



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

**“LIBERACIÓN IONTOFORÉTICA TRANSDÉRMICA DE KETOROLACO
TROMETAMINA A PARTIR DE VESÍCULAS LIPÍDICAS ULTRAFLEXIBLES”**

TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE

DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA

M en C. MARÍA GUADALUPE NAVA ARZALUZ

TUTOR
DRA. FLORA ADRIANA GANEM RONDERO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR
DR. ANDRÉS NAVARRETE CASTRO, FACULTAD DE QUÍMICA
DRA. LUZ MARÍA MELGOZA CONTRERAS
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

MÉXICO D.F. AGOSTO DE 2014



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO

| | |
|----------------------|--|
| Presidente | Dr. Andrés Navarrete Castro |
| Primer Vocal | Dra. Helgi Jung Cook |
| Segundo Vocal | Dr. Carlos Tomás Quirino Barreda |
| Tercer Vocal | Dra. Silvia del Socorro Pérez Casas |
| Secretario | Dra. Elizabeth Piñón Segundo |

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México por la formación recibida durante estos años y al programa PAPIIT (IN216313-3).

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca recibida durante la realización de estos estudios de posgrado Ref. 202530 y al proyecto de Investigación Científica Básica 2009 SEP-CONACYT, Proyecto No.: 129320.

A la Dra. Adriana Ganem Rondero por permitirme realizar este proyecto, por su paciencia, apoyo incondicional y amistad.

Al Dr. David Quintanar Guerrero por su apoyo incondicional.

Al Consejo Mexiquense de Ciencia y Tecnología, por el apoyo económico brindado a través de su Programa de Becas-Tesis.

A la Dra. Luz María Melgoza Contreras y al Dr. Andrés Navarrete Castro por sus aportaciones y consejos durante las reuniones semestrales con el Comité Tutelar.

Al Técnico Rodolfo Robles de la FES-Cuautitlán y al Jesús Espinosa de la FES-Iztacala, por su asistencia en los estudios de microscopía electrónica de transmisión.

A los sinodales por sus sugerencias vertidas en este documento.

DEDICATORIAS

A DIOS, MI FAMILIA Y AMIGOS

PUBLICACIONES DERIVADAS DEL PROYECTO DOCTORAL

Nava G., Piñón E., Mendoza L., Mendoza N., Quintanar D., Ganem A., Formulation and *in Vitro*, *ex Vivo* and *in Vivo* Evaluation of Elastic Liposomes for Transdermal Delivery of Ketorolac Tromethamine. *Pharmaceutics*, 2011, 3(4), 954-970

Artículos de revisión realizados durante los estudios de doctorado

Nava-Arzaluz M.G., Calderón-Lojero I., Quintanar-Guerrero D., Villalobos-García R., Ganem-Quintanar A., Microneedles as transdermal delivery systems: Combination with other enhancing strategies. *Current Drug Delivery*, 2012, 9(1) 57-73

Nava-Arzaluz M.G., Piñón-Segundo E., Ganem-Rondero A., Lechuga-Ballesteros D., Single Emulsion-Solvent Evaporation Technique and Modifications for the Preparation of Pharmaceutical Polymeric Nanoparticles. *Recent Patents on Drug Delivery & Formulation*, 2012, 6(3) 209-223

PRESENTACIONES EN CONGRESOS NACIONALES

Nava-Arzaluz M.G. et al., XLIII Congreso Nacional de Ciencias Farmacéuticas. *Permeación transdérmica iontoforética de ketorolaco trometamina formulado en vesículas elásticas*. Modalidad: Cartel. Puerto Vallarta Jalisco, México. Octubre 2010

Nava-Arzaluz M.G. et al., QuimiUNAM 2009. Presentación de cartel en la actividad académica, Coordinación de Estudios de Posgrado, UNAM, Ciudad Universitaria, México. Noviembre 2009

Nava-Arzaluz M.G. et al., XLII Congreso Nacional de Ciencias Farmacéuticas. *Permeación in vitro de ketorolaco trometamina formulado en vesículas elásticas*. Modalidad: Cartel. Cancún Quintana Roo, México. Octubre 2009

Nava-Arzaluz M.G. et al., XLI Congreso Nacional de Ciencias Farmacéuticas. *Formulación de ketorolaco trometamina en transfersomas*, Modalidad: Cartel. Ixtapa Zihuatanejo Guerrero, México. Octubre 2008

Por este cartel se obtuvo el premio Santiago Maza.

PRESENTACIONES EN CONGRESOS INTERNACIONALES

Nava-Arzaluz M.G. et al., 38TH Annual Meeting & Exposition of the Controlled Release Society (CRS). *In vitro and in vivo permeation of ketorolac tromethamine formulated in elastic liposomes (chemical enhancement)*. Modalidad: Pódium. Maryland, Estados Unidos, Julio 2011.

LUGAR DONDE SE REALIZÓ LA TESIS

Laboratorio de Investigación y Posgrado en Tecnología Farmacéutica (L-323), Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Campo 1, UNAM.

ÍNDICE

| | Página |
|---|--------|
| ÍNDICE GENERAL | i |
| ÍNDICE DE FIGURAS | v |
| ÍNDICE DE TABLAS | viii |
| LISTA DE ABREVIATURAS | ix |
| RESUMEN | x |
| ABSTRACT | xi |
| I. INTRODUCCIÓN | 1 |
| II. ANTECEDENTES | 2 |
| 2.1 Ketorolaco trometamina | 2 |
| 2.1.1 Farmacocinética del KT | 3 |
| 2.1.2 Mecanismo de acción del KT | 3 |
| 2.1.3 Efectos adversos del KT | 5 |
| 2.2 Liberación transdérmica de fármacos | 7 |
| 2.2.1 Anatomía y fisiología de la piel | 8 |
| 2.2.2 Estructura básica de la piel | 9 |
| 2.2.2.1 Tejido subcutáneo | 9 |
| 2.2.2.2 Dermis | 10 |
| 2.2.2.3 Epidermis | 10 |
| 2.2.2.4 Apéndices de la piel | 12 |
| 2.2.3 Sistema circulatorio de la piel | 12 |
| 2.2.4 Penetración de fármacos a través de la piel | 13 |
| 2.2.5 Estrategias para promover la absorción de fármacos | 15 |
| 2.2.6 Método de <i>Tape Stripping</i> para cuantificar fármacos a través de la piel | 17 |
| 2.3 Sistemas vesiculares para la administración transdérmica de fármacos | 19 |
| 2.3.1 Liposomas elásticos como sistemas de liberación transdérmica | 22 |
| 2.3.2 Mecanismo de promoción de la permeación transdérmica por los LE | 23 |
| 2.3.3 Método de preparación de LE | 26 |
| 2.4 Iontoforesis como promotor de absorción de fármacos | 30 |
| 2.4.1 Electroquímica de la iontoforesis | 30 |
| 2.4.2 Mecanismos de transporte iontoforéticos | 32 |
| 2.4.2.1 Electromigración | 32 |
| 2.4.2.2 Electroósmosis | 33 |

| | |
|---|----|
| 2.4.2.3 Cambios en la permeabilidad de la membrana | 34 |
| 2.4.3 Factores que afectan a la iontoforesis | 34 |
| III. JUSTIFICACIÓN E HIPÓTESIS | 38 |
| IV. OBJETIVOS | 40 |
| 4.1 Objetivo general | 40 |
| 4.2 Objetivos específicos | 40 |
| V. PARTE EXPERIMENTAL | 41 |
| 5.1 Reactivos | 41 |
| 5.2 Material | 41 |
| 5.3 Equipos e Instrumentos | 41 |
| 5.4 Material biológico | 42 |
| 5.5 Métodos | 43 |
| 5.5.1 Preparación de los liposomas elásticos | 43 |
| 5.5.2 Preparación de los liposomas elásticos conteniendo el fármaco | 44 |
| 5.5.3 Caracterización de los liposomas elásticos | 45 |
| 5.5.3.1 Determinación del tamaño de vesícula | 45 |
| 5.5.3.2 Determinación del potencial zeta | 45 |
| 5.5.3.3 Morfología de los liposomas elásticos | 46 |
| 5.5.3.4 Eficiencia de encapsulamiento | 46 |
| 5.5.3.5 Elasticidad de las vesículas | 46 |
| 5.5.3.6 Estabilidad física de los liposomas elásticos | 47 |
| 5.5.4 Solubilidad del ketorolaco trometamina en regulador de fosfatos pH 7.4 | 47 |
| 5.5.5 Estudio de liberación <i>in vitro</i> | 47 |
| 5.5.6 Estudios de permeación <i>in vitro</i> | 48 |
| 5.5.6.1 Obtención de la piel | 48 |
| 5.5.6.2 Experimentos de difusión pasiva | 48 |
| 5.5.6.3 Determinación del fármaco retenido en la piel | 49 |
| 5.5.7 Estudios de difusión <i>in vivo</i> | 49 |
| 5.5.8 Estudios de difusión <i>in vivo</i> utilizando como promotor de absorción la iontoforesis | 50 |
| 5.5.9 Determinación de la pérdida de agua transepidermal | 51 |
| 5.5.10 Estabilidad de las vesículas al aplicarles una corriente eléctrica | 51 |

| | |
|--|-----|
| 5.6 Métodos de cuantificación para el KT | 51 |
| 5.6.1 Método utilizado para cuantificar el KT en las pruebas de: solubilidad y eficiencia de encapsulamiento | 51 |
| 5.6.2 Método utilizado para cuantificar el KT en los estudios de liberación | 52 |
| 5.6.3 Método utilizado para cuantificar el KT en los estudios de permeación pasiva <i>in vitro</i> | 52 |
| 5.6.4 Método utilizado para cuantificar el KT retenido en piel | 52 |
| 5.6.5 Método utilizado para cuantificar el KT en los estudios <i>in vivo</i> | 53 |
| VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN | 54 |
| 6.1 Optimización del método de preparación de los liposomas elásticos | 54 |
| 6.2 Caracterización de los liposomas conteniendo el fármaco | 58 |
| 6.2.1 Tamaño de los liposomas elásticos | 58 |
| 6.2.2 Potencial zeta | 59 |
| 6.2.3 Morfología | 60 |
| 6.2.4 Eficiencia de encapsulamiento | 60 |
| 6.2.5 Elasticidad de las vesículas | 62 |
| 6.2.6 Estabilidad de los liposomas elásticos | 63 |
| 6.3 Liberación <i>in vitro</i> | 66 |
| 6.4 Permeación <i>in vitro</i> y deposición en la piel del KT | 69 |
| 6.5 Estudios de permeación <i>in vivo</i> | 71 |
| 6.5.1 Estudios de permeación pasiva <i>in vivo</i> | 71 |
| 6.5.2 Estudios de permeación <i>in vivo</i> utilizando como promotor de absorción la iontoforesis | 77 |
| 6.5.3 Determinaciones de pérdida de agua transepidermal | 85 |
| 6.5.4 Estabilidad de los LE al aplicarles una corriente eléctrica | 90 |
| VII CONCLUSIONES | 93 |
| VIII REFERENCIAS | 94 |
| IX ANEXOS | 105 |
| Anexo 1. Carta de Consentimiento Informado | 105 |
| Anexo 2. Métodos analíticos | 106 |
| Anexo 2.1 Método analítico para la evaluación de la solubilidad y eficiencia de encapsulamiento | 107 |
| Anexo 2.2 Método utilizado para cuantificar el KT en los estudios de liberación | 109 |
| Anexo 2.3 Método utilizado para cuantificar el KT en los estudios de permeación pasiva <i>in vitro</i> | 111 |
| Anexo 2.4 Método utilizado para cuantificar el fármaco retenido en la piel | 113 |

| | |
|---|-----|
| Anexo 2.5 Método utilizado para cuantificar el KT en los estudios <i>in vivo</i> | 115 |
| ANEXO 3. Análisis estadístico de la optimización del método de preparación de los LE | 117 |
| Anexo 3.1 Análisis estadístico del tamaño (respuesta) en función del número de extrusiones y tiempo de ultrasonido | 123 |
| Anexo 3.2 Análisis estadístico del IPD (respuesta) en función del número de extrusiones y tiempo de ultrasonido | 124 |
| Anexo 3.3 Análisis estadístico del potencial zeta (respuesta) en función del número de extrusiones y tiempo de ultrasonido | 125 |
| Anexo 3.4 Influencia del medio de hidratación sobre el tamaño de los LE | 126 |
| Anexo 3.5 Influencia de la cantidad adicionada de fármaco sobre la eficiencia de encapsulamiento | 127 |
| Anexo 4. Evaluación estadística de la elasticidad | 128 |
| Anexo 5. Evaluación de la estabilidad de los liposomas a través del tiempo evaluando tamaño, potencial zeta y eficiencia de encapsulamiento | 128 |
| Anexo 6. Estudios de liberación del KT a partir de los LE | 131 |
| Anexo 7. Resultados de la difusión pasiva <i>in vivo</i> del KT formulado en LE o en solución | 133 |
| Anexo 8. Resultados de la difusión iontoforética <i>in vivo</i> del KT formulado en LE o en solución | 137 |
| Anexo 9. Análisis estadístico para la TEWL | 142 |
| Anexo 10. Estabilidad eléctrica de los liposomas elásticos al aplicarles una corriente eléctrica | 146 |
| Anexo 11. Publicaciones | 149 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| No. De figura | Nombre de la figura | Página |
|----------------------|--|---------------|
| Figura 1. | Estructura química del ketorolaco trometamina | 2 |
| Figura 2. | Biosíntesis de eicosanoides. | 4 |
| Figura 3. | Estructura de la piel humana. | 9 |
| Figura 4. | Estructura de la epidermis. | 10 |
| Figura 5. | Estructura del estrato córneo en el que se le compara a una pared de ladrillos. (1) Células córneas (corneocitos), (2) Lípidos epidérmicos | 12 |
| Figura 6. | Rutas de absorción transdérmica. Modificada de Trommer y Neubert, 2006 | 14 |
| Figura 7. | Algunos métodos para optimizar la liberación transdérmica de fármacos (Modificada de Barry, 2001) | 16 |
| Figura 8. | Representación esquemática de la técnica de “ <i>Tape Stripping</i> ”. (Modificada de Pailler-Mattei <i>et al.</i> , 2007) | 17 |
| Figura 9. | Estructura básica de las vesículas lipídicas | 20 |
| Figura 10. | Mecanismo de penetración de los liposomas elásticos a través de la piel (Modificada de: Kumar <i>et al.</i> , 2012) | 24 |
| Figura 11. | Mecanismo elastomécanico de penetración de los liposomas elásticos a través de la piel (Modificada de: Kumar <i>et al.</i> , 2012) | 26 |
| Figura 12. | Esquema de un sistema iontoforético | 32 |
| Figura 13. | Representación esquemática para preparar liposomas elásticos, por medio del método de hidratación de película | 45 |
| Figura 14. | Celda de difusión tipo Franz | 48 |
| Figura 15. | Esquema general de los estudios de permeación <i>in vivo</i> | 50 |
| Figura 16. | Influencia del tiempo de ultrasonido y número de extrusiones sobre el tamaño de las vesículas. | 55 |
| Figura 17. | Influencia del tiempo de ultrasonido y número de extrusiones sobre el IPD | 55 |
| Figura 18. | Influencia del tiempo de sonicación y número de extrusiones sobre el potencial zeta | 57 |
| Figura 19. | Influencia del medio de hidratación sobre el tamaño de los LE | 57 |
| Figura 20. | Tamaño de liposomas convencionales (LC), liposomas elásticos sin fármaco (LE s/f) y Liposomas elásticos con fármaco (LE c/f) | 58 |
| Figura 21. | Potencial zeta de liposomas convencionales (LC), liposomas elásticos sin fármaco (LE s/f) y Liposomas elásticos con fármaco (LE c/f) | 59 |
| Figura 22. | Imagen de Microscopía electrónica de transmisión (TEM por sus siglas en inglés) de liposomas elásticos cargados de KT (X 50, 000). | 60 |
| Figura 23. | Efecto de la concentración de fármaco sobre la eficiencia de encapsulamiento (n=3) | 61 |

| | | |
|------------|---|----|
| Figura 24. | Tamaño de los liposomas elásticos en función del tiempo | 64 |
| Figura 25. | Cambio en el índice de polidispersión a través del tiempo | 64 |
| Figura 26. | Cambio del Potencial Z de los liposomas elásticos en función del tiempo | 65 |
| Figura 27. | Cambio en la cantidad de fármaco encapsulado a través del tiempo | 66 |
| Figura 28. | Prueba de difusión del KT en una bolsa de diálisis | 67 |
| Figura 29. | Perfiles de liberación del KT a partir de una solución y de liposomas elásticos | 68 |
| Figura 30. | Permeación transdérmica de KT (■ liposomas elásticos, ◆ solución). | 70 |
| Figura 31. | Perfil de permeación pasiva <i>in vivo</i> del KT formulado en vesículas elásticas y en solución (V = voluntario, LE = liposomas elásticos y S = solución) | 73 |
| Figura 32. | Valores medios del perfil de permeación pasiva <i>in vivo</i> del KT formulado en vesículas elásticas y en solución. | 73 |
| Figura 33. | Cantidad de KT vs profundidad de EC después de una hora de tratamiento para los voluntarios, 1, 2, 3, 4, 5 y 6. (◆ = LE; ■ = S). Medida del TEWL (g/m ² h) antes del tratamiento | 75 |
| Figura 34. | Perfil de penetración a través de EC humano <i>in vivo</i> de KT formulado en liposomas elásticos (◆) y en solución (●), n = 6 | 76 |
| Figura 35. | Correlación entre la pérdida de agua transepidermica de los voluntarios y la cantidad total permeada del KT | 77 |
| Figura 36. | Correlación entre la pérdida de agua transepidermica de los voluntarios y la distancia de penetración | 77 |
| Figura 37. | Perfil de permeación iontoforética <i>in vivo</i> del KT formulado en solución (V = voluntario) | 78 |
| Figura 38. | Perfil de permeación iontoforética <i>in vivo</i> del KT formulado en liposomas elásticos (V = voluntario). | 78 |
| Figura 39. | Valores medios del perfil de permeación iontoforética <i>in vivo</i> del KT formulado en vesículas elásticas y en solución | 79 |
| Figura 40. | Cantidad de KT vs profundidad de EC después de aplicar 20 minutos de iontoforesis (0.25 mA/cm ²) seguida de 40 minutos de difusión pasiva para los voluntarios, 1, 2, 3, 4 y 5 (◆ = LE; ■ = S). Nota. Para el voluntario 6 no se pudieron obtener las distancias de penetración | 80 |
| Figura 41. | Perfil promedio de penetración a través de EC humano <i>in vivo</i> de KT formulado en liposomas elásticos (◆) y en solución (■) aplicando iontoforesis, n = 5 | 81 |
| Figura 42. | Cantidad total permeada de KT a través de piel humana (<i>in vivo</i>) en solución (S) o LE por difusión pasiva e iontoforesis | 82 |
| Figura 43. | Distancia de penetración del KT en piel humana (<i>in vivo</i>) al administrarlo en solución (S) o LE por difusión pasiva e iontoforesis | 82 |

| | | |
|------------|--|----|
| Figura 44. | Valores de TEWL <i>in vivo</i> , obtenidos después de aplicar de manera conjunta una solución de fármaco (+) o liposomas elásticos (*) conteniendo KT e iontoforesis. TEWL a tiempo cero representa el valor basal (pre-tratamiento) | 87 |
| Figura 45. | Valores relativos de TEWL después de aplicar KT formulado en solución o LE y aplicando iontoforesis. Se reportan los valores obtenidos a los 3 min y a los 4.5 min. | 89 |
| Figura 46. | Tamaño promedio de los LE antes y después de aplicar una corriente eléctrica (C.E: corriente electrica) | 91 |
| Figura 47. | Porcentaje de KT encapsulado en LE antes y después de aplicar una corriente eléctrica (C.E: corriente eléctrica) | 92 |

