicles. *Colloids Surf. B: Biointerfaces.* 26 (2002) 235–241
- [8] T. W. Lee, J. C. Kim, S. J. Hwang. Hydrogel patches containing Triclosan for acne treatment. *Eur J Pharm Biopharm.* 56 (2003) 407–412.
- [9] M.-A. Bolzinger, S. Briançon, J. Pelletier, Y. Chevalier. Penetration of drugs through skin, a complex rate-controlling membrane. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* 17 (2012) 156-165.
- [10] M. Taglietti, C. N. Hawkins, J. Rao. Novel topical drug delivery systems and their potential use in acne vulgaris. *Skin Therapy Lett.* 13 (2008) 6–8.
- [11] J. J. Escobar-Chávez, R. Díaz-Torres, I. M. Rodríguez-Cruz, C. L. Domínguez-Delgado, R. Sampere Morales, E. Ángeles-Anguiano, L. M. Melgoza-Contreras. Nanocarriers for transdermal drug delivery. *Research and Reports in Transdermal Drug Delivery.* 1 (2012) 3-17.
- [12] J.-C. Leroux , E. Allemann , F. De Jaeghere , E. Doelker , R. Gurny. Biodegradable nanoparticles—from sustained release formulations to improved site specific drug delivery, *J. Control. Release.* 39 (1996) 339.
- [13] L. Brannon-Peppas, J. O. Blanchette. Nanoparticle and targeted systems for cancer therapy, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 56 (2004) 1649–1659.
- [14] C. L. Domínguez-Delgado, I. M. Rodríguez-Cruz and M. López-Cervantes. The skin: a valuable route for administration of drugs. In: *Current Technologies To Increase The Transdermal Delivery Of Drugs*, José Juan Escobar-Chávez /Virginia Merino (Eds.) Bentham Science Publishers Ltd, 2010. pp.01-22.

- [15] P. M. Elias, E.H. Choi. Interactions among stratum corneum defensive functions, *Exp. Dermatol.* 14 (2005) 719–726.
- [16] P. M. Elias, D.S. Friend. The permeability barrier in mammalian epidermis. *J. Cell Biol.* 65 (1975) 180–191.
- [17] P. W. Wertz, D. T. Downing. Glycolipids in mammalian epidermis: structure and function in the water barrier. *Sci.* 217 (1982) 1261–1262.
- [18] L. Landmann. Epidermal permeability barrier: transformation of lamellar granule-disks into intercellular sheets by a membrane-fusion process, a freeze-fracture study. *J. Invest. Dermatol.* 87 (1986) 202–209.
- [19] G. M. Gray, R. J. White, R. H. Williams, H. J. Yardley. Lipid composition of the superficial stratum corneum cells of the epidermis. *Br. J. Dermatol.* 106 (1982) 59–63.
- [20] P. W. Wertz, D. T. Downing. Ceramides of pig epidermis: structure determination. *J. Lipid Res.* 24 (1983) 759–765.
- [21] S. A. Long, P. W. Wertz, S. J. Strauss, D. T. Downing. Human stratum corneum polar lipids and desquamation. *Arch. Dermatol. Res.* 277 (1985) 284–287.
- [22] R. M. Lavker, T. Sun. Heterogeneity in epidermal basal keratinocytes: morphological and functional correlations. *Sci.* 215 (1982) 1239–1241.
- [23] L. Borradori, A. Sonnenberg. Structure and function of hemidesmosomes: more than simple adhesion complexes. *J. Invest. Dermatol.* 112 (1999) 411–418.
- [24] K. Li, K. Tamai, E.M.L. Tan, J. Uitto. Cloning of type XVII collagen. Complementary and genomic DNA sequences of mouse 180-kDa bullous pemphigoid antigen (BPAG2) predict an interrupted collagenous domain, a transmembrane segment, and unusual features in the 5'-end of the gene and the 3'-untranslated region of mRNA. *J. Biol. Chem.* 268 (1993) 8825–8834.
- [25] M. A. Stepp, S. Spurr-Michaud, A. Tisdale, J. Elwell, I. K. Gipson.  $\alpha_6\beta_4$  Integrin heterodimer is a component of hemidesmosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 87 (1990) 8970–8974.
- [26] R. E. Burgeson, A. M. Christiano. The dermal–epidermal junction. *Curr. Opin. Cell Biol.* 9 (1997) 651–658.
- [27] I. Steinstrasser, H. P. Merkle. Dermal metabolism of topically applied drugs: Pathways and models reconsidered, *Pharm. Acta Helv.*, 1995; 70: 3–24.
- [28] H. Wosicka, K. Cal. Targeting to the hair follicles: Current status and potential. *J Dermatol Sci.* 57 (2010) 83–89.
- [29] A. Szuba, S. G. Rockson. Lymphedema: anatomy, physiology and pathogenesis. *Vasc. Med.* 2 (1997) 321–326.
- [30] B. Illel, Formulation for transfollicular drug administration: some recent advances. *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* 14 (1997) 207–219.
- [31] T. X. Xiang, B. D. Anderson. Influence of chain ordering on the selectivity of dipalmitoylphosphatidylcholine bilayer membranes for permeant size and shape. *Biophys. J.* 75 (1998) 2658–71.
- [32] S. Geinoz, R. H. Guy, B. Testa, P.-A. Carrupt. Quantitative structure–permeation relationships (QSPeRs) to predict skin permeation: a critical evaluation. *Pharm. Res.* 21 (2004) 83–92.
- [33] G. Cevc. Drug delivery across the skin. *Exp. Opin. Invest. Drugs.* 6 (1997) 1887–1937.

- [34] G. Cevc, U. Vierl. Nanotechnology and the transdermal route. A state of the art review and critical appraisal. *J Control Release*. 141 (2010) 277–99.
- [35] A. Schätzlein, G. Cevc. Non-uniform cellular packing of the stratum corneum and permeability barrier function of intact skin: a high-resolution confocal laser scanning microscopy study using highly deformable vesicles (Transfersomes). *Br. J. Dermatol.* 138 (1998) 583–92.
- [36] G. Cevc Lipid suspensions on the skin. Permeation enhancement, vesicle penetration, and transdermal drug delivery. *Crit. Rev. Ther. Drug Carr. Syst.* 13 (1996) 257–388.
- [37] V. M. Meidan, M. Docker, A. D. Walmsley, W. J. Irwin. Low intensity ultrasound as a probe to elucidate the relative follicular contribution to total transdermal absorption. *Pharm. Res.* 15 (1998) 85–92.
- [38] V. M. Meidan, M.C. Bonnr, B.B. Michniak. Transfollicular drug delivery—is it a reality? *Int J Pharm.* 306 (2005) 1–14.
- [39] S. Mitragotri. Modeling skin permeability to hydrophilic and hydrophobic solutes based on four permeation pathways. *J. Control. Release.* 86 (2003) 69–92.
- [40] V. Aguilera, K. Kontturi, L. Murtoimiki, P. Ramírez Estimation of the pore size and charge density in human cadaver skin. *J. Control. Release.* 32 (1994) 249–257.
- [41] M. E. Johnson, D. Blankschein, R. Langer. Evaluation of solute permeation through the stratumcorneum: lateral bilayer diffusion as the primary transport mechanism. *J. Pharm. Sci.* 86 (1997) 1162–72.
- [42] Y. Frum, M. C. Bonner, G. M. Eccleston, V. M. Meidan. The influence of drug partition coefficient on follicular penetration: In vitro human skin studies. *Eur. J. Pharm. Sci.* 30 (2007) 280–287.
- [43] S. Dokka, S. R. Cooper, S. Kelly, G. E. Hardee, J. G. Karras. Dermal delivery of topically applied oligonucleotides via follicular transport in mouse skin. *J. Invest. Dermatol.* 124 (2005) 971–975.
- [44] Y. Y. Grams, L. Whitehead, G. Lamers, N. Sturman, J. A. Bouwstra. Online diffusion profile of a lipophilic dye in different depths of a hair follicle in human scalp skin. *J. Invest. Dermatol.* 125 (2005) 775–782.
- [45] U. Jacobi, R. Toll, W. Sterry, J. Lademann. Do follicles play a role as penetration pathways in in vitro studies on porcine skin? An optical study. *Laser Phys.* 15 (2005) 1594–1598.
- [46] A. Teichmann, M. Ossadnik, H. Richter, W. Sterry, J. Lademann. Semiquantitative determination of the penetration of a fluorescent hydrogel formulation into the hair follicle with and without follicular closure by microparticles by means of differential stripping. *Skin Pharmacol. Physiol.* 19 (2006) 101–105.
- [47] R. Alvarez-Román, A. Naik, Y.N. Kalia, R.H. Guy, H. Fessi. Skin penetration and distribution of polymeric nanoparticles. *J Control Release.* 99 (2004) 53–62.
- [48] R. Alvarez-Román, A. Naik, Y.N. Kalia, H. Fessi, R.H. Guy. Visualization of skin penetration using confocal laser scanning microscopy. *Eur J Pharm Biopharm.* 58 (2004) 301–16.
- [49] J. Lademann, H. Richter, A. Teichmann, N. Otberg, U. Blume-Peytavi, J. Luengo, Weiss B, U.F. Schaefer, C. M. Lehr, R. Wepf, W. Sterry. Nanoparticles—an efficient carrier for drug delivery into the hair follicles. *Eur J Pharm Biopharm.* 66 (2007) 159–64.

- [50] F. Knorr, J. Lademann, A. Patzelt, W. Sterry, U. Blume-Peytavi, A. Vogt. Follicular transport route — research progress and future perspectives. *Eur J Pharm Biopharm.* 71 (2009) 173–80.
- [51] J. Lademann, H. Richter, U.F. Schaefer, U. Blume-Peytavi, A. Teichmann, N. Otberg, Sterry W. Hair follicles—a long-term reservoir for drug delivery. *Skin Pharmacol Physiol.* 19 (2006) 232–6.
- [52] U. Blume-Peytavi, A. Vogt. Human hair follicle: reservoir function and selective targeting. *Br J Dermatol.* 165 (2011) 13–7.
- [53] S. Trauer, J. Lademann, F. Knorr, H. Richter, M. Liebsch, C. Rozycki, G. Balizs, R. Büttemeyer, M. Linscheid, A. Patzelt. Development of an in vitro modified skin absorption test for the investigation of the follicular penetration pathway of caffeine. *Skin Pharmacol Physiol.* 23 (2010) 320–7.
- [54] S. Trauer, A. Patzelt, N. Otberg, F. Knorr, C. Rozycki, G. Balizs, R. Büttemeyer, M. Linscheid, M. Liebsch, J. Lademann. Permeation of topically applied caffeine through human skin—a comparison of in vivo and in vitro data. *Br J Clin Pharmacol.* 68 (2009) 181–6.
- [55] V. Couturaud. Part I: Skin Types, Biophysical Characteristics of the Skin in Relation to Race, Sex, Age, and Site, In: A. O. Barel, M. Paye, H. I. Maibach (Eds.), *Handbook of Cosmetic Science and Technology*. 3rd ed, Informa Healthcare USA, Inc., New York, 2009, pp. 5-19.
- [56] T. C. Flynn, J. Petros, J. E. Clark, G. E. Viehman. Dry skin and moisturizers. *Clin. Dermatol.* 19 (2001) 387–392.
- [57] G. E. Pierard. Caractérisation des peaux sèches: La biométrie complète la clinique (Characterisation of dry skins: biometry completes clinic). *Cosmetology.* 14 (1997) 48–51.
- [58] K. Kitamura, A. Ito, K. Yamada, A. Ito, M. Fukuda. Research on the mechanism by which dry skin occurs and the development of an effective compound for its treatment. *J. Cosmet. Chem. Jpn.* 29 (1995) 133–145.
- [59] P. Clarys, A. Barrel. Quantitative evaluation of skin lipids. *Clin. Dermatol.* 13 (1995) 307–321.
- [60] A. V. Rawlings. Ethnic skin types: are there differences in skin structure and function. *Int. J. Cosmetic Science.* 28 (2006) 79–93.
- [61] G. La Ruche, J. P. Cesarini. Histologie et physiologie de la peau noire (Histology and physiology of black skin). *Ann. Dermatol. Venereol.* 119 (1992) 567–574.
- [62] E. Tschachler, F. Morizot. Chapter 3: Ethnic differences in skin aging, In: B. A. Gilchrest, J. Krutmann (Eds), *Skin Aging.*, 2006, pp. 3–31.
- [63] S. Diridollou, D. Black, M. Lagarde, Y. Gall, M. Berson, V. Vabre, F. Patat, L. Vaillant. Sex- and site-dependent variations in the thickness and mechanical properties of human skin in vivo. *Int. J. Cosmet. Sci.* 22 (2000) 421–435.
- [64] H. Dao, R. A. Kazin. Gender differences in skin: A review of the literature. *Gender Med.* 4 (2007) 308-328.
- [65] P. U. Giacomoni, T. Mammone, M. Teri. Gender-linked differences in human skin. *J. Dermatol. Sci.* 55 (2009) 144-149.
- [66] T. Gambichler, R. Matip, G. Moussa, P. Altmeyer, K. Hoffmann. In vivo data of epidermal thickness evaluated by optical coherence tomography: Effects of age, gender, skin type, and anatomic site. *J. Dermatol. Sci.* 44 (2006) 145-152.

- [67] G. N. Stamatias, R. B. Estanislao, M. Suero, Z.S. Rivera, J. Li, A. Khaiat, N. Kollias. Facial skin fluorescence as a marker of the skin's response to chronic environmental insults and its dependence on age. *Br. J. Dermatol.* 154 (2006) 125–132.
- [68] K. Hoffmann, T. P. Dirschka, M. Stucker, S. el-Gammal, P. Altmeyer. Assessment of actinic skin damage by 20-MHz sonography. *Phodermatol. Photoimmunol. Photomed.* 10 (1994) 97–101.
- [69] T. Ogiso, T. Shiraki, K. Okajima, T. Tanino, M. Iwaki, T. Wada. Transfollicular drug delivery: penetration of drugs through human scalp skin and comparison of penetration between scalp and abdominal skins in vitro. *J. Drug Target.* 10 (2002) 369–378.
- [70] P. Rolland, M.A. Bolzinger, C. Cruz, S. Briançon, D. Josse. Human scalp permeability to the chemical warfare agent VX. *Toxicol In Vitro.* 25 (2011) 1974–80.
- [71] U. Jacobi, M. Kaiser, R. Toll, S. Mangelsdorf, H. Audring, N. Otberg, W. Sterry, J. Lademann. Porcine ear skin an: in vitro model for human skin. *Skin Res Technol.* 13 (2007) 19–24.
- [72] J. Lademann, A. Patzelt, H. Richter, S. Schanzer, W. Sterry, A. Filbry, K. Bohnsack, F. Rippke, M. Meinke. Comparison of two in vitro models for the analysis of follicular penetration and its prevention by barrier emulsions. *Eur J Pharm Biopharm.* 72 (2009) 600–4.
- [73] R. Bazin, C. Fanchon. Equivalence of face and volar forearm for the testing of moisturizing and firming effect of cosmetics in hydration and biomechanical studies. *Int. J. Cosmet. Sc.* 28 (2006) 453–460.
- [74] A. Kawada. Risk and preventive factors for skin phototype. *J. Dermatol. Sci.* 23 (2000) S27-S29.
- [75] T. B. Fitzpatrick. The validity and practicality of sun-reactive skin types I through VI. *Arch. Dermatol.* 124 (1988) 869-71.
- [76] W. E. Roberts. Skin Type Classification Systems Old and New. *Dermatol. Clin.* 27 (2009) 529-533.
- [77] J. L. Chan, A. Ehrlich, R. C. Lawrence, A. N. Moshell, M. L. Turner, A. B. Kimball. Assessing the role of race in quantitative measures of skin pigmentation and clinical assessments of photosensitivity. *J. Am. Acad. Dermatol.* 52 (2005) 609-15.
- [78] J. K. Wagner, C. Jovel, H. L. Norton, E. J. Parra, M. D. Shriver. Comparing quantitative measures of erythema, pigmentation and skin response using reflectometry. *Pigment Cell Res.* 15 (2002) 379-84.
- [79] J. W. Fluhr, R. Darlenski, E. Berardesca. Ethnic groups and sensitive skin: two examples of special populations in dermatology. *Drug Discov. Today.* 5 (2008) 249-263.
- [80] S. Nouveau-Richard, Z. Yang, S. Mac-Mary, L. Li, P. Bastien, I. Tardy, C. Bouillon, P. Humbert, O. de Lacharrière. Skin ageing: A comparison between Chinese and European populations: A pilot study. *J. Dermatol. Sci.* 40 (2005) 187-193.
- [81] B. Dreno, F. Poli. Epidemiology of Acne. *Dermatology.* 206 (2003) 7–10.

- [82] C. Zouboulis, J. Piquero-Martin. Update Future of Systemic Acne Treatment. *Dermatology*. 206 (2003) 37–53.
- [83] V. Goulden, G.I. Stables, W.J. Cunliffe. Prevalence of facial acne in adults. *J Am Acad Dermatol*. 41 (1999) 577–580.
- [84] US Department of Health and Human Services, Agency for Health-care Research and Quality, Management of acne Rockville, MD: Agency for Healthcare Research and Quality; Mar, 2001. Summary-Evidence Report/Technology Assessment: Number 17. AHRQ Publication No. 01-E018.
- [85] A. L. Zaenglein, E. M. Graber, D. M. Thiboutot, J. S. Strauss, K. Wolff, L. A. Goldsmith, S. I. Katz, B. Gilchrest, A. S. Paller, D. J. Leffell. Chapter 78. Acne vulgaris and acneiform eruptions. *Fitzpatrick's Dermatology in General Medicine*. 7e: <http://www.accessmedicine.com/content.aspx?aID=2963025>. (último acceso, 8-Agosto del 2013).
- [86] J. F. Mac Faddin. Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica. Ed. Médica Panamericana, 2003.
- [87] R. A. Bojar, K. T. Holland. Acne and Propionibacterium acnes. *Clin. Dermatol*. 22 (2004) 375–9.
- [88] J. Kim. Review of the innate immune response in acne vulgaris: activation of toll-like receptor 2 in acne triggers inflammatory cytokine responses. *Dermatology*. 211 (2005) 193–8.
- [89] H.P.M. Gollnick, A. Krautheim. Topical treatment in acne: current status and future aspects. *Dermatology*. 206 (2003) 29–36.
- [90] D. Miller, Skillman, G. Smith, Gentle and fast-acting relief from a salicylic acid acne treatment with soothing natural extracts, *J. Am. Acad. Dermatol*. 12 (2004) 46.
- [91] S. Purdy, D. DeBerker. Acne vulgaris. *Clin Evid*. 5 (2008) 1714.
- [92] D. Thiboutot, D. Pariser, N. Egan, J. Flores, J. H. Herndon, N. B. Kanof, S. E. Kempers, S. Maddin, Y. P. Poulin, D. C. Wilson, J. Hwa, Y. Liu, M. Graeber. Adapalene gel 0.3% for the treatment of acne vulgaris: a multicenter, randomized, double-blind, controlled, phase III trial. *J Am Acad Dermatol*. 54 (2006) 242–250.
- [93] M. Ozolins, E. Eady, A. Avery, et al. Comparison of five antimicrobial regimens for treatment of mild to moderate inflammatory facial acne vulgaris in the community: randomized controlled trial. *Lancet*. 364 (2004) 2188–2195.
- [94] E. Seidler, A. Kimball. Meta-analysis comparing efficacy of benzoyl peroxide, clindamycin, benzoyl peroxide with salicylic acid, and combination benzoyl peroxide/clindamycin in acne. *J Am Acad Dermatol*. 63 (2010) 52–62.
- [95] J. Brown, C. Farquhar, O. Lee, Toomath R, Jepson R. Spironolactone versus placebo or in combination with steroids for hirsutism and/or acne (Review) *Cochrane Database Syst Rev*. 4 (2003) CD000194.
- [96] A. O. Arowojolu, M. F. Gallo, L. M. Lopez, D. A. Grimes. Combined oral contraceptive pills for treatment of acne (Review). *Cochrane Database Syst Rev*. 1 (2012) CD004425.
- [97] F.L. Hamilton, J. Car, C. Lyons, M. Car, A. Layton, A. Majeed. Laser and other light therapies for the treatment of acne vulgaris: systematic review. *Br J Dermatol*. 160 (2009) 1273–1285.

- [98] H. Haedersal, K. Togsverd-Bo, H.C. Wulf. Evidence-based review of lasers, light sources and photodynamic therapy in the treatment of acne vulgaris. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 22 (2008) 267–278.
- [99] M.H. Gold, J. Biron. Efficacy of a novel combination of pneumatic energy and broadband light for the treatment of acne. *J Drugs Dermatol.* 7 (2008) 639–642.
- [100] R. Wanitphakdeedecha, E. L. Tanzi, T. S. Alster. Photopneumatic therapy for the treatment of acne. *J Drugs Dermatol.* 8 (2009) 239–241.
- [101] E. Kessler, K. Flanagan, C. Chia, C. Rogers, D. A. Glaser. Comparison of  $\alpha$  and  $\beta$ -Hydroxy acid chemical peels in the treatment of mild to moderately severe facial acne vulgaris. *Dermatol Surg.* 34 (2008) 45–51.
- [102] T. Ilknur, M. Demirtasoglu, M. Unlu, Ş. Özkan. Glycolic acid peels versus amino fruit acid peels for acne. *J Cosmet Laser Ther.* 12 (2010) 242–245.
- [103] D. Thiboutot, A. Zaenglein, J. Weiss, G. Webster, B. Calvarese, D. Chen. An aqueous gel fixed combination of clindamycin phosphate 1.2% and benzoyl peroxide 2.5% for the once-daily treatment of moderate to severe acne vulgaris: assessment of efficacy and safety in 2813 patients. *J. Am. Acad. Dermatol.* 59 (2008) 792-800.
- [104] S. R. Berger, M. D.Tang, V. Sorba, Evaluation of the irritancy potential of adapalene and tretinoin in volunteers of different ethnic origins. *J. Am. Acad. Dermatol.* 11 (2004) 44.
- [105] C. Oprica, L. Emtestam, J. Lapins, F. Nyberg, K. Stenlund, L. Lundeber, E. Sillerstrom, C.E. Nord. Antibiotic-resistant *Propionibacterium acnes* on the skin of with moderate to severe acne in Stockholm. *Anaerobe.* 10 (2004) 155 –164.
- [106] J. J. Escobar-Chávez, I. M. Rodríguez-Cruz, C. L. Domínguez-Delgado. Chemical and physical enhancers for transdermal drug delivery. In: *Pharmacology*, Luca Galleli (Ed.) InTech Croatia, 2012, pp.397-434.
- [107] R. A. Tupker, J. Pinnagoda, J. P. Nater, The transient and cumulative effect of sodium lauryl sulphate on the epidermal barrier assessed by transepidermal water loss: Inter-individual variation, *Acta. Derm. Venereol. (Stockh)* 70 (1990) 1.
- [108] E.-S. Park, S.-Y. Chang, M. Hahn, S.-Ch. Chi. Enhancing effect of polyoxyethylene alkyl ethers on the skin permeation of ibuprofen, *Int. J. Pharm.* 209 (2000) 109-119.
- [109] A. Mehling, M. Kleber, H. Hensen. Comparative studies on the ocular and dermal irritation potential of surfactants, *Food. Chem. Toxicol.* 45 (2007) 747–758.
- [110] T. J. Hall-Manning, G. H. Holland, G. Rennie, P. Revell, J. Hines, M. D. Barratt and D. A. Basketter. Skin irritation potential of mixed surfactant systems, *Food. Chem. Toxicol.* 36 (1998) 233-238.
- [111] M.I. Hoq, T. Aoki, H.R. Ibrahim. Triclosan–lysozyme complex: a promising antimicrobial macromolecule stable against photooxidative damage. *Food Res. Int.* 42 (2009) 298–306.
- [112] L. Qian, Y. Guan, H. Xiao 2008. Preparation and characterization of inclusion complexes of a cationic  $\beta$ -cyclodextrin polymer with butylparaben or triclosan. *357 (2008) 244 - 251.*
- [113] J.-C. Kim, H. Y. Lee, M. H. Kim, H. J. Lee, H. Y. Kang, S. M. Kim. Preparation and characterization of chitosan/gelatin microcapsules containing triclosan. *52 (2006) 52-6.*



- [114] F. Maestrelli, M. Garcia-Fuentes, P. Mura, M. J. Alonso. A new drug nanocarrier consisting of chitosan and hydroxypropylcyclodextrin, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 63 (2006) 79–86.
- [115] L. Huang, J. Xin, Y. Guo, J. Li. A Novel Insulin Oral Delivery System Assisted by Cationic beta-Cyclodextrin Polymers. *J Appl Polym Sci.* 115 (2010) 1371-1379.
- [116] J. J. Escobar-Chávez, I. M. Rodríguez-Cruz, C. L. Domínguez-Delgado, R. Díaz-Torres, A. L. Revilla-Vázquez, N. Casas Aléncaster. Nanocarrier systems for transdermal drug delivery. In: *Recent Advances in Drug Carrier Systems*, Ali Demir Sezer, Ph.D. (Ed.) InTech Croatia, 2012, pp. 201-240.
- [117] I. Brigger, C. Dubernet, P. Couvreur. Nanoparticles in cancer therapy and diagnosis. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 54 (2002) 631-651.
- [118] Z. Cui, S. Han, D. Padinjarae, L. Huang. Immunsotimulation mechanism of LPD nanoparticles as a vaccine carrier. *Mol Pharmacol.* 2 (2005) 22-28.
- [119] M. Herffernan, N. Murthy. Polyketal nanoparticles: A new pH-sensitive biodegradable drug delivery vehicle. *Bioconjugate Chem.* 16 (2005) 1340-1342.
- [120] H. S. Yoo, J. E. Lee, H. Chung, I. C. Kwon, S. Y. Jeong. Self-assembled nanoparticles containing hydrophobically modified glycol chitosan for gene delivery. *J Control Release.* 103 (2005) 235-243
- [121] F. Danhier, B. Vroman, N. Lecouturier, N. Crockart, V. Pourcelle, H. Freichels, C. Jérôme, J. Marchand-Brynaert, O. Feron, V. Préat. Targeting of tumor endothelium by RGD-grafted PLGA-nanoparticles loaded with Paclitaxel. *J Control Release.* 140 (2009) 166-173.
- [122] S. Goswami, J. Bajpai, A. K. Bajpai. Designing Gelatin Nanocarriers as a Swellable System for Controlled Release of Insulin: An In-Vitro Kinetic Study. *J Macromol Sci.* 47 (2010) 119-130.
- [123] G. P. Li, Z. G. Liu, B. Liao, N. S. Zhong. Induction of Th1-Type Immune Response by Chitosan Nanoparticles Containing Plasmid DNA Encoding House Dust Mite Allergen Der p 2 for Oral Vaccination in Mice. *Cell Mol Immunol.* 6 (2009) 45-50.
- [124] E. Roger, F. Lagarce, E. Garcion, J. P. Benoit. Lipid nanocarriers improve paclitaxel transport throughout human intestinal epithelial cells by using vesicle-mediated transcytosis. *J Control Release.* 140 (2009) 174-181.
- [125] O. Rodriguez-Justo, Â. M. Moraes. Analysis of process parameters on the characteristics of liposomes prepared by ethanol injection with a view to process scale-up: Effect of temperature and batch volume. *Chem Eng Res Des.* 89 (2011) 785-792.
- [126] A. A. Gandhi, S. Chaskar, S. P. Jadhav, K. S. Salunkhe. Transfersomes. In: *International Medical Commission of Bhopal, Transdermal Drug Delivery*. Bhopal: Inventi Impact, 2011.
- [127] J. T. Madsen, S. Vogel, A. T. Karlberg, C. Simonsson, J. D. Johansen, K. E. Andersen. Ethosome formulations of known contact allergens can increase their sensitizing capacity. *Acta Derm Venereol.* 90 (2010) 374–378.
- [128] M. K. Chourasia, L. Kang, S. Yung Chan. Nanosized ethosomes bearing ketoprofen for improved transdermal delivery. *Results Pharma Sci.* 1 (2011) 60–67.
- [129] R. K. Keservani, A. K. Sharma, S. Ramteke. Novel vesicular approach for topical delivery of baclofen via niosomes. *Lat Am J Pharm.* 29 (2010) 1364–1370.