ÍNDICE DE TABLAS

| No. Tabla | Descripción | Página |
|------------------|--|---------------|
| Tabla 1. | Ventajas de la administración transdérmica de fármacos | 8 |
| Tabla 2. | Clasificación de los liposomas de acuerdo a su tamaño | 20 |
| Tabla 3. | Ventajas de los liposomas como sistemas de liberación de fármacos (Avinash <i>et al.</i> , 2011; Priyanka y Shipra, 2012). | 22 |
| Tabla 4. | Contenido de ácidos grasos de la fosfatidilcolina de soya (SPC) y de huevo (EPC) (New, 1990). | 27 |
| Tabla 5. | Condiciones de preparación de los liposomas elásticos por diferentes autores | 29 |
| Tabla 6. | Influencia del tiempo de ultrasonido y número de extrusiones a través de membranas de policarbonato de 100 nm. | 44 |
| Tabla 7. | Tamaños promedio e IPD al variar el tiempo de ultrasonido y el número de extrusiones (n=9) | 56 |
| Tabla 8. | Tamaño promedio (nm) de los liposomas elásticos y liposomas convencionales antes y después de la extrusión manual a través de una membrana de policarbonato con un tamaño de poro de 50 nm (n=9) | 63 |
| Tabla 9. | Porcentajes de liberación de KT a diferentes tiempos | 68 |
| Tabla 10. | Coefficientes de correlación de los diferentes modelos ajustados | 69 |
| Tabla 11. | Parámetros matemáticos de la ecuación y coeficientes de determinación para los gráficos de la figura 3 | 72 |
| Tabla 12. | Análisis de Varianza para μg - Suma de Cuadrados Tipo III (pasiva) | 74 |
| Tabla 13. | Análisis de Varianza para μg - Suma de Cuadrados Tipo III para la cantidad permeada iontoforéticamente en los voluntarios tratados con liposomas elásticos y solución | 81 |
| Tabla 14. | Estudios del empleo conjunto de iontoforesis y vesículas | 83 |
| Tabla 15. | Valores relativos de TEWL. Seguimiento de la aplicación simultánea de iontoforesis con solución de fármaco o liposomas elásticos. Se reportan los valores obtenidos a los 3 min y a los 4.5 min. | 89 |

LISTA DE ABREVIATURAS

| Abreviatura | Significado |
|--------------------|---|
| AINES | Antiinflamatorios no esteroideos |
| C.E | Corriente eléctrica |
| COX | Ciclooxigenasa |
| EC | Estrato corneo |
| EPC | Fosfatidilcolina de huevo |
| FDA | Administración de Alimentos y Drogas de los Estados Unidos de América |
| HPTLC | Cromatografía en capa fina de alta resolución |
| IPD | Índice de polidispersión |
| KT | Ketorolaco trometamina |
| LC | Liposomas convencionales |
| LE | Liposomas elásticos |
| LE c/f | Liposomas elásticos con fármaco |
| LE s/f | Liposomas elásticos sin fármaco |
| LUV | Vesículas unilamelares grandes |
| MLV | Vesículas multilamelares |
| MVV | Vesículas multivesiculares |
| mV | Milivolts |
| NMDA | Receptores N-metil-D-aspartato |
| <i>P</i> | coeficiente de permeabilidad |
| PGs | Prostaglandinas |
| PZ | Potencial zeta |
| rpm | Revoluciones por minuto |
| S | Solución |
| SPC | Fosfatidilcolina de soya |
| SUV | Vesículas unilamelares pequeñas |
| TEWL | Perdida de agua transepidermal |
| TGI | Tracto gastrointestinal |
| T _m | Temperatura de transición de fase |
| USP | Farmacopea de los Estados Unidos de América |
| V | Voluntario |

RESUMEN

El presente trabajo tiene como finalidad formular el ketorolaco trometamina en liposomas elásticos (LE) y evaluar su liberación transdérmica *ex vivo* e *in vivo*, además de evaluar *in vivo* el uso de la iontoforesis de manera conjunta con los LE con la finalidad de valorar si existía un efecto sinérgico. Esta investigación se dividió en tres partes:

En la primera parte se optimizó la preparación de los liposomas elásticos (LE) por el método de hidratación de película, para lo cual se varió el tiempo de ultrasonificación y el número de extrusiones como variables críticas que afectan el tamaño de los LE, obteniendo las condiciones a las que se prepararan los LE conteniendo el fármaco (10 minutos de ultrasonido y tres extrusiones a través de membranas de policarbonato con un tamaño de poro de 100 nm).

En la segunda parte se prepararon y caracterizaron LE conteniendo el KT, usando como activador de superficie el Tween® 80 obteniéndose los siguientes resultados; (i) Los LE presentaron un tamaño promedio de vesícula de alrededor de 127 nm, un potencial zeta de -12 mV y una eficiencia de encapsulamiento del 73%. (ii) Se comprobó la forma esférica de las vesículas por microscopía electrónica de transmisión. (iii) Se evaluó su elasticidad al hacerlas pasar por una membrana con un tamaño de poro de 50 nm. (iv) Los LE mostraron ser estables físicamente por dos meses al no haber cambio en el tamaño de las vesículas en este periodo de tiempo. (v) Se evaluó la liberación *in vitro* del fármaco a partir de los LE usando celdas de difusión tipo Franz y una membrana de diálisis con un peso molecular de corte de 8000 Da. Estos estudios mostraron un retardo en la liberación cuando el fármaco es incluido en los LE.

Por último en la tercera parte se evaluó la permeación *ex vivo* e *in vivo* (esta última usando también iontoforesis) de KT en solución y formulado en LE. La permeación *ex vivo* se evaluó a través de piel de oreja de cerdo usando celdas de difusión tipo Franz y solución amortiguadora de fosfatos (pH 7.4) a 32°C. Obteniéndose un flujo de 0.278 $\mu\text{g}/\text{cm}^2\cdot\text{h}$ y un tiempo de latencia cercano a 10 h lo cual puede indicar que el KT permanece en la piel (con la posibilidad de extender el efecto local). Los estudios de permeación *in vivo* se llevaron a cabo en voluntarios sanos usando la técnica del “tape stripping”. Se administró por difusión pasiva e iontoforesis (aplicando corriente eléctrica fisiológicamente aceptable). Demostrándose en los estudios de difusión pasiva una buena correlación entre la cantidad total permeada de fármaco (r^2 de 0.8779) con la pérdida de agua transepidérmica (TEWL) confirmando el mecanismo de transporte de estos acarreadores. Al aplicar iontoforesis se encontró que esta favorece la penetración del KT cuando este se encuentra en solución y no así cuando esta formulado en LE. El efecto de aplicar iontoforesis y LE sobre la barrera de permeabilidad de la piel se evaluó por medio de mediciones de TEWL.

ABSTRACT

This work aims to formulate the ketorolac tromethamine (KT) in elastic liposomes (EL) and evaluate transdermal release *ex vivo* and *in vivo*, in addition to evaluating *in vivo*, the use of iontophoresis in conjunction with the LE in order to act synergistically. The present study was divided into three parts:

In the first part was optimized the preparation of the EL by the hydration film method, for which ultrasound time and number of extrusions to which they are subjected EL to reduce its size was varied, obtaining the conditions to which the EL be prepared containing the drug (ten minutes ultrasonic and three extrusions through polycarbonate membranes with a pore size of 100 nm).

In the second part, was prepared and characterized EL containing KT, using as surface activator Tween 80. The EL had a mean vesicle size around 127 nm, a zeta potential of -12 mV and encapsulation efficiency of 73%. By transmission electron microscopy the spherical shape of vesicles was demonstrated. And the elasticity of the vesicles to put them through a membrane with a pore size of 50 nm was evaluated. Also the EL were shown to be physically stable for two months in the absence of change in the size of the vesicles in this time period. *In vitro* release of drug from EL was evaluated using Franz diffusion cells, and a dialysis membrane with a molecular weight cut-off of 8000 Da. These studies showed a delayed release when the drug is included in the EL compared to aqueous drug solution.

Finally, in the third part, drug permeation *ex vivo* and *in vivo* was assessed (the latter also using iontophoresis). The *ex vivo* permeation was evaluated through pig ear skin using Franz diffusion cells and phosphate buffer solution (pH 7.4) at 32°C. Yielding a flow of 0.278 µg/cm².h and latency time close to 10 h which may indicate that KT remains in the skin (with the possibility of extending the local effect). The *in vivo* permeation studies were performed in healthy volunteers using the technique of “tape stripping”. Was administered by passive diffusion and iontophoresis (applying electric current physiologically acceptable). Passive diffusion studies demonstrating a good correlation between the total amounts of drug permeated and penetration distance with transepidermal water loss (TEWL), confirming the mechanism of transport of these carriers. By applying iontophoresis was found that this favor the penetration of KT when it was in solution and not when it was formulated in EL. The effect of applying iontophoresis and EL on the permeability barrier of the skin was evaluated by measurements of TEWL.

I. INTRODUCCIÓN

La forma de administrar sustancias con actividad terapéutica ha cambiado radicalmente en las últimas tres décadas. Las formas farmacéuticas convencionales han perdido funcionalidad debido a la inespecificidad del tratamiento, la constante intervención del paciente y los efectos adversos generados. Términos tales como sistemas de liberación controlada, prolongada, extendida, vectores farmacéuticos, sistemas terapéuticos, etc., engloban el creciente interés de los investigadores farmacéuticos en desarrollar nuevas formas de dosificación de activos capaces de optimizar la forma y rapidez de entrega del fármaco y el lugar de su liberación.

La posibilidad de la administración de fármacos a través de la piel es cada vez más conocida y están apareciendo más productos en el mercado. La barrera de permeabilidad de la piel no es absoluta y hay la posibilidad de que ciertas sustancia penetren el tejido subyacente o incluso alcancen la circulación general, esto ha dado origen a numerosos estudios sobre la penetración de sustancias de diversa índole, se puede decir que estos estudios buscan fundamentalmente responder a las siguientes interrogantes: ¿Cuál es el grado y rapidez de penetración de una sustancia?, ¿Cómo puede verse comprometida la barrera de permeabilidad? y ¿Qué estrategias existen para favorecer el paso de sustancias de interés a través de la piel?

Las limitaciones de ésta vía de administración están principalmente asociadas con la función de barrera de la piel. La baja permeabilidad de la mayoría de las sustancias a través de la misma, ha guiado las investigaciones hacia la búsqueda de estrategias para favorecer el transporte, entre ellas podemos mencionar el uso de promotores de absorción ya sea químicos o físicos, así como el empleo de acarreadores de fármacos, con los cuales se pretende aumentar la permeabilidad del tejido.

Actualmente se está evaluando el empleo conjunto de algún acarreador (liposomas, nanopartículas etc.) con uno o más promotores de absorción, con la finalidad de promover el transporte de fármacos a través de la piel.

Existen muchas clases de fármacos que pueden producir beneficios cuando son administrados a través de la piel. La elevada acción analgésica (semejante al de la morfina) así como su peso molecular bajo hacen que el ketorolaco trometamina sea un buen candidato para la administración transdérmica. No obstante, debido a que presenta muy baja permeabilidad a través de la piel, en este trabajo se propone combinar un acarreador (liposomas elásticos) y un promotor de absorción físico (iontoforesis) con la finalidad de aumentar su permeación transdérmica.

II. ANTECEDENTES

2.1 Ketorolaco trometamina

El dolor es esencial para la supervivencia ya que previene contra lesiones posibles o reales de los tejidos. Por lo regular, los seres humanos no se adaptan al dolor. Esta es la causa de consulta médica más frecuente a nivel mundial, por lo que los analgésicos son los fármacos más usados, entre éstos, los antiinflamatorios no esteroideos (AINES) son los más comunes (Zavaleta *et al.*, 2007). Los AINES son un grupo heterogéneo de compuestos en cuya estructura química no existe un núcleo esteroideo. Existen seis categorías: salicilatos, fenamatos, derivados de las pirazonas, índoles, ácidos fenilacéticos y los ácidos fenilalcanoicos. A pesar de la diversidad de sus estructuras químicas, estos fármacos comparten las mismas propiedades terapéuticas: actividad antiinflamatoria, analgésica y antipirética. Además, comparten en mayor o menor medida los mismos efectos adversos (Rainsford, 2007).

El ketorolaco trometamina (KT, Figura 1), ácido 5-benzoil-2,3-dihidro-1H-pirrólico-1-carboxil, 2-amino-2-(hidroximetil)-1,3-propanodiol, es un fármaco antiinflamatorio no esteroideo perteneciente al grupo de los ácidos fenilacéticos, es un fármaco quirral, cuya actividad biológica se asocia con el enantiómero S (Rokhade *et al.*, 2006). Se produce como sal de trometamina para aumentar su solubilidad acuosa (Sturm *et al.*, 1997, Mathew *et al.*, 2007).

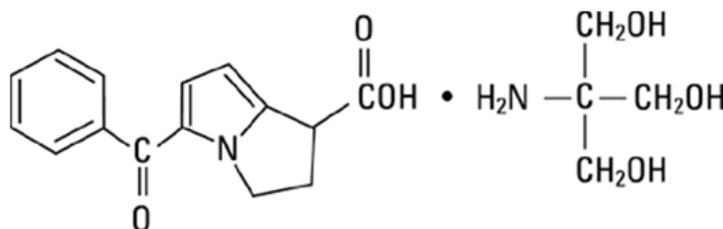


Figura 1. Estructura química del ketorolaco trometamina

El KT es ampliamente utilizado en México, por vía oral, intramuscular, intravenosa o tópica; está indicado en el tratamiento a corto plazo de la inflamación y dolor postoperatorio de moderado a grave, en el dolor agudo músculo-esquelético, dolor dental, incluyendo el dolor después de una cirugía bucal, y parece ser el AINE tópico de mayor efecto analgésico hasta la fecha (Orlandini *et al.*, 2004, Devarajan *et al.*, 2000). Se ha reportado que su efecto analgésico es comparable al de la morfina, sin producir los mismos efectos en el sistema nervioso central y sin provocar dependencia y efecto similar al de la meperidina por lo que se utiliza también para disminuir las dosis de opiáceos en el tratamiento del dolor severo. Así mismo, se ha reportado que su actividad antiinflamatoria es similar o comparable a la dexametasona, sin los efectos secundarios de los agentes esteroideos (Wang *et al.*, 2001).

Con respecto a la aspirina (AINE más utilizado) algunos autores reportan que es 20 veces más potente que ésta (Sturm *et al.*, 1997), y otros reportan que es 800 veces más potente (Devarajan *et al.*, 2000).

2.1.1 Farmacocinética del KT

La dosis de KT inicial recomendada es de 30 mg por vía intramuscular, seguida por dosis adicionales de 10 mg cada 6 horas. La biodisponibilidad oral del KT es de 90% con muy bajo metabolismo de primer paso hepático. Cuando el KT es absorbido después de la ingestión oral o cuando se administra intravenosamente, se disocia rápidamente en su forma aniónica a pH neutro (Kim *et al.*, 2005; Sturm *et al.*, 1997; Tiwari y Udupa, 2003). Tras su administración oral se alcanza el pico plasmático máximo a los 35 minutos, 1-2 horas después de una administración intramuscular y 5.4 minutos si se administra intravenosamente (López-Alarcon *et al.*, 1998).

Como ya se mencionó, el KT es un fármaco quiral cuya actividad se relaciona con el enantiómero S; el tiempo de vida media del enantiómero S es de 2.4 horas aproximadamente y para el enantiómero R el tiempo de vida media es de 5 horas. El tiempo de vida media para la mezcla racémica es de 4 a 6 horas (Rokhade *et al.*, 2006), por lo que se requiere administrar de manera frecuente.

El ketorolaco se une débilmente a proteínas plasmáticas en un 99%, el uso simultáneo de otro AINE desplaza al ketorolaco, incrementando la concentración plasmática de fármaco libre. El fármaco se metaboliza vía hepática derivando en metabolitos inactivos, la eliminación del KT es renal y es excretado como fármaco inalterado, metabolito conjugado con el ácido glucurónico o bien hidroxilado (Sturm *et al.*, 1997; Zavaleta *et al.*, 2007).

2.1.2 Mecanismo de acción del KT

Los receptores del dolor (nociceptores) pueden ser excitados por medios químicos y mecánicos. Las sustancias que producen la sensación dolorosa, como la histamina, estimulan directamente las terminaciones nerviosas, mientras que las prostaglandinas (PGs) reducen el umbral del dolor al aumentar la sensibilidad de los receptores al estímulo. Se sabe que las prostaglandinas PGE₂ y PGF_{2α} causan dolor local en los sitios de inyección, dolor vascular y cefalea. Por lo que disminuir la producción de PGs tendría un efecto analgésico.

La inflamación es una respuesta tisular a la agresión mediada por múltiples sustancias responsables de los cambios producidos en el foco inflamatorio. A partir de los fosfolípidos de la membrana celular, por la acción hidrolítica de la fosfolipasa A₂ y C, se produce ácido araquidónico que es metabolizado por la ciclooxigenasa (COX) y lipooxigenasa originándose así las prostaglandinas, lipoxinas, leucotrienos y tromboxanos.

El principal mecanismo de acción de los AINES es la inhibición de la enzima COX, también llamada prostaglandina endoperóxido H sintasa, con lo que impiden la biosíntesis de eicosanoides a partir del ácido araquidónico (Figura 2). Las PGs constituyen una familia de ácidos carboxílicos de cadena recta (20 carbonos) con grados variables de insaturación. Hay 10 grupos designados como A J para indicar las diferencias en sus estructuras moleculares. Las PGs tienen diferentes funciones sobre el organismo. La eficiencia de los distintos AINES está en función de sus diferencias farmacocinéticas y de su mayor o menor actividad anticiclooxigenasa.

La COX cuenta con dos isoformas diferentes (COX-1 y COX-2). La enzima COX-1 forma parte constitutiva de muchas células del organismo y tiene como finalidad sintetizar PGs protectoras de la mucosa gástrica, de la homeostasis electrolítica, PGs involucradas en la vasodilatación y las facilitadoras de agregación plaquetaria. Por otro lado, la COX-2 además de ser constitutiva en menor cantidad, también es inducida por los procesos inflamatorios, ya que también produce prostaciclina y tromboxanos responsables de la regulación vasoconstricción/vasodilatación, fibrinólisis y sensibilización de receptores nociceptivos periféricos (Vane *et al.*, 1998; Zavaleta *et al.*, 2007).

Muchos datos indican que además de su acción primaria inhibiendo la síntesis de prostaglandinas, los AINES tienen actividad a nivel central. Sotgiu *et al.*, (1998) sugieren que el Ketorolaco puede lograr su efecto analgésico a nivel central interfiriendo con la actividad de los receptores N-metil-D-aspartato (NMDA) en neuronas espinales involucradas en el procesamiento de señales nociceptivas.

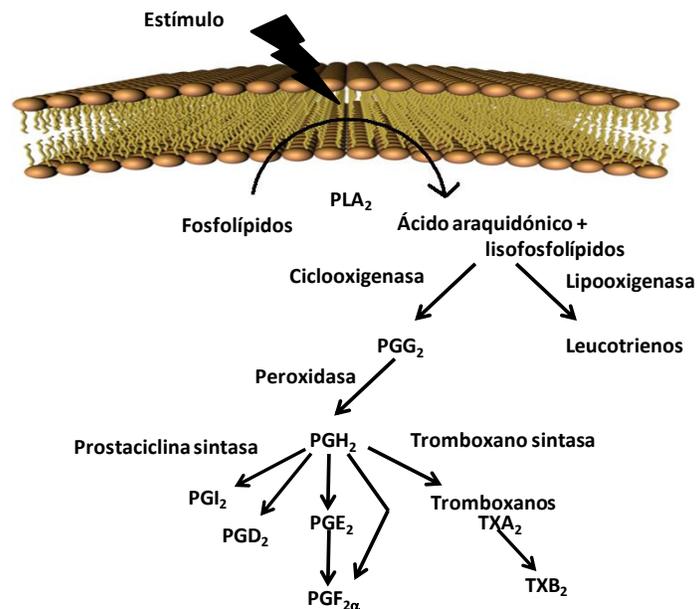


Figura 2. Biosíntesis de eicosanoides.

2.1.3 Efectos adversos del KT

Se ha propuesto que la actividad terapéutica de un AINE no selectivo, es debida a la inhibición de la isoenzima COX-2, mientras que los efectos adversos ocasionados por estos se debe a la inhibición de la isoenzima COX-1.

El ketorolaco no es selectivo para alguna de las isoformas de la COX, inhibe tanto la producción de PGs pro-inflamatorias y PGs en nociceptores periféricos (lo cual nos da la respuesta deseada), así como PGs protectoras, lo cual explica la mayoría de los efectos adversos producidos por el consumo de ketorolaco; entre éstos los más frecuentes son los gastrointestinales: dolor abdominal, dispepsia, náusea, vómito, diarrea, constipación, estomatitis, gastritis, úlcera péptica, hemorragia y perforación.

Estos daños al tracto gastrointestinal se pueden producir por dos mecanismos: irritación local directa y por la disminución de PGs citoprotectoras (PGI₂ y PGE₂) derivada de la inhibición de COX-1 en las células epiteliales gástricas. Estas PGs inhiben la secreción de ácido, mejoran el flujo sanguíneo de la mucosa y promueven la secreción de moco, eventos disminuidos durante el tratamiento con KT.

Otros efectos adversos severos que se han reportado son los renales, el consumo de KT puede causar insuficiencia renal y síndrome nefrótico, así como edema, hipertensión, proteinuria, poliuria y hematuria. Puede también provocar falla hepática.

El KT puede exacerbar la insuficiencia cardiaca congestiva, aumenta el riesgo de eventos trombóticos como infarto agudo al miocardio y enfermedad vascular cerebral (Petruzzelli *et al.*, 2007; Zavaleta *et al.*, 2007).

Como se ha observado una elevada incidencia de efectos adversos producidos por la administración de ketorolaco, la Administración de Alimentos y Drogas de los Estados Unidos de Norteamérica (FDA por sus siglas en inglés), ha determinado que la dosis y la duración máxima de su uso sea restringido a cinco días y en el año 2007 publicó una alerta en el que se indica que las formas de dosificación de ketorolaco deberán contener un instructivo; en España, la agencia española de medicamentos y productos sanitarios cambió la forma de uso de los medicamentos que contienen ketorolaco, indicando que estos medicamentos son exclusivamente de uso hospitalario.

Como puede observarse la administración del ketorolaco conlleva muchos riesgos cuando se administra en una forma de dosificación convencional, por otra parte, la mayoría de las reacciones adversas están relacionadas a la dosis y es aconsejable no exceder la dosis límite. De aquí la necesidad de tener una alternativa para la administración de este fármaco. La tendencia en el desarrollo de formulaciones con AINES ha sido mejorar su eficacia terapéutica y reducir la severidad de los efectos adversos. Una de estas alternativas es la liberación transdérmica, la cual es

una ruta de administración atractiva para mantener los niveles plasmáticos de KT por periodos prolongados de tiempo.

Cordero *et al.* (2001) propusieron y determinaron el índice de actividad tópica antiinflamatoria, concluyendo que el ketorolaco presenta una aceptable eficiencia y viabilidad para formularse en formas farmacéuticas tópicas.

Las ventajas asociadas con la liberación transdérmica han sido bien documentadas, sin embargo, la liberación transdérmica de fármacos ofrece un gran desafío debido a las excelentes propiedades de barrera de la capa externa de la piel: el estrato córneo. Los fármacos utilizados para liberación transdérmica deben tener ciertas características como: peso molecular entre 200 y 500 daltons, una apropiada lipofilia y elevada potencia (Barry, 2004; Chiarello, 2004). . Aunque el ketorolaco tiene una actividad analgésica alta y un peso molecular pequeño, el valor de su log P se ha reportado de tan solo 0.9 – 1.04, por lo cual no es suficientemente lipofílico para pasar a través de la bicapa lipídica del estrato córneo. Se ha probado la liberación transdérmica de ketorolaco usando promotores químicos de absorción, diferentes vehículos e iontoforesis, no obstante los resultados no han sido satisfactorios.

Doh *et al.* (2003) sintetizaron y evaluaron una serie de ésteres de alquilo de ketorolaco, los cuales presentaron elevada permeación a través de la piel y tiempos de retardo cortos, pero presentan una elevada inestabilidad química. Este mismo grupo preparó diferentes amidas derivadas del KT para mejorar su estabilidad; sin embargo, la permeación transdérmica de estos compuestos fue más baja que la del propio ketorolaco (Kim *et al.*, 2005).

2.2 Liberación transdérmica de fármacos

Uno de los objetivos de la investigación farmacéutica es el diseñar nuevas moléculas con actividad farmacológica que den respuesta a enfermedades aún por resolver como el cáncer, la infección por virus VIH, la enfermedad de Alzheimer, entre otras. Sin embargo, existen muchas moléculas con comprobada acción farmacológica para diversos padecimientos que presentan problemas de estabilidad, solubilidad, permeabilidad a través de las membranas, tiempos de vida media en plasma muy cortos, efectos adversos severos, etc., por lo que de manera simultánea se realizan investigaciones enfocadas a resolver dichos problemas, aplicando novedosas vías de administración que impliquen la administración no invasiva de fármacos. Una de estas vías es la administración transdérmica.

La aplicación de fármacos sobre la piel puede tener dos objetivos:

a) Liberación tópica o dérmica, la cual consiste en aplicar el fármaco de manera tópica para el tratamiento de enfermedades de la piel. Ésta tiene la ventaja de localizar altas concentraciones de fármaco en el sitio de acción, reduciendo los niveles sistémicos del fármaco y por lo tanto reduciendo los efectos adversos sistémicos.

b) Liberación transdérmica: ésta utiliza la piel como una ruta alternativa para la liberación sistémica de fármacos. La liberación transdérmica puede dar una liberación de fármaco constante. La entrada controlada de fármaco disminuye las variaciones de los niveles plasmáticos de éste, lo cual reduce los efectos adversos, particularmente si el fármaco tiene una ventana terapéutica estrecha.

El uso de la piel como sitio de liberación de fármacos se remonta a tiempos antiguos, en el papiro de Ebers se menciona el uso de la corteza de la planta de ricino embebida con agua colocada sobre la cabeza, para aliviar el dolor. Históricamente, los emplastos medicinales pueden ser vistos como los primeros sistemas de liberación transdérmicos. En la actualidad, el desarrollo de los sistemas de liberación transdérmica comenzó en los años setenta del siglo pasado y en 1979 la FDA aprobó el primer parche transdérmico conteniendo escopolamina (Ahad *et al.*, 2010).

La administración transdérmica de fármacos ofrece varias ventajas con respecto a otras vías de administración, las cuales se enlistan en la tabla 1 (Mills y Cross., 2006; Avinash *et al.*, 2011).

El éxito de los sistemas de liberación transdérmica en el mercado es evidente, existen más de 35 productos aprobados en los Estados Unidos de Norteamérica, para una amplia variedad de patologías. En el 2005 el mercado fue de 12.5 billones de dólares y se espera que para el 2015 sea de 31.5 billones de dólares (Ahad *et al.*, 2010). A pesar de las muchas ventajas que ofrece la piel como sitio de liberación de fármacos, actualmente algunos fármacos se encuentran en el mercado formulados como un sistema de liberación transdérmica entre ellos la escopolamina, también llamada hioscina, nitroglicerina, clonidina, estradiol, norestisterona, levonorgestrol, testosterona,

fentanil, nicotina, oxibutinina y lidocaína. Hay muchos fármacos (iónicos o macromoleculares) para los que sería deseable la liberación transdérmica, pero que actualmente es inviable debido a las deficiencias de esta vía de liberación, ocasionadas por las propiedades de barrera de la piel, la cual impide la penetración de este tipo de compuestos en cantidades suficientes para dar un efecto terapéutico (Barry *et al.*, 2001). Para entender la liberación transdérmica de fármacos y como alterar las propiedades de barrera de la piel, es necesario conocer la anatomía, fisiología y composición química de este órgano.

Tabla 1. Ventajas de la administración transdérmica de fármacos

| |
|--|
| Se reducen los intervalos de dosificación |
| Se disminuye el efecto de primer paso hepático |
| Se evita el metabolismo pre-sistémico en el tracto gastrointestinal (TGI) |
| Baja actividad proteolítica |
| Fácil administración |
| No invasiva |
| Aceptabilidad por parte del paciente |
| Área superficial grande y accesible |
| Seguridad de empleo (es posible retirar el medicamento en caso de urgencia) |
| La robustez de la piel facilita la utilización de promotores de absorción |
| Poca variación del pH, con respecto al TGI |
| Evita la liberación errática con respecto al TGI, debida a las interacciones con la comida |
| Posibilidad de localizar con precisión un dispositivo de liberación |
| Reducción de los efectos adversos |
| Es útil en pacientes inconscientes |

2.2.1 Anatomía y fisiología de la piel

La piel es un órgano complejo que cubre la superficie del cuerpo, cuya principal función es la de proteger al organismo. Es considerada como el órgano más grande, ya que representa el 10% de la masa corporal y tiene una superficie aproximada de 2 m². Este órgano permite al organismo interactuar con el ambiente. Las funciones de la piel se consideran esenciales para la supervivencia de los seres humanos en relación al ambiente agresivo, proveyendo una interface multifuncional entre el cuerpo y el medio que lo rodea. Entre las funciones protectoras se encuentran las siguientes:

- Barrera química en dos direcciones, controlando la pérdida de agua, electrolitos y otros constituyentes del cuerpo y evitando la entrada de compuestos dañinos o no deseados provenientes del ambiente.
- Barrera microbiológica, previene la penetración de microorganismos a través de la piel intacta.

- Barrera contra las radiaciones ultravioletas, como resultado de la producción de melanina por los melanocitos en la capa basal estimulados por la luz ultravioleta.
- Regulación de la temperatura corporal, la piel es responsable de mantener la temperatura corporal aproximadamente en 37°C.

Otras funciones importantes son las sensoriales y endocrinas (síntesis de vitamina D y feromonas), así como la excreción y absorción de sustancias (Menon, 2002; Villarino y Landoni, 2006).

2.2.2 Estructura básica de la piel

Anatómicamente, la piel está constituida de 3 capas superpuestas: epidermis que a su vez se puede dividir en epidermis viable y no viable (estrato córneo), dermis e hipodermis o tejido subcutáneo (figura 3). En adición a estas estructuras, la piel consta de varios anexos: folículos pilosos, glándulas sudoríparas, glándulas apócrinas y uñas.

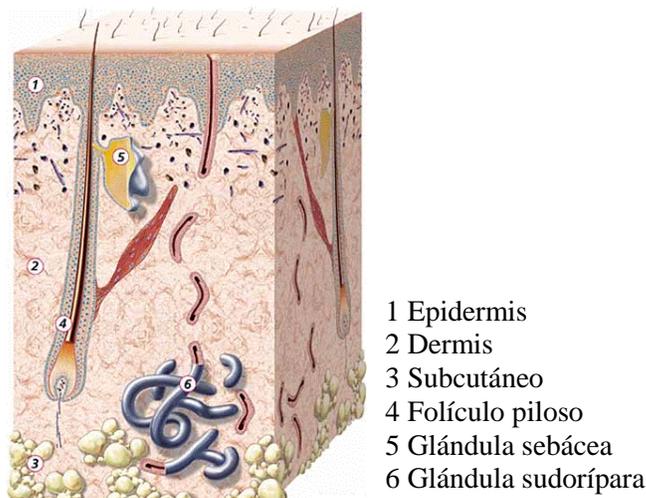


Figura 3. Estructura de la piel humana.

Tomada de: http://www.eucerin.es/skin/skincell_1.html (Consultada en mayo 2009)

2.2.2.1 Tejido subcutáneo

El tejido subcutáneo, la capa más interna de la piel, se caracteriza por su estructura fibrosa conectiva, la cual está compuesta principalmente por fibras elásticas y grasa. Esta capa actúa como aislante y amortiguador de impactos, reservorio de calorías y proveedor de nutrientes para las capas más superficiales de la piel. En esta capa se encuentra la base de los folículos pilosos, la porción secretoria de las glándulas sudoríparas, los nervios cutáneos, así como redes de vasos linfáticos y sanguíneos.

2.2.2.2 Dermis

La dermis es una capa fibrosa que soporta y fortalece a la epidermis. Su espesor varía de 2-3 mm. Consiste de una matriz de tejido conectivo laxo compuesto por colágeno y elastina, proteínas fibrosas embebidas en un gel de mucopolisacáridos (glicosaminoglicanos), iones y agua. Esta matriz ayuda a sostener las células y a permitir la difusión de oxígeno y nutrientes a las células de la epidermis. La dermis está altamente vascularizada e incluye también a las unidades pilocebáceas y glándulas. Los principales tipos de células de la dermis son fibroblastos, macrófagos y células mast, además de leucocitos infiltrados (Menon, 2002). Los fibroblastos son los responsables de secretar colágeno, elastina y proteoglicanos, los cuales dan soporte y elasticidad a la piel.

2.2.2.3 Epidermis

La epidermis (figura 4) es la capa superficial de la piel y provee la principal barrera de protección contra la entrada de sustancias al organismo. La epidermis consiste de un epitelio escamoso estratificado con una membrana basal. La epidermis como ya se mencionó se puede dividir en epidermis viable y no viable, la epidermis viable consta de varias capas de células las cuales varían en su nivel de diferenciación. Cerca del 95% de la epidermis está constituida por queratinocitos y el resto son células de Langerhans, Merkel (nociceptores) y melanocitos. Tiene un espesor aproximado de 100 – 150 μm .

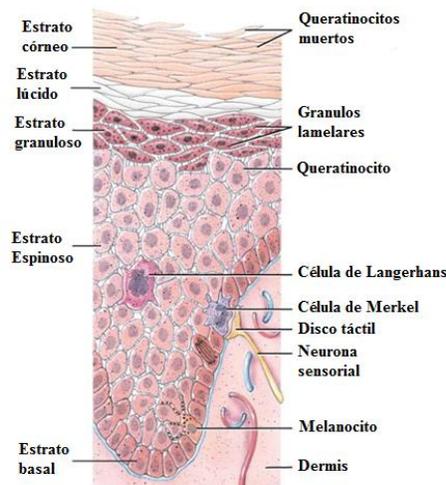


Figura 4. Estructura de la epidermis.

Modificada de: http://www.uaz.edu.mx/histo/TortorAna/ch05/05_03.jpg (Consultada en Mayo 2014)

El estrato basal es una sola capa de células basales columnares, las cuales permanecen unidas a la membrana basal por medio de hemidesmosomas.

Durante el proceso de diferenciación, las células de las capas de la epidermis (capa basal, espinosa, granulosa y lúcida) son convertidas en corneocitos (células ricas en queratina), para formar el estrato córneo. Estos cambios incluyen el achatamiento y alargamiento de los queratinocitos, pérdida del núcleo e incremento en la cantidad de queratina. Además, los cuerpos lamelares, también llamados cuerpos de Odland, vierten su contenido al espacio intercelular, estos cuerpos de Odland están presentes desde la capa espinosa, haciéndose cada vez más abundantes conforme avanza la diferenciación celular. Dicho contenido incluye: glucosilceramidas, fosfolípidos, colesterol y enzimas como lipasas, esfingomielinasa, β -glucosilcerebrosidasa y fosfodiesterasas. Además, existe evidencia de que una vez que el contenido lipídico de estos gránulos es secretado, éste es procesado por las enzimas co-excretadas, transformando los lípidos pro-barrera en los lípidos enriquecidos con ceramida que formarán la barrera lipídica. El proceso de diferenciación se ha estimado que dura 21 días (Menon, 2002; Walters, 2002).

El estrato córneo (EC), la capa más externa de la epidermis, también llamado epidermis no viable, tiene un espesor aproximado de 10 – 40 μm , que puede variar dependiendo del sitio de localización. En condiciones normales, tiene un contenido de agua del 20% p/p (Bouwstra *et al.*, 2003).

El EC consta de 15 -25 capas de corneocitos (resultado de la diferenciación celular), los cuales son células apiladas hexagonales, achatadas y cornificadas embebidas en lípidos intercelulares altamente organizados, provenientes de los cuerpos Odland.