- [130] G. P. Kumar, P. R. Rao. Ultra deformable niosomes for improved transdermal drug delivery: the future scenario. *Asian J Pharm Sci.* 7 (2012) 96–109.
- [131] S. Svenson, D. A. Tomalia. Dendrimers in biomedical applications– reflections on the field. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 57 (2005) 2106-2129.
- [132] Y. Cheng, Z. Xu, M. Ma, T. Xu. Dendrimers as drug carriers: Applications in different routes of drug administration. *J Pharm Sci.* 97 (2008) 123-143.
- [133] M. J. Cloninger. Biological applications of dendrimers. *Curr Opin Chem Biol.* 6 (2002) 742-748.
- [134] P. Niederhafner, J. Šebestík, J. Ježek. Peptide dendrimers. *J Pept Sci.* 11 (2005) 757-788.
- [135] O. Sonnevile-Aubrun, J. -T. Simonnet, F. L. Alloret. Nanoemulsions: a new vehicle for skincare products. *Adv Colloid Interfac.* 108-109 (2004) 145-149.
- [136] T. Chen, S. M. D’Addio, M. T. Kennedy, A. Swietlow, I. G. Kevrekidis, A. Z. Panagiotopoulos. Protected Peptide Nanoparticles: Experiments and Brownian Dynamics Simulations of the Energetics of Assembly. *Nano Lett.* 9 (2009) 2218-2222.
- [137] Vanderhoff, J.W., El-Aasser, M.S., Ugelstad, J., 1979. Polymer emulsification process. U.S. Pat. 4, 177, 177.
- [138] H. Fessi, F. Puisieux, J. P. Devissaguet, N. Ammoury, S. Benita. Nanocapsules deposition by interfacial polymer deposition following solvent displacement. *Int J Pharm.* 55 (1989) R1-R4.
- [139] B. Sjostrom, B. Bergenstahl. Preparation of submicron drug particles in lecithin-stabilized o/w emulsions. Model studies of the precipitation of cholesteryl acetate. *Int. J. Pharm.* 88 (1992) 53-62.
- [140] R. Cavalli, O. Caputo, M. R. Gasco. Preparation and characterisation of solid lipid nanospheres containing paclitaxel. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 10 (2000) 305-309.
- [141] C. Schwarz, W. Mehnert, J. S. Lucks, R. H. Muller. Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery. I. Production, characterization and sterilization. *J. Cont. Rel.* 30 (1994) 83-96.
- [142] H. Heiati. Solid lipid nanocarriers as drug carriers. Plasma stability and biodistribution of solid lipid nanoparticles containing the lipophilic prodrug 3'-azido-3'-deoxythymidine palmitate in mice., *Int. J. Pharm.* 174 (1998) 71-80.
- [143] M. R. Gasco. Method for producing solid lipid microspheres having a narrow size distribution. 5250236 U. S. 1993.
- [144] R. Cavalli. Sterilisation and freeze-drying of drug-free and drug loaded solid lipid nanoparticles. *Int. J. Pharm.* 148 (1997) 47-54
- [145] C. Charcosset, A. A. El-Harati, H. Fessi, Preparation of solid lipid nanoparticles using a membrane contractor. *J. Cont. Rel.* 108 (2005) 112-120.
- [146] F. Q. Hu. Preparation of solid lipid nanoparticles with clobetasol propionate by a novel solvent diffusion method in aqueous system and physicochemical characterization. *Int. J. Pharm.* 239 (2002) 121-128.
- [147] R. H. Müller, M. Radtke, S. A. Wissing. Solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC) in cosmetic and dermatological preparations. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 54 (2002) S131-S155.

- [148] Z. Mei, H. Chen, T. Weng, Y. Yang, X. Yang. Solid lipid nanoparticle and microemulsion for topical delivery of triptolide. *Eur. J. Pharm Biopharm.* 56 (2003)189-196.
- [149] W. Liu., M. Hu, W. Liu, C. Xue, H. Xu, X. Yang. Investigation of the carbopol gel of solid lipid nanoparticles for the transdermal iontophoretic delivery of triamcinolone acetonide acetate. *Int. J. Pharm.* 364 (2008) 135-141.
- [150] E. Ugazio, R. Cavalli, M. R. Gasco. Incorporation of cyclosporin A in solid lipid nanoparticles (SLN). *Int. J. Pharm.* 241 (2002) 341-344.
- [151] N. P. Aditya, S. Patankar, B. Madhusudhan, R. S. R. Murthy, E. B. Souto. Arthemeter-loaded lipid nanoparticles produced by modified thin-film hydration: Pharmacokinetics, toxicological and in vivo anti-malarial activity. *Eur J. Pharm. Sci.* 40 (2010) 448-455.
- [152] V. Sanna, G. Caria, A. Mariani. Effect of lipid nanoparticles containing fatty alcohols having different chain length on the ex vivo skin permeability of Econazole nitrate. *Powder Technol.* 201 (2010) 32-36.
- [153] M. Joshi, V. Patravale. Nanostructured lipid carrier (NLC) based gel of celecoxib. *Int. J. Pharm.* 346 (2008) 124-132.
- [154] V. Teeranachaideekul, E. B. Souto, V. B. Junyaprasert, R. H. Müller. Cetyl palmitate-based NLC for topical delivery of Coenzyme Q10 – Development, physicochemical characterization and in vitro release studies. *Eur J Pharm Sci.* 67 (2007) 141-148.
- [155] C. Puglia, R. Filosa, A. Peduto, P. de Caprariis, L. Rizza, F. Bonina, P. Blasi. Evaluation of alternative strategies to optimize ketorolac transdermal delivery. *AAPS Pharm. Sci. Technol.* 7 (2006) 1–9
- [156] V. Teeranachaideekul, R. H. Müller, V. B. Junyaprasert. Encapsulation of ascorbyl palmitate in nanostructured lipid carriers (NLC)—effects of formulation parameters on physicochemical stability. *Int. J. Pharm.* 340 (2007) 198–206.
- [157] V. Jenning, S. H. Gohla. Encapsulation of retinoids in solid lipid nanoparticles (SLN). *J. Microencapsul.* 18 (2001) 149–158.
- [158] J. P.Jee, S. J. Lim, J. S. Park, C. K. Kim. Stabilization of all-trans retinol by loading lipophilic antioxidants in solid lipid nanoparticles. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 63 (2006) 134–139.
- [159] H. Tsujimoto, K. Hara. Application 21-Development of functional skincare cosmetics using biodegradable PLGA nanospheres. *Nanoparticle Technology Handbook (Second Ed)*, 2012, 501-506.
- [160] A. Patzelt, H. Richter, F. Knorr, U. Schäfer, C. M. Lehr, L. Dähne, W. Sterry, J. Lademann. Selective follicular targeting by modification of the particle sizes. *J Control Release.* 150 (2011) 45–8.
- [161] J. Shim, K. H. Seok, W. Park, S. Han, J. Kim, I. Chang. Transdermal delivery of mixnoxidil with block copolymer nanoparticles. *J Control Release.* 97 (2004) 477-484.
- [162] E. D. Cetin, E. Savk, M. Uslu, M. Eskin, A. Karul. Investigation of the inflammatory mechanisms in alopecia areata. *Am. J. Dermatopathol.* 31 (2009) 53-60.

- [163] A. F. Ourique, A. R. Pohlmann, S. S. Guterres, R. C. R. Beck. Tretinoin-loaded nanocapsules: Preparation, physicochemical characterization, and photostability study. *Int. J. Pharm.* 352 (2008) 1–4.
- [164] P. Lee, S. Peng, C. Su, F. Mi, H. Chen, M. Wei, H. J. Lin, H. W. Sung. The use of biodegradable polymeric nanoparticles in combination with a low-pressure gene gun for transdermal DNA delivery. *Biomaterials.* 29 (2008) 742-751.
- [165] M. J. Santander-Ortega, T. Stauner, B. Loretz, J. L. Ortega-Vinuesa, D. Bastos-González, G. Wenz, U. F. Schaefer, C. M. Lehr. Nanoparticles made from novel starch derivatives for transdermal drug delivery. *J Control Release.* 141 (2010) 85-92.
- [166] X. Huang, Y. Du, H. Yuan, F. Hu. Preparation and pharmacodynamics of low-molecular-weight chitosan nanoparticles containing insulin. *Carbohydr Polym.* 76 (2009) 368-373.
- [167] A. J. Thote, R. B. Gupta. Formation of nanoparticles of a hydrophilic drug using supercritical carbon dioxide and microencapsulation for sustained release. *Nanomed-Nanotechnol.* 1 (2005) 85-90.
- [168] P. A. McCarron, M. Hall. Incorporation of novel 1-alkylcarbonyloxymethyl prodrugs of 5-fluorouracil into poly(lactide-co-glycolide) nanoparticles. *Int. J. Pharm.* 348 (2008) 115-124.
- [169] J. Fuchs, T. M. Zollner, Kaufmann R., M. Podda. Redox-modulated pathways in inflammatory skin diseases. *Free Radical Bio Med.* 30 (2001) 337–53.
- [170] M. Schäfer-Korting, W. Mehnert, H.C. Korting. Lipid nanoparticles for improved topical application of drugs for skin diseases. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 59 (2007) 427–443.
- [171] A. M. Layton. Acne vulgaris and similar eruptions. *Medicine.* 33 (2005) 44-48.
- [172] K. A. Shah, A. A. Date, M. D. Joshi, V. B. Patravale. Solid lipid nanoparticles (SLN) of tretinoin: potential in topical delivery. *Int. J. Pharm.* 345 (2007) 163–171.
- [173] M. V. Seiden, F. Muggia, A. Astrow, U. Matulonis, S. Campos, M. Roche. A phase II study of liposomal lurtotecan (OSI-211) in patients with topotecan resistant ovarian cancer. *Gynecol Oncol.* 93 (2004) 229-232.
- [174] J. Guo, Q. Ping, G. Sun, C. Jiao. Lecithin vesicular carriers for transdermal delivery of cyclosporin A. *Int. J. Pharm.* 194 (2000) 201-207.
- [175] J. Guo, Q. Ping, L. Zhang. Transdermal delivery of insulin in mice by using lecithin vesicles as a carrier. *Drug Deliv.* 7 (2000) 113-116.
- [176] G. Cevc, A. Schatzlein, H. Richardsen. Ultradeformable lipid vesicles can penetrate the skin and other semi-permeable barriers unfragmented. Evidence from double label CLSM experiments and direct size measurements. *Bioch. Biophys. Acta.* 1564 (2002) 21-30.
- [177] Z. Wang, Z. Itoh, Y. Hosaka, I. Kobayashi, Y. Nakano, I. Maeda, F. Umeda, J. Yamakawa, M. Kawase, K. Yag. Novel Transdermal Drug Delivery System with Polyhydroxyalkanoate and Starburst Polyamidoamine Dendrimer. *J Biosci. Bioeng.* 95 (2003) 541-543.
- [178] A. S. Chauhan, S. Sridevi, K. B. Chalasani, A. K. Jain, S. K. Jain, N. K. Jain, P. V. Diwan. Dendrimer-mediated transdermal delivery: Enhanced bioavailability of indomethacin. *J. Control Release.* 90 (2003) 335-343.

- [179] C. Yiyun, M. Na, X. Tongwen, F. Rongqiang, W. Xueyuan, W. Xiaomin, W. Longping. Transdermal delivery of nonsteroidal anti-inflammatory drugs mediated by polyamidoamine (PAMAM) dendrimer. *J Pharm Sci.* 96 (2007) 595-602.
- [180] V. V. K. Venuganti, O. P. Perumal. Effect of poly(amidoamine) (PAMAM) dendrimer on skin permeation of 5-fluorouracil. *Int. J. Pharm.* 361 (2008) 230-238.
- [181] H. D. Beall, K. B. Sloan. Topical delivery of 5-fluorouracil (5-FU) by 1, 3-bisalkylcarbonyl-5-FU prodrugs. *Int. J. Pharm.* 231 (2002) 43-49.
- [182] W. R. Lee, S. C. Shen, K. H. Wang, C. H. Hu, J. Y. Fang. The effect of laser treatment on skin to enhance and control transdermal delivery of 5-fluorouracil. *J Pharm. Sci.* 91 (2002) 1613-1626.
- [183] F. Kuo, B. Subramanian, T. Kotyla, T. A. Wilson, S. Yoganathan, R. J. Nicolosi. Nanoemulsions of an anti-oxidant synergy formulation containing gamma tocopherol have enhanced bioavailability and anti-inflammatory properties. *Int J. Pharm.* 363 (2008) 206-213.
- [184] F. Shakeel, W. Ramadan. Transdermal delivery of anticancer drug caffeine from water-in-oil nanoemulsions. *Colloid Surface B.* 75 (2010) 356-362.
- [185] H. Wu, C. Ramachandran, A. U. Bielinska, K. Kingzett, R. Sun, N. D. Weiner, B. J. Roessler. Topical transfection using plasmid DNA in a water-in-oil nanoemulsion. *Int J. Pharm.* 221 (2001) 23-34.
- [186] B. Subramanian, F. Kuo, E. Ada, T. Kotyla, T. Wilson, S. Yoganathan, R. Nicolosi. Enhancement of anti-inflammatory property of aspirin in mice by a nano-emulsion preparation. *Int Immunopharmacol.* 8 (2008) 1533-1539.
- [187] D. Mou, H. Chen, D. Du, C. Mao, J. Wan, H. Xu, J. Yang. Hydrogel-thickened nanoemulsion system for topical delivery of lipophilic drugs. *Int. J. Pharm.* 353 (2008) 270-276.
- [188] M. P. Alves, A. L. Scarrone, M. Santos, A. R. Pohlmann, S. S. Guterres. Human skin penetration and distribution of nimesulide from hydrophilic gels containing nanocarriers. *Int. J. Pharm.* 341 (2007) 215-220.
- [189] J. Pardeike, A. Hommoss, R. H. Müller. Lipid nanoparticles (SLN, NLC) in cosmetic and pharmaceutical dermal products. *Int. J. Pharm.* 366 (2009) 170–184.
- [190] G. Cevc. Lipid vesicles and other colloids as drug carriers on the skin, *Adv. Drug. Deliv. Rev.* 56 (2004) 675– 711.
- [191] R. Haag. Supramolecular drug-delivery systems based on polymeric core-shell architectures. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 43 (2004) 278-282.
- [192] M. R. Radowski, A. Shukla, H. von Berlepsch, C. Bottcher, G. Pickaert, H. Rehage, R. Haag. Supramolecular aggregates of dendritic multishell architectures as universal nanocarriers. *Angew Chem. Int. Ed. Engl.* 46 (2007) 1265-1269.
- [193] S. S. Tinkle, J. M. Antonini, B. A. Rich, J. R. Roberts, R. Salmen, K. DePree, E. J. Adkins. Skin as a route of exposure and sensitization in chronic beryllium disease. *Environ Health Perspect.* 111 (2003) 1202-1208.
- [194] S. Kim, Y. T. Lim, E. G. Soltesz, A. M. De Grand, J. Lee, A. Nakayama. Near-infrared fluorescent type II quantum dots for sentinel lymph node mapping. *Nat Biotechnol.* 22 (2004) 93-97.
- [195] A. Gonçalves, A. C. Braud, F. Viret, D. Genre, G. Gravis, C. Tarpin. Phase I study of pegylated liposomal doxorubicin (Caelyx) in combination with carboplatin in patients with advanced solid tumors. *Anticancer Res.* 23 (2003) 3543-3548.

- [196] G. M. M. El Maghraby, A. C. Williams, B. W. Barry. Can drug-bearing liposomes penetrate intact skin? *J Pharm Pharmacol.* 58 (2006) 415-429.
- [197] J. Guo, Q. Ping, G. Sun, C. Jiao. Lecithin vesicular carriers for transdermal delivery of cyclosporin A. *Int. J. Pharm.* 194 (2000) 201-207.
- [198] J. Guo, Q. Ping, L. Zhang. Transdermal delivery of insulin in mice by using lecithin vesicles as a carrier. *Drug Deliv.* 7 (2000) 113-116.
- [199] P. L. Honeywell-Nguyen, A. de Graaff, H. E. Junginger, J. A. Bouwstra. Interaction between elastic and rigid vesicles with human skin in vivo. *Proc. Int. Symp. Control Release Bioact. Mater.* 27 (2000) 237-238.
- [200] I. L. Medintz, H. T. Uyeda, E. R. Goldman, H. Mattoussi. Quantum dot bioconjugates for imaging, labeling and sensing. *Nat Mater.* 4 (2005) 435-446.
- [201] S. D. Caruthers, S. A. Wickline, G. M. Lanza. Nanotechnological applications in medicine. *Curr. Opin. Biotech.* 18 (2007) 26-30.
- [202] C. L. Domínguez- Delgado. Estudio sobre el transporte a través de piel in vitro de triclosán, formulado en una dispersión de nanopartículas poliméricas, como alternativa para el tratamiento del acné. Efecto del laureato de sacarosa como promotor de absorción. Informe de investigación de Maestría. Posgrado en Ciencias Químicas, UNAM, 2008.
- [203] B. J. Doménech, L. J. Martínez, D. J. Plá. *Biofarmacia y Farmacocinética*, Ed. Síntesis. Madrid, España, 1998.
- [204] A. Thielitz, M. Helmdach, E. M. Ropke, H. Gollnick. Lipid analysis of follicular casts from cyanoacrylate strips as a new method for studying therapeutic effects of antiacne agents. *Br J Dermatol.* 145 (2001) 19–27.
- [205] M. Ossadnik, V. Czaika, A. Teichmann, W. Sterry, H. J. Tietz, J. Lademann, S. Koch. Differential stripping: introduction of a method to show the penetration of topically applied antifungal substances into the hair follicles. *Mycoses.* 50 (2007) 457–62.
- [206] J. A. Palero, H. S.de Bruijn, A. van der Ploeg-van den Heuvel, H. J. C. M. Sterenborg, H. C. Gerritsen. In vivo nonlinear spectral imaging in mouse skin. *Opt. Express.* 14 (2006) 4395–4402.
- [207] L. H. Laiho, S. Pelet, T. M. Hancewicz, P. D. Kaplan, P. T. So. Two-photon 3-D mapping of ex vivo human skin endogenous fluorescence species based on fluorescence emission spectra. *J. Biomed. Opt.* 10 (2005) 024016.
- [208] Y. C. Wu, J. N. Y. Qu. Two-photon autofluorescence spectroscopy and second-harmonic generation of epithelial tissue. *Opt. Lett.* 30 (2005) 3045–3047.
- [209] B. R. Masters, P. T. C. So. Confocal microscopy and multiphoton excitation microscopy of human skin in vivo. *Opt. Express.* 8 (2001) 2–10.
- [210] A. Zoumi, A. Yeh, B. J. Tromberg. Imaging cells and extracellular matrix in vivo by using second-harmonic generation and two photon excited fluorescence. *Proc.Natl. Acad. Sci.USA.* 99 (2002) 11014–11019.
- [211] W. R. Zipfel, R. M. Williams, R. Christie, A. Yu Nikitin, B. T. Hyman, W. W. Webb. Live tissue intrinsic emission microscopy using multiphoton-excited native fluorescence and second harmonic generation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 100 (2003) 7075–7080.
- [212] T. H. Tsai, S. H. Jee, C. Y. Dong, S. J. Lin. Multiphoton microscopy in dermatological imaging. *J. Dermatol. Sci.* 56 (2009) 1-8.

- [213] J. Paoli, M. Smedh, M. B. Ericson. Multiphoton laser scanning microscopy—a novel diagnostic method for superficial skin cancers., *Semin. Cutan. Med. Surg.* 28 (2009) 190-195.
- [214] D. C. L. Domínguez. Estudio comparativo de la absorción percutánea in vitro de triclosán a partir de un sistema nanoparticulado y dos formas comerciales, destinados al tratamiento de acné. Tesis de Licenciatura. FES-C. UNAM, 2006.
- [215] ICH, Validation of Analytical Procedures: Text And Methodology Q2(R1), <http://www.ich.org/products/guidelines/quality/article/quality-guidelines.html> (October 1994/November 1996, último acceso Agosto, 2013)
- [216] FDA Guidance for Industry, Bioanalytical Method Validation <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/Guidances/ucm070107.pdf> (2000, último acceso Agosto, 2013).
- [217] Manual of Dispersion Technology Systems. Nanometric group, Malvern Instrument., Inc. South Borough MA, 2005.
- [218] A. Budhian, S. J. Siegel, K. I. Winey. Controlling the in vitro release profiles for a system of haloperidol-loaded PLGA nanoparticles. *Int. J. Pharm.* 346 (2008) 151–159.
- [219] L. Mu, S.S. Feng. A novel controlled release formulation for the anticancer drug paclitaxel (Taxol): PLGA nanoparticles containing vitamin E TPGS. *J. Control. Release.* 86 (2002) 33–48.
- [220] S. Kockischa, G. D. Reesb, J. Tsibouklisc, J. D. Smart. Mucoadhesive, triclosan-loaded polymer microspheres for application to the oral cavity: preparation and controlled release characteristics. *Eur J Pharm Biopharm.* 59 (2005) 207–216.
- [221] S. Gautam, S. Mahaveer. Review: In-vitro drug release characterization models. *Int J Pharm Stud Res.* 2 (2011) 77-84.
- [222] W. I. Higuchi. Diffusional models useful in biopharmaceutics drug release rate processes. *J. Pharm. Sci.* 56 (1967) 315-324.
- [223] A. A. Noyes, W. R. Whitney. The rate of solution of solid substances in their own solutions. *J. Am. Chem. Soc.* 19 (1897) 930-934.
- [224] R. W. Kormeyer, R. Gurny, E. Doelker, P. Buri, N.A. Peppas. Mechanisms of solute release from porous hydrophilic polymers. *Int. J. Pharm.* 15 (1983) 25-35.
- [225] A. W. Hixson, J. H. Crowell. Dependence of reaction velocity upon surface and agitation (I) theoretical consideration. *Ind. Eng. Chem.* 23 (1931) 923-931.
- [226] R.W. Baker, H.S. Lonsdale. Controlled release of biologically active agents, A.C. Tanquary, R.E. Lacey (Eds), Plenum Press, New York, 1974.
- [227] S. Dash, P. N. Murthy, L. Nath, Chowdhury P. Kinetic modeling on drug release from controlled drug delivery systems. *Acta Poloniae Pharmaceutica, Drug Research.* 67 (2010) 217-223.
- [228] D. A. Chiappetta, E. P. Gergic, M. J. Legaspi, G. N. Cantarelli, M. F. Garcia-Gamboa, C. Bregni. Comprimidos Bioadhesivos Formulados con Excipientes Hidrofilicos para Uso Bucofaríngeo. *Acta Farm. Bonaerense.* 25 (2006) 360-5.
- [229] H. S. Kas. Chitosan: properties, preparations, and application to microparticulate systems, *J. Microencaps.* 14 (1997) 689–711.
- [230] R. Müller, K. Mäder, S. Gohla. Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery—a review of the state of the art, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 50 (2000) 161–177.