El EC es considerado como la principal barrera para el intercambio de sustancias entre el organismo y el ambiente y por lo tanto para la absorción transdérmica de fármacos. La matriz intercelular (en la que están embebidos los corneocitos) está formada por desmosomas y lípidos, que proveen cohesión a los corneocitos; entre los lípidos se puede mencionar que hay principalmente ceramidas (41%) de las cuales se han aislado nueve clases en el EC humano, ácidos grasos libres (9%), los cuales son principalmente ácidos de cadena larga saturados (con más de 20 átomos de carbono), colesterol (27%), ésteres de colesterol (10%), sulfato de colesterol (2%) y en menor proporción triglicéridos y glicosfingolípidos. Los fosfolípidos que predominan en la capa basal de la epidermis, son convertidos a glucosilceramidas y posteriormente a ceramidas y ácidos grasos libres, por lo que están ausentes en las capas más externas del EC. Estos lípidos se orientan en bicapas multilamelares altamente ordenadas debido a los ácidos de cadena larga y se ha demostrado que son esenciales para las funciones de barrera de la piel normal (Bouwstra *et al.*, 2003; Menon, 2002; Walters y Roberts, 2002).

El EC ha sido descrito como una pared de ladrillos (figura 5), en la que los ladrillos son los corneocitos ricos en queratina y el cemento son los lípidos intercelulares. Este arreglo hace que el EC sea 1000 veces menos permeable al agua que otras membranas biológicas (Mills y Cross, 2006).

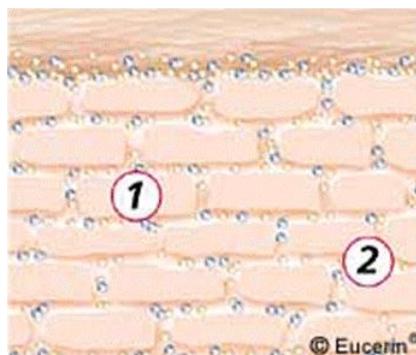


Figura 5. Estructura del estrato córneo en el que se le compara a una pared de ladrillos. (1) Células córneas (corneocitos), (2) Lípidos epidérmicos
Tomada de: http://www.eucerin.es/skin/skincell_3.html (Consultada en mayo, 2009)

Debido a su organización y composición, el EC es considerado como la principal barrera para la absorción de fármacos a través de la piel.

2.2.2.4 Apéndices de la piel

Los apéndices de la piel representan el 1% de la superficie total de la misma e incluyen principalmente glándulas sudoríparas, folículos pilosos, glándulas sebáceas y uñas.

Las glándulas sudoríparas (apocrinas y ecrinas) están presentes en gran cantidad en la piel humana, cerca de 400 glándulas/cm². Las apocrinas emergen en los ductos foliculares y están localizadas en las axilas y en la región perineal en adultos. Las ecrinas son más pequeñas y están dispersas sobre todo el cuerpo (excepto en las mucosas) y excretan el sudor a través de los ductos sudoríparos en la superficie de la piel.

El vello está distribuido sobre todo el cuerpo, excepto en las palmas de las manos y las plantas de los pies. Los folículos pilosos pueden ser un sitio importante para la penetración percutánea, aunque su área solo es del 0.1 – 1% del total de la superficie de la piel.

Las glándulas sebáceas son halocrinas, se encuentran en todas las regiones del cuerpo con una densidad de 1-2 glándulas por folículo piloso. La actividad de estas glándulas varía según el sitio de localización y la edad. Las glándulas sebáceas asociadas a los folículos pilosos se denominan unidad pilosebácea (Monteiro, 2006).

2.2.3 Sistema circulatorio de la piel

El sistema circulatorio de la piel es una extensa red vascular que no sólo provee de nutrientes a la piel, folículos pilosos y apéndices glandulares, así como al tejido graso subcutáneo, sino que

también participa en otras funciones biológicas, tales como el intercambio de calor, reparación y respuesta inmune.

El suministro de sangre a la piel proviene de arterias importantes que se encuentran en el tejido conectivo subcutáneo. Las ramificaciones terminales de estas arterias dan lugar a tres plexos: el plexo subcutáneo, el cual se localiza justo debajo de la dermis y emite ramificaciones al plexo cutáneo, el cual lleva el suministro de sangre a la dermis alcanzando la dermis superior y posteriormente se ramifica para formar el plexo superficial subpapilar de asas capilares que lleva la sangre hasta la superficie de la epidermis. El transporte de nutrientes dentro de la epidermis o el intercambio de sustancias entre la epidermis y la dermis se consigue a través de la difusión pasiva. La epidermis por sí misma es avascular. Las venas dentro de la piel están organizadas a lo largo de la misma línea de las arterias (Lu y Flynn, 2009), formando tres plexos: plexo subcutáneo, plexo cutáneo y plexo subpapilar. Cabe señalar que las arteriolas pertenecientes al plexo cutáneo y subpapilar presentan anastomosis arteriovenosa, los cuales son conexiones que unen las arteriolas directamente con las vénulas correspondientes.

Se ha estimado que la superficie vascular disponible para el intercambio de sustancias (incluyendo fármacos) entre la sangre y el tejido local, es de la misma magnitud que la superficie de la piel. También se ha reportado que el flujo sanguíneo a través de la piel es de 0.01 a 1 mL por minuto por gramo de tejido, el cual depende del sitio del cuerpo y de la temperatura. Sangre suficiente a 150 μm dentro de la superficie de la piel arrastra eficientemente sustancias (que han alcanzado esta profundidad) al interior del cuerpo.

2.2.4 Penetración de fármacos a través de la piel

El proceso por el cual un fármaco aplicado sobre la piel llega a circulación sistémica consta de varios pasos: a) la solubilización del principio activo y/o su liberación a partir de la formulación, b) partición desde la formulación hacia el EC, c) una vez alcanzado el EC, su difusión dentro del mismo a través de los lípidos intercelulares principalmente, d) la partición a partir del EC hacia la epidermis viable, e) difusión a través de la epidermis viable hacia la dermis y f) la captación por parte de los capilares locales y eventualmente la circulación sistémica (Kalia y Guy, 2001).

La fisiología de la piel ilustra las tres rutas factibles por las cuales se puede dar el transporte pasivo de un fármaco a través de la piel; (i) difusión intercelular a través de los lípidos lamelares del EC. (ii) difusión transcelular a través de los corneocitos y lípidos intercelulares y (iii) difusión a través de los apéndices cutáneos: la unidad pilosebácea (transfolicular) y los conductos del sudor (transglandular). Estas rutas se ejemplifican en la figura 6 (Ahad, 2010).

La ruta más directa es la transcelular, pero el fármaco encuentra una resistencia significativa a permear porque tendría que cruzar tanto estructuras lipofílicas como hidrofílicas. La ruta más común es la ruta intercelular. Los anexos (unidad pilosebácea y conductos sudoríparos) contribuyen con el transporte de fármacos a través de la piel con tan solo el 0.1%, por lo que se considera que esta ruta es insignificante para tener un flujo de fármaco constante. Sin embargo, se ha observado que esta ruta puede ser importante para iones y para grandes moléculas polares (Barry, 2001; Schäfer-Korting *et al.*, 2007; Trommer y Neubert, 2006).

Está documentado que las moléculas polares permean principalmente a través de las rutas polares dentro del EC hidratado, mientras que las no polares lo hacen a través de la matriz lipídica del EC (Ahad *et al.*, 2010).

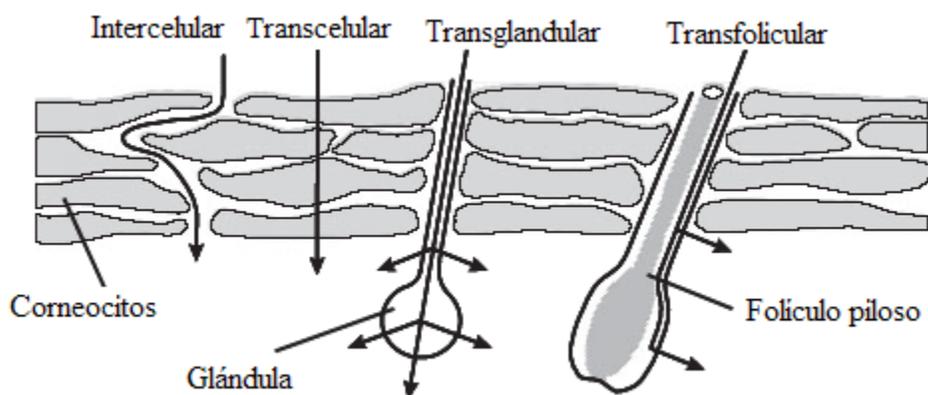


Figura 6. Rutas de absorción transdérmica. Modificada de Trommer y Neubert, 2006

Existen diversos factores que influyen sobre el grado de difusión de los compuestos a través del EC:

- Características fisicoquímicas del fármaco como: peso molecular, estructura química, hidrofobicidad, etc.
- Concentración del fármaco
- Vehículo utilizado, el cual debe tener una elevada permeabilidad, ser bien tolerado por la piel, liberar con facilidad y rapidez el principio activo.
- Difusividad del compuesto en el EC.

En general, compuestos lipofílicos de bajo peso molecular pueden permear la piel mejor que compuestos hidrofílicos o de alto peso molecular, lo cual es debido al bajo contenido de agua y al alto contenido de lípidos en el EC. Sin embargo, si la piel se encuentra hidratada o se expone de manera prolongada al agua, sus propiedades de barrera se ven disminuidas (Salminen y Roberts, 2000).

Por otra parte, cualquiera de las dos rutas (intercelular o transfolicular) puede ser importante dependiendo de las propiedades fisicoquímicas del fármaco, así como también de las condiciones de la piel. Ya que la absorción percutánea es un proceso de difusión pasiva espontáneo, el fármaco tomará la ruta que ofrezca menos resistencia.

La penetración de los fármacos a través del EC es un proceso lento, seguido de una difusión rápida a través de la epidermis viable y la dermis. Estos procesos se llevan a cabo por difusión pasiva. La velocidad y magnitud del transporte están gobernadas por la ley de Fick.

Así, la permeabilidad del EC como un resistor de la penetración es proporcional a la movilidad difusiva de la molécula de fármaco dentro del EC (coeficiente de difusión, D_{SC}), proporcional a la capacidad del EC para solubilizar al fármaco con respecto al vehículo (coeficiente de partición, K_{SC}), pero inversamente proporcional al espesor del EC (h_{SC}). Por lo anterior, en el estado estable y en condiciones sink o de drenado, la permeación del fármaco puede ser descrita por medio de la siguiente ecuación:

$$J_{SC} = \frac{K_{SC} D_{SC} C}{h_{SC}}$$

Donde J_{SC} ($\mu\text{g}/\text{cm}^2 \text{ h}^{-1}$) es el flujo de fármaco a través del EC en el estado estable y C es la concentración de fármaco en el sistema de liberación.

2.2.5 Estrategias para promover la absorción de fármacos

A pesar de las múltiples ventajas que representa la administración de fármacos a través de la piel (Tabla 1), el bajo flujo del mismo logrado hace difícil alcanzar los niveles terapéuticos deseados para la mayoría de los principios activos, por lo que la absorción adecuada de éstos continúa siendo uno de los desafíos más importantes en el desarrollo de sistemas de liberación transdérmicos. También se ha mencionado que el EC es el responsable de la baja permeabilidad de la piel. Para lograr una liberación transdérmica adecuada y aprovechando que la piel se regenera constantemente, se han desarrollado diferentes estrategias para vencer las propiedades de barrera de la misma. Entre éstas se encuentra el empleo de promotores de absorción, ya sea de tipo físico o químico, así como el uso de acarreadores, que faciliten la liberación del fármaco, estas estrategias usan energía mecánica, química o eléctrica para inducir una alteración estructural del EC o proveer fuerzas impulsoras adicionales a la difusión; o bien, modifican las características del fármaco para aumentar su permeabilidad a través de la piel. La figura 7 muestra las diversas estrategias utilizadas para aumentar la permeación de fármacos a través de la piel.

La principal desventaja de los promotores de permeación químicos es que la mayoría de ellos induce irritación o sensibilización, causando daño y reduciendo las funciones de barrera de la piel

por periodos de tiempo prolongados, lo cual no es deseable en el proceso de liberación transdérmica de fármacos (Sheihet *et al.*, 2008).

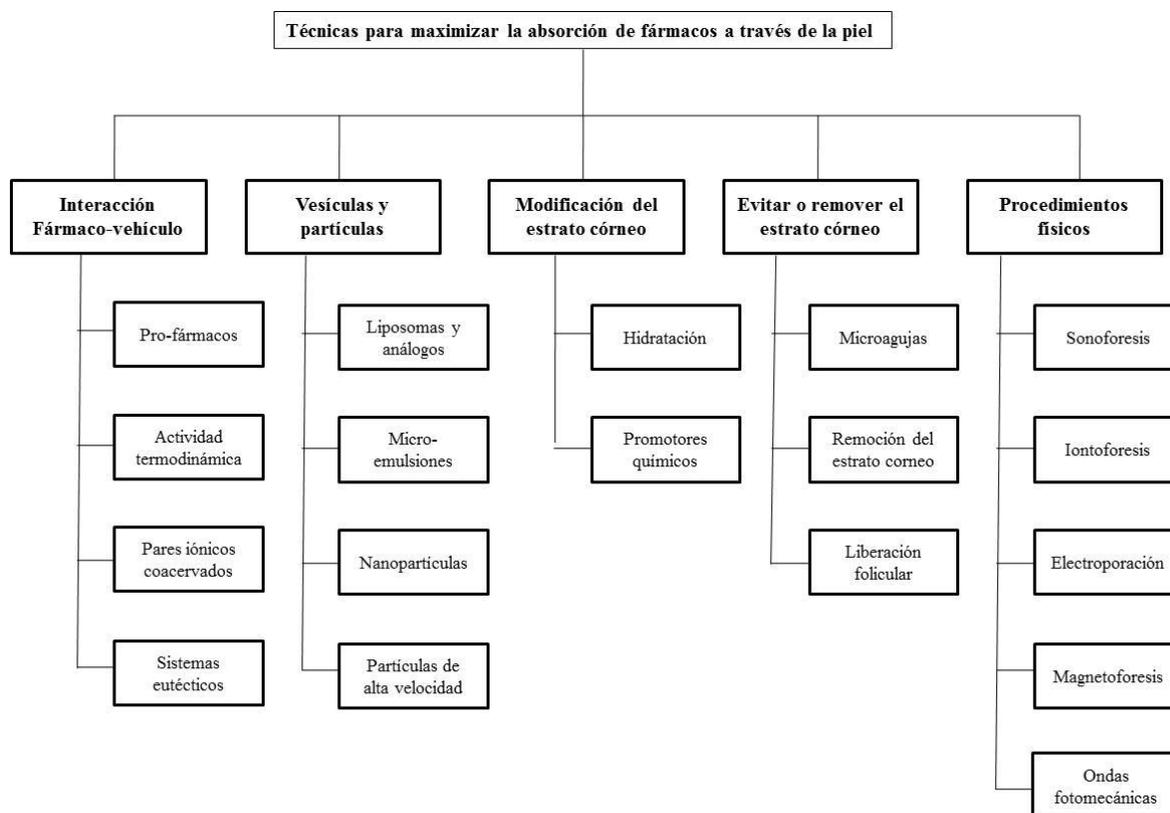


Figura 7. Algunos métodos para optimizar la liberación transdérmica de fármacos (Modificada de Barry, 2001)

El desarrollo de nuevos sistemas de liberación para fármacos ya existentes (como es el caso del KT) no sólo podría mejorar el desempeño del fármaco en términos de eficacia y seguridad sino que también mejoraría el cumplimiento del paciente y el beneficio terapéutico general. Por ello, la combinación de promotores de absorción puede considerarse como una alternativa en el desarrollo de las formulaciones.

Se ha reportado que la combinación de dos o más promotores químicos de la penetración conduce a un sinergismo y se ha sugerido que se podría incrementar de manera importante la penetración de fármacos tras la aplicación epicutánea combinando métodos físicos y químicos de promoción. En el presente trabajo se evaluará el efecto de la aplicación simultánea de un promotor químico (liposomas elásticos) y promotor físico (iontoforesis) en la permeación transdérmica de KT.

2.2.6 Método de *Tape Stripping* para cuantificar fármacos a través de la piel

Para estudiar la penetración *in vivo* del KT (formulado en liposomas elásticos o en solución) a través del estrato córneo de piel humana, se usó el método de “tape stripping” (TS) el cual es un método básico para el estudio de la penetración de sustancias aplicadas tópicamente.

La técnica de TS es una técnica común en estudios cutáneos ya que es mínimamente invasiva y permite evaluar (Löffler et al., 2004; Puglia et al., 2008; Dragicevic et al., 2010):

- La penetración de fármacos dentro de la piel
- La permeación de fármacos a través de la piel
- La distribución de fármacos en el EC
- La dermatofarmacocinética de productos de uso tópico (biodisponibilidad y bioequivalencia), avalada por la FDA (Food and Drug Administration)
- Estudiar la fisiología del EC, investigando la cohesión de los corneocitos en el EC *in vivo* cuantificando la cantidad de EC removido

Mediante este método se determina la concentración del fármaco en el EC. Este método consiste de manera general en la aplicación de la formulación a evaluar sobre la piel de animales o humanos y después del tiempo de aplicación, el EC es removido mediante la aplicación sucesiva de cintas adhesivas y remoción de las mismas (Figura 8). El fármaco se extrae de las cintas adhesivas, mediante el uso de disolventes para su posterior cuantificación mediante un método analítico.

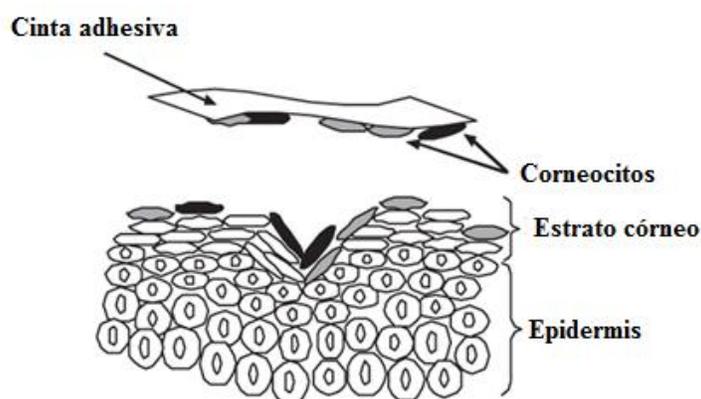


Figura 8. Representación esquemática de la técnica de “*Tape Stripping*”. (Modificada de Pailler-Mattei et al., 2007)

Se han propuesto varios métodos para medir la cantidad de EC removido por el stripping, 1) pesar las cintas antes y después del stripping, 2) análisis espectroscópico de las cintas y 3) extracción de proteínas de la cinta seguida de la cuantificación total de proteínas por el método modificado de Lowry (Löffler et al., 2004).