- [231] K. S. Klee, M. Farwick, P. Lersch. Triggered release of sensitive active ingredients upon response to the skin's natural pH. *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects*. 338 (2009) 162–166.
- [232] J. N. Miller, J. C. Miller, *Estadística y quimiometría para química analítica*. Prentice Hall, Madrid, España, 4<sup>a</sup> ed, 2002. pp 111-135.
- [233] F. P. Schmook, J. G. Meingassner, A. Billich, Comparison of human skin or epidermis model with human and animal skin in in-vitro percutaneous absorption, *Int. J. Pharm.* 215 (2001) 51–56.
- [234] B. Godin, E. Toutilou, Transdermal skin delivery: prediction for humans from in vivo, ex vivo and animal models, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 59 (2007) 1152–1161.
- [235] S. P. Huong, H. Bun, J-D. Fourneron, J-P. Reynier, V. Andrieu, Use of various models for in vitro percutaneous absorption studies of ultraviolet filters, *Skin Res. Technol.* 15 (2009) 253–261.
- [236] J. O'Connor, S. Cage. In vitro skin absorption—can it be used in isolation for risk assessment purposes. In: K.R. Brain, K.A. Walters (Eds.), *Abstracts of Presentations at the Ninth International Perspectives in Percutaneous Penetration Conference*, STS Publishing, 2004.
- [237] R. P. Zendzian. Dermal absorption of pesticides in the rat. *Am. Ind. Hyg. Assoc. J.* 61 (2000) 473–483.
- [238] R. P. Zendzian. Pesticide residues in/on the skin and its potential contribution to dermal toxicity. *J. Appl. Toxicol.* 23 (2003) 121–136.
- [239] E.-S. Park, S.-Y Chang, M. Hahn, S.-Ch. Chi, Enhancing effect of polyoxyethylene alkyl ethers on the skin permeation of ibuprofen, *Int. J. Pharm.* 209 (2000) 109-119.
- [240] M. S. Roberts, Y. Dancik, T. W. Prow, C. A. Thorling, L. L. Lin, J. E. Grice, T. A. Robertson, K. König, W. Becker. Non-invasive imaging of skin physiology and percutaneous penetration using fluorescence spectral and lifetime imaging with multiphoton and confocal microscopy. *Eur J Pharm Biopharm.* 77 (2011) 469–88.
- [241] S. Lombardi Borgia, M. Regehly, R. Sivaramakrishnan, W. Mehnert, H. C. Korting, K. Danker, B. Röder, K. D. Kramer, M. Schäfer-Korting. Lipid nanoparticles for skin penetration enhancement—correlation to drug localization within the particle matrix as determined by fluorescence and paretic spectroscopy. *J Control Release*. 110 (2005) 151–63.
- [242] R. Toll, U. Jacobi, H. Richter, J. Lademann, H. Schaefer, U. Blume-Peytavi. Penetration profile of microspheres in follicular targeting of terminal hair follicles. *J Invest Dermatol.* 123 (2004) 168–76.
- [243] J. Lekki, Z. Stachura, W. Dabros, J. Stachura, F. Menzel, T. Reinert, T. Butz, J. Pallon, E. Gontier, M.D. Ynsa, P. Moretto, Z. Kertesz, Z. Szikszai, A.Z. Kiss, On the follicular pathway of percutaneous uptake of nanoparticles: Ion microscopy and autoradiography studies, *Nucl. Instrum. Methods Phys. Res. Sect. B* 260 (2007) 174–177.
- [244] M.-A. Bolzinger, S. Briançon, Y. Chevalier. Nanoparticles through the skin: managing conflicting results of inorganic and organic particles in cosmetics and pharmaceuticals. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol.* 3 (2011) 463–78.
- [245] J. P. Ryman-Rasmussen, J. E. Riviere, N. A. Monteiro-Riviere. Penetration of intact skin by quantum dots with diverse physicochemical properties. *Toxicol Sci.* 91 (2006) 159–65.



- [246] H. Wagner, K.-H. Kostka, C.-M. Lehr, U. F. Schaefer. pH profiles in human skin: influence of two in vitro test systems for drug delivery testing. *Eur J Pharm Biopharm.* 55 (2003) 57–65.
- [247] T. J. Mosmann. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol. Methods* 65 (1983) 55-63.
- [248] I. Hoq, H. R. Ibrahim. Potent antimicrobial action of triclosan–lysozyme complex against skin pathogens mediated through drug-targeted delivery mechanism. *Eur J Pharm Sci.* 42 (2011) 130–137.
- [249] J. Saising, S. P. Voravuthikunchai, Anti Propionibacterium acnes activity of rhodomirtone, an effective compound from *Rhodomirtus tomentosa* (Aiton) Hassk. leaves. *Anaerobe.* 18 (2012) 400-404.
- [250] D.-H. Oh, D. L. Marshall. Antimicrobial activity of ethanol, glycerol monolaurate or lactic acid against *Listeria monocytogenes*. *Int J Food Microbiol,* 20 (1993) 239-246.
- [251] W.-J. Li, S.-P. Nie, X.-Z. Liu, H. Zhang, Y. Yang, Q. Yu, M.-Y. Xie. Antimicrobial properties, antioxidant activity and cytotoxicity of ethanol-soluble acidic components from *Ganoderma atrum*. *Food Chem Toxicol.* 50 (2012) 689–694.
- [252] D. A. Chiappetta, J. Degrossi, S. Teves, M. D’Aquino, C. Bregni, A. Sosnik. Triclosan-loaded poloxamine micelles for enhanced topical antibacterial activity against biofilm. *Eur J Pharm Biopharm.* 69 (2008) 535–545.
- [253] M. H. Schmid-Wendtner, H.C. Korting, The pH of the skin surface and its impact on the barrier function, *Skin Pharmacol. Physiol.* 19 (2006) 296–302.
- [254] A. C. Williams, B. W. Barry, Penetration enhancers, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 56 (2004) 603–618.
- [255] A. Patzelt, F. Knorr, U. Blume-Peytavi, W. Sterry, J. Lademann. Hair follicles, their disorders and their opportunities. *Drug Discov Today Dis Mech.* 5 (2008) 173–81.
- [256] N. Otberg, A. Teichmann, U. Rasuljev, R. Sinkgraven, W. Sterry, J. Lademann. Follicular penetration of topically applied caffeine via a shampoo formulation. *Skin Pharmacol Physiol.* 20 (2007) 195–8.
- [257] H. Schaefer, J. Lademann The role of follicular penetration. *Skin Pharmacol Physiol.* 14 (2001) 23–7.
- [258] H. Knaggs. Cell biology of the pilosebaceous unit. In: G. F. Webster, A. V. Rawlings (Eds). *Acne and its Therapy*. New York: Informa Healthcare, 2007. pp. 12–36.
- [259] A. Vogt, S. Hadam, M. Heiderhoff, H. Audring, J. Lademann, W. Sterry, U. Blume-Peytavi. Morphometry of human terminal and vellus hair follicles. *Exp Dermatol.* 16 (2007) 946–50.
- [260] K. Krause, K. Foitzik. Biology of the hair follicle: the basics. *Semin Cutan Med Surg.* 25 (2006) 2–10.
- [261] M. Hordinsky *Advances in hair diseases.* *Adv Dermatol.* 24 (2008) 245–59.
- [262] H. Chen, X. Chang, D. Du, W. Liu, T. Weng, Y. Yang, et al. Podophyllotoxin-loaded solid lipid nanoparticles for epidermal targeting. *J Control Release.* 110 (2006) 296–306.

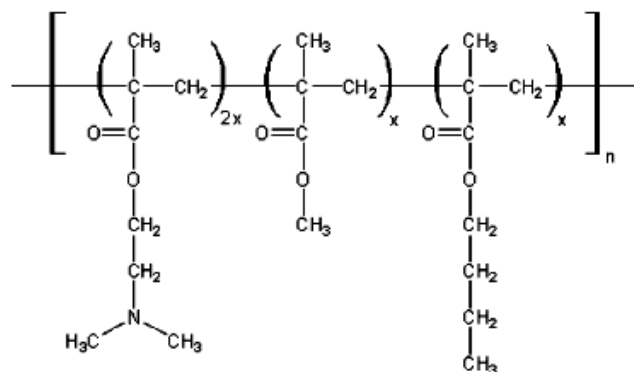
## ANEXOS

### 1. ANEXO I

#### 1.1 Monografía del polímero Eudragit® E 100

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

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



**Estructura molecular del polímero Eudragit® E 100.<sup>i</sup>**

- Gránulos amarillos, con característico olor a aminas.
- Pureza 98% en sustancia seca.
- PM- 150 000
- Soluble en fluido gástrico

- Soluble en soluciones de Buffer de 2 a 5 y arriba de 5.0 de pH (forma sales con ácidos), a pHs neutros se hace permeable al agua y en soluciones buffer. Es soluble en alcohol isopropílico, acetona, alcohol etílico, cloruro de metileno y otros solventes orgánicos, así como metil etil cetona (15min). La siguiente Cuadro proporciona detalles de otros solventes en los cuales se disuelve Eudragit® E 100, con sus respectivos tiempos de disolución.

**Solubilidad del polímero Eudragit® E 100<sup>ii</sup>**  
(15g en 100 g de solvente a 20°C con agitación)

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

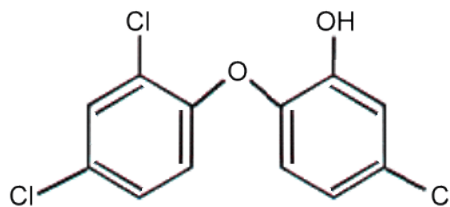
- Posibles aplicaciones: recubrimiento de comprimidos, cápsulas, gránulos, píldoras.
- Índice de acidez: 180mg de KOH/g de sustancia seca.
- Índice de refracción : 1.380-1.385
- P. de transición vítrea: 46 °C.

i. R.I. Moustafine a, V.A. Kemenova c, G. Van den Mooter, Characteristics of interpolyelectrolyte complexes of Eudragit E 100 with sodium alginate, Int. J. Pharm. 294 (2005);113–120.  
ii. Röhm Pharma Polymers. A Company of the Hüls Group. GMBH, Weiterstad.

## 1.2 Monografía del fármaco triclosán

- **Sinónimo:** Cloxifenol
- **Nombre propio:** Adasept; Gamophen; Irgasan DP 300; Ster Zac; Tersaseptico; Zalclense, Irgasan CH 3635
- **Nombre Químico:** 5-Cloro-2-(2,4-diclorofenoxi) fenol ó 2, 4, 4'-tricloro-2'-hidroxifenil eter.
- **Fórmula:** C<sub>12</sub> H<sub>7</sub> Cl<sub>3</sub> O<sub>2</sub>; C 49.78%, H 2.44%, Cl 36.73%, O 11.05%.

### Estructura química



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

- **Actividad plastificante cuando es encapsulado junto con algunos fármacos**
- **Actividad Farmacológica:** Agente antimicrobiano no catiónico
- **Peso Molecular:** 289.53
- **Apariencia:** Poder cristalino blanco o suaves aglomerados
- **Solubilidad:** en NaOH 1M, soluble en soluciones alcalinas; soluble en solventes orgánicos, prácticamente insoluble en agua. Soluble en muchos surfactantes. Solubilidad en etanol 1gm/1ml.
- **Solución:** clara a turbia
- **Espectro Ultravioleta:** Con un solvente como lo es el etanol se produce un pico a 283nm con un coeficiente de extinción de  $A=1_1 = 179$  b; con etanol alcalino se produce un pico a 295nm.
- **Espectro de Masas:** Picos principales a m/z 288, 290, 218, 146, 114, 63, 51, 148.
- **Punto de Fusión:** 55 °C a 57 °C
- **Presión de Vapor:** (20°C)  $4 \times 10^{-6}$  mm Hg
- **Pka:** 7.9
- **Cuantificación.** La cuantificación puede hacerse por cromatografía de gases. En plasma u orina la sensibilidad es de 2ng /ml.
- **Compatibilidad con la piel**<sup>iii</sup>
- **Estabilidad:** Estable a la hidrólisis
- **Usos:** Altamente un efectivo antimicrobiano de amplio espectro. Poco eficaz contra P. auruginosa y hongos. Este es usado en pastas dentales y soluciones para lavados

bucales, detergentes. Usado como desinfectante, bacteriostático y como conservador para preparaciones cosméticas. Es usado en concentraciones de 0.05 a 2%.

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

### 1.3 Preparación de una solución al 5 % de goma tragacanto

Se pesaron 2.5 g de goma tragacanto y se dejaron en contacto en 50 ml de agua destilada. En el mismo contenedor se colocaron 0.1 g de metilparabeno y 0.015g de propilparabeno. Después de una hora los ingredientes fueron agitados mecánicamente hasta su completa homogenización.

- 
- i. Barry B. W. Lipid-Protein-partitioning theory of skin penetration enhancement. J. Cont. Rel. 15 (1991);:237-248.
  - ii. Clarke's., Isolation and Identification of Drugs. Second Edition, The pharmaceutical Press. London, (1986).

## 2. ANEXO II: ANÁLISIS ESTADÍSTICO

### Cantidades de triclosán obtenidas de las cinéticas de liberación a partir de la dispersión de nanopartículas en un medio de pH 6.0

Tiempo (h)	Cantidad de fármaco (mg)						Promedio	D.E.	% Triclosán	D.E (%)
	Celda 1	Celda 2	Celda 3	Celda 4	Celda 5	Celda 6				
<b>0.3333</b>	12.7628	8.2945	7.2277	9.4814	9.2425	2.9806	8.3316	3.2138	13.8860	5.3563
<b>0.6667</b>	12.7628	11.5292	10.4547	10.3631	16.3511	12.0638	12.2541	2.2100	20.4235	3.6833
<b>1</b>	17.6360	28.3229	21.2307	13.4755	20.9128	16.9342	19.7520	5.0756	32.9200	8.4593
<b>1.5</b>	27.6324	32.7059	23.2130	21.6990	23.1072	19.9420	24.7166	4.6709	41.1943	7.7848
<b>2</b>	27.6324	35.0726	23.2130	23.2159	23.1072	19.9420	25.3639	5.3504	42.2731	8.9174
<b>3</b>	29.7297	35.0726	27.5170	27.3261	23.1072	19.9420	27.1158	5.2513	45.1930	8.7522
<b>4</b>	29.7297	35.0726	27.5170	27.3261	23.6977	22.7241	27.6779	4.4592	46.1298	7.4320
<b>5</b>	30.2869	35.0726	27.5170	27.3261	23.6977	22.7241	27.7708	4.5159	46.2846	7.5266
<b>6</b>	30.2869	52.4083	27.5170	27.3261	23.6977	22.7241	30.6600	11.0052	51.1001	18.3420
<b>7</b>	30.2869	52.4083	27.5170	27.3261	23.6977	22.7241	30.6600	11.0052	51.1001	18.3420
<b>8</b>	31.0032	52.4083	27.5170	27.3261	23.6977	22.7241	30.7794	11.0042	51.2990	18.3404

**Prueba de bondad de ajuste (Kolmogorov-Smirnov) para determinar si los datos de las cinéticas de liberación en un medio de pH 6.0 se ajustan a una población normal.**

Tiempo	0.33	0.66	1	1.5	2	3	4	5	6	7	8
<b>DPLUS</b>	0.193585	0.242308	0.218729	0.292907	0.322626	0.142655	0.181058	0.189073	0.346859	0.346859	0.325217
<b>DMINUS</b>	0.198947	0.196087	0.12272	0.153341	0.169928	0.182644	0.135226	0.131886	0.235421	0.235421	0.232078
<b>DN</b>	0.198947	0.242308	0.218729	0.292907	0.322626	0.182644	0.181058	0.189073	0.346859	0.346859	0.325217
<b>P-Value</b>	0.971482	0.872731	0.936379	0.681985	0.560054	0.98821	0.989329	0.982804	0.475191	0.475191	0.549657

Statgraphics centurion XVI (v 16.1.11)

Esta prueba es basada en calcular la distancia vertical máxima (DN) entre las funciones de distribución acumulada de las muestras, lo cual es aproximadamente la máxima distancia entre el conjunto de datos de los cuantiles. La Cuadro muestra los resultados para determinar si los datos provenientes de la cinética de liberación a pH 6.0 se ajustan a una distribución normal. Desde que el *valor de P* es más grande o igual a 0.05 en todas las pruebas realizadas, se puede decir que los datos vienen de una distribución normal con el 95% del nivel de confianza.

**Cantidades de triclosán obtenidas de las cinéticas de liberación a partir de la dispersión de nanopartículas en un medio de pH 5.7**

Tiempo (h)	Cantidad de fármaco (mg)						Promedio	D.E.	% Triclosán	D.E. (%)
	Celda 1	Celda 2	Celda 3	Celda 4	Celda 5	Celda 6				
0.25	4.2003	7.3566	3.4811	4.4203	4.9701	4.2307	4.7765	1.3512	7.9609	2.2521
0.5	7.5059	7.3566	5.9862	4.4423	6.6466	7.1767	6.5191	1.1594	10.8651	1.9323
1	11.3957	10.0905	10.4921	9.2149	7.5984	8.7351	9.5878	1.3537	15.9796	2.2562
1.5	11.6152	10.0905	10.4921	9.3083	10.3181	10.0145	10.3064	0.7584	17.1774	1.2640
2	12.5892	12.3553	12.4553	11.6876	12.7599	15.9558	12.9672	1.5094	21.6120	2.5156
3	18.2106	16.2033	17.1736	20.1667	18.4255	21.4139	18.5989	1.9149	30.9982	3.1915
4	18.2106	16.2033	21.1885	20.1667	21.8097	22.0340	19.9355	2.2998	33.2258	3.8329
5	23.4530	21.9367	24.9119	22.6137	24.9073	24.4960	23.7198	1.2576	39.5329	2.0960
7.5	27.6002	36.0185	30.2076	28.6277	24.9073	25.1790	28.7567	4.0942	47.9279	6.8236

**Prueba de bondad de ajuste Kolmogorov-Smirnov para determinar si los datos de las cinéticas de liberación en medio pH 5.7 se ajustan a una población normal**

Tiempo (h)	0.25	0.5	1	1.5	2	3	4	5	7.5
<i>DPLUS</i>	0.276365	0.197342	0.108525	0.236655	0.387951	0.202753	0.180752	0.171574	0.194857
<i>DMINUS</i>	0.168858	0.214728	0.144814	0.183457	0.198286	0.126859	0.207077	0.231452	0.173553
<i>DN</i>	0.276365	0.214728	0.144814	0.236655	0.387951	0.202753	0.207077	0.231452	0.194857
<i>P-Value</i>	0.749178	0.944867	0.99961	0.889987	0.329325	0.966052	0.959129	0.904806	0.976642

Statgraphics centurion XVI (v 16.1.11)

Esta prueba es basada en calcular la distancia vertical máxima (DN) entre las funciones de distribución acumulada de las muestras, lo cual es aproximadamente la máxima distancia entre el conjunto de datos de los cuantiles. La Cuadro muestra los resultados para determinar si los datos provenientes de la cinética de liberación a pH 7.5 se ajustan a una distribución normal. Desde que el *valor de P* es más grande o igual a 0.05 en todas las pruebas realizadas, se puede decir que los datos vienen de una distribución normal con el 95% del nivel de confianza.

La Cuadro siguiente muestra los valores más bajos y más altos de las poblaciones o cantidades de triclosán sospechosas para ser anómalas, obtenidas a partir de la cinética de liberación de la dispersión de nanopartículas a diferentes intervalos de tiempo en un medio de pH 5.7. Las medias de las muestras y las desviaciones estándares de los resultados para los intervalos de tiempo de 3, 4 y 7.5 horas son de 18.599, 19.936, 28.757 y 1.915, 2.299, 4.094 respectivamente. Los valores estudentizados miden cuántas desviaciones estándares tiene cada valor a partir de la media de la muestra. Los valores más extremos para los datos obtenidos en los intervalos de tiempo 3, 4 y 7.5 horas están marcados de color rojo en la siguiente Cuadro. Desde que los *valores de P* para la prueba de Grubbs en ambas pruebas son mayores o iguales a 0.05, esos valores no son significativos para ser anómalos (outliers) en el 95 % de nivel de confianza, asumiendo que todos los valores siguen una distribución normal.

**Análisis de identificación y tratamiento de valores sospechosos (outliers) potenciales de las cantidades de triclosán obtenidas en las cinéticas de liberación a diferentes intervalos de tiempo en el medio de pH 5.7**

<b>t=3</b>	<b>Sorted Values</b>	<b>Studentized Values</b>	<b>Studentized Values</b>	<b>Modified</b>
<b>Row</b>	<b>Value</b>	<b>Without Deletion</b>	<b>With Deletion</b>	<b>MAD Z-Score</b>
2	16.2033	-1.25109	-1.69943	-0.953173
3	17.1736	-0.744344	-0.857992	-0.515822
1	18.2106	-0.202774	-0.218722	-0.0484182
5	18.4255	-0.0905724	-0.0973083	0.0484182
4	20.1667	0.81871	0.959272	0.833178
6	21.4139	1.47007	2.27427	1.39534
<b>t=4</b>				
2	16.2033	-1.62287	-2.87169	-2.42552
1	18.2106	-0.749994	-0.865517	-1.33732
4	20.1667	0.100537	0.108039	-0.276967
3	21.1885	0.544862	0.606825	0.276967
5	21.8097	0.814966	0.95405	0.613704
6	22.034	0.912498	1.09489	0.735296
<b>t=7.5</b>				
5	24.9073	-0.940216	-1.13693	-0.860219
6	25.179	-0.873861	-1.03784	-0.787341
1	27.6002	-0.282492	-0.306148	-0.137831
4	28.6277	-0.0315052	-0.033819	0.137831
3	30.2076	0.354384	0.38623	0.561659
2	36.0185	1.77369	3.84638	2.12051

**Grubbs' Test (assumes normality) t=3**

Test statistic = 1.47007

P-Value = 0.638933



**Grubbs' Test (assumes normality) t=4**

Test statistic = 1.62287

P-Value = 0.352242

**Grubbs' Test (assumes normality) t=7.5**

Test statistic = 1.77369

P-Value = 0.147863

Statgraphics centurion XVI (v 16.1.11)

Las cantidades de triclosán sospechosas para ser anómalas obtenidas a partir de la cinética de liberación en un medio de pH de 6 a diferentes intervalos de tiempo, también fueron analizadas estadísticamente asumiendo distribuciones normales. Dichos datos fueron seleccionados por poseer una alta variabilidad. Las medias de las muestras y las desviaciones estandares se muestran en la siguiente Cuadro.

**Cantidades de triclosán sospechosas para ser anómalas, obtenidas a partir de la cinética de liberación en un medio de pH 6 a diferentes intervalos de tiempo**

Tiempo (h)	Media (mg)	D.E. (mg)
6	30.66	11.005
7	30.66	11.005
8	30.779	11.004
6 (sin dato anómalo)	26.310	3.082
7 (sin dato anómalo)	26.310	3.082
8 (sin dato anómalo)	26.455	3.320

La Cuadro siguiente muestra los valores más bajos y más altos de las cantidades de triclosán liberadas a diferentes intervalos de tiempo en el medio de pH 6. Se muestran también, los valores estudentizados que miden cuántas desviaciones estándares tiene cada valor a partir de la media de la muestra.

Desde que los *valores de P* para la prueba de Grubbs en cada intervalo de tiempo son menores a 0.05, esos valores son anómalos (outliers) en el 95 % de nivel de confianza. Éste fue el resultado para los datos provenientes de la sexta, séptima y octava hora en el estudio de liberación en medio de pH 6, asumiendo que todos los valores siguen una distribución normal como fue confirmado en los cálculos estadísticos anteriormente descritos. Dado lo anterior, esos valores probados son anómalos y no provienen desde las mismas distribuciones normales como el resto de las observaciones. La remoción de esos datos fue realizada, así como un análisis estadístico a los datos restantes, mostrando todos ser de la misma población.