Generalmente la cantidad de SC removido por TS no es linealmente proporcional al número de cintas removidas, la técnica de tape stripping parece ser simple y fácil de realizar, sin embargo hay diferentes parámetros que pueden influir en la cantidad de SC removido con cada cinta, entre las que se pueden mencionar la hidratación de la piel, la cohesión entre los corneocitos (la cual incrementa con la profundidad del EC), el sitio del cuerpo y las diferencias interindividuales. Por lo que, es esencial para la comparación de la penetración de diferentes formulaciones que la cantidad de fármaco detectada en cada cinta se relacione con la posición real estandarizada en el estrato córneo.

2.3 Sistemas vesiculares para la administración transdérmica de fármacos.

Como ya se mencionó anteriormente la piel es una barrera a la penetración de sustancias hacia la circulación sistémica, por lo que se han investigado y desarrollado diversas técnicas cuya función principal va dirigida a perturbar y debilitar los lípidos intercelulares altamente organizados del estrato córneo o aumentar la fuerza impulsora en un intento de mejorar el transporte de fármacos a través de la piel intacta. Un buen sistema de liberación transdérmico no solo debe de proveer una adecuada liberación del fármaco a partir de la formulación, sino que también debe permitir que cantidades considerables de fármaco venzan la barrera de permeabilidad, asegurándose de no irritar la piel y de que el fármaco no se inactive sobre la superficie de la piel o durante el proceso de permeación (Honeywell-Nguyen y Bouwstra, 2005). Una de estas técnicas es el empleo de acarreadores coloidales, los cuales han recibido considerable interés en su aplicación en la liberación transdérmica de fármacos, ya que estos pueden cumplir requisitos importantes como: no toxicidad, suficiente capacidad de carga, posibilidad de liberar el fármaco de manera controlada, ya sea de manera temporal o espacial, y presentar buena estabilidad física y química. La principal característica que tienen en común estos sistemas es su tamaño submicrónico y pueden diferir en su composición, carga de fármaco y espectro de aplicación. Uno de estos sistemas acarreadores más estudiados son los liposomas. No obstante, existe la controversia sobre su efectividad y modo de acción.

Los liposomas fueron introducidos en 1965 por Bangham y colaboradores e inicialmente se usaron como modelos para estudiar la membrana celular.

Los liposomas son partículas vesiculares coloidales en las cuales una o más bicapas lipídicas encierran un volumen acuoso. Están constituidos por moléculas anfifílicas. Estas moléculas que generalmente son fosfolípidos se pueden agregar espontáneamente en estructuras vesiculares después de la adición de un exceso agua (> 45%), lo cual es resultado de su carácter anfifílico debido a la presencia de una región polar o hidrofílica (cabeza) y una región no polar o lipofílica (cola). Las cabezas hidrofílicas se orientan hacia la fase acuosa y las colas lipídicas se orientan unas con otras en la presencia de agua, como se muestra en la figura 9 (Chen, 2011), pudiendo formar vesículas con una (vesículas unilamelares) o más (vesículas multilamelares) bicapas concéntricas, por lo que estas vesículas contienen uno o más compartimientos lipofílicos dentro de las membranas y uno o más compartimientos hidrofílicos entre las membranas. Esto hace posible que puedan ser “entrapados” fármacos de naturaleza hidrofílica, lipofílica o anfifílica. Los fármacos hidrofílicos son atrapados en los compartimientos acuosos, mientras que los hidrofóbicos pueden ser atrapados en las bicapas lipídicas y los anfifílicos particionarse entre las bicapas lipídicas y la fase acuosa.

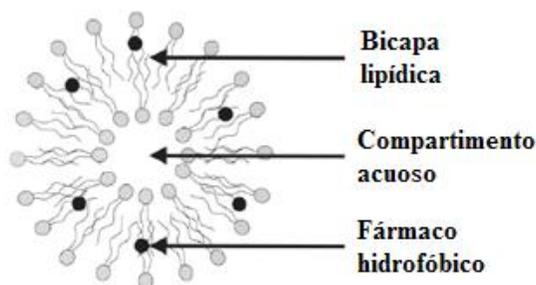


Figura 9. Estructura básica de las vesículas lipídicas

Los liposomas pueden ser clasificados de acuerdo al tamaño de la vesícula como se muestra en la tabla 2.

Tabla 2. Clasificación de los liposomas de acuerdo a su tamaño

| Liposoma | Tamaño (nm) | Abreviatura |
|---------------------------------|-------------|-------------------------------|
| Vesículas unilamelares pequeñas | 20 a 50 | SUV, por sus siglas en inglés |
| Vesículas unilamelares grandes | 50 – 500 | LUV, por sus siglas en inglés |
| Vesículas multilamelares | 500 – 10000 | MLV, por sus siglas en inglés |

Dependiendo del método de preparación se pueden obtener diferentes tipos de liposomas: vesículas multivesiculares (MVV; contienen varias vesículas embebidas en una bicapa lipídica), multilamelares (MLV; constituidas por varias bicapas concéntricas), vesículas unilamelares grandes (LUV) y vesículas unilamelares pequeñas (SUV) las cuales están constituidas solo por una bicapa lipídica (Neubert, 2011).

Las vesículas se pueden preparar a partir de una amplia variedad de lípidos y surfactantes, entre ellos, los más comunes son los fosfolípidos y surfactantes no iónicos. Aquellas vesículas preparadas con fosfolípidos se denominan liposomas y las preparadas con surfactantes no iónicos, niosomas (Honeywell-Nguyen y Bouwstra, 2005).

Dada su versatilidad estructural, su carácter biodegradable y su biocompatibilidad, se empezó a estudiar el uso potencial como sistemas de liberación de fármacos. La versatilidad de los liposomas se refleja en primer lugar, en el hecho de que son capaces de incorporar a su estructura moléculas hidrofílicas, hidrofóbicas y también de carácter anfifílico. Además, sus propiedades físicas como la carga superficial, el tamaño, la permeabilidad/rigidez de la pared o su capacidad de carga pueden ser fácilmente modulables. Por último, utilizando lípidos funcionalizados, se pueden unir anticuerpos u otros ligandos a la superficie de estas vesículas, que se convierten en sistemas de transporte con capacidad para acceder por ejemplo, específicamente a un determinado tejido (*site-*

specific targeting), de una forma bastante parecida a la que es de suponer había previsto Paul Ehrlich cuando introdujo el concepto de *bala mágica* (Strebhardt y Ullrich, 2008).

El carácter mimético de los liposomas con relación a la organización estructural de los lípidos del estrato córneo provee una estrategia para lograr la vehicularización en la absorción percutánea de fármacos. Pero fue hasta 1980 que Mezei y Gulasekhram reportaron el incremento de la deposición en la epidermis y dermis de acetónido de triamcinolona formulado en liposomas. En 1988 se aprobó el primer producto liposomal de aplicación tópica, el cual era una preparación de econazol para la terapia tópica de la dermatomicosis (Egbaria y Weiner, 1990; El Maghraby *et al.*, 2008).

Las propiedades fisicoquímicas de las vesículas como tamaño, carga, lamelaridad y elasticidad dependen de su composición, y a su vez estas características pueden determinar su comportamiento y efectividad como sistemas de liberación transdérmicos (Honeywell-Nguyen y Bouwstra, 2008).

Las vesículas se usan para la administración dérmica y transdérmica de fármacos porque estas pueden (Honeywell-Nguyen y Bouwstra, 2005):

- Actuar como acarreadores de fármacos para liberar el fármaco encapsulado en o a través de la piel.
- Actuar como promotores de permeación debido a la penetración de los componentes lipídicos de la vesícula y la alteración de los lípidos intercelulares en el estrato córneo.
- Servir como un depósito para la liberación sostenida de fármacos.
- Servir como una barrera limitante para la modulación de la absorción sistémica, proporcionando una liberación controlada del fármaco.

Los liposomas han sido ampliamente investigados como sistemas de liberación de fármacos tanto para ser utilizados para la vía tópica, como para la vía transdérmica, así como para otras vías de administración como la oral y parenteral, debido a las ventajas que ofrece su uso (Tabla 3).

Los estudios enfocados a la liberación transdérmica de fármacos incorporados en liposomas han arrojado resultados contradictorios. En muchos casos se demuestra que los liposomas tienen poco o nulo valor como acarreadores para la liberación transdérmica de fármacos, ya que estos no pueden penetrar a capas profundas de la piel y permanecen confinados en la capa superior del estrato córneo (Touitou *et al.*, 2000). Algunos otros estudios han reportado que los liposomas sólo promueven la deposición de fármaco en la piel, sugiriendo que estos son útiles únicamente como sistemas de liberación tópicos. Otros, sin embargo, han sugerido que la aplicación de fármacos en liposomas puede conducir a concentraciones terapéuticas de fármaco en la circulación sistémica y por lo tanto son adecuados para la administración transdérmica (El Maghraby *et al.*, 2006; 2008). Estos resultados inconsistentes pueden explicarse en parte al hecho de que los estudios se realizaron

con liposomas de diferente composición y por lo tanto con diferentes características fisicoquímicas. El reporte de resultados contradictorios sobre la utilidad de las liposomas ha seguido publicándose aumentando la controversia.

Tabla 3. Ventajas de los liposomas como sistemas de liberación de fármacos (Avinash *et al.*, 2011; Priyanka y Shipra, 2012).

| Ventajas |
|---|
| Biocompatibilidad |
| Ausencia de toxicidad |
| Biodegradabilidad |
| Capacidad de encapsular moléculas lipofílicas e hidrofílicas |
| Capacidad de aumentar el tiempo de residencia en la circulación sistémica de fármacos |
| Capacidad de dirigirse a órganos y tejidos |
| Capacidad de reducir la toxicidad del fármaco y aumentar su biodisponibilidad |

2.3.1 Liposomas elásticos como sistemas de liberación transdérmica

A partir del descubrimiento de los liposomas ha habido una intensa investigación sobre ellos, persiguiendo diferentes objetivos: mejorar algunos aspectos tecnológicos (métodos de preparación), mejorar sus características de estabilidad (incorporando colesterol), aumentar el tiempo en la circulación sistémica (stealth liposomes), dirigirlos a un órgano en específico (drug targeting) o bien para que puedan actuar como acarreadores transdérmicos de fármacos. Con respecto a este último punto se busca diseñar nuevos sistemas vesiculares que tengan las ventajas de los liposomas (alta biocompatibilidad y baja toxicidad), pero que además puedan promover la permeación transdérmica de fármacos. Así en 1992, Cevc y Blume introdujeron liposomas deformables a los que denominaron como Transfersomas® (IDEA AG, Munich, Alemania). Estos liposomas deformables contienen un activador de superficie (generalmente un surfactante) para modificar la elasticidad de la bicapa e incrementar la deformabilidad. Debido a su elasticidad y deformabilidad, parecen ser acarreadores útiles para la liberación transdérmica de algunos fármacos (Elsayed *et al.*, 2007).

El término transfersoma significa cuerpo acarreador (“carrying body”) y se deriva de la palabra latina “transferre” que significa “llevar a través de” y de la palabra griega “soma” que significa “cuerpo” (Priyanka, 2012). En este trabajo nos referiremos a los transfersomas como liposomas elásticos (LE) o deformables. En términos funcionales, los LE pueden ser descritos como gotas lipídicas cuya deformabilidad les permite pasar fácilmente a través de poros mucho más pequeños que su propio tamaño. Son agregados complejos altamente adaptables que responden al estrés adaptando su forma. Esta flexibilidad minimiza el riesgo de ruptura de la vesícula (Priyanka y Shipra, 2012).

Los LE son liposomas modificados los cuales están formados por compuestos naturales anfipáticos, suspendidos en una solución acuosa. Al igual que los liposomas, contienen una bicapa lipídica que rodea un núcleo acuoso. Debido a la incorporación de un agente activo de superficie en su membrana, los LE son altamente flexibles, propiedad que les facilita una rápida penetración a través de los espacios lipídicos intercelulares del estrato córneo (cuyo tamaño es apreciablemente menor al de las vesículas).

Un activador de superficie es a menudo un surfactante de una sola cadena que desestabiliza la bicapa lipídica de la vesícula e incrementa la deformabilidad de la bicapa por disminución de la tensión interfacial (Honeywell-Nguyen y Bouwstra, 2005). Entre estos activadores se encuentran Colato de sodio, deoxicolato de sodio, Span® 80, Tween® 80 y glicirrizinato de dipotasio (Cevc, 1996; El Maghraby *et al.*, 1999, 2000; Trotta *et al.*, 2004).

La efectividad de los LE como sistemas de liberación dérmica y transdérmica de fármacos ha sido exitosamente demostrada usando moléculas con diferentes características como tamaño molecular y lipofilia, tales como: lidocaína, tetracaína, ciclosporina, hidrocortisona, dexametasona, acetónido de triamcinolona, diclofenaco, ibuprofeno, tamoxifeno, testosterona, etc. (Cevc, 1997).

Diversos estudios han reportado que los liposomas deformables fueron capaces de mejorar la liberación *in vitro* a través de la piel de varios fármacos (El Maghraby *et al.*, 1999, 2001; Trotta *et al.*, 2002, 2004; Boinpally *et al.*, 2003) y de penetrar la piel intacta *in vivo*, transfiriendo cantidades terapéuticas de fármaco (Cevc y Blume, 2001, 2004), con eficacia comparable a la de una administración subcutánea (Cevc *et al.*, 1995, 1998; Paul *et al.*, 1995; Cevc, 2003).

2.3.2 Mecanismo de promoción de la permeación transdérmica por los LE

Se ha propuesto que hay varios mecanismos por los cuales los liposomas convencionales pueden aumentar la permeación transdérmica de fármacos: a) penetración de las vesículas intactas, actuando como acarreadores; b) actuando como promotores de permeación perturbando la organización de los lípidos del estrato córneo, incrementando así el transporte de fármacos a través de la piel y c) por adsorción/fusión de las vesículas con el SC (Fahr y Chen, 2010).

El mecanismo por el cual los LE aumentan la penetración transdérmica de fármacos está relacionado con su forma de aplicación. Las vesículas pueden ser aplicadas oclusivamente (cubiertas con un parche para evitar la evaporación del agua) o no oclusivamente (expuestas al aire, promoviendo la evaporación del agua).

Según los estudios realizados por Cevc *et al.*, (1998) los LE cumplen con todos los requerimientos para penetrar eficientemente las barreras de permeabilidad, incluyendo la piel intacta de mamíferos, con una eficacia cercana al 100% y una eficiencia de la liberación mayor al 50%; dichos autores

sugieren que esto depende de la diferencia de presión osmótica transdérmica. Además, el paso de los LE a través de la piel es función de su flexibilidad, hidrofilia y capacidad de conservar su integridad mientras experimentan cambios drásticos de forma. Dichas propiedades contribuyen también a evitar la agregación y fusión de las vesículas (Cevc *et al.*, 1998).

Los LE pueden actuar como sistemas acarreadores de fármacos, por lo que las vesículas intactas entran en el estrato córneo transportando moléculas de fármaco dentro de la piel. Este mecanismo fue propuesto por Cevc *et al.*, (1998) ellos proponen que la fuerza impulsora para que las vesículas penetren la piel es la xerofobia (tendencia a evitar alrededores secos). La principal diferencia entre los LE y los liposomas tradicionales es la elevada adaptabilidad dependiente del estrés de estas vesículas deformables, lo cual hace posible que éstas se estrujen entre las células del estrato córneo, a pesar del gran tamaño de las vesículas. Así pueden entrar de manera intacta y espontánea en la piel, bajo la influencia del gradiente de hidratación transcutáneo que se presenta de manera natural *in vivo*, sin desintegración de las vesículas (Figura 10). La oclusión podría eliminar este gradiente y por lo tanto tener un efecto perjudicial para la acción de las vesículas deformables (Cevc y Blume, 1992; Honeywell-Nguyen y Bouwstra, 2005). Los liposomas elásticos pueden penetrar incluso si los poros son cinco veces más pequeños que su propio diámetro (Cevc *et al.*, 2002; Hofer *et al.*, 2004).

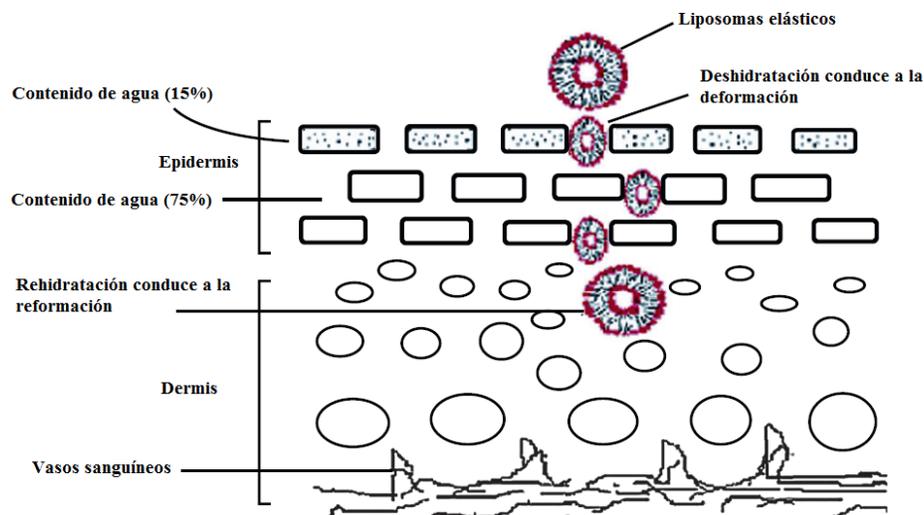


Figura 10. Mecanismo de penetración de los liposomas elásticos a través de la piel (Modificada de: Kumar *et al.*, 2012)

Este mecanismo de penetración de la piel por los liposomas deformables puede explicarse de la siguiente forma:

Cuando se coloca una suspensión de liposomas deformables en la superficie de la piel, el agua se evapora y las vesículas comienzan a secarse. Los fosfolípidos son xerofóbicos, es decir, evitan los

alrededores secos. Por lo tanto, las vesículas se mueven a lo largo de la zona donde existe el gradiente osmótico, siendo atraídas hacia áreas con mayor contenido de agua en los espacios estrechos entre células adyacentes. Este fenómeno, junto con la gran capacidad de las vesículas para deformarse, origina una fuerza provocada por las vesículas que obliga al ensanchamiento de las uniones intercelulares en la piel y crea canales transcutáneos de 20 a 30 nm de amplitud. Estos nuevos canales intercelulares permiten el paso a las entidades lo suficientemente deformables para adaptarse a ellos. A lo largo de dichos canales en el estrato córneo, los liposomas deformables alcanzan regiones con alto contenido de agua en las capas profundas de la piel. Posteriormente, las vesículas se distribuyen entre las células. Debido a que son muy grandes para penetrar los vasos sanguíneos cutáneos, los liposomas deformables se desvían de ellos y llegan al tejido subcutáneo. Por último, las vesículas llegan a circulación sistémica vía el sistema linfático fenestrado, que tiene aperturas con amplitud suficiente (Cevc *et al.*, 1995). Para que las vesículas permanezcan hinchadas, deben seguir el gradiente de hidratación local y penetrar dentro de las capas profundas de la piel, más hidratadas (epidermis y dermis) (Dhamecha *et al.*, 2009).