**Análisis de identificación y tratamiento de valores sospechosos (outliers) potenciales de las cantidades de triclosán, obtenidas en la cinética de liberación en un medio de pH 6 a diferentes intervalos de tiempo**

<b>t=6</b>	<b>Sorted Values</b>	<b>Studentized Values</b>	<b>Studentized Values</b>	<b>Modified</b>
<b>Row</b>	<b>Value</b>	<b>Without Deletion</b>	<b>With Deletion</b>	<b>MAD Z-Score</b>
6	22.7241	-0.721105	-0.827315	-0.961704
5	23.6977	-0.632638	-0.714185	-0.76238
4	27.3261	-0.30294	-0.32879	-0.0195414
3	27.517	-0.285594	-0.309576	0.0195414
1	30.2869	-0.0339036	-0.0363942	0.58662
2	52.4083	1.97618	8.46865	5.11551
<b>t=7</b>				
6	22.7241	-0.721105	-0.827315	-0.961704
5	23.6977	-0.632638	-0.714185	-0.76238
4	27.3261	-0.30294	-0.32879	-0.0195414
3	27.517	-0.285594	-0.309576	0.0195414
1	30.2869	-0.0339036	-0.0363942	0.58662
2	52.4083	1.97618	8.46865	5.11551
<b>t=8</b>				
6	22.7241	-0.732018	-0.841667	-0.867409
5	23.6977	-0.643543	-0.727841	-0.687629
4	27.3261	-0.313815	-0.340875	-0.0176254
3	27.517	-0.296468	-0.321613	0.0176254
1	31.0032	0.0203376	0.0218297	0.661371
2	52.4083	1.96551	7.81719	4.61394
<b>t=6 (sin dato anómalo)</b>				
5	22.7241	-1.16372	-1.65874	-1.04838
4	23.6977	-0.847795	-1.04225	-0.826586
3	27.3261	0.329602	0.36302	0.0
2	27.517	0.391548	0.434397	0.0434889
1	30.2869	1.29037	2.01688	0.6745
<b>t=7 (sin dato anómalo)</b>				
5	22.7241	-1.16372	-1.65874	-1.04838
4	23.6977	-0.847795	-1.04225	-0.826586
3	27.3261	0.329602	0.36302	0.0
2	27.517	0.391548	0.434397	0.0434889
1	30.2869	1.29037	2.01688	0.6745
<b>t=8 (sin dato anómalo)</b>				
5	22.7241	-1.12328	-1.56243	-0.855487
4	23.6977	-0.830045	-1.01436	-0.6745
3	27.3261	0.262779	0.287586	0.0
2	27.517	0.320275	0.352402	0.0354873
1	31.0032	1.37027	2.30753	0.683553

**Grubbs' Test (assumes normality)- t=6**

Test statistic = 1.97618

P-Value = 0.00904582

**Grubbs' Test (assumes normality)-t=7**

Test statistic = 1.97618

P-Value = 0.00904582

**Grubbs' Test (assumes normality)-t=8**

Test statistic = 1.96551

P-Value = 0.012236

**Grubbs' Test (assumes normality)-t=6 (sin dato anómalo)**

Test statistic = 1.29037

P-Value = 0.845045

**Grubbs' Test (assumes normality) -t=7 (sin dato anómalo)**

Test statistic = 1.29037

P-Value = 0.845045

**Grubbs' Test (assumes normality) -t=8 (sin dato anómalo)**

Test statistic = 1.37027

P-Value = 0.655016

Statgraphics centurion XVI (v 16.1.11)

**Prueba de bondad de ajuste Kolmogorov-Smirnov para determinar si el conjunto de datos sin los valores anómalos de las cinéticas de liberación en medio pH 6 se ajustan a una población normal**

Esta prueba es basada en calcular la distancia vertical máxima (DN) entre las funciones de distribución acumulada de las muestras, lo cual es aproximadamente la máxima distancia entre el conjunto de datos de los cuantiles. La Cuadro muestra los resultados para determinar si el conjunto de datos provenientes de la cinética de liberación a pH 6 a intervalos de tiempo 6, 7 y 8 sin considerar los valores anómalos se ajustan a una distribución normal. Desde que el *valor de P* es más grande o igual a 0.05 en todas las pruebas realizadas, se puede decir que los datos vienen de una distribución normal con el 95% del nivel de confianza.

<b>Tiempo (h)</b>	<b>t=6 (s/anómalo)</b>	<b>t=7 (s/anómalo)</b>	<b>t=8 (s/anómalo)</b>
<b>DPLUS</b>	0.201725	0.201725	0.196744
<b>DMINUS</b>	0.229152	0.229152	0.203642
<b>DN</b>	0.229152	0.229152	0.203642
<b>P-Value</b>	0.955456	0.955456	0.985654

## Prueba de comparación de las varianzas de los datos obtenidos en las cinéticas de liberación a dos diferentes pHs

### Prueba de hipótesis:

Ho: La hipótesis nula:  $\sigma_1 = \sigma_2$

Hi: La hipótesis alternativa:  $\sigma_1 \neq \sigma_2$

### Criterio de aceptación

Si el *valor de P* calculado  $> 0.05$ , no se rechaza Ho, por lo tanto las varianzas son iguales.

Si el *valor de P* calculado  $< 0.05$ , se rechaza Ho, por lo tanto las varianzas son diferentes.

Esto nos permite determinar si la diferencia aparente entre la variabilidad de los datos obtenidos en las cinéticas de liberación a diferentes intervalos de tiempo son estadísticamente significativos o si están dentro del rango de variabilidad aleatoria normal para las muestras del tamaño actual. La Cuadro siguiente muestra que las varianzas de los datos son iguales.

### Comparación de las desviaciones estándar de los datos de las distancias de penetración acumuladas obtenidas en los estudios de permeación

Variance Check	Test
Hartley's	49.7757

Statgraphics centurion XVI (v 16.1.11)

Esta prueba asume que las muestras vienen de poblaciones que se distribuyen normalmente como ya fue calculado previamente con la prueba de Kolmogorov-Smirnov.

La Cuadro siguiente muestra un procedimiento de comparación múltiple para determinar que medias son diferentes de otras. En la misma se observan seis grupos homogéneos, en los cuales dentro de cada grupo de X por columnas no hay diferencia significativa de medias con un nivel de confianza del 95 %, utilizando el procedimiento de comparación múltiple de Bonferroni.

**Prueba de rango múltiple (Bonferroni) para determinar que medias de las cantidades de triclosán obtenidas en cada intervalo de tiempo en dos medios de pH son estadísticamente diferentes de otras con un 95 % de confianza**

<b>Tiempo (h)-Medio de pH</b>	<b>Count</b>	<b>Mean</b>	<b>Homogeneous Groups</b>
<b>0.25-pH 5.7</b>	6	4.77653	X
<b>0.5-pH 5.7</b>	6	6.51905	XX
<b>0.33-pH 6</b>	6	8.33158	XX
<b>1-pH 5.7</b>	6	9.58777	XX
<b>1.5-pH 5.7</b>	6	10.3065	XX
<b>0.66-pH 6</b>	6	12.2541	XX
<b>2-pH 5.7</b>	6	12.9672	XXX
<b>3-pH 5.7</b>	6	18.5989	XXX
<b>1-pH 6</b>	6	19.752	XXX
<b>4-pH 5.7</b>	6	19.9355	XXXX
<b>5-pH 5.7</b>	6	23.7198	XXXX
<b>1.5-pH 6</b>	6	24.7166	XXXX
<b>2-pH 6</b>	6	25.3638	XXXX
<b>7-pH 6</b>	5	26.3104	XXX
<b>6-pH 6</b>	5	26.3104	XXX
<b>8-pH 6</b>	5	26.4536	XXX
<b>3-pH 6</b>	6	27.1158	XX
<b>4-pH 6</b>	6	27.6779	X
<b>5-pH 6</b>	6	27.7707	X
<b>7.5-pH 5.7</b>	6	28.7567	X

Statgraphics centurion XVI (v 16.1.11)

**Distancias acumuladas de penetración de triclosán en la piel de doce voluntarios cuando fue tratada con la emulsión (o/w) disponible en el mercado, obtenidas mediante la técnica del *tape stripping*.**

No. de cintas	Voluntarios												Promedio (µm)	D.E.
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12		
1	0.8580	0.8284	0.7101	0.8284	1.8639	0.4734	0.4438	1.2130	0.8876	0.0000	0.5917	1.6864	0.8481	0.5537
2	1.8047	1.3314	1.3314	1.7456	2.8994	0.7988	0.7988	1.8935	1.3905	0.1479	0.8284	2.2485	1.4349	0.7451
3	2.9586	1.6568	2.0414	2.7515	3.4615	1.1834	1.0947	2.3669	1.8935	0.2959	1.0059	2.7219	1.9527	0.9419
4	4.2012	1.5385	2.4556	3.4024	3.6982	1.4793	1.3314	2.8107	2.4260	0.5917	1.3314	3.4615	2.3940	1.1432
5	5.8284	1.8935	3.5799	4.0533	4.2308	1.7751	1.5385	3.1657	2.8402	0.9172	1.5680	3.6982	2.9241	1.4359
6	6.5680	2.1006	5.3254	4.5858	4.6450	2.1302	1.7751	3.5207	3.2840	1.2426	1.7456	4.2604	3.4320	1.6730
7,8	11.1538	2.5148	8.5207	6.0355	5.1479	2.8698	2.1006	4.1124	5.0592	1.3609	2.1598	5.4734	4.7091	2.8887
9, 10	13.4024	3.3136	10.5917	7.1302	5.7988	4.2899	2.6036	6.5976	6.6864	2.1893	2.5148	7.5148	6.0528	3.4196
11, 12	17.0414	3.8462	12.7515	7.8402	6.2130	5.3846	2.8402	8.8757	7.9290	2.7811	3.0178	8.7574	7.2732	4.3204
13, 14	19.4970	4.1124	14.9704	8.8462	6.7160	6.0651	3.2840	10.2367	8.6982	3.3432	4.4675	9.9704	8.3506	4.9202
15, 16	22.3669	4.4970	16.8343	9.5858	7.0414	6.9822	3.7574	11.8935	9.4970	4.0533	5.4438	11.5089	9.4551	5.6052

**Prueba de bondad de ajuste Kolmogorov-Smirnov para determinar si los datos se ajustan a una población normal**

Voluntarios	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<i>DPLUS</i>	0.0948161	0.189476	0.13802	0.107519	0.267868	0.197953	0.179531	0.184422	0.179777	0.134944	0.293962	0.104377
<i>DMINUS</i>	0.105325	0.100829	0.0719043	0.152216	0.163469	0.127575	0.142943	0.120029	0.121765	0.187497	0.208494	0.0841977
<i>DN</i>	0.105325	0.189476	0.13802	0.152216	0.267868	0.197953	0.179531	0.184422	0.179777	0.187497	0.293962	0.104377
<i>P-Value</i>	0.9943	0.61388	0.920713	0.852335	0.201403	0.557522	0.68089	0.647918	0.679237	0.627187	0.125937	0.994934

Statgraphics centurión XVI (v 16.1.11)

Esta prueba es basada en calcular la distancia vertical máxima (DN) entre las funciones de distribución acumulada de las muestras, lo cual es aproximadamente la máxima distancia entre el conjunto de datos de los cuantiles. La Cuadro muestra los resultados para determinar si los datos provenientes de las distancias de penetración de triclosán en la piel de doce voluntarios cuando fue tratada con la emulsión (o/w) se ajustan a una distribución normal. Desde que el *valor de P* es más grande o igual a 0.05 en todas las pruebas realizadas, se puede decir que los datos vienen de una distribución normal con el 95% del nivel de confianza.

**Distancias acumuladas de penetración de triclosán en la piel de doce voluntarios cuando fue tratada con la dispersión de nanopartículas, obtenidas mediante la técnica del *tape stripping***

No. de cintas	Voluntarios												Promedio (µm)	D.E.
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12		
1	2.2485	0.7988	4.3491	1.2130	0.8284	1.7456	2.1302	2.4852	1.1538	0.9467	1.6864	1.3314	1.7431	0.9959
2	4.3195	1.3905	6.2130	2.0118	1.3314	2.8994	3.4024	3.9053	1.7751	1.5680	2.2189	3.4615	2.8748	1.4645
3	6.3018	1.9822	9.0533	2.9290	1.8639	3.7870	3.9941	5.0000	2.5148	1.9822	2.7515	4.5858	3.8955	2.1258
4	8.1657	2.6627	11.6272	3.6686	2.4852	4.3491	4.5858	5.9172	3.2840	2.7219	3.5503	5.7988	4.9014	2.6917
5	10.1183	2.9882	14.1420	4.2308	3.3728	5.0000	5.1183	6.8343	4.3787	3.8166	4.2308	7.0118	5.9369	3.2520
6	13.1657	3.5799	16.5680	4.9704	3.9645	5.8580	5.5917	7.7811	5.2663	4.9704	4.9112	8.3728	7.0833	3.9518
7,8	18.2544	4.5266	22.3077	6.2722	5.3254	7.2485	6.5089	9.4083	7.4556	6.4201	6.5385	11.0355	9.2751	5.4894
9,10	23.5799	5.1479	26.3905	7.1893	6.3018	8.9941	7.3373	11.3609	8.8166	7.5740	7.1598	12.9882	11.0700	6.8668
11,12	26.3314	6.2130	31.4793	7.8698	7.1302	10.3254	8.0769	13.4024	9.8817	8.6686	7.6627	15.4438	12.7071	8.0877
13,14	29.1124	6.4497	33.7574	9.1420	7.8994	11.2426	8.8462	15.0296	10.6509	9.5266	9.0828	17.7811	14.0434	8.7463
15,16	32.6923	7.0118	37.7811	9.7633	8.1657	12.2485	9.5266	15.9763	11.1538	9.9704	9.8521	18.2544	15.1997	9.9321

**Prueba de bondad de ajuste Kolmogorov-Smirnov para determinar si los datos se ajustan a una población normal**

Voluntarios	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>DPLUS</b>	0.0997936	0.108597	0.110839	0.122874	0.0697428	0.196945	0.290852	0.206307	0.0965763	0.190142	0.186138	0.191893
<b>DMINUS</b>	0.193327	0.145152	0.0768647	0.117425	0.11242	0.142063	0.195798	0.148147	0.0850097	0.0791875	0.104029	0.235626
<b>DN</b>	0.193327	0.145152	0.110839	0.122874	0.11242	0.196945	0.290852	0.206307	0.0965763	0.190142	0.186138	0.235626
<b>P-Value</b>	0.588118	0.88887	0.98937	0.969125	0.98751	0.564147	0.133488	0.516596	0.998333	0.609408	0.636341	0.339234

Statgraphics centurion XVI (v 16.1.11)

Esta prueba es basada en calcular la distancia vertical máxima (DN) entre las funciones de distribución acumulada de las muestras, lo cual es aproximadamente la máxima distancia entre el conjunto de datos de los cuantiles. La Cuadro muestra los resultados para determinar si los datos provenientes de las distancias de penetración de triclosán en la piel de doce voluntarios cuando fue tratada con la dispersión de nanopartículas se ajustan a una distribución normal. Desde que el *valor de P* es más grande o igual a 0.05 en todas las pruebas realizadas, se puede decir que los datos vienen de una distribución normal con el 95% del nivel de confianza.

Las Cuadros siguientes muestran los resultados para determinar si los datos provenientes de las distancias de penetración acumuladas de triclosán obtenidos en los estudios de permeación utilizando las formulaciones estudiadas se ajustan a una distribución normal.

**Prueba de bondad de ajuste Kolmogorov-Smirnov para determinar si los datos de las distancias de penetración acumuladas obtenidas en los estudios de permeación *in vivo* se ajustan a una población normal**

Formulaciones	Emulsión	Dispersión Nps
DPLUS	0.169159	0.283487
DMINUS	0.152364	0.204861
DN	0.169159	0.283487
P-Value	0.882278	0.291104

Formulaciones	Emulsión (o/w)-Mujeres	Emulsión (o/w)-Hombres	Dispersión Nps-Hombres	Dispersión Nps-Mujeres	Dispersión Nps Hombres-dato anómalo
DPLUS	0.27196	0.201429	0.258244	0.382151	0.175488
DMINUS	0.200635	0.124455	0.216306	0.279209	0.125759
DN	0.27196	0.201429	0.258244	0.382151	0.175488
P-Value	0.97952	0.858557	0.585745	0.773347	0.966228

Statgraphics centurion XVI (v 16.1.11)

Esta prueba es basada en calcular la distancia vertical máxima (DN) entre las funciones de distribución acumulada de las muestras, lo cual es aproximadamente la máxima distancia entre el conjunto de datos de los cuantiles. Desde que el *valor de P* es más grande o igual a 0.05 en todas las pruebas realizadas, se puede decir que los datos vienen de una distribución normal con el 95% del nivel de confianza.

Asumiendo la normalidad en los datos, se realizó una prueba formal para determinar razonablemente si todas las observaciones o distancias de penetración acumuladas obtenidas de los voluntarios tratados con ambas formulaciones en los estudios de permeación venían de la misma distribución normal, antes de estimar cualquier estadística adicional. La siguiente Cuadro muestra los valores más bajos y más altos de las poblaciones ya mencionadas.

Para los 12 valores de la emulsión y de la dispersión de nanopartículas, las medias de las muestras y las desviaciones estándares resultaron ser de 9.482, 5.578 y 15.2, 9.932, respectivamente. También se muestran los valores estudentizados que miden cuántas desviaciones estándares tiene cada valor a partir de la media de la muestra. Los valores más extremos del conjunto de datos de la emulsión y de la dispersión de nanopartículas están en la fila 1 y 3 que son 2.309 y 2.273 veces el valor de sus respectivas desviaciones estándares desde sus medias muestrales. Dichos valores resultaron pertenecer significativamente a sus



poblaciones normales de procedencia, desde que los *valores de P* para la prueba de Grubbs son mayores o iguales a 0.05, en el 95 % de nivel de confianza. Valores mayores que 3.5 veces la desviación estándar pueden ser posibles valores anómalos (outliers).

**Análisis de identificación y tratamiento de valores sospechosos (outliers) potenciales de las poblaciones normales, correspondientes a las distancias de penetración acumuladas obtenidas de los voluntarios tratados con cada formulación**

Emulsión (o/w)		Studentized Values	Studentized Values	Modified
Row	Sorted Values	Without Deletion	With Deletion	MAD Z-Score
7	3.7574	-1.02634	-1.12809	-0.886735
10	4.26036	-0.936174	-1.01905	-0.787886
2	4.61538	-0.872525	-0.94388	-0.71811
11	5.44379	-0.72401	-0.773445	-0.5553
6	6.98225	-0.448197	-0.470902	-0.252938
...				
4	9.5858	0.0185644	0.0193099	0.258752
12	11.5089	0.363331	0.380414	0.636705
8	11.8935	0.432284	0.453862	0.712295
3	16.8343	1.31807	1.50693	1.68334
1	22.3669	2.30994	3.50155	2.77068
<b>Dispersión de Nps</b>				
2	7.01183	-0.824381	-0.887917	-1.17304
5	8.16568	-0.708208	-0.75567	-0.791804
7	9.52663	-0.571184	-0.603963	-0.342138
4	9.76331	-0.547353	-0.577976	-0.263935
11	9.85207	-0.538417	-0.568258	-0.234609
...				
6	12.2485	-0.297135	-0.310424	0.557196
8	15.9763	0.0781933	0.0813568	1.78889
12	18.2544	0.30756	0.321417	2.54159
1	32.6923	1.76121	2.20157	7.31197
3	37.7811	2.27356	3.38745	8.99333

**Grubbs' Test (assumes normality)- Emulsión (o/w)**

Test statistic = 2.30994

P-Value = 0.0880154

**Grubbs' Test (assumes normality)- Dispersión de Nps**

Test statistic = 2.27356

P-Value = 0.10585

Statgraphics centurion XVI (v 16.1.11)

Asumiendo normalidad en los datos como ya fue confirmado en los estadísticos anteriores y asumiendo que los valores pertenecen a sus correspondientes distribuciones, se realizaron pruebas comparativas de las mismas. Una de ellas fue la pruebas de comparación realizada a las distribuciones acumuladas de las distancias totales de penetración de triclosán en los voluntarios tratados con ambas formulaciones (emulsión o/w y dispersión de Nps). En este caso la distancia máxima es 0.4167. Desde que el *valor de P* es más grande o igual a 0.05 se puede decir que no hay una diferencia estadísticamente significativa entre las dos distribuciones con el 95% del nivel de confianza.

### **Comparison of the distributions of the two samples (Kolmogorov-Smirnov Test)**

Estimated overall statistic DN = 0.416667

Two-sided large sample K-S statistic = 1.02062

Approximate P-value = 0.249269

Statgraphics centurion XVI (v 16.1.11)

### **Prueba de comparación de las desviaciones estándar de los datos de las distancias de penetración *in vivo* acumuladas obtenidas en los estudios de permeación**

#### ***Prueba de hipótesis:***

Ho: La hipótesis nula:  $\sigma_1 = \sigma_2$

Hi: La hipótesis alternativa:  $\sigma_1 \neq \sigma_2$

#### ***Criterio de aceptación***

Si el *valor de P* calculado  $> 0.05$ , no se rechaza Ho, por lo tanto las desviaciones estándar son iguales.

Si el *valor de P* calculado  $< 0.05$ , se rechaza Ho, por lo tanto las desviaciones estándar son diferentes.

Esto nos permite determinar si la diferencia aparente entre la variabilidad de los datos de la distancia de penetración acumulados son estadísticamente significativos o si están dentro del rango de variabilidad aleatoria normal para las muestras del tamaño actual.

La Cuadro siguiente muestra que las desviaciones estándar y las varianzas de los datos de la distancia de penetración acumulada obtenidos de los estudios de permeación *in vivo* son iguales. Desde que el *valor de P* es más grande que 0.05 no hay diferencia estadísticamente significativa entre las desviaciones estándar en un nivel de confianza del 95 %.

**Comparación de las desviaciones estándar de los datos de las distancias de penetración acumuladas obtenidas en los estudios de permeación**

Variance Check	Test	P-Value
Bartlett's	1.17111	0.0682767

Comparison	Sigma1	Sigma2	F-Ratio	P-Value
Dispersión Nps/emulsión	9.93214	5.57791	3.17061	0.0682

Statgraphics centurion XVI (v 16.1.11)

Esta prueba asume que las muestras vienen de poblaciones que se distribuyen normalmente como ya fue calculado previamente con la prueba de Kolmogorov-Smirnov.

Las distancias totales de penetración de triclosán en cada voluntario por género también fueron analizadas estadísticamente asumiendo distribuciones normales de acuerdo a los análisis estadísticos realizados con anterioridad, para determinar si todas las observaciones obtenidas venían de la misma distribución normal. La siguiente Cuadro muestra los valores más bajos y más altos de las distancias totales de penetración de triclosán en los voluntarios (subdivididos en mujeres y hombres) tratados con cada formulación.

En este análisis también se muestran los valores estudentizados que miden cuántas desviaciones estándares tiene cada valor a partir de la media de la muestra. Desde que los *valores de P* para la prueba de Grubbs en cada tratamiento son mayores o iguales a 0.05, esos valores no son anómalos (outliers) en el 95 % de nivel de confianza (este fue el resultado para todos los tratamientos excepto para las distancias totales de triclosán provenientes de voluntarios hombres y mujeres tratados con la dispersión de Nps) asumiendo que todos los otros valores siguen una distribución normal como fue confirmado en los cálculos estadísticos ya reportados.

Con respecto a los resultados provenientes de voluntarios hombres y mujeres tratados con la dispersión de nanopartículas, *el valor de P* de la prueba de Grubbs es menor a 0.05, por lo que ese valor es anómalo y no proviene desde la misma distribución normal como las demás observaciones con un 95 % de nivel de confianza. Dado lo anterior, se procedió a remover esos datos anómalos y se realizaron nuevamente los correspondientes análisis estadísticos. Los resultados mostraron que todos los datos correspondientes pertenecen a sus distribuciones normales ( $p > 0.5$ ).

**Análisis de identificación y tratamiento de valores sospechosos (outliers) potenciales de las poblaciones normales, correspondientes a las distancias totales de penetración de triclosán obtenidas de cada voluntario por género en los estudios de permeación**

Emulsión (o/w) mujeres		<i>Studentized Values</i>	<i>Studentized Values</i>	<i>Modified</i>
<i>Row</i>	<i>Sorted Values</i>	<i>Without Deletion</i>	<i>With Deletion</i>	<i>MAD Z-Score</i>
3	4.26036	-0.839352	-1.29636	-0.6745
2	9.5858	-0.267067	-0.291162	0.0
1	22.3669	1.10642	4.10122	1.6188
<b>Emulsión (o/w)-Hombres</b>				
5	3.7574	-1.153	-1.34563	-0.902042
1	4.61538	-0.949526	-1.06931	-0.666373
8	5.44379	-0.753073	-0.826116	-0.438831
4	6.98225	-0.38823	-0.41295	-0.016253
3	7.04142	-0.374198	-0.397719	0.0
7	9.49704	0.208147	0.219712	0.6745
9	11.5089	0.685249	0.746173	1.2271
6	11.8935	0.77646	0.854109	1.33275
2	16.8343	1.94817	3.00234	2.68987
<b>Dispersión Nps-Hombres</b>				
1	7.01183	-0.784728	-0.86406	-0.93495
3	8.16568	-0.662852	-0.720149	-0.6745
5	9.52663	-0.519101	-0.556925	-0.367302
8	9.85207	-0.484726	-0.518738	-0.293842
7	11.1538	-0.347225	-0.368536	0.0
4	12.2485	-0.231599	-0.244645	0.247094
6	15.9763	0.162154	0.170958	1.08855
9	18.2544	0.402781	0.428782	1.60277
2	37.7811	2.46529	6.80538	6.0104
<b>Dispersión Nps-Mujeres</b>				
2	9.76331	-0.58519	-0.719997	-0.6745
3	9.97041	-0.569475	-0.694333	0.0
1	32.6923	1.15466	155.867	74.0023
<b>Dispersión Nps-Hombres-s/dato anómalo</b>				
1	7.01183	-1.16938	-1.40389	-1.15349
2	8.16568	-0.870322	-0.983703	-0.772254
4	9.52663	-0.517593	-0.560039	-0.322587
7	9.85207	-0.433244	-0.465597	-0.215058
6	11.1538	-0.0958505	-0.101494	0.215058
3	12.2485	0.187867	0.199353	0.576746
5	15.9763	1.15404	1.38032	1.80844
8	18.2544	1.74448	2.60217	2.56114

**Grubbs' Test (assumes normality) Emulsión (o/w) -Mujeres**

Test statistic = 1.10642

P-Value = 0.554239

**Grubbs' Test (assumes normality) Emulsión (o/w)-Hombres**

Test statistic = 1.94817

P-Value = 0.228448

**Grubbs' Test (assumes normality) Dispersión Nps-Hombres**

Test statistic = 2.46529

P-Value = 0.0032551

**Grubbs' Test (assumes normality) Dispersión Nps-Mujeres**

Test statistic = 1.15466

P-Value = 0.0150067

**Grubbs' Test (assumes normality) Dispersión Nps-Hombres-s/dato anómalo**

Test statistic = 1.74448

P-Value = 0.407021

Statgraphics centurion XVI (v 16.1.11)

Cantidades de triclosán penetradas en la piel de doce voluntarios cuando fue tratada con la emulsión (o/w), obtenidas mediante la técnica del *tape stripping*.

No. de cintas	Voluntarios												Promedio (µg)	D.E.
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12		
1	15.9810	14.2831	19.6876	10.0430	11.2294	45.7239	21.6997	20.0184	10.0641	25.1272	11.9630	7.9028	17.8103	10.3045
2	8.5986	13.7794	31.1451	13.5381	9.4910	13.4363	25.9477	10.5353	6.4918	10.6625	8.7996	3.6539	13.0066	7.9117
3	6.7094	6.3241	25.8477	33.1002	10.8635	8.6311	12.4131	9.9579	5.9029	6.4084	7.0376	5.6274	11.5686	8.7677
4	11.5260	9.9201	14.9482	8.0853	7.0139	32.5219	10.3273	9.3243	4.0786	10.9266	0.1711	8.0844	10.5773	7.8590
5	5.9863	9.6446	15.0816	10.2238	4.9263	12.5799	13.4231	7.1648	2.4702	13.3398	1.6839	6.8726	8.6164	4.4526
6	6.8989	8.0669	6.7269	8.1994	4.2348	6.1916	10.1097	11.6374	4.3428	25.4809	17.2789	8.9119	9.8400	6.0548
7,8	3.0739	5.3694	15.3659	8.2845	9.1787	3.2634	6.9726	8.8084	0.1904	7.1262	10.3343	14.0163	7.6653	4.4016
9, 10	3.9847	26.1539	14.3866	7.3377	21.3619	1.9410	12.9063	0.0000	0.0000	1.5444	11.5190	9.1137	8.8739	8.8813
11, 12	3.7654	17.8326	13.9058	6.3786	6.0925	2.6904	6.0960	0.0000	0.0000	1.1934	11.1908	6.1451	5.9606	5.9765
13, 14	2.1393	30.6634	7.6132	10.4493	4.6911	1.7041	7.2754	0.0000	0.0000	4.1120	11.6673	7.9598	7.0427	8.6239
15, 16	0.0000	19.4314	13.8487	13.4091	4.3384	3.2476	4.3515	3.7066	0.0000	1.8252	2.3605	6.1952	5.7459	6.5323

Cantidad total permeada	(µg)	D.E.
Emulsión (o/w)	107.9619	40.6539

**Cantidades de triclosán penetradas en la piel de doce voluntarios cuando fue tratada con la dispersión de nanopartículas, obtenidas mediante la técnica del *tape stripping*.**

No. de cintas	Voluntarios												Promedio (µg)	D.E.
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12		
<b>1</b>	67.3710	81.3549	88.9066	148.5460	47.8817	147.1859	169.7473	179.4305	106.2311	98.4591	65.3440	23.7346	102.0161	49.5605
<b>2</b>	20.6915	99.4261	73.0844	141.2899	65.7459	148.8180	142.8694	120.7678	85.2483	59.8894	64.0549	52.9177	89.5670	41.0921
<b>3</b>	22.9949	122.6167	62.4868	149.9333	59.0111	77.7124	83.3284	94.4735	88.0879	41.3285	58.0265	51.7743	75.9812	35.1310
<b>4</b>	37.1955	104.3656	51.2461	59.7060	40.0983	45.0290	86.8682	49.8894	68.0125	0.0000	55.9003	31.3136	52.3119	27.0241
<b>5</b>	33.1634	63.7197	72.0139	29.5963	40.1685	38.7162	105.5888	23.6574	59.2401	0.0000	51.6708	21.7655	44.7849	28.0119
<b>6</b>	42.5474	81.3979	48.4196	22.1911	24.6534	25.7836	102.2920	7.8291	22.0648	0.0000	50.2562	13.9391	36.6244	30.4281
<b>7,8</b>	22.3596	46.2847	34.4498	13.6925	15.9802	23.6083	134.1646	10.5651	11.4970	0.0000	52.9186	0.0035	30.3035	36.7515
<b>9, 10</b>	22.3324	26.9788	23.5706	16.9524	18.0546	10.9574	117.3403	1.6067	0.9082	0.0000	27.1262	1.2803	22.1022	31.8614
<b>11, 12</b>	9.7367	16.5242	17.5965	23.1397	8.5144	7.5176	82.1569	4.6551	0.0000	0.0000	32.2631	5.6072	16.9957	22.8165
<b>13, 14</b>	19.9140	8.9321	35.2843	19.6139	12.9107	5.3194	57.7545	0.2922	0.1808	0.0000	25.5792	1.2425	15.4285	17.6831
<b>15, 16</b>	76.7260	20.4072	10.7915	16.4882	4.1646	7.0648	46.2812	0.0000	0.0000	0.0000	11.0548	1.3198	15.8422	23.3946

Cantidad total permeada de la dispersión de nanopartículas	(µg)	D.E.
<b>n= 12</b>	503.5612	246.5923
<b>n= 12- dato anómalo</b>	446.758	155.878

**Prueba de bondad de ajuste Kolmogorov-Smirnov para determinar si los datos obtenidos (cantidades de triclosán) en la piel de doce voluntarios tratada con la emulsión (o/w) se ajustan a una población normal**

<i>Cintas</i>	<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>	<i>5</i>	<i>6</i>	<i>7 y 8</i>	<i>9 y 10</i>	<i>11 y 12</i>	<i>13 y 14</i>	<i>15 y 16</i>
<b>DPLUS</b>	0.186251	0.294425	0.294965	0.28529	0.127795	0.232233	0.115488	0.1467	0.242505	0.220994	0.275823
<b>DMINUS</b>	0.168157	0.122044	0.249005	0.158456	0.146642	0.177288	0.104135	0.139553	0.129471	0.187578	0.162774
<b>DN</b>	0.186251	0.294425	0.294965	0.28529	0.146642	0.232233	0.115488	0.1467	0.242505	0.220994	0.275823
<b>P-Value</b>	0.799417	0.249987	0.24808	0.283997	0.958607	0.553771	0.997186	0.958468	0.491128	0.601071	0.322826

Statgraphics centurion XVI (v 16.1.11)

**Prueba de bondad de ajuste Kolmogorov-Smirnov para determinar si los datos obtenidos (cantidades de triclosán) en la piel de doce voluntarios tratada con la dispersión de nanopartículas se ajustan a una población normal**

<i>Cintas</i>	<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>	<i>5</i>	<i>6</i>	<i>7 y 8</i>	<i>9 y 10</i>	<i>11 y 12</i>	<i>13 y 14</i>	<i>15 y 16</i>
<b>DPLUS</b>	0.132775	0.155833	0.149555	0.143109	0.151667	0.225394	0.240912	0.355721	0.244914	0.152442	0.260983
<b>DMINUS</b>	0.152294	0.145932	0.0787294	0.130617	0.118312	0.111748	0.202668	0.241539	0.221298	0.186892	0.241842
<b>DN</b>	0.152294	0.155833	0.149555	0.143109	0.151667	0.225394	0.240912	0.355721	0.244914	0.186892	0.260983
<b>P-Value</b>	0.94354	0.93267	0.951194	0.966602	0.94535	0.575692	0.500497	0.0959718	0.477203	0.796006	0.39147

Statgraphics centurion XVI (v 16.1.11)

La prueba de bondad de ajuste Kolmogorov-Smirnov está basada en calcular la distancia vertical máxima (DN) entre las funciones de distribución acumulada de las muestras, lo cual es aproximadamente la máxima distancia entre el conjunto de datos de los cuantiles. Las Cuadros de la prueba muestran los resultados para determinar si los datos (cantidades de triclosán en la piel de doce voluntarios tratada ya sea con la emulsión o con la dispersión de nanopartículas) se ajustan a distribuciones normales. Desde que los *valores de P* son más grandes o iguales a 0.05 en todas las pruebas realizadas, se puede decir que los datos vienen de distribuciones normales con el 95% del nivel de confianza.



La siguiente Cuadro muestra un procedimiento de comparación múltiple para determinar que medias son diferentes de otras. En la misma se observan cinco grupos homogéneos, en los cuales dentro de cada grupo de X no hay diferencia significativa de medias con un nivel de confianza del 95 %, utilizando el procedimiento de comparación múltiple de Bonferroni.

**Prueba de rango múltiple (Bonferroni) para determinar que medias de cantidades de triclosán obtenidas en cada cinta (stripping) para cada formulación probada son estadísticamente diferentes de otras con un 95 % de confianza**

<i>No de Cinta</i>	<i>Count</i>	<i>Mean</i>	<i>Homogeneous Groups</i>
<b>15.16.Emulsión (o/w)</b>	12	6.05951	X
<b>11.12.Emulsión (o/w)</b>	12	6.27422	X
<b>13.14.Emulsión (o/w)</b>	12	7.35624	X
<b>7.8.Emulsión (o/w)</b>	12	7.66533	X
<b>5.Emulsión (o/w)</b>	12	8.61641	X
<b>9.10.Emulsión (o/w)</b>	12	9.18744	XX
<b>6.Emulsión (o/w)</b>	12	9.84001	XX
<b>4.Emulsión (o/w)</b>	12	10.5773	XX
<b>3.Emulsión (o/w)</b>	12	11.5686	XX
<b>2.Emulsión (o/w)</b>	12	13.0066	XX
<b>13.14.Dispersión Nps</b>	12	15.5853	XX
<b>15.16.Dispersión Nps</b>	12	16.1915	XX
<b>11.12.Dispersión Nps</b>	12	17.3093	XXX
<b>1.Emulsión (o/w)</b>	12	17.8103	XXX
<b>9.10.Dispersión Nps</b>	12	22.259	XXX
<b>7.8.Dispersión Nps</b>	12	30.4604	XXX
<b>6.Dispersión Nps</b>	12	36.7812	XXX
<b>5.Dispersión Nps</b>	12	44.9417	XXX
<b>4.Dispersión Nps</b>	12	52.4687	XX
<b>3.Dispersión Nps</b>	12	75.9812	XX
<b>2.Dispersión Nps</b>	12	89.5669	X
<b>1.Dispersión Nps</b>	12	102.016	X

Cada cinta viene expresada por el número seguido de un punto (ej. 1.)

Statgraphics centurion XVI (v 16.1.11)

Las siguientes Cuadron muestran los resultados para determinar si las cantidades de triclosán totales obtenidas en los estudios de permeación utilizando las formulaciones estudiadas se ajustan a distribuciones normales.

**Prueba de bondad de ajuste Kolmogorov-Smirnov para determinar si los datos (cantidades totales de triclosán penetradas en la piel de doce voluntarios, obtenidas en los estudios de permeación *in vivo*) se ajustan a una población normal**

<b>Formulaciones</b>	<b>Emulsión (o/w)</b>	<b>Dispersión Nps (n=12)</b>	<b>Dispersión Nps (n=12-dato anómalo)</b>
<b>DPLUS</b>	0.134312	0.194923	0.121439
<b>DMINUS</b>	0.114681	0.108912	0.162499
<b>DN</b>	0.134312	0.194923	0.162499
<b>P-Value</b>	0.981955	0.751969	0.93348

<b>Formulaciones</b>	<b>Emulsión (o/w, Hombres)</b>	<b>Dispersión Nps (Hombres)</b>	<b>Emulsión (o/w, Mujeres)</b>	<b>Dispersión Nps (Hombres-dato anómalo)</b>	<b>Dispersión Nps (Mujeres)</b>
<b>DPLUS</b>	0.194693	0.275619	0.193845	0.169993	0.2208
<b>DMINUS</b>	0.149266	0.134211	0.243396	0.212266	0.189007
<b>DN</b>	0.194693	0.275619	0.243396	0.212266	0.2208
<b>P-Value</b>	0.884637	0.513754	0.994252	0.86378	0.998577

La prueba de Kolmogorov-Smirnov está basada en calcular la distancia vertical máxima (DN) entre las funciones de distribución acumulada de las muestras, lo cual es aproximadamente la máxima distancia entre el conjunto de datos de los cuantiles. Desde que los *valores de P* son más grandes o iguales a 0.05 en todas las pruebas realizadas, se puede decir que los datos vienen de una distribución normal con el 95% del nivel de confianza.

Una vez asumida la probabilidad normal para los valores correspondientes a la cantidad total de triclosán para cada voluntario se realizó una prueba formal para determinar razonablemente si todas las observaciones obtenidas en los estudios de permeación *in vivo* utilizando ambas formulaciones venían de la misma distribución normal. La Cuadro siguiente muestra los valores más bajos y más altos de las poblaciones o cantidades totales de triclosán obtenidas de cada voluntario tratado con cada formulación.

**Análisis de identificación y tratamiento de valores sospechosos (outliers) potenciales de las poblaciones normales, correspondientes a las cantidades totales de triclosán obtenidas para cada voluntario tratado con las formulaciones estudiadas**

Emulsión (o/w)		<i>Studentized Values</i>	<i>Studentized Values</i>	<i>Modified</i>
Row	Sorted Values	<i>Without Deletion</i>	<i>With Deletion</i>	<i>MAD Z-Score</i>
<b>9</b>	<b>33.5407</b>	<b>-1.83061</b>	-2.33029	-1.54433
<b>1</b>	68.6636	-0.966658	-1.05556	-0.73879
<b>8</b>	81.153	-0.659443	-0.7012	-0.452347
<b>12</b>	84.4832	-0.577529	-0.6109	-0.375971
<b>5</b>	93.4214	-0.357667	-0.374407	-0.170975
...				
<b>4</b>	129.049	0.518693	0.546858	0.646133
<b>7</b>	131.522	0.57954	0.613101	0.702867
<b>6</b>	131.931	0.589598	0.624118	0.712245
<b>2</b>	161.469	1.31616	1.50429	1.38968
<b>3</b>	178.557	1.7365	2.15737	1.7816
<b>Dispersión de Nps</b>				
<b>10</b>	199.677	-1.23233	-1.39081	-1.49036
<b>12</b>	204.898	-1.21116	-1.3628	-1.4639
<b>5</b>	337.183	-0.674709	-0.718191	-0.793317
<b>1</b>	375.032	-0.521219	-0.549596	-0.601451
<b>9</b>	441.471	-0.251794	-0.262729	-0.264663
...				
<b>3</b>	517.85	0.0579456	0.0602816	0.12252
<b>6</b>	537.712	0.138492	0.144189	0.223205
<b>4</b>	641.15	0.557959	0.589528	0.747549
<b>2</b>	672.008	0.683097	0.727551	0.903975
<b>7</b>	<b>1128.39</b>	<b>2.53386</b>	4.37285	3.21747
<b>Dispersión de Nps (dato anómalo removido)</b>				
<b>9</b>	<b>199.677</b>	<b>-1.58509</b>	-1.94452	-1.67571
<b>11</b>	204.898	-1.5516	-1.88841	-1.6459
<b>5</b>	337.183	-0.702953	-0.754356	-0.890604
<b>1</b>	375.032	-0.460141	-0.485872	-0.6745
<b>8</b>	441.471	-0.0339222	-0.0354018	-0.295165
...				
<b>10</b>	494.194	0.304314	0.319198	0.00586692
<b>3</b>	517.85	0.456072	0.481474	0.140931
<b>6</b>	537.712	0.583493	0.620638	0.254337
<b>4</b>	641.15	1.24707	1.42937	0.844921
<b>2</b>	672.008	1.44503	1.71814	1.02111

**Grubbs' Test (assumes normality)-Emulsión (o/w)**

Test statistic = 1.83061

P-Value = 0.597011

**Grubbs' Test (assumes normality)-Dispersión de Nps**

Test statistic = 2.53386

P-Value = 0.0224131

**Grubbs' Test (assumes normality)-Dispersión de Nps (dato anómalo removido)**

Test statistic = 1.58509

P-Value = 1.0

Statgraphics centurion XVI (v 16.1.11)

Las medias de las muestras y las desviaciones estandares de los resultados para la emulsión y para la dispersión de nanopartículas son 107.962, 503.561 y 40.6539, 246.592 respectivamente. Los valores estudentizados miden cuántas desviaciones estándares tiene cada valor a partir de la media de la muestra.

Los valores más extremos para los datos de la emulsión y de la dispersión de nanopartículas estan en la fila 9 y 7 que son 1.831 y 2.533 veces el valor de sus respectivas desviaciones estandares desde sus medias muestrales. Desde que el *valor de P* para la prueba de Grubbs en la emulsión (o/w) es mayor o igual a 0.05, ese valor no es significativo para ser anómalo (outlier) en el 95 % de nivel de confianza, asumiendo que todos los otros valores siguen una distribución normal como fue confirmado en los cálculos estadísticos reportados con anterioridad.

Con respecto a los resultados para la dispersión de nanopartículas, *el valor de P* de la prueba de Grubbs es menor a 0.05, por lo que ese valor es anómalo y no proviene desde la misma distribución normal como las demás observaciones con un 95 % de nivel de confianza.

Dado lo anterior, se procedió a remover ese dato anómalo desde la población y se realizó nuevamente un análisis estadístico. La población resulto venir de una distribución normal y la media de la muestra así como su desviación estándar resultaron ser de 446.758 y 155.878 respectivamente. El valor más extremo de este último conjunto de datos para la dispersión de nanopartículas se ubica en la fila 9 y es 1.585 veces el valor de su desviación estándar desde su media muestral. Dicho valor no resulto ser anómalo ( $P > 0.05$ ).

Una vez que se corroboró la pertinencia de los datos en las muestras correspondientes se realizaron pruebas de comparación de las mismas, es decir, una prueba de comparación de las distribuciones acumuladas de las cantidades de triclosán obtenidas aplicando las dos formulaciones en los estudios de permeación *in vivo* (emulsión (o/w) y la dispersión de nanopartículas ( $n = 12$ -dato anómalo)).

En este caso la distancia máxima es 1.0. Desde que el valor de P, en la Cuadro siguiente es menor a 0.05 se puede decir que hay una diferencia significativa estadísticamente entre las dos distribuciones con el 95% del nivel de confianza.

**Comparison of the distributions of the two samples (Kolmogorov-Smirnov Test)**

Estimated overall statistic DN = 1.0

Two-sided large sample K-S statistic = 2.39565

Approximate P-value = 0.0000207054

Statgraphics centurion XVI (v 16.1.11)

**Prueba de comparación de las desviaciones estándar de los datos (cantidades de triclosán totales obtenidas en los estudios de permeación para cada voluntario) provenientes de las dos muestras****Prueba de hipótesis:**Ho: La hipótesis nula:  $\sigma_1 = \sigma_2$ Hi: La hipótesis alternativa:  $\sigma_1 \neq \sigma_2$ **Criterio de aceptación**

Si el *valor de P* calculado  $> 0.05$ , no se rechaza Ho, por lo tanto las desviaciones estándar son iguales.

Si el *valor de P* calculado  $< 0.05$ , se rechaza Ho, por lo tanto las desviaciones estándar son diferentes.

Esto nos permite determinar si la diferencia aparente entre la variabilidad de los datos de las cantidades totales de triclosán son estadísticamente significativos o si están dentro del rango de variabilidad aleatoria normal para las muestras del tamaño actual (emulsión (o/w),  $n=12$  y dispersión de nanopartículas,  $n=12$ -dato anómalo).

La Cuadro siguiente prueba la hipótesis nula de que las desviaciones estándar y las varianzas de los datos obtenidos (cantidades totales de triclosán para cada voluntario) en los estudios de permeación *in vivo* son iguales con un 95 % de nivel de confianza. Esta prueba asume que las muestras vienen de poblaciones que se distribuyen normalmente como ya fue calculado previamente con la prueba de Kolmogorov-Smirnov.

**Comparación de las desviaciones estándar de los datos de las cantidades totales de triclosán obtenidas en los estudios de permeación**

Variance Check	Test
Hartley's	773.469

Comparison	Sigma1	Sigma2	F-Ratio	P-Value
Dispersión Nps / Emulsión (o/w)	155.878	40.6539	14.7017	0.0001

Statgraphics centurion XVI (v 16.1.11)

Las cantidades totales de triclosán para cada voluntario por género también fueron analizadas estadísticamente asumiendo distribuciones normales y para determinar si todas las observaciones obtenidas venían de la misma distribución normal.

La siguiente Cuadro muestra los valores más bajos y más altos de las cantidades totales de triclosán obtenidas de los voluntarios (subdivididos en mujeres y hombres) tratados con cada formulación. Además, se muestran también, los valores estudentizados que miden cuántas desviaciones estándares tiene cada valor a partir de la media de la muestra. Dichos valores se muestran en rojo.

Desde que los *valores de P* para la prueba de Grubbs en cada tratamiento son mayores o iguales a 0.05, esos valores no son anómalos (outliers) en el 95 % de nivel de confianza (este fue el resultado para todos los tratamientos excepto para las cantidades totales de triclosán provenientes de voluntarios hombres tratados con la dispersión de Nps) asumiendo que todos los otros valores siguen una distribución normal como fue confirmado en los cálculos estadísticos reportados anteriormente. Con respecto a los resultados provenientes de voluntarios hombres tratados con la dispersión de nanopartículas, *el valor de P* de la prueba de Grubbs es menor a 0.05, por lo que ese valor es anómalo y no proviene desde la misma distribución normal como las demás observaciones con un 95 % de nivel de confianza.

Dado lo anterior, se procedió a remover ese dato anómalo desde la población y se realizó nuevamente un análisis estadístico. La población resulto venir de una distribución normal y el valor más extremo de este último conjunto de datos para la dispersión de nanopartículas no resulto ser anómalo ( $P > 0.05$ ).

**Grubbs' Test (assumes normality)- Emulsión (o/w)-Hombres**

Test statistic = 1.70176

P-Value = 0.57953

**Grubbs' Test (assumes normality)- Emulsión (o/w)-Mujeres**

Test statistic = 1.08262

P-Value = 0.67839

**Grubbs' Test (assumes normality)-Dispersión Nps-Hombres**

Test statistic = 2.29718

P-Value = 0.0255546

**Grubbs' Test (assumes normality) Dispersión Nps- Hombres (removiendo dato anómalo)**

Test statistic = 1.83957

P-Value = 0.276519

**Grubbs' Test (assumes normality) Dispersión Nps-Mujeres**

Test statistic = 1.06108

P-Value = 0.774362

Statgraphics centurion XVI (v 16.1.11)

**Análisis de identificación y tratamiento de valores sospechosos (outliers) potenciales de las poblaciones normales, correspondientes a las cantidades totales de triclosán obtenidas de cada voluntario por género en los estudios de permeación**

<b>Emulsión (o/w)-Hombres</b>		<i>Studentized Values</i>	<i>Studentized Values</i>	<i>Modified</i>
<b>Row</b>	<b>Sorted Values</b>	<i>Without Deletion</i>	<i>With Deletion</i>	<i>MAD Z-Score</i>
<b>7</b>	<b>33.5407</b>	<b>-1.70176</b>	-2.32604	-1.08708
<b>6</b>	81.153	-0.642178	-0.696281	-0.231075
<b>9</b>	84.4832	-0.568068	-0.611845	-0.171204
<b>3</b>	93.4214	-0.369154	-0.392253	-0.010507
<b>8</b>	94.0058	-0.356148	-0.378178	0.0
<b>5</b>	131.522	0.478759	0.51214	0.6745
<b>4</b>	131.931	0.487859	0.522208	0.681852
<b>1</b>	161.469	1.1452	1.33446	1.2129
<b>2</b>	178.557	1.52549	1.95722	1.52013
<b>Emulsión (o/w)-Mujeres</b>				
<b>1</b>	<b>68.6636</b>	<b>-1.08262</b>	-3.30175	-1.2375
<b>3</b>	107.747	0.193527	0.208212	0.0
<b>2</b>	129.049	0.889091	1.47792	0.6745
<b>Dispersión Nps-Hombres</b>				
<b>9</b>	204.898	-1.28588	-1.54463	<b>-3.70099</b>
<b>3</b>	337.183	-0.77263	-0.849509	-2.00866
<b>7</b>	441.471	-0.368004	-0.391007	-0.6745
<b>6</b>	493.167	-0.167428	-0.17654	-0.0131456
<b>8</b>	494.194	-0.163441	-0.17232	0.0
<b>2</b>	517.85	-0.0716593	-0.0754373	0.302629
<b>4</b>	537.712	0.00540427	0.00568714	0.556729
<b>1</b>	672.008	0.526458	0.565136	2.27478
<b>5</b>	<b>1128.39</b>	<b>2.29718</b>	4.76008	<b>8.11334</b>
<b>Dispersión Nps- Hombres (removiendo dato anómalo)</b>				
<b>8</b>	<b>204.898</b>	<b>-1.83957</b>	-2.90961	<b>-4.04781</b>
<b>3</b>	337.183	-0.894209	-1.01469	-2.19359
<b>6</b>	441.471	-0.148929	-0.157865	-0.731817
<b>5</b>	493.167	0.220513	0.234252	-0.00720151
<b>7</b>	494.194	0.227856	0.242118	0.00720151
<b>2</b>	517.85	0.396909	0.425468	0.338778
<b>4</b>	537.712	0.538852	0.584163	0.617183
<b>1</b>	672.008	1.49858	1.9924	2.49957
<b>Dispersión Nps-Mujeres</b>				
<b>3</b>	199.677	-0.924977	-1.63899	-0.6745
<b>1</b>	375.032	-0.136104	-0.145373	0.0
<b>2</b>	<b>641.15</b>	<b>1.06108</b>	2.8533	1.02361

Statgraphics centurion XVI (v 16.1.11)

**Intensidad de la fluorescencia del colorante rojo de nilo contenido en la emulsión (o/w) disponible en el mercado, a diferentes intervalos de profundidad en la zona folicular de la piel humana (Tiempo de contacto en los estudios de permeación: 1 hora).**