La alta deformabilidad de las vesículas permite que aún los agregados más grandes mantengan su tamaño después de atravesar los poros. Cevc y colaboradores encontraron que la composición química de las vesículas elásticas no cambia significativamente durante su pasaje a través de los poros estrechos (Cevc *et al.*, 2002). Con base a la información obtenida hasta la fecha, se piensa que las vesículas elásticas conservan su estabilidad física, siendo transportadas a través de la piel en forma de entidades dinámicas intactas, pudiendo atravesar el estrato córneo independientemente de la concentración del fármaco (Cevc *et al.*, 2008).

Se considera que el componente elastomecánico juega un papel importante en el movimiento de los liposomas elásticos a través de poros pequeños. Cuando un LE alcanza un poro, este es capaz de cambiar la composición de su membrana de manera reversible como resultado de la auto-optimización de su deformabilidad (Figura 11), para poder pasar a través de los poros, los componentes de los liposomas elásticos responsables de su deformabilidad comienzan a acumularse en los sitios de estrés, mientras que los componentes menos flexibles sufren una dilución, lo cual reduce significativamente la deformación de la membrana y permite que las vesículas altamente flexibles pasen a través de los poros.

El paso de los liposomas elásticos a través de la piel y las barreras epiteliales es influenciado por la flexibilidad de su membrana, lo cual se puede lograr empleando proporciones adecuadas de activadores de superficie. La flexibilidad de la membrana de estos liposomas también reduce la posibilidad de que se rompan en la piel (Kumar *et al.*, 2012).

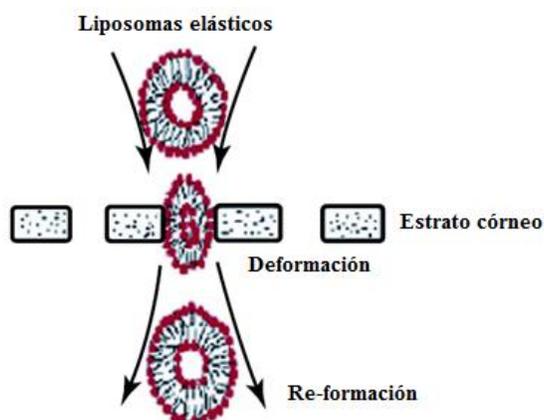


Figura 11. Mecanismo elastomecánico de penetración de los liposomas elásticos a través de la piel (Modificada de: Kumar *et al.*, 2012)

Se ha propuesto otro mecanismo, y es que las vesículas pueden actuar como promotores de permeación, las vesículas al entrar en el estrato córneo, modifican las lamelas de los lípidos intercelulares, lo cual podría facilitar la permeación de moléculas de fármaco libres (Dhamecha *et al.*, 2009).

2.3.3. Método de preparación de LE

Los liposomas elásticos están compuestos básicamente de una mezcla de fosfolípidos y un tensioactivo en una proporción óptima para dar elasticidad a la membrana y se han investigado diferentes proporciones de fosfolípidos y tensioactivo, y la mejor proporción es 85:15 respectivamente. Se ha reportado que la eficiencia de entrapamiento disminuye cuando se incrementa la proporción de tensioactivo por arriba del 15% con respecto al fosfolípido y que por el contrario la elasticidad de las vesículas disminuye cuando la proporción del tensioactivo disminuye (El Maghraby *et al.*, 2000; Jain *et al.*, 2003; Mishra *et al.*, 2006). La disminución de la eficiencia de encapsulamiento a mayores concentraciones de tensioactivo se debe a la conversión de vesículas lipídicas a micelas mixtas. Al mismo tiempo los activadores de superficie causan fluidización de la bicapa que es responsable del incremento de la elasticidad de la membrana de las vesículas. Estas micelas son mucho más pequeñas que las vesículas lipídicas (10 nm) y se ha reportado que son menos deformables y tienen menor habilidad para penetrar la piel en comparación con los liposomas elásticos (Ahad *et al.*, 2012).

Por esta razón la proporción de fosfolípido: tensioactivo se mantuvo constante (85:15). En el presente trabajo se utilizó como fosfolípido la fosfatidilcolina de soya no hidrogenada y como activador de superficie el Monooleato de sorbitan polietoxilado (20) (Tween® 80).

Cuando se habla de fosfolípidos de origen natural no se hace referencia a una sola sustancia. Por ejemplo, el término fosfatidilcolina incluye varias moléculas que tienen en común el grupo fosfato unido a colina. La composición de los ácidos grasos en la fosfatidilcolina es variable y depende de la fuente del fosfolípido. Mientras que sólo un 20% de los ácidos grasos presentes en la fosfatidilcolina de soya (SPC, por sus siglas en inglés) son saturados, en la fosfatidilcolina proveniente del huevo (EPC, por sus siglas en inglés) los ácidos grasos saturados llega hasta un 50%. En la tabla 4 se muestra la proporción de ácidos grasos que contiene la SPC y la EPC. La abreviatura empleada es la convencional para ácidos grasos, el primer número indica el número de carbonos y el segundo el número de insaturaciones.

Según la temperatura, las membranas de fosfolípidos pueden existir en diferentes fases, cuando la temperatura aumenta, la bicapa pasa de un estado altamente ordenado o gel sólido, a un estado desorganizado o cristal líquido, estado en el cual las moléculas de fosfolípidos pueden moverse con mayor libertad. A la temperatura a la que ocurre este fenómeno se le llama temperatura de transición de fases o T_m . El valor de T_m depende de la longitud de la cadena hidrocarbonada, del grado de insaturación y de la naturaleza de la cabeza polar.

Las membranas obtenidas con fosfatidilcolina de soya, presentan transiciones entre -15°C y 7°C dependiendo de la composición lipídica por lo que están en estado cristal líquido a temperatura ambiente. Por el contrario las membranas obtenidas a partir de fosfatidilcolina hidrogenada poseen transiciones por encima de los 40°C , por lo que a temperatura ambiente se encuentran en un estado de gel sólido. Se ha reportado que las vesículas elásticas preparadas con fosfolípidos en estado cristal líquido a temperatura ambiente son más eficientes en el transporte de fármacos a través de la piel (van den Bergh *et al.*, 1999).

Tabla 4. Contenido de ácidos grasos de la fosfatidilcolina de soya (SPC) y de huevo (EPC) (New, 1990).

| Ácido graso | No. de carbonos:No. de insaturaciones | Abundancia relativa (% p/p) | |
|--------------------------------------|---------------------------------------|-----------------------------|------|
| | | SPC | EPC |
| Ácido palmítico | 16:0 | 17.2 | 35.3 |
| Ácido esteárico | 18:0 | 3.8 | 13.5 |
| Ácido oleico | 18:1 | 22.6 | 26.8 |
| Ácido linoléico | 18:2 | 47.8 | 5.7 |
| Ácido α ó γ -linoléico | 18:3 | 8.6 | 0.2 |
| Ácido araquidónico | 20:4 | - | 1.3 |
| Ácido all cis-eicosapentaenoico | 20:5 | - | 3.6 |
| Ácido all cis-docosapentaenoico | 22:5 | - | 1.3 |
| Ácido all cis-docosahexaenoico | 22:6 | - | 12.6 |

El Tween® 80 es un tensioactivo no iónico, los tensioactivos no iónicos son muy usados como adyuvantes en la industria farmacéutica por su baja toxicidad y sus múltiples funciones (Huang *et al.*, 2006). El Tween® 80 ha mostrado ser tan efectivo como el colato de sodio como activador de superficie en la obtención de vesículas elásticas de fosfatidilcolina (El Maghraby *et al.*, 2000).

Los liposomas elásticos se pueden obtener a partir de los métodos descritos para la preparación de liposomas convencionales. El método más utilizado hasta el momento es el de hidratación de película propuesto por Cevc y Blume (1992).

Como ya se mencionó, los liposomas se forman espontáneamente cuando los fosfolípidos se dispersan en un medio acuoso, como una forma de minimizar las interacciones de las cadenas hidrocarbonadas con el agua. El desafío de preparar liposomas radica en conseguir vesículas de un tamaño y estructura determinada, que incorporen fármacos que se mantengan encapsulados hasta llegar al sitio deseado.

El método más sencillo y utilizado para la preparación de liposomas es el de hidratación de película, el cual consiste en disolver los fosfolípidos en un disolvente adecuado, generalmente se utiliza cloroformo o mezclas de cloroformo: metanol, y posteriormente evaporar el disolvente para obtener una película lipídica delgada y homogénea sobre un soporte sólido. A continuación se adiciona una solución acuosa con acción mecánica para hidratar la película y formar los liposomas. De esta manera se obtiene una mezcla de vesículas multilamelares (MLVs) con una distribución de tamaño heterogénea. El tamaño y el número de lamelas se pueden modificar mediante sonicación y extrusión. La sonicación consiste en impartir energía ultrasónica a la suspensión vesicular para reducir el tamaño de las vesículas. La extrusión de MLVs consiste en forzar el pasaje de la suspensión de MLVs a través de membranas de policarbonato de poros definidos, de esta manera los MLV pierden su estructura para dar lugar a liposomas unilamerales, siendo posible obtener liposomas con diámetros medios entre 800 y 50 nm según el diámetro de poro empleado. El número de veces que se repita esta operación, y el tiempo que se someta a ultrasonido la suspensión liposomal determinará la lamelaridad y la dispersión del tamaño de la suspensión final.

El fármaco a encapsular puede ser incorporado durante la formación de la película lipídica o bien en el medio acuoso usado para hidratar la película dependiendo de las propiedades fisicoquímicas del mismo.

Como se muestra en la tabla 5, se han reportado diferentes condiciones para la preparación de los liposomas elásticos por el método de hidratación de película, incluyendo varios tiempos de sonicación (desde aquellos autores que no someten a ultrasonido hasta los que someten las dispersiones hasta sesenta minutos de ultrasonido, la mayoría no reporta la intensidad del

ultrasonido empleada) y número de extrusiones (algunos han reportado más de treinta extrusiones) a través de membranas con diferentes tamaños de poro.

Tabla 5. Condiciones de preparación de los liposomas elásticos por diferentes autores

| Fármaco | Tiempo de ultrasonido (min.)/potencia(W) | No de extrusiones | Tamaño de poro del filtro | Referencia |
|---------------------------------------|--|---------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|
| Oestradiol | 30 | 10 | Sándwich 0.2/0.1 μm | El Maghraby <i>et al</i> , 2000 |
| -- | 30 | Filtraciones secuenciales | 0.4, 0.2, 0.1, 0.08 μm | Cevc <i>et al</i> 2002 |
| Estradiol | 30 | 10 | Sándwich 0.2/0.1 μm | Essa <i>et al</i> , 2002 |
| Dexametasona | 20 (40W) | N/M | Sándwich 0.45/0.2 μm | Jain <i>et al</i> , 2003 |
| Estradiol | 30 | 10 | Sándwich 0.2/0.1 μm | Essa <i>et al</i> , 2004 |
| DNA | 60 | 30 | 0.1 μm | Kim <i>et al</i> , 2004 |
| Metotrexato | 8 (32W) | -- | -- | Trotta <i>et al</i> , 2004 |
| DNA | 60 | 30 | 0.1 μm | Lee <i>et al</i> , 2005 |
| Melatonina | -- | 10 | Sándwich 0.2/0.1 μm | Dubey <i>et al</i> , 2006 |
| Antígeno de superficie de Hepatitis B | -- | N/M* | Sándwich 0.45/0.22 μm | Mishra <i>et al</i> , 2006 |
| Clorhidrato de Propranolol | 20 (40W) | N/M | Sándwich 0.2/0.1 μm | Mishra <i>et al</i> , 2007 |
| Rizatriptan | 20 (40 W) | N/M | Sándwich 0.2/0.1 μm | Garg <i>et al.</i> , 2008 |
| Salmon calcitonina | 5 | Filtraciones secuenciales | 0.8, 0.45 y 0.2 μm | Chen <i>et al.</i> , 2009 |
| Betametasona | -- | N/M | 0.4/0.2 μm | Gillet <i>et al.</i> , 2009 |
| Sucrosa | 45 (80W) | 15 | Sándwich 0.2/0.1 μm | Montanari <i>et al.</i> , 2009 |
| Diclofenaco sódico | 30 | N/M | Sándwich 0.45/0.22 μm | El Zaafarany <i>et al.</i> , 2010 |

*N/M: no mencionado; -- Parámetro no utilizado

2.3 Iontoforesis como promotor de absorción de fármacos

Aprovechando que la piel es un tejido robusto con un alto grado de recuperación. Uno de los promotores físicos más estudiados para aumentar el transporte de fármacos a través de ella es el empleo de una corriente eléctrica como fuerza impulsora para la penetración de fármacos ionizados, este método es conocido como iontoforesis.

La idea de aplicar una corriente eléctrica sobre la superficie de los tejidos para incrementar la penetración de los fármacos ionizados no es nueva, fue propuesta en 1747 por Veratti, aunque esta no se puso en práctica hasta el siglo XX (1907) por Leduc (Phipps *et al.*, 2002), y últimamente ha cobrado gran interés debido a los avances en el campo de la electrónica.

La iontoforesis es un proceso que promueve la penetración de sustancias ionizadas dentro o a través de un tejido por la aplicación de un potencial eléctrico apropiado. Estudios *in vitro* e *in vivo* han demostrado la factibilidad de este método para promover la penetración de fármacos y la absorción dentro de la circulación sistémica (Bhatia y Singh, 1998; Green *et al.*, 1996; Kari, 1986; Sage y Riviere, 1992). Esta técnica es capaz de aumentar el rango de compuestos que pueden ser administrados transdérmicamente. Las ventajas que ofrece la iontoforesis son las siguientes (Wang *et al.*, 2005):

1. Liberación de moléculas ionizadas y no ionizadas.
2. Liberación continua o pulsátil de fármacos.
3. Posibilidad de terminar fácilmente la liberación del fármaco.
4. Ofrece un mejor control sobre la cantidad de fármaco liberado, ya que esta cantidad depende de la corriente aplicada, de la duración de la amplitud de corriente y área de exposición de la piel.
5. Restauración de las propiedades de barrera de la piel sin producir irritación severa.
6. Mejora la liberación de moléculas polares, así como de compuestos de alto peso molecular.
7. Se puede utilizar tanto para liberación local o sistémica.
8. Reducción considerable de la variación inter e intra individual, ya que el grado de liberación es más dependiente de la corriente aplicada que de las características del estrato córneo.

2.4.1 Electroquímica de la iontoforesis

La corriente eléctrica es aplicada a través de dos electrodos colocados en la piel del paciente. El primer electrodo o electrodo donador libera el agente terapéutico ionizado, mientras que el segundo electrodo o electrodo receptor sirve para cerrar el circuito. Cuando el electrodo donador es el cátodo y el electrodo receptor es el ánodo se denomina iontoforesis catódica y se utiliza para fármacos

cargados positivamente (ej., aminos o péptidos), el arreglo inverso se denomina iontoforesis anódica y es empleada para moléculas cargadas negativamente (ej., ácidos orgánicos). El sistema más utilizado en ambos tipos de iontoforesis es el formado por el electrodo de plata (ánodo) y el electrodo de cloruro de plata (cátodo) debido a que no afectan la solución del fármaco (ej., no modifican el pH de la solución).

Un sistema iontoforético consta de los siguientes elementos: Un dispositivo generador de la corriente eléctrica, dos electrodos (ánodo y cátodo) y las cámaras anódicas y catódicas. El electrodo y cámara activa son aquellos en los que se produce el paso de los fármacos, el electrodo activo está en contacto con la cámara activa en la que se encuentra el fármaco, el electrodo no activo está en contacto con un vehículo auxiliar que contiene los iones necesarios para el paso de la corriente y las reacciones electroquímicas de los electrodos (figura 12).

Una vez que la corriente se aplica, el campo eléctrico impone la direccionalidad sobre el movimiento de los iones presentes: los iones positivos en el ánodo se mueven hacia el cátodo mientras que los aniones se mueven en la dirección opuesta.

La electroquímica ocurrida en el ánodo (Ag) requiere iones cloruro (Cl^-) en el compartimiento anódico, lo cual conduce usualmente a la disminución en la eficiencia de la liberación del fármaco ya que el NaCl comúnmente usado para proveer los iones Cl^- también genera concentraciones significativas de iones Na^+ los cuales compiten con el fármaco. Cuando los iones Cl^- llegan a la solución cercana al otro electrodo reaccionan con la plata metálica para formar cloruro de plata y debido a su bajo producto de solubilidad se deposita en la superficie del electrodo, liberando simultáneamente un electrón. Para mantener la electroneutralidad en el compartimiento anódico, cualquier catión debe moverse fuera de este y hacia la piel o un anión debe dejar la piel y moverse hacia el ánodo. En el compartimiento catódico, el AgCl es reducido por la llegada de los electrones provenientes de la fuente de poder y se genera plata metálica junto con iones Cl^- , los cuales pasan a la solución, para mantener la electroneutralidad, la carga negativa debe ser compensada por la llegada al cátodo de un catión proveniente de la piel o por la pérdida de aniones. Como el circuito eléctrico es completado por los iones inorgánicos endógenos que están presentes en la piel, principalmente los iones Na^+ y Cl^- , estos pueden afectar la eficiencia del transporte de fármacos (Kalia *et al.*, 2004).