No. de plano z	Profundidad ( $\mu\text{m}$ )	Intensidad de la Fluorescencia			Promedio	D. E.	Promedio-blanco
		1	2	3			
1	0	47.329	27.147	44.139	39.538	10.849	7.860
2	10	65.015	25.696	47.567	46.093	19.701	11.483
3	20	66.977	24.344	52.211	47.844	21.649	8.935
4	30	71.143	22.605	50.138	47.962	24.342	11.405
5	40	78.098	21.729	49.195	49.674	28.188	18.273
6	50	83.969	20.356	48.895	51.073	31.862	25.142
7	60	79.52	19.061	47.274	48.618	30.252	27.473
8	70	66.837	18.122	42.444	42.468	24.358	25.759
9	80	52.656	17.809	34.231	34.899	17.433	21.527
10	90	39.078	17.371	24.459	26.969	11.069	15.917
11	100	30.914	16.96	17.245	21.706	7.975	12.000
12	110	22.357	16.528	13.016	17.300	4.718	7.624
13	120	16.345	15.745	10.085	14.058	3.454	4.187
14	130	11.653	14.945	7.778	11.459	3.587	1.753
15	140	8.346	13.596	6.113	9.352	3.842	-0.050
16	150	6.248	12.274	5.167	7.896	3.830	1.518
17	160	5.367	11.819	4.707	7.298	3.929	2.263
18	170	4.708	11.281	0	5.330	5.666	1.205
19	180	4.269	10.711	0	4.993	5.392	2.985
20	190	4.173	10.342	0	4.838	5.203	2.846
21	200	4.119	10.319	0	4.813	5.194	2.809
22	210	0	10.342	0	3.447	5.971	1.479
23	220	0	11.819	0	3.940	6.824	3.940
24	230	0	13.28	0	4.427	7.667	4.427
25	240	0	14.859	0	4.953	8.579	4.953
26	250	0	15.804	0	5.268	9.124	5.268
27	260	0	17.197	0	5.732	9.929	5.732
28	270	0	19.45	0	6.483	11.229	6.483
29	280	0	22.194	0	7.398	12.814	7.398
30	290	0	24.29	0	8.097	14.024	8.097
31	300	0	24.17	0	8.057	13.955	8.057
32	310	0	23.093	0	7.698	13.333	7.698
33	320	0	22.466	0	7.489	12.971	7.489
34	330	0	20.498	0	6.833	11.835	6.833
35	340	0	16.531	0	5.510	9.544	5.510
36	350	0	12.364	0	4.121	7.138	4.121



**Intensidad de la fluorescencia del colorante rojo de nilo contenido en la solución saturada, a diferentes intervalos de profundidad en la zona folicular de la piel humana (Tiempo de contacto en los estudios de permeación: 1 hora).**

No. de plano z	Profundidad (µm)	Intensidad de la Fluorescencia			Promedio	D. E.	Promedio-blanco
		1	2	3			
1	0	31.541	26.888	36.545	31.658	4.830	0.000
2	10	46.961	32.11	37.165	38.745	7.551	4.136
3	20	57.761	36.522	37.059	43.781	12.110	4.872
4	30	47.68	40.129	38.717	42.175	4.819	5.618
5	40	34.897	40.773	38.935	38.202	3.006	6.801
6	50	26.569	39.651	35.48	33.900	6.683	7.968
7	60	23.608	37.508	29.884	30.333	6.961	9.188
8	70	23.371	34.108	26.804	28.094	5.484	11.386
9	80	25.594	35.384	22.498	27.825	6.727	14.453
10	90	26.995	39.712	17.229	27.979	11.274	16.926
11	100	24.986	41.775	13.347	26.703	14.292	16.997
12	110	21.155	35.85	10.293	22.433	12.826	12.757
13	120	19.974	31.194	8.759	19.976	11.218	10.105
14	130	21.573	28.428	8.118	19.373	10.332	9.667
15	140	29.522	27.876	7.333	21.577	12.363	12.175
16	150	38.053	28.001	6.641	24.232	16.042	17.854
17	160	35.687	27.035	6.754	23.159	14.851	18.124
18	170	26.848	25.151	6.931	19.643	11.042	15.519
19	180	18.497	22.215	6.687	15.800	8.108	13.791
20	190	12.97	18.627	6.163	12.587	6.241	10.595
21	200	9.564	15.416	5.7	10.227	4.892	8.223
22	210	7.083	13.214	5.279	8.525	4.159	6.557
23	220	5.649	11.704	4.928	7.427	3.721	7.427
24	230	5.031	10.209	4.638	6.626	3.109	6.626
25	240	0	8.917	4.465	4.461	4.459	4.461
26	250	0	7.929	4.387	4.105	3.972	4.105
27	260	0	7.473	4.332	3.935	3.752	3.935
28	270	0	7.416	4.314	3.910	3.724	3.910
29	280	0	7.794	4.277	4.024	3.903	4.024
30	290	0	7.635	4.257	3.964	3.826	3.964
31	300	0	7.695	4.265	3.987	3.855	3.987
32	310	0	7.424	0	2.475	4.286	2.475
33	320	0	7.435	0	2.478	4.293	2.478
34	330	0	8.27	0	2.757	4.775	2.757
35	340	0	0	0	0.000	0.000	0.000
36	350	0	0	0	0.000	0.000	0.000

**Intensidad de la fluorescencia del colorante rojo de nilo contenido en la dispersión de nanopartículas, a diferentes intervalos de profundidad en la zona folicular de la piel humana (Tiempo de contacto en los estudios de permeación: 1 hora).**

No. de plano z	Profundidad (µm)	Intensidad de la Fluorescencia			Promedio	D. E.	Promedio-blanco
		1	2	3			
1	0	90.949	45.479	63.544	66.657	22.894	34.979
2	10	88.329	59.835	74.152	74.105	14.247	39.496
3	20	84.9	70.284	83.151	79.445	7.982	40.536
4	30	81.833	84.894	88.833	85.187	3.509	48.630
5	40	74.274	97.837	89.445	87.185	11.943	55.784
6	50	68.231	106.756	80.53	85.172	19.678	59.241
7	60	62.815	107.984	72.323	81.041	23.813	59.895
8	70	59.809	106.787	65.685	77.427	25.596	60.718
9	80	57.794	100.575	57.851	72.073	24.683	58.701
10	90	55.432	88.401	51.68	65.171	20.205	54.118
11	100	51.175	77.176	45.693	58.015	16.819	48.309
12	110	46.048	68.971	38.832	51.284	15.737	41.608
13	120	41.625	62.848	31.709	45.394	15.908	35.523
14	130	35.251	57.114	27.562	39.976	15.332	30.270
15	140	28.99	52.471	24.115	35.192	15.161	25.790
16	150	24.458	48.54	20.693	31.230	15.108	24.852
17	160	19.794	44.579	18.284	27.552	14.765	22.517
18	170	15.437	41.875	16.383	24.565	14.998	20.441
19	180	12.301	38.087	15.185	21.858	14.129	19.849
20	190	10.477	33.613	15.935	20.008	12.094	18.016
21	200	9.303	28.653	15.591	17.849	9.871	15.845
22	210	8.854	24.12	13.937	15.637	7.774	13.669
23	220	8.335	18.25	14.013	13.533	4.975	13.533
24	230	7.505	12.845	13.55	11.300	3.305	11.300
25	240	6.441	0	11.689	6.043	5.855	6.043
26	250	5.348	0	9.062	4.803	4.555	4.803
27	260	4.796	0	0	1.599	2.769	1.599
28	270	4.494	0	0	1.498	2.595	1.498
29	280	4.335	0	0	1.445	2.503	1.445
30	290	4.28	0	0	1.427	2.471	1.427
31	300	0	0	0	0.000	0.000	0.000
32	310	0	0	0	0.000	0.000	0.000
33	320	0	0	0	0.000	0.000	0.000
34	330	0	0	0	0.000	0.000	0.000
35	340	0	0	0	0.000	0.000	0.000
36	350	0	0	0	0.000	0.000	0.000

**Intensidad de la fluorescencia del colorante rojo de nilo contenido en la emulsión (o/w) disponible en el mercado, a diferentes intervalos de profundidad en la zona folicular de la piel humana (Tiempo de contacto en los estudios de permeación: 8 horas).**

No. de plano z	Profundidad ( $\mu\text{m}$ )	Intensidad de la Fluorescencia			Promedio	D. E.
		1	2	3		
1	0	5.779	7.031	15.745	9.518	5.429
2	10	6.332	6.352	14.781	9.155	4.872
3	20	5.713	5.845	14.103	8.554	4.806
4	30	5.266	5.094	12.477	7.612	4.214
5	40	4.771	4.213	10.925	6.636	3.725
6	50	4.279	4.091	8.721	5.697	2.621
7	60	3.912	3.95	6.378	4.747	1.413
8	70	3.473	3.831	5.119	4.141	0.866
9	80	2.98	6.148	4.07	4.399	1.609
10	90	2.493	8.943	3.307	4.914	3.513
11	100	2.107	10.37	2.723	5.067	4.603
12	110	1.839	10.198	2.471	4.836	4.654
13	120	1.641	8.433	2.344	4.139	3.735
14	130	1.58	6.694	2.757	3.677	2.678
15	140	1.844	5.009	3.219	3.357	1.587
16	150	1.975	3.529	3.264	2.923	0.831
17	160	2.117	2.283	2.663	2.354	0.280
18	170	1.958	1.285	1.693	1.645	0.339
19	180	1.494	0.727	1.016	1.079	0.387
20	190	0.943	0.418	0.554	0.638	0.272
21	200	0.596	0.237	0.296	0.376	0.193
22	210	0.344	0.134	0.164	0.214	0.114
23	220	0	0.076	0	0.025	0.044
24	230	0	0	0	0	0
25	240	0	0	0	0	0
26	250	0	0	0	0	0
27	260	0	0	0	0	0
28	270	0	0	0	0	0
29	280	0	0	0	0	0
30	290	0	0	0	0	0
31	300	0	0	0	0	0
32	310	0	0	0	0	0
33	320	0	0	0	0	0
34	330	0	0	0	0	0
35	340	0	0	0	0	0
36	350	0	0	0	0	0
37	360	0	0	0	0	0
38	370	0	0	0	0	0
39	380	0	0	0	0	0

**Intensidad de la fluorescencia del colorante rojo de nilo contenido en la solución saturada, a diferentes intervalos de profundidad en la zona folicular de la piel humana (Tiempo de contacto en los estudios de permeación: 8 horas).**

No. de plano z	Profundidad ( $\mu\text{m}$ )	Intensidad de la Fluorescencia			Promedio	D. E.
		1	2	3		
1	0	6.501	5.96	3.967	5.476	1.335
2	10	5.963	4.888	5.412	5.421	0.538
3	20	4.717	4.053	5.411	4.727	0.679
4	30	3.485	3.498	4.67	3.884	0.680
5	40	3.576	2.955	3.835	3.455	0.452
6	50	3.614	2.633	3.402	3.216	0.516
7	60	3.755	3.498	3.22	3.491	0.268
8	70	3.776	7.17	3.237	4.728	2.132
9	80	3.16	6.729	2.853	4.247	2.155
10	90	2.494	4.756	2.317	3.189	1.360
11	100	1.993	3.557	1.858	2.469	0.944
12	110	1.656	2.42	1.318	1.798	0.565
13	120	1.769	1.637	1.071	1.492	0.371
14	130	2.267	1.156	1.204	1.542	0.628
15	140	2.688	1.072	2.962	2.241	1.021
16	150	1.928	1.089	3.141	2.053	1.032
17	160	1.829	1.007	3.105	1.980	1.057
18	170	1.764	1.064	2.467	1.765	0.702
19	180	1.593	1.505	1.9	1.666	0.207
20	190	1.346	1.647	1.922	1.638	0.288
21	200	1.179	1.459	1.453	1.364	0.160
22	210	1.244	2.377	0.743	1.455	0.837
23	220	1.175	2.896	0.314	1.462	1.315
24	230	1.055	2.601	0.125	1.260	1.251
25	240	0.927	1.982	0	0.970	0.992
26	250	0.752	1.362	0	0.705	0.682
27	260	0.681	0.686	0	0.456	0.395
28	270	0.622	0.235	0	0.286	0.314
29	280	0.613	0.09	0	0.234	0.331
30	290	0.529	0.038	0	0.189	0.295
31	300	0.411	0	0	0.137	0.237
32	310	0.331	0	0	0.110	0.191
33	320	0.293	0	0	0.098	0.169
34	330	0.257	0	0	0.086	0.148
35	340	0.231	0	0	0.077	0.133
36	350	0.191	0	0	0.064	0.110
37	360	0.178	0	0	0.059	0.103
38	370	0.151	0	0	0.050	0.087
39	380	0	0	0	0.000	0.000

**Intensidad de la fluorescencia del colorante rojo de nilo contenido en la dispersión de nanopartículas, a diferentes intervalos de profundidad en la zona folicular de la piel humana (Tiempo de contacto en los estudios de permeación: 8 horas).**

No. de plano z	Profundidad ( $\mu\text{m}$ )	Intensidad de la Fluorescencia			Promedio	D. E.
		1	2	3		
1	0	8.432	26.763	9.727	14.974	10.230
2	10	8.714	26.556	16.675	17.315	8.938
3	20	8.5	26.263	25.124	19.962	9.943
4	30	8.904	23.913	30.496	21.104	11.067
5	40	12.52	23.064	35.022	23.535	11.258
6	50	13.628	23.098	37.04	24.589	11.777
7	60	13.583	23.802	38.074	25.153	12.301
8	70	11.838	24.081	34.971	23.630	11.573
9	80	10.269	24.235	29.378	21.294	9.888
10	90	7.828	22.927	20.465	17.073	8.101
11	100	6.846	22.17	14.368	14.461	7.662
12	110	5.952	19.891	11.928	12.590	6.993
13	120	5.455	18.982	10.94	11.792	6.804
14	130	4.886	17.207	10.212	10.768	6.179
15	140	4.241	13.192	9.255	8.896	4.486
16	150	4.356	10.531	9.084	7.990	3.230
17	160	3.343	8.368	8.305	6.672	2.883
18	170	3.217	6.628	7.373	5.739	2.216
19	180	2.89	5.639	6.636	5.055	1.940
20	190	2.288	5.184	6.541	4.671	2.172
21	200	2.122	5.327	6.539	4.663	2.282
22	210	1.956	5.455	5.687	4.366	2.090
23	220	2.057	5.745	3.372	3.725	1.869
24	230	2.88	3.915	1.915	2.903	1.000
25	240	4.336	2.04	1.31	2.562	1.579
26	250	4.418	1.33	1.049	2.266	1.869
27	260	3.508	1.175	0.863	1.849	1.445
28	270	2.54	1.069	0.642	1.417	0.996
29	280	2.174	1.082	0.339	1.198	0.923
30	290	2.14	1.035	0.138	1.104	1.003
31	300	1.652	0.892	0.062	0.869	0.795
32	310	1.115	0.74	0.028	0.628	0.552
33	320	0.679	0.598	0	0.426	0.371
34	330	0.489	0.533	0	0.341	0.296
35	340	0.291	0.544	0	0.278	0.272
36	350	0.174	0.406	0	0.193	0.204
37	360	0.116	0.29	0	0.135	0.146
38	370	0	0.219	0	0.073	0.126
39	380	0	0.21	0	0.070	0.121

**Intensidad de la fluorescencia del colorante rojo de nilo contenido en la emulsión (o/w) disponible en el mercado, a diferentes intervalos de profundidad en la zona folicular de la piel humana (Tiempo de contacto en los estudios de permeación: 24 horas).**

No. de plano z	Profundidad ( $\mu\text{m}$ )	Intensidad de la Fluorescencia			Promedio	D. E.
		1	2	3		
1	0	26.983	40.105	40.7	35.929	7.753
2	10	46.468	64.741	36.295	49.168	14.414
3	20	63.869	79.013	38.393	60.425	20.528
4	30	75.673	77.969	41.896	65.179	20.197
5	40	80.699	71.044	43.014	64.919	19.575
6	50	79.758	65.375	40.878	62.004	19.658
7	60	72.796	66.264	36.273	58.444	19.477
8	70	66.042	68.766	29.795	54.868	21.756
9	80	57.367	65.225	24.29	48.961	21.724
10	90	46.346	58.619	19.982	41.649	19.742
11	100	38.154	51.203	17.681	35.679	16.897
12	110	32.265	39.763	15.618	29.215	12.358
13	120	25.259	27.921	13.256	22.145	7.813
14	130	18.369	19.165	10.341	15.958	4.881
15	140	13.24	11.573	7.167	10.660	3.138
16	150	9.111	6.113	4.263	6.496	2.447
17	160	6.218	3.29	2.27	3.926	2.049
18	170	3.845	1.816	1.005	2.222	1.463
19	180	2.287	0.968	0.488	1.248	0.932
20	190	1.297	0	0	0.432	0.749
21	200	0	0	0	0.000	0.000
22	210	0	0	0	0.000	0.000
23	220	0	0	0	0.000	0.000
24	230	0	0	0	0.000	0.000
25	240	0	0	0	0.000	0.000
26	250	0	0	0	0.000	0.000
27	260	0	0	0	0.000	0.000
28	270	0	0	0	0.000	0.000
29	280	0	0	0	0.000	0.000
30	290	0	0	0	0.000	0.000
31	300	0	0	0	0.000	0.000
32	310	0	0	0	0.000	0.000
33	320	0	0	0	0.000	0.000
34	330	0	0	0	0.000	0.000
35	340	0	0	0	0.000	0.000
36	350	0	0	0	0.000	0.000
37	360	0	0	0	0.000	0.000
38	370	0	0	0	0.000	0.000
39	380	0	0	0	0.000	0.000
40	390	0	0	0	0.000	0.000
41	400	0	0	0	0.000	0.000
42	410	0	0	0	0.000	0.000
43	420	0	0	0	0.000	0.000
44	430	0	0	0	0.000	0.000

**Intensidad de la fluorescencia del colorante rojo de nilo contenido en la solución saturada, a diferentes intervalos de profundidad en la zona folicular de la piel humana (Tiempo de contacto en los estudios de permeación: 24 horas).**

No. de plano z	Profundidad ( $\mu\text{m}$ )	Intensidad de la Fluorescencia			Promedio	D. E.
		1	2	3		
1	0	3.809	5.983	8.503	6.098	2.349
2	10	4.172	5.764	9.821	6.586	2.913
3	20	4.139	5.351	15.885	8.458	6.460
4	30	3.975	5.069	21.591	10.212	9.870
5	40	3.657	4.516	20.625	9.599	9.558
6	50	3.566	4.456	22.18	10.067	10.499
7	60	3.339	4.82	20.472	9.544	9.493
8	70	2.808	4.462	18.002	8.424	8.336
9	80	2.617	3.919	16.741	7.759	7.806
10	90	2.365	3.321	13.017	6.234	5.893
11	100	1.915	3.031	8.237	4.394	3.374
12	110	1.52	2.467	4.962	2.983	1.778
13	120	1.247	2.264	3.107	2.206	0.931
14	130	1.096	2.466	1.33	1.631	0.733
15	140	1.052	4.011	0.649	1.904	1.836
16	150	1.011	4.997	0.386	2.131	2.501
17	160	1.153	4.887	0.244	2.095	2.461
18	170	0.907	3.758	0.175	1.613	1.893
19	180	0.752	2.535	0	1.096	1.302
20	190	0.772	2.297	0	1.023	1.169
21	200	0.788	2.038	0	0.942	1.028
22	210	0.707	1.813	0	0.840	0.914
23	220	0.817	1.851	0	0.889	0.928
24	230	0.844	1.89	0	0.911	0.947
25	240	0.699	2.132	0	0.944	1.087
26	250	0.678	2.027	0	0.902	1.032
27	260	0.746	1.915	0	0.887	0.965
28	270	0.693	2.163	0	0.952	1.105
29	280	0.617	2.513	0	1.043	1.310
30	290	0.547	1.09	0	0.546	0.545
31	300	0.438	0.384	0	0.274	0.239
32	310	0.398	0.209	0	0.202	0.199
33	320	0.386	0.119	0	0.168	0.198
34	330	0.456	0.086	0	0.181	0.242
35	340	0.714	0.146	0	0.287	0.377
36	350	0.703	0.314	0	0.339	0.352
37	360	0.877	0.231	0	0.369	0.455
38	370	1.164	0.057	0	0.407	0.656
39	380	0.783	0.022	0	0.268	0.446
40	390	0.422	0.012	0	0.145	0.240
41	400	0.271	0	0	0.090	0.156
42	410	0.178	0	0	0.059	0.103
43	420	0.148	0	0	0.049	0.085
44	430	0.056	0	0	0.019	0.032

**Intensidad de la fluorescencia del colorante rojo de nilo contenido en la dispersión de nanopartículas, a diferentes intervalos de profundidad en la zona folicular de la piel humana (Tiempo de contacto en los estudios de permeación: 24 horas).**

No. de plano z	Profundidad ( $\mu\text{m}$ )	Intensidad de la Fluorescencia			Promedio	D. E.
		1	2	3		
1	0	19.199	16.497	32.346	22.681	8.479
2	10	19.671	19.121	38.87	25.887	11.247
3	20	20.318	20.976	41.81	27.701	12.223
4	30	25.76	21.299	40.828	29.296	10.233
5	40	30.394	21.764	38.57	30.243	8.404
6	50	31.036	22.962	36.852	30.283	6.976
7	60	27.764	24.167	34.626	28.852	5.314
8	70	24.788	24.742	30.706	26.745	3.430
9	80	20.296	26.174	24.475	23.648	3.025
10	90	17.027	29.007	19.929	21.988	6.250
11	100	15.704	31.779	18.947	22.143	8.501
12	110	14.328	34.555	24.869	24.584	10.117
13	120	12.699	34.167	29.205	25.357	11.239
14	130	11.247	33.853	31.276	25.459	12.375
15	140	9.768	32.704	27.839	23.437	12.085
16	150	8.682	28.016	24.955	20.551	10.392
17	160	8.342	24.424	18.085	16.950	8.101
18	170	6.917	23.042	11.553	13.837	8.302
19	180	4.85	21.782	7.047	11.226	9.207
20	190	3.368	20.078	3.739	9.062	9.542
21	200	2.344	18.88	1.834	7.686	9.698
22	210	1.828	18.483	0.799	7.037	9.926
23	220	1.764	14.954	0.437	5.718	8.026
24	230	1.681	10.379	0.252	4.104	5.481
25	240	1.264	6.843	0.141	2.749	3.589
26	250	0.99	3.952	0.079	1.674	2.025
27	260	0.939	1.926	0.044	0.970	0.941
28	270	0.744	0.889	0.027	0.553	0.462
29	280	0.547	0.444	0	0.330	0.291
30	290	0	0.282	0	0.094	0.163
31	300	0	0	0	0.000	0.000
32	310	0	0	0	0.000	0.000
33	320	0	0	0	0.000	0.000
34	330	0	0	0	0.000	0.000
35	340	0	0	0	0.000	0.000
36	350	0	0	0	0.000	0.000
37	360	0	0	0	0.000	0.000
38	370	0	0	0	0.000	0.000
39	380	0	0	0	0.000	0.000
40	390	0	0	0	0.000	0.000
41	400	0	0	0	0.000	0.000
42	410	0	0	0	0.000	0.000
43	420	0	0	0	0.000	0.000
44	430	0	0	0	0.000	0.000



**Intensidad de la fluorescencia del colorante rojo de nilo contenido en la emulsión (o/w) disponible en el mercado, a diferentes intervalos de profundidad en la zona folicular de la piel de oreja porcina (Tiempo de contacto en los estudios de permeación: 1 hora).**

No. de plano z	Profundidad (µm)	Intensidad de la Fluorescencia			Promedio	D. E.
		1	2	3		
1	0	11.706	5.446	7.382	8.178	3.205
2	10	14.98	5.578	7.593	9.384	4.950
3	20	20.158	5.576	8.4	11.378	7.734
4	30	19.986	5.603	8.767	11.452	7.558
5	40	17.315	5.63	9.337	10.761	5.971
6	50	15.051	6.704	9.919	10.558	4.210
7	60	13.413	8.836	8.248	10.166	2.828
8	70	12.145	8.746	7.228	9.373	2.518
9	80	10.618	7.398	6.654	8.223	2.107
10	90	9.779	5.855	5.803	7.146	2.281
11	100	9.472	4.86	4.979	6.437	2.629
12	110	7.79	4.019	3.791	5.200	2.246
13	120	5.866	3.04	2.361	3.756	1.859
14	130	4.153	2.224	1.679	2.685	1.300
15	140	2.628	1.536	1.031	1.732	0.816
16	150	1.597	0.882	0.609	1.029	0.510
17	160	0.884	0	0.334	0.406	0.446
18	170	0	0	0.18	0.060	0.104
19	180	0	0	0.093	0.031	0.054
20	190	0	0	0.044	0.015	0.025
21	200	0	0	0	0.000	0.000
22	210	0	0	0	0.000	0.000
23	220	0	0	0	0.000	0.000
24	230	0	0	0	0.000	0.000
25	240	0	0	0	0.000	0.000
26	250	0	0	0	0.000	0.000
27	260	0	0	0	0.000	0.000
28	270	0	0	0	0.000	0.000
29	280	0	0	0	0.000	0.000
30	290	0	0	0	0.000	0.000

**Intensidad de la fluorescencia del colorante rojo de nilo contenido en la solución saturada, a diferentes intervalos de profundidad en la zona folicular de la piel de oreja porcina (Tiempo de contacto en los estudios de permeación: 1 hora).**

No. de plano z	Profundidad (µm)	Intensidad de la Fluorescencia			Promedio	D. E.
		1	2	3		
1	0	2.443	0.776	0.645	1.288	1.002
2	10	2.52	0.914	0.597	1.344	1.031
3	20	2.011	1.267	0.639	1.306	0.687
4	30	1.625	1.309	1.133	1.356	0.249
5	40	1.327	1.223	1.436	1.329	0.107
6	50	1.206	1.117	1.51	1.278	0.206
7	60	1.156	1.014	2.224	1.465	0.661
8	70	1.012	0.894	2.601	1.502	0.953
9	80	1.187	0.828	2.459	1.491	0.857
10	90	1.418	0.797	2.042	1.419	0.623
11	100	1.557	0.808	1.783	1.383	0.510
12	110	1.597	0.767	1.799	1.388	0.547
13	120	1.502	0.727	1.665	1.298	0.501
14	130	1.446	0.654	1.596	1.232	0.506
15	140	1.353	0.665	1.643	1.220	0.502
16	150	1.436	0.507	1.766	1.236	0.653
17	160	1.335	0.403	2.176	1.305	0.887
18	170	1.491	0.376	2.399	1.422	1.013
19	180	1.758	0.304	1.808	1.290	0.854
20	190	1.635	0.251	1.524	1.137	0.769
21	200	1.577	0	1.213	0.930	0.826
22	210	1.588	0	0.87	0.819	0.795
23	220	1.291	0	0.614	0.635	0.646
24	230	1.013	0	0.396	0.470	0.511
25	240	0.825	0	0.268	0.364	0.421
26	250	0.714	0	0.18	0.298	0.371
27	260	0.697	0	0	0.232	0.402
28	270	0.664	0	0	0.221	0.383
29	280	0.54	0	0	0.180	0.312
30	290	0.255	0	0	0.085	0.147

**Intensidad de la fluorescencia del colorante rojo de nilo contenido en la dispersión de nanopartículas, a diferentes intervalos de profundidad en la zona folicular de la piel de oreja porcina (Tiempo de contacto en los estudios de permeación: 1hora).**

No. de plano z	Profundidad (µm)	Intensidad de la Fluorescencia			Promedio	D. E.
		1	2	3		
1	0	9.285	8.324	3.746	7.118	2.960
2	10	8.387	10.272	4.2	7.620	3.108
3	20	7.369	11.31	4.733	7.804	3.310
4	30	6.354	12.316	4.804	7.825	3.966
5	40	5.439	11.766	4.34	7.182	4.008
6	50	4.561	10.39	3.981	6.311	3.545
7	60	3.806	9.359	3.687	5.617	3.241
8	70	3.363	8.691	3.52	5.191	3.032
9	80	2.916	7.57	3.212	4.566	2.606
10	90	2.583	6.285	2.977	3.948	2.033
11	100	2.336	5.29	2.597	3.408	1.635
12	110	2.034	5.015	2.357	3.135	1.636
13	120	1.836	4.414	1.929	2.726	1.462
14	130	1.655	4.079	1.532	2.422	1.436
15	140	1.476	4.118	1.371	2.322	1.557
16	150	1.22	4.18	1.092	2.164	1.747
17	160	0.917	4.691	0.87	2.159	2.193
18	170	0.797	4.494	0.663	1.985	2.174
19	180	0.734	4.177	0.491	1.801	2.062
20	190	0.717	3.35	0.317	1.461	1.648
21	200	0.718	2.756	0.225	1.233	1.342
22	210	0.509	2.267	0.185	0.987	1.120
23	220	0.341	1.923	0.149	0.804	0.974
24	230	0.214	1.678	0.123	0.672	0.873
25	240	0.129	1.487	0.092	0.569	0.795
26	250	0.076	1.232	0.083	0.464	0.665
27	260	0.039	0.915	0.049	0.334	0.503
28	270	0	0.677	0.031	0.236	0.382
29	280	0	0	0	0.000	0.000
30	290	0	0	0	0.000	0.000

**Intensidad de la fluorescencia del colorante rojo de nilo contenido en la emulsión (o/w) disponible en el mercado, a diferentes intervalos de profundidad en la zona folicular de la piel de oreja porcina (Tiempo de contacto en los estudios de permeación: 8 horas).**

No. de plano z	Profundidad (µm)	Intensidad de la Fluorescencia			Promedio	D. E.
		1	2	3		
1	0	6.82	6.42	5.654	6.298	0.592
2	10	6.309	6.628	6.043	6.327	0.293
3	20	5.889	7.002	6.231	6.374	0.570
4	30	5.46	7.343	6.452	6.418	0.942
5	40	4.843	7.47	6.598	6.304	1.338
6	50	4.35	6.983	6.351	5.895	1.375
7	60	3.872	6.464	6.182	5.506	1.422
8	70	3.71	6.007	5.881	5.199	1.291
9	80	3.759	5.37	5.419	4.849	0.945
10	90	3.66	5.07	4.662	4.464	0.726
11	100	3.828	4.813	4.119	4.253	0.506
12	110	3.778	4.262	3.608	3.883	0.339
13	120	3.127	3.55	2.949	3.209	0.309
14	130	2.576	2.931	2.397	2.635	0.272
15	140	2.159	2.475	1.925	2.186	0.276
16	150	1.637	2.187	1.438	1.754	0.388
17	160	1.177	1.858	1	1.345	0.453
18	170	0.767	1.297	0.674	0.913	0.336
19	180	0.439	0.691	0	0.377	0.350
20	190	0.224	0.321	0	0.182	0.165
21	200	0	0.167	0	0.056	0.096
22	210	0	0.095	0	0.032	0.055
23	220	0	0	0	0.000	0.000
24	230	0	0	0	0.000	0.000
25	240	0	0	0	0.000	0.000
26	250	0	0	0	0.000	0.000
27	260	0	0	0	0.000	0.000
28	270	0	0	0	0.000	0.000
29	280	0	0	0	0.000	0.000
30	290	0	0	0	0.000	0.000

**Intensidad de la fluorescencia del colorante rojo de nilo contenido en la solución saturada, a diferentes intervalos de profundidad en la zona folicular de la piel de oreja porcina (Tiempo de contacto en los estudios de permeación: 8 horas).**

No. de plano z	Profundidad (µm)	Intensidad de la Fluorescencia			Promedio	D. E.
		1	2	3		
1	0	2.784	4.453	0.746	2.661	1.857
2	10	2.501	5.313	0.848	2.887	2.257
3	20	2.292	5.195	0.909	2.799	2.187
4	30	2.054	4.827	1.162	2.681	1.911
5	40	1.775	4.184	1.577	2.512	1.451
6	50	1.551	3.426	1.654	2.210	1.054
7	60	1.403	2.928	1.496	1.942	0.855
8	70	1.357	2.485	1.443	1.762	0.628
9	80	1.145	2.087	1.32	1.517	0.501
10	90	1.19	1.719	1.116	1.342	0.329
11	100	1.062	1.603	0.915	1.193	0.362
12	110	0.891	1.733	0.726	1.117	0.540
13	120	0.769	1.488	0.563	0.940	0.486
14	130	0.686	1.123	0.449	0.753	0.342
15	140	0.672	0.895	0.37	0.646	0.263
16	150	0.535	0.511	0.313	0.453	0.122
17	160	0.411	0.199	0.288	0.299	0.106
18	170	0.326	0.055	0.236	0.206	0.138
19	180	0.221	0.012	0.194	0.142	0.114
20	190	0.159	0	0	0.053	0.092
21	200	0.132	0	0	0.044	0.076
22	210	0.081	0	0	0.027	0.047
23	220	0.036	0	0	0.012	0.021
24	230	0	0	0	0.000	0.000
25	240	0	0	0	0.000	0.000
26	250	0	0	0	0.000	0.000
27	260	0	0	0	0.000	0.000
28	270	0	0	0	0.000	0.000
29	280	0	0	0	0.000	0.000
30	290	0	0	0	0.000	0.000

**Intensidad de la fluorescencia del colorante rojo de nilo contenido en la dispersión de nanopartículas, a diferentes intervalos de profundidad en la zona folicular de la piel de oreja porcina (Tiempo de contacto en los estudios de permeación: 8 horas).**

No. de plano z	Profundidad (µm)	Intensidad de la Fluorescencia			Promedio	D. E.
		1	2	3		
1	0	10.967	2.184	4.713	5.955	4.521
2	10	11.46	2.391	4.605	6.152	4.728
3	20	11.437	2.949	4.756	6.381	4.471
4	30	11.281	3.578	4.522	6.460	4.201
5	40	10.586	4.514	4.49	6.530	3.513
6	50	10.662	4.895	4.239	6.599	3.534
7	60	11.822	4.974	4.131	6.976	4.218
8	70	11.552	5.092	3.32	6.655	4.333
9	80	11.333	5.922	2.887	6.714	4.278
10	90	13.275	6.101	2.9	7.425	5.313
11	100	16.388	6.47	3.358	8.739	6.805
12	110	17.25	6.744	3.434	9.143	7.214
13	120	15.166	6.521	3.408	8.365	6.092
14	130	8.626	6.389	3.995	6.337	2.316
15	140	5.575	5.944	4.823	5.447	0.571
16	150	4.293	5.436	5.505	5.078	0.681
17	160	2.728	5.036	9.121	5.628	3.237
18	170	1.105	4.128	9.781	5.005	4.404
19	180	0.381	2.502	10.435	4.439	5.300
20	190	0	1.996	8.852	3.616	4.643
21	200	0	1.231	4.163	1.798	2.139
22	210	0	0.31	1.871	0.727	1.003
23	220	0	0.09	0	0.030	0.052
24	230	0	0.033	0	0.011	0.019
25	240	0	0.014	0	0.005	0.008
26	250	0	0.008	0	0.003	0.005
27	260	0	0.005	0	0.002	0.003
28	270	0	0.004	0	0.001	0.002
29	280	0	0	0	0.000	0.000
30	290	0	0	0	0.000	0.000

**Intensidad de la fluorescencia del colorante rojo de nilo contenido en la emulsión (o/w) disponible en el mercado, a diferentes intervalos de profundidad en la zona folicular de la piel de oreja porcina (Tiempo de contacto en los estudios de permeación: 24 horas).**

No. de plano z	Profundidad (µm)	Intensidad de la Fluorescencia			Promedio	D. E.
		1	2	3		
1	0	44.475	42.372	48.515	45.121	3.122
2	10	45.638	44.052	49.307	46.332	2.695
3	20	48.515	43.438	45.204	45.719	2.577
4	30	49.307	40.634	41.483	43.808	4.781
5	40	45.204	37.974	39.293	40.824	3.850
6	50	41.483	35.141	36.466	37.697	3.345
7	60	39.293	33.238	32.318	34.950	3.789
8	70	36.466	31.167	27.194	31.609	4.652
9	80	32.318	28.124	22.717	27.720	4.813
10	90	27.194	26.328	19.585	24.369	4.166
11	100	22.717	23.915	16.862	21.165	3.774
12	110	19.585	16.936	15.323	17.281	2.152
13	120	16.862	11.221	14.506	14.196	2.833
14	130	15.323	11.07	12.4	12.931	2.176
15	140	14.506	10.224	9.691	11.474	2.640
16	150	12.4	9.786	8.039	10.075	2.195
17	160	9.691	7.05	6.367	7.703	1.755
18	170	8.039	4.774	5.175	5.996	1.781
19	180	6.367	3.195	3.957	4.506	1.656
20	190	5.175	2.179	2.743	3.366	1.592
21	200	3.957	1.482	1.805	2.415	1.345
22	210	2.743	0.994	0	1.246	1.389
23	220	1.805	0	0	0.602	1.042
24	230	0	0	0	0.000	0.000
25	240	0	0	0	0.000	0.000
26	250	0	0	0	0.000	0.000
27	260	0	0	0	0.000	0.000
28	270	0	0	0	0.000	0.000
29	280	0	0	0	0.000	0.000
30	290	0	0	0	0.000	0.000

**Intensidad de la fluorescencia del colorante rojo de nilo contenido en la solución saturada, a diferentes intervalos de profundidad en la zona folicular de la piel de oreja porcina (Tiempo de contacto en los estudios de permeación: 24 horas).**

No. de plano z	Profundidad (µm)	Intensidad de la Fluorescencia			Promedio	D. E.
		1	2	3		
1	0	4.483	3.59	1.588	3.220	1.482
2	10	3.97	3.469	1.361	2.933	1.385
3	20	3.538	3.317	1.255	2.703	1.259
4	30	3.221	3.059	1.417	2.566	0.998
5	40	2.976	2.921	1.654	2.517	0.748
6	50	2.718	2.802	1.68	2.400	0.625
7	60	2.611	2.491	1.561	2.221	0.575
8	70	2.71	2.188	1.625	2.174	0.543
9	80	2.602	1.978	1.533	2.038	0.537
10	90	2.298	1.842	1.507	1.882	0.397
11	100	2.153	1.681	1.391	1.742	0.385
12	110	2.066	1.558	1.291	1.638	0.394
13	120	1.849	2.001	1.147	1.666	0.456
14	130	1.568	2.399	0.968	1.645	0.719
15	140	1.269	2.107	0.784	1.387	0.669
16	150	1.072	1.821	0.616	1.170	0.608
17	160	0.886	1.624	0.528	1.013	0.559
18	170	0.707	1.255	0.444	0.802	0.414
19	180	0.586	0.976	0.311	0.624	0.334
20	190	0.388	0.826	0.184	0.466	0.328
21	200	0	0	0.098	0.033	0.057
22	210	0	0	0.047	0.016	0.027
23	220	0	0	0	0.000	0.000
24	230	0	0	0	0.000	0.000
25	240	0	0	0	0.000	0.000
26	250	0	0	0	0.000	0.000
27	260	0	0	0	0.000	0.000
28	270	0	0	0	0.000	0.000
29	280	0	0	0	0.000	0.000
30	290	0	0	0	0.000	0.000



**Intensidad de la fluorescencia del colorante rojo de nilo contenido en la dispersión de nanopartículas, a diferentes intervalos de profundidad en la zona folicular de la piel de oreja porcina (Tiempo de contacto en los estudios de permeación: 24 horas).**

No. de plano z	Profundidad (µm)	Intensidad de la Fluorescencia			Promedio	D. E.
		1	2	3		
1	0	8.742	13.153	9.58	10.492	2.343
2	10	10.795	11.483	10.271	10.850	0.608
3	20	14.875	10.101	12.183	12.386	2.393
4	30	17.459	11.725	11.311	13.498	3.436
5	40	17.011	12.928	10.151	13.363	3.451
6	50	13.7	10.521	10.077	11.433	1.976
7	60	13.056	8.838	10.17	10.688	2.156
8	70	14.988	7.799	10.669	11.152	3.619
9	80	16.578	7.72	13.01	12.436	4.457
10	90	16.034	7.655	17.519	13.736	5.318
11	100	15.295	9.649	18.758	14.567	4.598
12	110	14.547	10.803	16.879	14.076	3.065
13	120	13.584	10.585	15.041	13.070	2.272
14	130	14.464	8.664	16.994	13.374	4.271
15	140	20.429	7.881	21.694	16.668	7.636
16	150	27.582	6.579	23.635	19.265	11.163
17	160	28.789	6.272	23.786	19.616	11.824
18	170	24.95	6.201	24.614	18.588	10.729
19	180	21.678	6.162	23.674	17.171	9.586
20	190	18.998	5.047	20.745	14.930	8.603
21	200	16.065	1.976	17.409	11.817	8.549
22	210	11.904	0.517	14.561	8.994	7.461
23	220	9.345	0.167	12.388	7.300	6.362
24	230	6.523	0	12.413	6.312	6.209
25	240	3.104	0	12.8	5.301	6.677
26	250	1.094	0	13.532	4.875	7.517
27	260	0.376	0	9.566	3.314	5.418
28	270	0.145	0	5.582	1.909	3.182
29	280	0.062	0	3.569	1.210	2.043
30	290	0	0	0	0.000	0.000

## PUBLICACIÓN

European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics 79 (2011) 102–107



Contents lists available at ScienceDirect

European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/ejpb](http://www.elsevier.com/locate/ejpb)

## Research paper

## Preparation and characterization of triclosan nanoparticles intended to be used for the treatment of acne

Clara Luisa Domínguez-Delgado, Isabel Marlen Rodríguez-Cruz, José Juan Escobar-Chávez, Iván Omar Calderón-Lojero, David Quintanar-Guerrero, Adriana Ganem\*

División de Estudios de Posgrado (Laboratorio de Posgrado en Tecnología Farmacéutica), Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Estado de México, México

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 22 October 2010

Accepted in revised form 26 January 2011

Available online 2 February 2011

## Keywords:

Skin

Acne

Triclosan

Nanoparticles

Emulsion

Percutaneous permeation

## ABSTRACT

This work focuses on the preparation and characterization of nanoparticles containing triclosan. Additionally, *in vitro* percutaneous permeation of triclosan through pig ear skin was performed, and comparisons were made with two commercial formulations: An o/w emulsion and a solution, intended for the treatment of acne. The nanoparticle suspensions were prepared by the emulsification–diffusion by solvent displacement method, using Eudragit® E 100 as polymer. All batches showed a size smaller than 300 nm and a positive Zeta potential, high enough (20–40 mV) to ensure a good physical stability. Differential scanning calorimetry (DSC), transmission electron microscopy (TEM), and scanning electron microscopy (SEM) studies suggested that triclosan was molecularly dispersed in the nanoparticle batches containing up to 31% of triclosan, with good encapsulation efficiency (95.9%). The results of the *in vitro* permeation studies showed the following order for the permeability coefficients: Solution > cream ≈ nanoparticles; while for the amount retained in the skin, the order was as follows: cream > nanoparticles ≈ solution. Nanoparticles, being free of surfactants or other potentially irritant agents, can be a good option for the delivery of triclosan to the skin, representing a good alternative for the treatment of acne.

© 2011 Elsevier B.V. All rights reserved.

## 1. Introduction

The cutaneous route offers diverse advantages as a site for drug administration. However, due to the natural properties of the skin as a protection barrier, the search for new strategies able to enhance the penetration of drugs has become essential [1]. On the one hand, different carrier systems have been proposed in an attempt to favor the transport of drugs through the skin, enabling drug retention and in some cases allowing a controlled release [2–5]. Among these systems, polymeric nanoparticles are expected to be able to form a depot in the hair follicles, providing a targeted controlled drug delivery [6]. On the other hand, penetration enhancers are commonly used to improve drug absorption [7–11]. Surfactants and bile salts are among the most commonly studied enhancers for cutaneous administration. Typically, both cationic and anionic surfactants are more potent enhancers than their nonionic counterparts, but they are also more toxic [12–14].

Acne is a common disorder experienced by up to 80% of individuals between 11 and 30 years of age, and by up to 5% of older adults [15]. It is a common multifactorial disorder of the pilosebaceous follicles, involving sebaceous hyperplasia, follicular hyperkeratinization, hormone imbalance, bacterial infection, immune hypersensitivity; and, in some cases, there is evidence of genetic influence [16–21]. Since microbial colonization is a factor for the development of acne, triclosan was used in our study due to its strong antimicrobial activity against *Propionibacterium acnes* [2,22]. A variety of commercial formulations containing triclosan are available in the market to treat acne. Although, in this study, triclosan-loaded nanoparticles are proposed as a new formulation for the treatment of acne, it is clear that applications are not limited to this skin complaint. In a previous work, our group reported the preparation and characterization of triclosan nanoparticles for periodontal treatment [23].

In the present work, nanoparticles were prepared through the emulsification–diffusion by solvent displacement process and were characterized by their size, Zeta potential, encapsulation efficiency, and morphology. *In vitro* percutaneous permeation through pig ear skin was evaluated for triclosan-loaded nanoparticles and was compared with that obtained with two formulations available in the market for the treatment of acne: An o/w emulsion and a solution.

\* Corresponding author. División de Estudios de Posgrado (Laboratorio de Posgrado en Tecnología Farmacéutica), Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM. Av. 1° de Mayo s/n, Campo 1, Cuautitlán Izcalli, C.P. 54704, Estado de México, Mexico. Tel.: +52 55 56232065; fax: +52 55 58938675.

E-mail address: [ganemq@hotmail.com](mailto:ganemq@hotmail.com) (A. Ganem).

## 2. Materials and methods

### 2.1. Materials

Triclosan (M.W. 289.5) was a contribution from Multiqum (Mexico D.F.), Eudragit® E 100 was provided by Helm (Mexico), poly (vinyl alcohol) (Mowiol® 4-88) was purchased from Glomarza, Mexico, and was used as stabilizer. Monobasic potassium phosphate, methyl ethyl ketone, ethanol, and methanol were obtained from Fermont (Productos Químicos Monterrey, Mexico). Brij® 58 was provided by Canamex, S.A., Mexico; hydrochloric acid and sodium hydroxide were obtained from J.T. Baker, USA. All other chemicals were of analytical grade and were used without further purification. Water was obtained from a Milli-Q System (Millipore, Schwalbach, Germany). Porcine ear skin was obtained from the slaughterhouse immediately after pig's death.

### 2.2. Nanoparticle preparation

Nanoparticles were prepared using the emulsification–diffusion by solvent displacement method [24]. The organic solvent (methyl ethyl ketone) and water were mutually saturated in order to ensure the initial thermodynamic equilibrium of both liquids. Following separation of the two phases, the polymer (Eudragit® E 100) and triclosan were dissolved in the water-saturated organic solvent, and this solution was emulsified with a solvent-saturated aqueous solution containing 5% (w/v) of poly (vinyl alcohol). Emulsification was performed using a stirrer (Caframo® RZR-1, Germany) at 2000 rpm for 10 min. Finally, the organic solvent was removed by vacuum steam distillation, in order to promote the diffusion of the solvent from the internal to the external phase and induce polymer aggregation to obtain nanoparticles. All dispersions were centrifuged using an Optima® LE-80 K ultracentrifuge (Beckman, USA), and nanoparticles were resuspended by magnetic stirring and sonication.

The effect of temperature (30, 60 and 90 °C) and solvent elimination rate (30, 90 and 150 rpm) during vacuum steam distillation on particle size was evaluated for unloaded nanoparticles. According to the results obtained, no significant differences in size were observed (Fig. 1). Hence, the temperature and rate of solvent elimination chosen were 30 °C and 30 rpm, respectively, due to the feasibility of the method. Some batches were lyophilized for 36 h using a freeze-drier (Labconco®, USA). The resulting nanoparticles were then stored in a desiccator until used. Batches with increasing amounts of triclosan (up to 60% with respect to polymer weight) were prepared in order to determine the maximum entrapped amount. Table 1 shows the amounts of triclosan used in each batch.

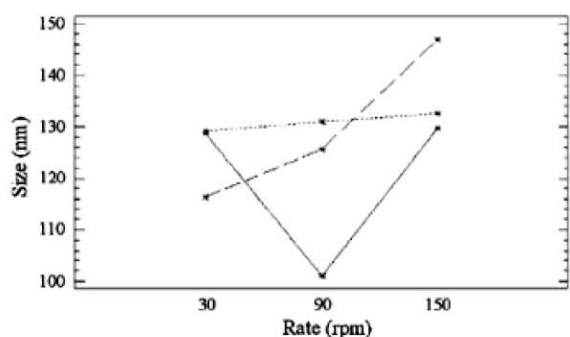


Fig. 1. Influence of solvent elimination rate (rpm) and temperature during the vacuum steam distillation, on nanoparticle size 30 °C (—); 45 °C (---); and 60 °C (·····),  $P > 0.5$ .

Table 1

Composition of nanoparticle batches with increasing amounts of triclosan, prepared in order to determine the maximum entrapped amount.

Batch	Eudragit® E 100 (mg)	Eudragit® E 100 (% w/w)	Triclosan (mg)	Triclosan (% w/w)
1	400	100.00	0	0.00
2	400	95.24	20	4.76
3	400	90.91	40	9.09
4	400	86.96	60	13.04
5	400	83.33	80	16.67
6	400	80.00	100	20.00
7	400	74.07	140	25.93
8	400	68.97	180	31.03
9	400	64.52	220	35.48
10	400	60.61	260	39.39
11	400	57.14	300	42.86
12	400	54.05	340	45.95
13	400	51.28	380	48.72
14	400	48.78	420	51.22
15	400	46.51	460	53.49
16	400	44.44	500	55.56
17	400	40.00	600	60.00

### 2.3. Particle size analysis

Nanoparticles average size, polydispersity index, and particle size distribution were determined by photon correlation spectroscopy, using a Nanosizer® Coulter N4 Plus (Beckman, USA). Dispersions were diluted with distilled water to ensure that the light scattering signal was within the sensitivity range of the instrument. Measurements were made in triplicate for all batches prepared and were performed at a 90° scattering angle at 25 °C ( $n = 3$ ).

### 2.4. Differential scanning calorimetry (DSC)

Samples of either ≈4 mg of drug, polymer, stabilizer, or both loaded and unloaded batches (previously freeze-dried) were weighed directly in standard aluminum pans. Studies were carried out at a constant heating rate of 10 °C/min and scanned from 0 to 300 °C, under constant purging of nitrogen at 50 ml/min, using a DSC Q 10 (TA Instruments, USA). Indium was used as the standard reference material to calibrate the DSC instrument.

### 2.5. Superficial charge

The Zeta potential of nanoparticle batches containing different amounts of triclosan was determined using a Zetasizer, Malvern Systems (ZEN 3600, United States), at the viscosity and dielectric constant of water, with an electrical current of 150 V at 25 °C. Deionized water was used as dispersion medium. Electrophoretic mobility was converted into Zeta potential by the Helmholtz–Smoluchowski equation ( $n = 3$ ).

### 2.6. Encapsulation efficiency

The ‘encapsulation efficiency’ parameter refers to the percentage of drug entrapped with respect to the total amount of drug added through the nanoparticle preparation process. Freeze-dried samples of loaded and placebo nanoparticles were dissolved in ethanol, and suitable dilutions were performed until achieving an acceptable triclosan concentration. Quantification was performed by spectrophotometry at 285 nm ( $n = 3$ ), using an UV–Vis spectrophotometer (Varian, Cary 50, Australia). The triclosan content in nanoparticles was expressed as the ratio of the amount of triclosan found in nanoparticles and the total initial amount of triclosan used in the preparation of the batch, and was represented as a percentage, according to the following expression:

$$\% \text{ Encapsulation efficiency} = \frac{\text{Amount of triclosan found in nanoparticles}}{\text{Total initial amount of triclosan}} \times 100 \quad (1)$$

### 2.7. Morphology studies

The morphological examination of nanoparticles was performed by scanning electron microscopy (SEM) using a JSM-6400 scanning electron microscope (JEOL, Tokyo, Japan). A concentrated aqueous dispersion of nanoparticles was finely spread over stubs and dried under vacuum. The sample was coated with a thick gold layer of ~20 nm (1200 V, 5 mA and 0.15 Torr for 6 min). The morphology of nanoparticulate systems, such as shape and occurrence of aggregation phenomena, was also characterized by transmission electron microscopy (TEM) using a transmission electron microscope (JEOL 2010, Tokio, Japan). Samples were diluted with distilled water as dispersion medium and were placed on copper grids for viewing, with a voltage of 200 kV and at a resolution of 1.9 Å (40,000 X).