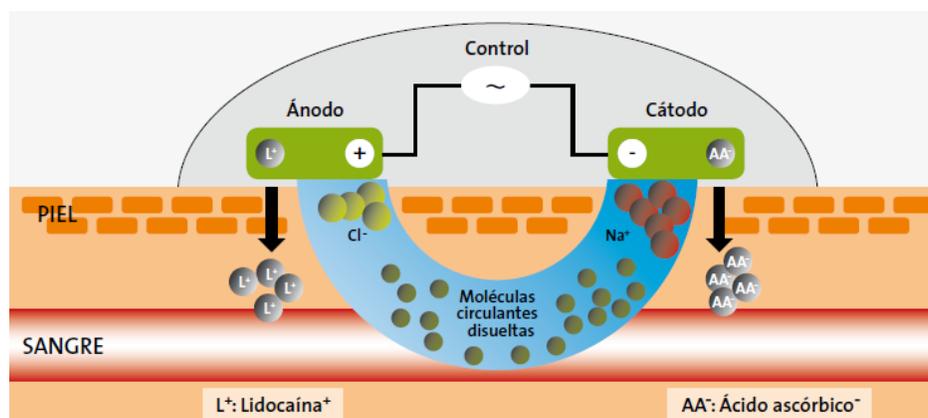


Figura 12. Esquema de un sistema iontoforético

2.4.2 Mecanismos de transporte iontoforéticos

El flujo iontoforético observado en el estado estable para una especie cargada X , puede ser considerado como la suma de dos mecanismos separados de transporte: electromigración (J_X^{EM}) y electroósmosis (J_X^{EO}), asumiendo que la permeación pasiva es despreciable.

$$J_X^T = J_X^{EM} + J_X^{EO}$$

2.4.2.1 Electromigración

Los compuestos iónicos en solución se disocian, asumiendo una carga positiva o negativa dependiendo de si el átomo pierde o gana un electrón. Mientras están cargados, cada ion puede ser influenciado por un campo eléctrico, los iones cargados en forma positiva (cationes) serán atraídos hacia el polo negativo (cátodo) y repelidos del polo positivo (ánodo). Iones cargados en forma negativa (aniones) serán atraídos al ánodo y repelidos del cátodo. La repulsión electrostática de cargas similares es la fuerza impulsora para la iontoforesis. La identificación de la polaridad del fármaco impone la polaridad del electrodo usado para llevar al ion a los tejidos subyacentes. Los fármacos positivos son colocados bajo el ánodo y los fármacos negativos son colocados bajo el cátodo.

Bajo la influencia del campo eléctrico los iones positivos serán repelidos por el electrodo positivo y atraídos hacia el negativo, análogamente los iones negativos serán repelidos por el electrodo negativo y atraídos por el electrodo positivo. Las mismas atracciones y repulsiones serán experimentadas por los fármacos si estos tienen carácter iónico. A consecuencia de esta electrorepulsión, las sustancias iónicas serán transportadas a través de la membrana.

La electromigración se refiere al movimiento ordenado de los iones en la presencia de un campo eléctrico aplicado. El flujo electromigratorio de un ion X está relacionado con el componente flujo de corriente i_x debido a su transporte por la constante de Faraday, F.

$$J_X^{EM} = \frac{1}{z_x A F} * i_x$$

donde, A representa el área de la sección transversal para el transporte a través de la piel y z_x es la carga. El flujo de corriente iónica debido a el movimiento de X puede ser relacionado a la corriente aplicada, I, por una constante de proporcionalidad, t_x , el número de transporte de X ($0 < t_x < 1$) describe la fracción de corriente transferida por X.

$$J_X^{EM} = \frac{1}{z_x A F} * t_x I$$

El número de transporte de X depende de las propiedades fisicoquímicas de X y de cómo se comparan las propiedades correspondientes de otros iones presentes en el sistema:

$$J_X^{EM} = \left(\frac{1}{z_x F} \right) \frac{z_x u_x c_x}{\sum_{n=0}^i z_i u_i c_i} * I_D$$

donde I_D es la densidad de corriente aplicada ($=I/A$), y z_x , u_x y c_x se refieren a la carga, movilidad y concentración del fármaco en la membrana respectivamente; el denominador es la suma de los productos de estos parámetros para cada ion que contribuye a la transferencia de carga a través de la membrana. Esta última ecuación explica porque la presencia de iones competitivos puede reducir el flujo de fármaco y por lo tanto reducir la eficiencia de la liberación.

2.4.2.2 Electroósmosis

Si la membrana posee una carga eléctrica neta y en consecuencia una mayor permeabilidad a cationes (si está cargada negativamente) o a aniones (si está cargada positivamente), se produce un flujo convectivo de solvente (electroósmosis). Este flujo de solvente tiene lugar en la dirección ánodo-cátodo o en la dirección cátodo-ánodo según la membrana sea más permeable a cationes o a aniones. Este flujo convectivo de solvente transporta sustancias neutras a través de la membrana y además aumenta o contrarresta el transporte por electrorepulsión de los compuestos iónicos.

Para explicarlo se ha utilizado la aplicación de la diferencia de presión y la diferencia de potencial a través de la membrana para la generación corriente y un flujo de volumen.

La electroósmosis puede ser explicada como el flujo de volumen inducido por el flujo de corriente, es decir el movimiento de carga a través de la membrana. A nivel molecular, la electroósmosis

puede ser vista como el resultado del hecho de que la piel tiene un punto isoeléctrico entre 4 y 4.5, arriba del cual los grupos carboxilatos presentes en la membrana están ionizados. La aplicación de un campo eléctrico a través de la membrana cargada favorece el movimiento de contra iones que tratan de neutralizar la membrana. La electroósmosis puede ser definida como un proceso de flujo que es flujo de volumen por unidad de área y tiempo (ej., $\mu\text{l cm}^{-2} \text{h}^{-1}$) o como una velocidad de solvente, v , que es equivalente al coeficiente de permeabilidad (ej., cm h^{-1}). La existencia de este flujo de solvente en dirección del ánodo al cátodo significa que: a) las moléculas neutras pueden ser liberadas por iontoforesis anódica y b) los cationes se verán beneficiados por una segunda fuerza impulsora en adición a la electromigración.

2.4.2.3 Cambios en la permeabilidad de la membrana

Además de la electromigración y electroósmosis la aplicación de una corriente eléctrica sobre la piel puede afectar la barrera de permeabilidad de la misma, pudiendo contribuir al transporte de la sustancia activa. Este aumento corresponde a un aumento del transporte del fármaco por difusión pasiva a través de la membrana. La permeabilidad de la piel puede alterarse temporalmente durante la iontoforesis por: 1) expansión de los canales existentes en la piel o creación de poros nuevos; 2) fluidización de la matriz lipídica en el espacio intercelular; o 3) El re-arreglo de proteínas en el EC (Fang *et al.*, 2000).

Por tanto, por efecto combinado de los tres mecanismos citados se podrán transportar a través de la piel por iontoforesis sustancias activas iónicas y no iónicas.

2.4.3 Factores que afectan a la iontoforesis

A pesar de las ventajas que representa el uso de la iontoforesis para la administración transdérmica y que ya han sido mencionadas, la iontoforesis es afectada por los siguientes factores (Patel *et al.*, 2010):

a) Concentración del fármaco

Se ha reportado que se incrementa la penetración del fármaco durante la iontoforesis cuando se incrementa la concentración del mismo. Esto es generalmente cierto hasta que se alcanza una meseta en la que al aumentar la concentración de fármaco en la piel no hay un incremento en el flujo.

b) Forma de la sal del fármaco

Se ha reportado que diferentes formas de sales presentan conductividades específicas. Por lo que el tipo de sal debe ser considerado.

c) pH del microambiente

De acuerdo con la ecuación de Henderson-Hasselbalch, el pH de la solución determinará el grado de ionización del fármaco, para un óptimo proceso de iontoforesis, se desea que una gran cantidad de fármaco esté ionizado. Sin embargo, el pH debe ser tal que sea tolerable y seguro para el paciente.

d) Intensidad de corriente y duración de la corriente

A partir de la ley de Faraday, se sabe que la cantidad de fármaco transportada iontoforéticamente depende de la intensidad de la corriente y de la duración de la misma. Así, esta ley sugiere que se transporta el mismo número de iones a diferentes intensidades de corriente, si el tiempo se relaciona inversamente con la intensidad. Sin embargo, en algunos casos, densidades altas por corto tiempo liberan más fármaco que densidades bajas con tiempos prolongados, debido posiblemente a cambios en la permeabilidad de la piel por el empleo de intensidades de corriente elevadas, resultando por lo tanto en un mayor flujo.

e) Competencia por iones presentes en los electrodos

La corriente eléctrica es llevada por iones positivos y negativos en la solución. No hay mayor diferencia entre iones de la misma carga, aunque sean de compuestos diferentes. Se sabe que la presencia de excipientes en las formas de dosificación (conservadores, soluciones amortiguadoras) altera la cantidad de fármaco liberado.

f) Estabilidad del fármaco durante el proceso iontoforético

El fármaco debe ser estable bajo la influencia de un campo eléctrico. La oxidación o reducción del fármaco no solo decrece la cantidad total de fármaco disponible, sino que los productos de degradación podrían tener la misma carga que el fármaco ionizado y podría competir con él, reduciendo la cantidad de fármaco transportada, además de que los productos de degradación pudieran ser tóxicos.

g) Tipo de matriz que contiene al fármaco

La migración del fármaco bajo la influencia de una corriente eléctrica pudiera ser afectada por la matriz o formulación en la que se encuentra. Lo cual puede estar relacionado con diferencias en viscosidades, porosidades, grado de liberación a partir de la forma de dosificación etc.

h) Densidad de corriente

La densidad de corriente es la cantidad de corriente liberada por unidad de área. Se deben de considerar los siguientes aspectos: 1) La corriente debe ser lo suficientemente alta para promover la permeación del fármaco; 2) No debe de producir daño a la piel; 3) Debe haber

una relación cuantitativa entre el flujo y la corriente aplicada; y 4) Debe haber estabilidad electroquímica del fármaco.

i) Factores anatómicos del paciente

Entre los factores anatómicos por parte del paciente que influyen en la profundidad de penetración del fármaco figuran los siguientes: espesor de la piel en el sitio de aplicación, presencia de tejido subcutáneo adiposo, presencia de inflamación (puede influir debido al incremento de la temperatura) y el nivel elevado de flujo sanguíneo presente.

Actualmente se está evaluando el uso conjunto de algún acarreador (liposomas, nanopartículas, etc.) con uno o más promotores de absorción, con la finalidad de mejorar el transporte a través de la piel de diversas moléculas y tener un efecto sinérgico para lograr que el fármaco llegue a circulación sistémica.

El efecto aditivo del uso de dos o más promotores, o de un acarreador y un promotor de absorción, no puede ser asumido, ya que se ha observado que en algunos casos no ocurre; por ejemplo: la combinación de electroporación y liposomas disminuye la liberación transdérmica del fármaco comparado con la electroporación y una solución de fármaco no liposomal. La reducción de la permeación del fármaco puede no obstante ser debido a la reparación de la piel electroporada por los fosfolípidos de los liposomas (Essa, 2003).

Con respecto al uso conjunto de iontoforesis y liposomas se han encontrado resultados contradictorios, algunos autores han reportado que esta combinación reduce la permeación del fármaco (Vutla, 1995; Fang 1999), otros sin embargo, mencionan que esta combinación incrementa la permeación (Kulkarni *et al.*, 1996; Badkar *et al.*, 1999; Fang *et al.*, 1999; Li *et al.*, 2001; Essa *et al.*, 2002, 2004) y otros no han observado una diferencia significativa (Vutla *et al.*, 1995).

La variedad de efectos de la combinación de liposomas/iontoforesis se ha relacionado con diferentes mecanismos los cuales pueden operar simultáneamente. El incremento de la permeación de fármacos puede ser atribuida a: i) la fusión de los fosfolípidos liposomales con el estrato córneo, lo cual incrementa la permeabilidad (Fang *et al.*, 1999; Essa *et al.*, 2002); ii) disminución de la resistencia por parte de las vesículas elásticas (Li *et al.*, 2001); iii) incremento de la deformabilidad de los liposomas elásticos por la electricidad, conduciendo a una mayor penetración a través de la piel (Essa *et al.*, 2002).

Entre los mecanismos de retardo que ocasiona el uso conjunto de los liposomas y la iontoforesis se encuentran el incremento de la estabilidad de los liposomas por el campo eléctrico conduciendo a la reducción de la liberación y permeación (Fang *et al.*, 1999) y la protección del fármaco entrampado

del metabolismo en la piel, lo cual conduce a una permeación más lenta de moléculas grandes intactas (Vutla et al., 1995).

III. JUSTIFICACIÓN E HIPÓTESIS

Los fármacos antiinflamatorios no esteroideos son usados para el tratamiento del dolor músculo esquelético, no obstante, la principal desventaja de la administración oral de estos fármacos son los severos efectos adversos gástricos que presentan, entre ellos sangrado gástrico, perforación y ulceración péptica (Cordero *et al.*, 2001); además, algunos de estos fármacos tienen tiempos de vida media relativamente cortos (4 – 6 horas), por lo que se requieren dosis frecuentes para aliviar el dolor.

Uno de estos fármacos es el KT, el cual es un potente analgésico y antiinflamatorio. Su biodisponibilidad oral reportada es del 90%, con un tiempo de vida media de 4 a 6 horas, por lo que se requiere una administración frecuente para mantener niveles terapéuticos. El uso prolongado de KT puede resultar en ulceración gastrointestinal y falla renal aguda. Debido a esto, en el 2007 la FDA publicó una alerta en el que se restringía el uso de ketorolaco a hospitales, por lo que se hace necesaria una alternativa para la administración de este fármaco. Para evitar un sistema de liberación invasivo (inyección intramuscular) y eliminar los regímenes de dosificación frecuentes, es necesario un modo no invasivo de liberación.

La liberación transdérmica parece ser una ruta atractiva de administración no invasiva que permitiría mantener los niveles sanguíneos de fármaco por largos periodos de tiempo. Existen diversos reportes para la administración transdérmica de fármacos antiinflamatorios no esteroideos, usando promotores de absorción químicos, seleccionando los vehículos apropiados etc., pero con problemas en modular el grado de liberación y el tiempo de retardo. La mayoría de los fármacos antiinflamatorios no esteroideos son ácidos débiles, por lo que se encuentran ionizados a pH fisiológico, por lo que el empleo de la iontoforesis podría ayudar a promover su permeación a través de la piel.

Se ha reportado el empleo de promotores de absorción ya sea de carácter químico o físico para mejorar la penetración de fármacos a través de la piel.

Una de estas herramientas es el uso de nanoacarreadores. En particular, los liposomas elásticos son acarreadores potenciales para la administración transdérmica de fármacos. El paso de los liposomas elásticos a través de la piel es función de su flexibilidad, hidrofilia y capacidad para conservar su integridad, mientras experimentan cambios drásticos de forma. Otra posible herramienta es el empleo de la iontoforesis, la cual permite mejorar la absorción de fármacos iónicos. Actualmente se está evaluando la posibilidad de utilizar de manera conjunta algún acarreador y un promotor físico con la finalidad de que actúen de manera sinérgica.

Existen muchos reportes sobre el uso separado de iontoforesis y liposomas, sin embargo, se han publicado pocos estudios sobre la liberación iontoforética de fármacos formulados en liposomas. El

uso combinado de iontoforesis y liposomas aumenta la permeación de colchicina de dos a tres veces (Kulkarni et al., 1996). También existen pocos reportes sobre el efecto del uso combinado de iontoforesis y liposomas elásticos en la liberación transdérmica de fármacos (Essa et al., 2002), sin que existan hasta el momento reportes sobre la integridad y estabilidad de los liposomas elásticos al aplicarles una corriente eléctrica.

HIPÓTESIS

Si los LE penetran libremente a través de la piel, entonces éstos favorecerán la permeación transdérmica del KT encapsulado. Además, si la iontoforesis favorece el paso de sustancias cargadas a través de la piel, entonces es posible que el uso de este promotor físico aumente la permeación del KT y de LE cargados negativamente.

IV. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL

Estudiar la liberación transdérmica pasiva e iontoforética de ketorolaco trometamina formulado en liposomas elásticos.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Optimizar el método de hidratación de película para la preparación de los liposomas elásticos, modificando el tiempo de sonicación y número de extrusiones a través de membranas de policarbonato.
- Preparar los liposomas elásticos que incluyan el principio activo por el método de hidratación de película optimizado.
- Caracterizar los liposomas elásticos obtenidos en función de: tamaño, potencial zeta, morfología, eficiencia de encapsulamiento, elasticidad y estabilidad física.
- Evaluar la liberación *in vitro* del fármaco a partir de los liposomas elásticos, por los métodos de diálisis y de difusión a través de una membrana artificial en celdas verticales tipo Franz.
- Llevar a cabo la permeación pasiva a través de la piel *in vitro*, comparando los liposomas elásticos con respecto a una solución de fármaco.
- Realizar estudios de penetración *in vivo*, en voluntarios sanos, para comparar la liberación iontoforética y pasiva del fármaco a través de la piel.
- Verificar la integridad de los liposomas elásticos, al someterlos a la corriente eléctrica utilizada en los estudios de permeación *in vivo*.
- Determinar cómo se altera la barrera de permeabilidad de la piel al aplicar la corriente eléctrica utilizada en los estudios de permeación *in vivo*, por medio de la medida de la pérdida de agua transepidermal.
- Desarrollar los métodos analíticos para la cuantificación del ketorolaco trometamina, en los diferentes experimentos realizados.

V. PARTE EXPERIMENTAL

5.1 Reactivos

Ketorolaco trometamina (donado por Globe Chemicals S.A de C.V, México).

Fosfatidilcolina de frijol de soya (Epikuron® 200), pureza = 95.9% (Lucas Meyer, Hamburg, FRG; Alemania).

Monooleato de polioxietilen sorbitán (Tween® 80) (ICI Surfactants, Wilmington, DE).

Acetato de etilo (reactivo analítico, Aldrich; EE. UU).

Ácido acético glacial (reactivo analítico, Merck; México).

Alcohol etílico (reactivo analítico, Fermont; México).

Metanol (reactivo analítico, Fermont; México).

Fosfato monobásico de potasio (Productos Químicos Monterrey, S.A; México).

Biftalato de potasio (J.T. Baker, México).

Hidróxido de sodio (J.T.Baker, México).

SPI-Chem™ Formvar® Resina para Microscopía Electrónica (SPI Supplies, EE.UU)

Ácido fosfotúngstico (J.T. Baker, México).

Agua provista por el sistema de purificación Milli-Q (Millipore® Corp., Bedford, MA; EE.UU).

5.2 Material

Celdas verticales tipo Franz de vidrio con un área de exposición promedio de 0.8244 cm² y un volumen receptor de 1.8 ml.

Cámara cromatográfica de fondo plano (CAMAG, Suiza)

Placas de sílica gel, fase normal con indicador de fluorescencia (Machery-Nagel; Germany).

Bolsas de diálisis con un peso molecular de corte de 8000 (Spectra/Por®, Spectrum Laboratories, EE. UU.)

Cinta adhesiva Scotch® No. 142-SP (3M, EE. UU.)

Parches para iontoforesis: Ionto Plus HP electrodes, (Richmar Corporation, EE.UU)

Portafiltras (11 mm de diámetro) y membranas de policarbonato con un tamaño de poro de 100 y 50 nm (Millipore Corp., Bedford, MA; EE.UU).

Jeringas de 3 mL

Cristalería en general

5.3 Equipos e Instrumentos

Balanza analítica BBC32 (Boeco; Alemania).