### 2.8. Skin tissue

Full-thickness porcine ear skin was recovered from the slaughterhouse, following the slaughter of the animals and before being treated with vapor or hot water. The subcutaneous fat was removed from the skin, and the tissue was cut with a dermatome (Zimmer, Mod. 901, USA) to obtain a skin thickness ranging from 650 to 750 µm. Finally, the resulting skin was stored frozen at -35 °C before use.

### 2.9. In vitro permeation kinetics

In vitro permeation studies ( $n = 6$ ) were carried out placing the skin (0.63 cm<sup>2</sup>) between the donor and receptor compartments of vertical Franz-type glass diffusion cells. Two milliliters of the receptor phase (phosphate buffer pH 7.4 with addition of 3% w/v of Brij® 58 to keep sink conditions) were constantly stirred with a Teflon-coated magnetic bar and maintained at 37 °C. The donor phase was filled with 0.5 ml of formulation (nanoparticles, solution, or emulsion o/w). At selected time intervals, the receptor medium was collected and replaced with fresh medium. Samples were analyzed spectrophotometrically at 285 nm. Triclosan concentrations were obtained using a suitable calibration curve, correcting for the dilution effect.

At the end of the experiments, triclosan was extracted from the skin by soaking the tissues in ethanol for 21 h at room temperature. Triclosan content was analyzed by spectrophotometry at 285 nm. At least six measurements of each sample were conducted.

### 2.10. Statistical analysis

The size and charge of nanoparticles, the permeability coefficients, and the amount of triclosan extracted from the skin were statistically evaluated by one-way analysis of variance (ANOVA). Post hoc comparisons of individual group means were performed with the Duncan test. Differences were considered significant if  $P < 0.05$ .

## 3. Results and discussion

In this study, nanoparticles were prepared using the emulsification–diffusion by solvent displacement method. Eudragit® E 100 was chosen as the polymeric material due to its dissolution prop-

erties (i.e., soluble in acid media up to pH 5, swellable and permeable above pH 5). Taking into account the skin pH, release from nanoparticles is expected to occur by dissolution of the polymer and/or by diffusion through the polymeric matrix. The effect of temperature and solvent elimination rate during vacuum steam distillation on particle size was evaluated in unloaded nanoparticles. As shown in Fig. 1, no significant differences in size were observed. A clear relationship between the size of triclosan-loaded nanoparticles and the amount of triclosan for the different batches was not found. As shown in Fig. 2, nanoparticle size ranged from 120 to 240 nm. Although for batches 1–7 (0–140 mg of triclosan) the size apparently increased linearly, unexpectedly, batches 8–17 containing a greater amount (180–600 mg of triclosan) showed a smaller size. The Zeta potential for batches 1–11 was positive due to the cationic charge of the Eudragit® E 100 polymer and was high enough (20–39 mV) to provide a stable suspension of particles (Fig. 3). Usually, the Zeta potential required must be  $|Z| > 30$ –50 to ensure an acceptable physical stability by a good electrostatic repulsion [25]. A greater amount of triclosan in nanoparticles (batches 12–17) resulted in a lower Zeta potential that, as mentioned, can be associated with a lower stability.

Differential scanning calorimetry (DSC) was used to characterize the thermal behavior of molecules by studying phase transitions. Shifts of exothermic and endothermic peaks are usually related to interactions between drugs and polymers [26].

Thermograms for the materials involved in nanoparticles preparation (stabilizer, polymer, and drug), as well as for a drug–polymer physical mixture (50:50%), are shown in Fig. 4. As can be observed, the stabilizer (a) shows an endotherm near 200 °C, related to the melting point of poly (vinyl alcohol) [27]. The value of  $T_g$  for Eudragit® E 100 is found near 54 °C (b); therefore, as expected, unloaded nanoparticles (c) show solely the endotherm related to the polymer's  $T_g$ . Triclosan (e) shows an endothermic peak at 54 °C, associated with its melting point (melting point 54–57 °C, [28]). In the case of the physical mixture (d), the drug melting point is clearly observed, indicating no association between the drug and the polymer. The polymer's  $T_g$  and the drug melting point are very close; however, the presence of triclosan is clearly evident by a sharp well-defined peak. Batches 2–6 of loaded nanoparticles (20–100 mg of triclosan) show endotherms related to  $T_g$ , but they are not associated with triclosan melting point, indicating that triclosan was molecularly dispersed into the polymeric matrix (data not shown).

The thermograms of some triclosan-loaded nanoparticle batches (7, 8, 11 and 16) are shown in Fig. 5. No melting point was observed for triclosan entrapped in nanoparticles, presenting only the endothermic peak associated with the glass transition temperature of the polymer. This implies a close interaction between the polymer and the drug, suggesting a molecular dispersion

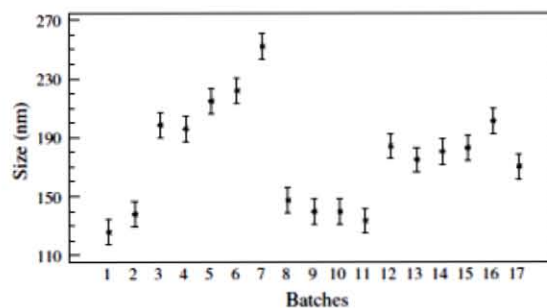


Fig. 2. Particle size for nanoparticle batches with increasing amounts of triclosan (from 0% to 60%).

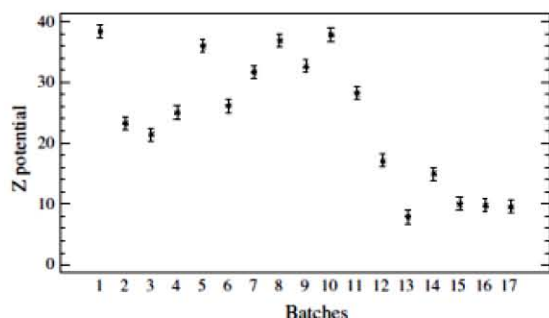


Fig. 3. Zeta potential for nanoparticle batches with increasing amounts of triclosan.

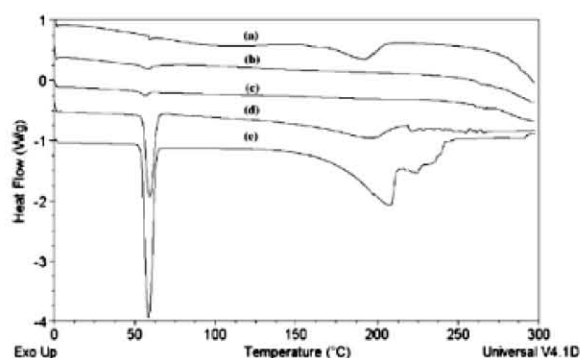


Fig. 4. Thermograms for stabilizer [poly (vinyl alcohol)] (a); polymer [Eudragit® E 100] (b); unloaded nanoparticles [0% triclosan] (c); a physical mixture of triclosan and Eudragit® E 100 (d); and triclosan (e).

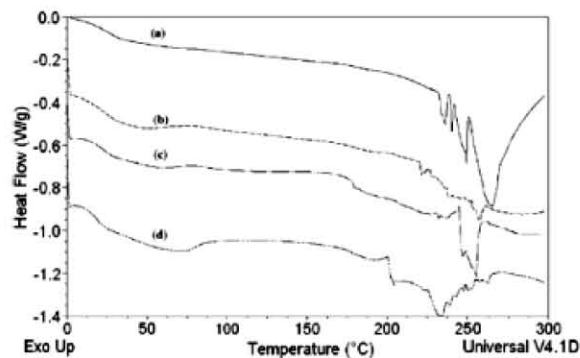


Fig. 5. Thermograms for batches with increasing amounts of triclosan: (a) batch 7, 25.93%; (b) batch 8, 31.03%; (c) batch 11, 42.86%; (d) batch 16, 55.56%.

of drug into the polymer matrix. It is important to mention that the  $T_g$  of Eudragit® E 100 shifts to lower temperatures as the amount of triclosan increases. This behavior can be attributed to a loss of polymer crystallinity and to the fact that triclosan can behave as a nonconventional plasticizer, favoring film formation. Similar results have been reported by other researchers [2,23]. Comparing the thermograms of unloaded nanoparticles (Fig. 4) with those containing triclosan (Fig. 5), an endothermic event is observed at temperature above 200 °C, probably related to triclosan decomposition. As the content of triclosan increased in the nanoparticles,

this endothermic behavior shifted to a lower temperature and it became more evident.

Morphology studies using SEM show that loaded nanoparticles (Fig. 6 a) have a spherical shape and a solid surface, and that particle size agrees with that determined by photon correlation spectroscopy. However, visualization by this technique was difficult due to the tendency of Eudragit® E 100 to form films. This was the reason for using TEM. Similar results regarding size were obtained by TEM (Fig. 6b and c), showing nanoparticles of less than 200 nm. Nevertheless, as shown in Fig. 6c, a high particle concentration results in nanoparticle fusion and film formation.

DSC, TEM, and SEM studies (Figs. 5 and 6) confirm that triclosan is molecularly dispersed in nanoparticle batches containing up to 31% and that above this ratio, triclosan interacts with the polymer, suggesting that it acts as a nonconventional plasticizer, promoting the fusion of the nanoparticle.

According to these results, batch 8, containing 31% of triclosan, was chosen for *in vitro* permeation studies, due to its high encapsulation efficiency (95.9%) and good stability. Nanoparticles used for permeation studies had an average particle size of  $147 \pm 37$  nm. Permeation studies were performed over eight hours. Two slopes were observed during permeation, and therefore, two fluxes and two permeability coefficients ( $C_p$ ) are reported in Table 2. Since the amount of triclosan was different for the commercial formulations and nanoparticles (a fact that affects permeation capability), a ratio of the total amount permeated or the amount retained in the skin with respect to the triclosan concentration in each formulation was calculated. As shown in Table 2, and in Figs. 7 and 8, the highest total amount permeated (PA) was obtained for the solution, while the greatest amount retained in the skin (RA) was found for the emulsion.

In the case of the solution and the emulsion, the high triclosan permeability can be attributed to its high surfactant content. Surfactants are incorporated into many therapeutic and cosmetic preparations. Usually, they are added to formulations in order to stabilize emulsions and suspensions or to solubilize lipophilic active ingredients. Surfactants have been shown to influence skin permeability in a number of ways. Many surfactants penetrate into the skin and act directly on skin components, sometimes inducing a loss of membrane integrity, e.g., by lipid or protein extraction or by protein denaturation [12,14]. Sodium lauryl sulfate and sodium laureth sulfate are anionic surfactants; lauryl glucoside and steareth 20 are other surfactants used as emulsifier agents. They are contained in the commercial formulations for the treatment of acne tested in this study. Structural parameters, such as chain length, the degree and position of insaturations, and the nature of substituents in the molecule, can influence their action as skin penetration enhancers. It is well accepted that the linear alkyl chain of 12 carbon atoms maximizes the effect of a surfactant on membrane permeability. The  $C_{12}$  chain has an oil/water intermediate solubility and is able to penetrate the lipid bilayer [12,14,29]. Among a series of polyoxyethers, lauryl ( $C_{12}$ ) ether was reported to be the most effective enhancer for ibuprofen, followed by oleyl ( $C_{18}$ ) ether [7]. So, these surfactants had the potential to fluidize lipids within the stratum corneum and to improve drug permeation into the skin. However, this potential enhancing effect is often directly proportional to the degree of skin irritation [14].

Sodium lauryl sulfate and sodium laureth sulfate have been classified as irritants, and lauryl glucoside has been classified as slightly irritant [13,14,30]. In general, surfactants can cause major potential damage to the skin in patients with acne.

In addition to the enhancing effect of surfactants, the cream tested in this work contains a dermoabrasive cleaner with aluminum oxide particles, which can also contribute to triclosan penetration (Table 2 and Fig. 8). On the other hand, the fatty

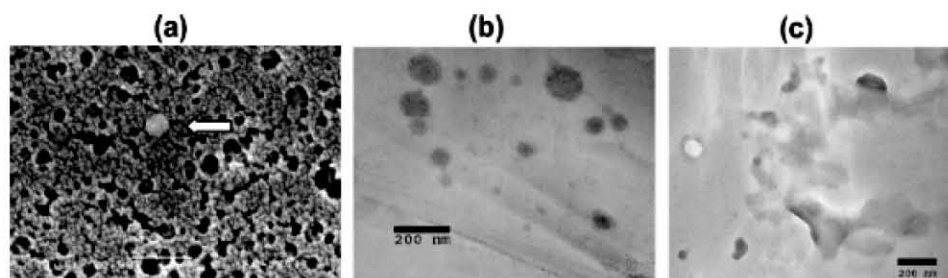


Fig. 6. Micrographs for batch 8 (31.03% of triclosan): (a) SEM (bar = 1  $\mu\text{m}$ ); (b and c) TEM (bar = 200 nm).

Table 2

Permeation parameters for the three formulations PA = Total permeated amount/vehicle concentration; RA = Drug retained in the skin/vehicle concentration.

		Solution	Emulsion (w/o)	Nanoparticle dispersion
Flux ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2 \text{ h}$ )	0–2 h	6.2765 $\pm$ 3.29	6.3457 $\pm$ 1.37	10.6675 $\pm$ 5.13
	2–8 h	4.8371 $\pm$ 1.59	4.0942 $\pm$ 1.17	2.0611 $\pm$ 0.92
$C_p$ ( $\mu\text{m}/\text{h}$ )	0–2 h	24.0845 $\pm$ 12.62	6.0697 $\pm$ 1.31	5.9264 $\pm$ 2.85
	2–8 h	18.5611 $\pm$ 6.11	3.9161 $\pm$ 1.12	1.1451 $\pm$ 0.51
PA		13.7252 $\pm$ 3.97	3.5795 $\pm$ 0.87	2.0623 $\pm$ 0.96
RA		2.3145 $\pm$ 1.45	6.5568 $\pm$ 0.96	1.5923 $\pm$ 0.40

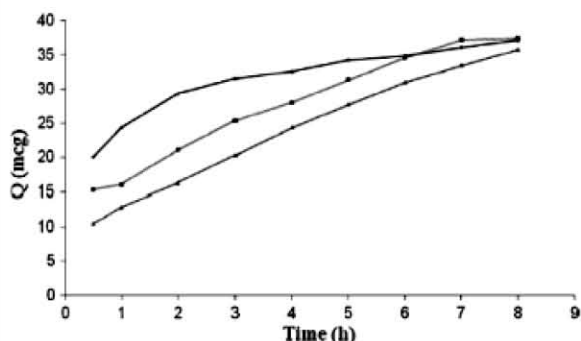


Fig. 7. Permeation kinetics of triclosan from three formulations using pig ear skin ( $n = 6$ ). (●) Nanoparticle dispersion ( $n = 5$ ); (■) emulsion ( $n = 6$ ); (▲) solution ( $n = 9$ ).

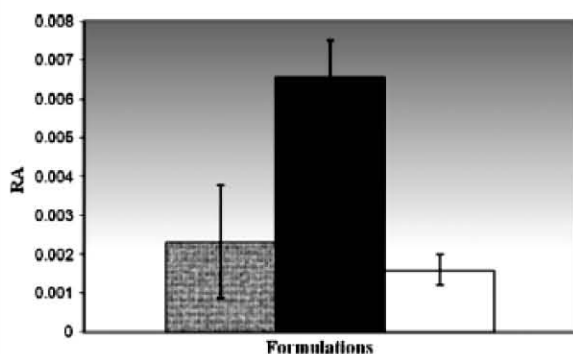


Fig. 8. Triclosan retained in pig ear skin at the end of the permeation experiments. (▨) Solution ( $n = 6$ ); (■) emulsion ( $n = 4$ ); (□) nanoparticle dispersion ( $n = 6$ ). RA = Retained amount/concentration.

components of the emulsion favored the penetration and accumulation of triclosan in the skin, obtaining the highest RA, due to the

great affinity of these kinds of components for cutaneous lipid domains. The ANOVA test showed no differences for the total permeated amount (PA) between the emulsion and nanoparticles, nor for the amount retained in the skin (RA) between the solution and nanoparticles ( $P > 0.5$ ).

It is important to point out that for all formulations, the permeation profiles showed an apparent *burst* effect (Fig. 7). The flux of triclosan was fivefold higher for nanoparticles than for the solution or the emulsion during the first two hours. This suggests that nanoparticles can penetrate quickly into hair follicles, and then saturate this way, gradually decreasing drug flux. The solution and the emulsion had practically constant fluxes throughout the permeation experiment.

Therefore, nanoparticle suspension can be potentially effective in the treatment of acne, due to the small size of nanoparticles that allows a target site (mainly in the hair follicle) and could form a depot to control the delivery of triclosan. In this respect, previous reports have revealed, through surface images, that (i) polystyrene nanoparticles accumulated preferentially in the follicular openings, (ii) this distribution increased in a time-dependent manner, and (iii) follicular localization was favored by the smaller particle size [6]. This is a good point for nanoparticles, since they can accumulate in the target site, releasing triclosan directly in the affected site. Furthermore, this formulation lacks enhancing agents that could cause some irritant reaction, contrary to the two commercial formulations.

#### 4. Conclusions

In this study, Eudragit® E 100 nanoparticles were prepared using the emulsification–diffusion by solvent displacement method. All batches showed a size below 300 nm. DSC, TEM, and SEM studies confirm that triclosan is molecularly dispersed in nanoparticle batches containing up to 31% triclosan, with high encapsulation efficiency (95.9%) and a good stability. At higher drug content, triclosan interacts with the polymer, with a decrease in its glass transition temperature, acting as a nonconventional plasticizer, and then promoting the fusion of the nanoparticles. According to permeation results (taking into account the concentration of triclosan in each formulation), the following order was found (i) for

the amount permeated: solution > emulsion  $\approx$  nanoparticles; (ii) for the amount retained in the skin: emulsion > solution  $\approx$  nanoparticles. It is expected that the colloidal properties of nanoparticles will favor penetration through hair follicles, where they can form a depot, promoting triclosan release from these sites. Further studies should be conducted in this sense.

#### Acknowledgment

The authors acknowledge a grant from CONACyT (Ref. 81883) and PAPIIT (Ref. IN209709). The authors are grateful to Mr. Rodolfo Robles for his technical assistance with the SEM images.

#### References

- [1] G. Cevc, Drug delivery across the skin, *Exp. Opin. Invest. Drugs* 6 (12) (1997) 1887–1937.
- [2] J.-C. Kim, M.-E. Song, M.-J. Kim, E.-J. Lee, S.-K. Park, M.-J. Rang, H.-J. Ahn, Preparation and characterization of triclosan-containing vesicles, *Colloid Surface B* 26 (2002) 235–241.
- [3] R.H. Müller, M. Radtke, S.A. Wissing, Solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC) in cosmetic and dermatological preparations, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 54 (2002) S131–S155.
- [4] G. Cevc, Lipid vesicles and other colloids as drug carriers on the skin, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 56 (2004) 675–711.
- [5] F. Maestrelli, M. Garcia-Fuentes, P. Mura, M.J. Alonso, A new drug nanocarrier consisting of chitosan and hydroxypropylcyclodextrin, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 63 (2006) 79–86.
- [6] R. Alvarez-Román, A. Naik, Y.N. Kalia, R.H. Guy, H. Fessi, Skin penetration and distribution of polymeric nanoparticles, *J. Control. Release* 99 (2004) 53–62.
- [7] E.-S. Park, S.-Y. Chang, M. Hahn, S.-Ch. Chi, Enhancing effect of polyoxyethylene alkyl ethers on the skin permeation of ibuprofen, *Int. J. Pharm.* 209 (2000) 109–119.
- [8] J. Cázarez-Delgado, A. Naik, Y.N. Kalia, D. Quintanar-Guerrero, A. Ganem-Quintanar, Skin permeation enhancement by sucrose esters: a pH-dependent phenomenon, *Int. J. Pharm.* 297 (2005) 204–212.
- [9] J.J. Escobar-Chávez, Estudio de la penetración a través de la piel de naproxeno sódico utilizando agentes promotores de penetración (Azona<sup>®</sup> y Transcutol<sup>®</sup>), y de digluconato de clorhexidina mediante iontoforesis, Ph.D. Thesis, Facultad de Química, UNAM, Mexico, 2006, pp. 10–22.
- [10] A. Choi, H. Gang, I. Chun, H. Gwak, The effects of fatty acids in propylene glycol on the percutaneous absorption of alendronate across the excised hairless mouse skin, *Int. J. Pharm.* 357 (2008) 126–131.
- [11] K. Vávrová, K. Lorencová, J. Klimentová, J. Novotný, A. Holý, A. Hrabálek, Transdermal and dermal delivery of acyclovir: effects of pH and permeation enhancers, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 69 (2008) 597–604.
- [12] H.A. Ayala-Bravo, D. Quintanar-Guerrero, A. Naik, Y.N. Kalia, J.M. Cornejo-Bravo, A. Ganem-Quintanar, Effects of sucrose oleate and sucrose laurate on in vivo human stratum corneum permeability, *Pharmaceut. Res.* 20 (2003) 1267–1273.
- [13] A. Mehling, M. Kleber, H. Hensen, Comparative studies on the ocular and dermal irritation potential of surfactants, *Food. Chem. Toxicol.* 45 (2007) 747–758.
- [14] E. Toutou, B.W. Barry, *Enhancement in Drug Delivery*, CRC Press, Taylor & Francis Group, United States of América, 2007, pp. 233–251.
- [15] V. Goulden, G.J. Stables, W.J. Cunliffe, Prevalence of facial acne in adults, *J. Am. Acad. Dermatol.* 41 (1999) 577–580.
- [16] G.M. White, Recent findings in the epidemiologic evidence, classification, and subtypes of acne vulgaris, *J. Am. Acad. Dermatol.* 39 (1998) S34–S37.
- [17] V. Bataille, H. Snieder, A.J. MacGregor, P. Sasieni, T.D. Spector, The influence of genetics and environmental factors in the pathogenesis of Acne: a Twin Study of Acne in Women, *J. Invest. Dermatol.* 119 (6) (2002) 1317–1322.
- [18] H. Gollnick, Current concepts of the pathogenesis of acne: implications for drug treatment, *Drugs* 63 (2003) 1579–1596.
- [19] U. Jappe, Pathological mechanisms of acne with special emphasis on Propionibacterium acnes and related therapy, *Acta Derm. Venereol.* 83 (2003) 241–248.
- [20] I. Nagy, A. Pivarsci, K. Kis, A. Koreck, L. Bodai, A. McDowell, H. Selmann, S. Patrick, C.C. Zouboulis, L. Kemény, Propionibacterium acnes and lipopolysaccharide induce the expression of antimicrobial peptides and proinflammatory cytokines/chemokines in human sebocytes, *Microbes Infect.* 8 (2006) 2195–2205.
- [21] C.G. Burkhart, C.N. Burkhart, Expanding the microcomedone theory and acne therapeutics: propionibacterium acnes biofilm produces biological glue that holds corneocytes together to form plug, *J. Am. Acad. Dermatol.* 57 (2007) 722–724.
- [22] T.-W. Lee, J.-Ch. Kim, S.-J. Hwang, Hydrogel patches containing Triclosan for acne treatment, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 56 (2003) 407–412.
- [23] E. Piñon-Segundo, A. Ganem-Quintanar, V. Alonso-Pérez, D. Quintanar-Guerrero, Preparation and characterization of triclosan nanoparticles for periodontal treatment, *Int. J. Pharm.* 294 (2005) 217–232.
- [24] D. Quintanar-Guerrero, E. Allémann, H. Fessi, E. Doelker, Pseudolatex preparation using a novel emulsion-diffusion process involving direct displacement of partially water-miscible solvents by distillation, *Int. J. Pharm.* 188 (1999) 155–164.
- [25] Dispersion Technology Systems, Nanometric group, Malvern Instrument, Inc., Southborough, MA, May 2005.
- [26] B. Sarmiento, D. Ferreira, F. Veiga, A. Ribeiro, Characterization of insulin-loaded alginate nanoparticles produced by ionotropic pre-gelation through DSC and FTIR studies, *Carbohydr. Polym.* 66 (2006) 1–7.
- [27] R.C. Rowe, P.J. Sheskey, S.C. Owen, *Pharmaceutical Excipients*, Electronic Version. Ed. Pharmaceutical Press and American Pharmacists Association, 2004.
- [28] A.C. Moffat, *Clarke's Isolation and Identification of Drugs*, second ed., The Pharmaceutical Press, London, 2004.
- [29] R.A. Tupker, J. Pinnagoda, J.P. Nater, The transient and cumulative effect of sodium lauryl sulphate on the epidermal barrier assessed by transepidermal water loss: inter-individual variation, *Acta Derm. Venereol. (Stockh)* 70 (1990) 1.
- [30] T.J. Hall-Manning, G.H. Holland, G. Rennie, P. Revell, J. Hines, M.D. Barratt, D.A. Basketter, Skin irritation potential of mixed surfactant systems, *Food Chem. Toxicol.* 36 (1998) 233–238.