Coulter® N4 Plus Submicron Particle Sizer (Coulter Corp., Miami; FL; EE. UU).

Zetasizer (Zetasizer 3000, Malvern, UK, software from Malvern Instruments Dispersion Technology and Light Scattering Systems, versión 1.32).

Microcentrifuga EBA 12/12R (Hettich, Alemania).

pH metro (Corning 430, UK).

Aplicador automático para Cromatografía de Capa Fina de Alta Resolución, Automatic TLC Sampler III Versión 2.12 (CAMAG, Suiza).

Scanner 3 y software CATS Versión 4.06 para Cromatografía de Capa Fina de alta resolución (CAMAG, Suiza).

Espectrofotómetro UV-VIS, (Varian, Modelo Cary IE 95031003, Australia).

Sonicador Branson® Ultrasonic Cleaner 5210, (Branson Ultrasonics Corp., Danbury, CT; EE.UU).

Rotavapor Laborota 4000 (Heidolph, Alemania).

Vórtex (Mixer M 16715, EE. UU).

Parrilla eléctrica con agitación (Cimarec®, Thermoline, EE. UU)

Agitador magnético Magnestir® (Lab-Line instruments, EE. UU)

Recirculador de líquidos con termostato (VWR Scientific, EE. UU)

Agitador magnético multiplaza 509C (Barnstead International, EE. UU)

Microscopio Electrónico de Transmisión (JEOL JEM-100CX II., Japón)

Dermatoma eléctrico Zimmer, (Varsovia, Polonia)

Equipo de iontoforesis: Dual Channel Iontophoresis System, (Chattanooga ionto™, EE.UU)

Tewameter TM® 210, Courage-Khazaka (Colonia, Alemania)

5.4 Material biológico

A) Estudios de permeación *in vitro*

Piel de oreja de cerdo, obtenida de animales recién sacrificados en el rastro local.

B) Estudios de permeación *in vivo*

Los estudios de permeación *in vivo* se realizaron en adultos voluntarios sanos que aceptaron participar y que firmaron la carta de consentimiento informado.

Los estudios de permeación realizados fueron de dos tipos: estudios de permeación pasiva y estudios de permeación empleando como promotor de absorción la iontoforesis, ambos procedimientos se realizaron en seis voluntarios sanos cada uno.

Previo a la realización del estudio se dio una explicación detallada del procedimiento y requerimientos por parte del voluntario a fin de aclarar todas sus dudas durante el estudio, al finalizar la explicación se le solicitó el consentimiento informado (Anexo 1).

Para la selección de los voluntarios se siguieron los siguientes criterios:

i) Criterios de inclusión

Mujeres y hombres mayores de 18 años.

Mujeres y hombres sin enfermedad alguna, ni antecedentes de alergias, patologías e hipersensibilidad en la piel.

Mujeres no embarazadas.

ii) Criterios de exclusión

Mujeres y hombres menores de 18 años.

Mujeres y hombres que hayan utilizado algún producto cosmético y/o farmacéutico en la parte interna de ambos brazos el día del estudio.

Mujeres y hombres con alguna enfermedad, con antecedentes de alergias, patologías e hipersensibilidad en la piel.

Mujeres embarazadas.

Mujeres y hombres que no deseen participar.

Voluntarios que presenten hipersensibilidad a las formulaciones.

5.5 Métodos

5.5.1 Preparación de los liposomas elásticos.

Los liposomas elásticos se prepararon por el método de hidratación de película descrito por Cevc y Blume (1992), el cual consiste en los siguientes pasos:

- 1) Pesar en un vaso de precipitados la cantidad requerida de fosfatidilcolina (PC) y agente tensoactivo (Tween® 80), de tal forma que se encuentren en la siguiente proporción: 86% de PC y 14% de Tween® 80.
- 2) Disolver los componentes anteriores en etanol.
- 3) Transferir la solución obtenida en el punto anterior a un matraz balón, enjuagando 3 veces el vaso con etanol.
- 4) Evaporar el disolvente en un rotavapor a presión reducida.
- 5) Secar a vacío la película formada en el punto anterior durante 12 horas en un desecador.
- 6) Suspender la película en solución de etanol al 7% (v/v), agitando con vórtex durante 15 minutos. La cantidad de etanol al 7% deberá ser tal, que la concentración final de fosfatidilcolina sea del 5% (p/v).
- 7) Dejar hidratar la suspensión formada en el punto anterior durante dos horas.
- 8) Someter la suspensión a ultrasonido (40 kHz).

9) Extruir la suspensión a través de una membrana de policarbonato con tamaño de poro de 100 nm y 11 mm de diámetro.

El método se ejemplifica en la figura 13.

Se evaluó la influencia del medio de hidratación, para lo cual se prepararon 6 lotes con el método descrito anteriormente. Tres de ellos se hidrataron con agua y los otros tres con etanol al 7%. Midiendo el tamaño de las vesículas obtenidas.

Para optimizar el método de preparación de los liposomas elásticos, se varió el tiempo de ultrasonido y el número de extrusiones a través de la membrana de policarbonato, el diseño factorial fue 5 X 4 (Número de extrusiones X Tiempo de sonicación), como se muestra en la tabla 6. Para cada punto se prepararon tres lotes de liposomas elásticos por el método descrito anteriormente.

Los liposomas elásticos se caracterizaron por tamaño y potencial zeta con el fin de determinar las condiciones óptimas de preparación, obteniéndose tres lecturas de cada uno de los lotes preparados.

Tabla 6. Influencia del tiempo de ultrasonido y número de extrusiones a través de membranas de policarbonato de 100 nm.

| No. de extrusiones | Tiempo de ultrasonido (minutos) | | | |
|--------------------|---------------------------------|----|----|----|
| | 0 | 10 | 20 | 30 |
| 1 | | | | |
| 2 | | | | |
| 3 | | | | |
| 4 | | | | |
| 5 | | | | |

5.5.2 Preparación de los liposomas elásticos conteniendo el fármaco.

Los liposomas elásticos conteniendo ketorolaco trometamina se prepararon por el método de hidratación de película previamente optimizado. De manera general se pesaron y disolvieron los componentes (fosfatidilcolina, Tween® 80 y el fármaco) en etanol, se evaporó el disolvente a presión reducida, se dejó secar la película formada a vacío durante doce horas, se suspendió la película con etanol al 7%, con agitación durante 15 minutos, se dejó hidratar la suspensión obtenida durante dos horas, posteriormente se sometió a 10 minutos de ultrasonido y finalmente la suspensión se extruyó tres veces a través de una membrana de policarbonato con tamaño de poro de 100 nm. En la figura 13 se ejemplifica el método de preparación de los liposomas elásticos.

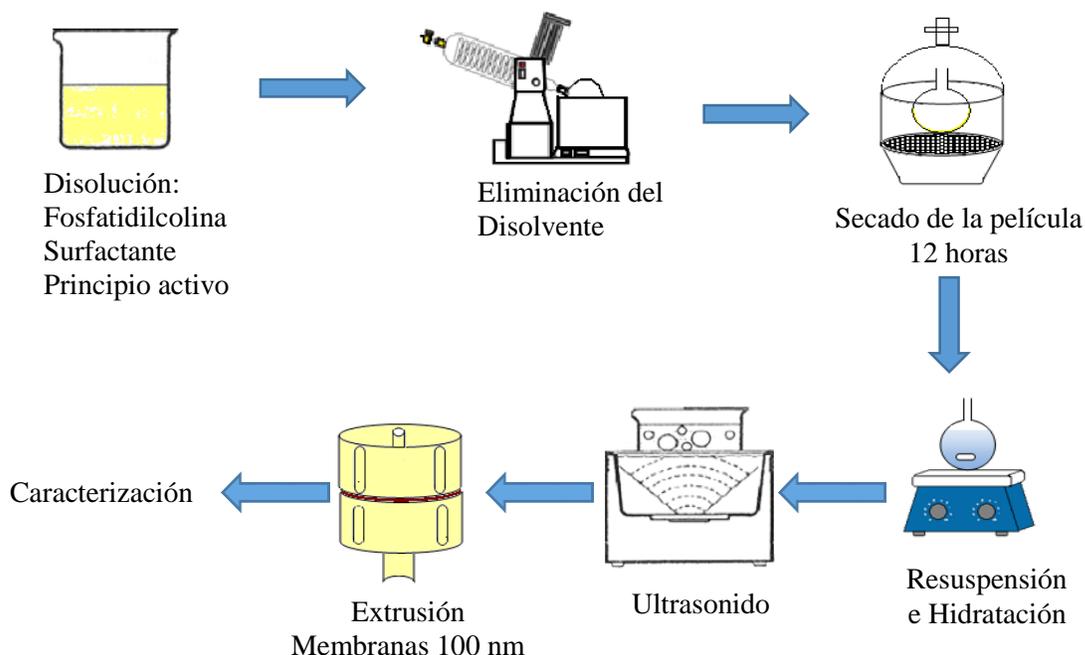


Figura 13. Representación esquemática para preparar liposomas elásticos, por medio del método de hidratación de película

5.5.3 Caracterización de los liposomas elásticos.

Los liposomas elásticos obtenidos, se caracterizaron evaluando su tamaño, potencial zeta, morfología, eficiencia de encapsulamiento, estabilidad física y elasticidad.

5.5.3.1 Determinación del tamaño de vesícula

La determinación del tamaño promedio de los liposomas elásticos, la distribución del tamaño (índice de polidispersidad, IP) y la desviación estándar se determinaron por espectroscopía de correlación de fotones usando un Zetasizer (Malvern systems ZEN 3600, EE. UU.). Para esta prueba con todos los lotes de liposomas elásticos se utilizó como medio de dispersión agua destilada, realizándose las lecturas a 25 °C, con un ángulo de incidencia del rayo láser de 90°. Las determinaciones se realizaron por triplicado.

5.5.3.2 Determinación del potencial zeta

El potencial zeta se determinó con ayuda de un Zetasizer (Malvern systems ZEN 3600, EE. UU.), a la viscosidad y constante dieléctrica del agua, 150 volts de corriente eléctrica, a una temperatura de 25 °C utilizando una celda de capilar doblado. El medio de dispersión fue agua destilada. Cada determinación se realizó por triplicado.

5.5.3.3 Morfología de los liposomas elásticos

La morfología de las liposomas elásticos fue observada por microscopía electrónica de transmisión (MET). La preparación de la muestra consistió en lo siguiente: se colocó una gota de la dispersión de las vesículas sobre una rejilla de cobre malla 200, previamente cubierta con una película de Formvar® (resina de poli(vinil formal) y se dejaron en contacto durante dos minutos para formar una película delgada. Antes de que la muestra se secase sobre la rejilla, se adicionó una gota de ácido fosfotúngstico al 1% (p/v) sobre la muestra, el exceso de ácido se retiró con papel filtro y se dejó secar al aire a temperatura ambiente. Las muestras así preparadas se observaron en un microscopio electrónico de transmisión JEM-CX100 (JEOL, Japón).

5.5.3.4 Eficiencia de encapsulamiento

Para determinar la eficiencia de encapsulamiento, el fármaco libre, el cual no está en el interior de las vesículas, se separó de las mismas por cromatografía de permeación en gel, en columnas de Sephadex® G-10, usando el método de centrifugación en minicolumna. De manera general, el Sephadex® G-10 se hidrató y se dejó hinchar en agua destilada a temperatura ambiente, con agitación ocasional, durante al menos seis horas. El gel obtenido se almacenó a 4°C.

Las minicolumnas se prepararon colocando un papel filtro en la base de jeringas de 3 mL, posteriormente se llenaron con el gel. El exceso de agua se removió por centrifugación a 1500 rpm durante tres minutos. Se aplicaron 200 µL de la suspensión de vesículas en las minicolumnas de Sephadex® y se centrifugaron a 1500 rpm durante tres minutos; entonces, se adicionó 400 µL de agua y se volvió a centrifugar con la misma velocidad y tiempo para eluir las vesículas. Es importante mencionar que hasta esta etapa, el fármaco libre permanece en la columna y el volumen colectado contiene las vesículas con el fármaco en su interior y no fármaco libre, lo cual se probó previamente al aplicar en lugar de la suspensión de vesículas, una solución saturada de KT, realizando el mismo procedimiento. Bajo estas condiciones el fármaco no es eluido, su elución ocurre hasta el tercer ciclo de centrifugación.

Una vez que el fármaco libre fue separado de los liposomas elásticos, estos se disolvieron en etanol, se llevaron al volumen deseado (25 mL, matraz volumétrico) y se cuantificó el fármaco liberado por cromatografía en capa fina de alta resolución (HPTLC por sus siglas en inglés).

5.5.3.5 Elasticidad de las vesículas

Se prepararon tres lotes de LE con y sin fármaco, así como también tres lotes de liposomas. La elasticidad de las vesículas fue determinada midiendo el tamaño de las mismas antes y después de

ser extruidas manualmente a través de membranas de policarbonato con un tamaño de poro de 50 nm. El experimento fue llevado a cabo por triplicado.

5.5.3.6 Estabilidad física de los liposomas elásticos

Tres lotes de suspensión de liposomas elásticos se almacenaron a 4°C, a diferentes intervalos de tiempo, la dispersión fue sometida a observación macroscópica, para observar si hubiese evidencias de sedimentación y/o agregación. Al mismo tiempo, se midió el tamaño de partícula, el índice de polidispersión y el potencial zeta. También se determinó la habilidad de las vesículas de retener el fármaco encapsulado, por el método descrito para eficiencia de encapsulamiento.

5.5.4 Solubilidad del ketorolaco trometamina en regulador de fosfatos pH 7.4

La prueba se realizó por quintuplicado, colocando en viales 3 mL de regulador de fosfatos pH 7.4 (USP 24), a los que se les adicionó un exceso de fármaco. Se dejaron en agitación constante durante 24 horas; transcurrido este tiempo, las suspensiones se centrifugaron a 6000 rpm durante 30 minutos y del sobrenadante se tomó una alícuota de 100 µL, la cual se filtró y se diluyó a 100 mL. La cantidad de KT disuelto se cuantificó por medio de HPTLC.

5.5.5 Estudio de liberación *in vitro*

La liberación del fármaco a partir de los liposomas elásticos se evaluó por dos métodos:

a) Diálisis

3 mL de la suspensión de vesículas elásticas o 3 mL de una solución de fármaco, se colocaron en bolsas de diálisis con un peso molecular de corte de 8000 (previamente hidratadas durante al menos doce horas en solución reguladora de fosfatos pH 7.4), y colocados en 60 mL de regulador de fosfatos pH 7.4, con agitación suave a 37°C. A intervalos de tiempo predeterminados, se tomaron muestras de 4 mL del medio de liberación, reemplazándose con medio fresco. Para determinar la cantidad de fármaco liberada las muestras obtenidas se analizaron por HPTLC.

b) Celdas de Franz

La liberación del fármaco a través de una membrana artificial fue evaluada usando celdas verticales de difusión tipo Franz. Una membrana de celofán de diálisis con un peso molecular de corte de 8000, se hidrató con el medio receptor (solución reguladora de biftalato de potasio pH 5.5) por al menos 12 horas. La membrana hidratada se montó entre los compartimentos donador y receptor de la celda de Franz. El medio donador consistió de 1.5 mL de solución acuosa del fármaco (2 mg/mL) o 1.5 mL de la suspensión de los liposomas elásticos. El medio receptor consistió de 20 mL de

regulador de biftalato de potasio pH 5.5 con agitación magnética. El área disponible para la difusión fue de 5 cm². La temperatura se controló a 32°C, para imitar la piel humana. Se tomaron muestras de 4 mL a diferentes intervalos de tiempo reemplazando de manera inmediata el volumen tomado con medio fresco. Todas las muestras se analizaron espectrofotométricamente a 323 nm, para cuantificar el fármaco difundido. No se encontró interferencia con otros componentes. El experimento se realizó por triplicado.

El uso de las celdas de Franz provee un método preciso y fiable para evaluar la liberación de compuestos activos a partir de formulaciones tópicas (Montenegro et al, 1996). La temperatura fue controlada a 32°C y el pH del medio aceptor fue 5.5, simulando las condiciones de la piel *in vivo*.

5.5.6 Estudios de permeación *in vitro*

5.5.6.1 Obtención de la piel

La piel empleada para los estudios de difusión transdérmica es de orejas de cerdo, obtenida del rastro local, antes de que los cerdos sean pasados por agua caliente o vapor. La piel se aisló del cartílago y se cortó empleando un dermatoma a un grosor de 600-700 µm. La piel una vez obtenida se congeló a -20°C hasta su uso en las permeaciones.

5.5.6.2 Experimentos de difusión pasiva

La piel se descongeló e hidrató a una temperatura de 37°C con solución salina isotónica y se montó en celdas de difusión verticales tipo Franz modificadas (Figura 14), situando el estrato córneo hacia la solución donadora.

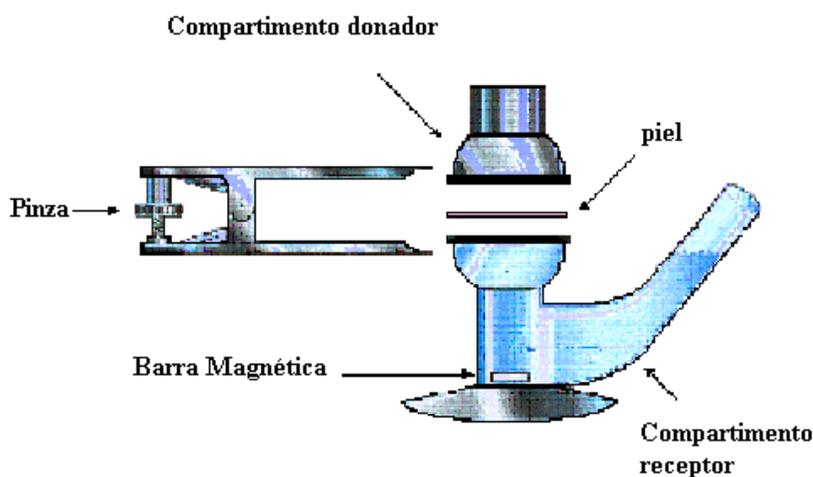


Figura 14. Celda de difusión tipo Franz

El medio donador consistió de 250 μL de la formulación a evaluar (solución de KT o suspensión de liposomas elásticos). El medio receptor consistió de 2 mL de regulador de fosfatos pH 7.4 con agitación constante para evitar que se forme una zona de estancamiento. El área disponible para la difusión fue de 0.567 cm^2 , las celdas se mantuvieron a 37°C. Se tomaron muestras de 1 mL, las cuales se empezaron a tomar después de 12 horas de estar montadas las celdas, se comenzó después de 12 horas ya que en determinaciones previas se encontró que durante las primeras 12 horas no hay fármaco en el compartimiento receptor. Las muestras se analizaron por HPTLC a 323 nm, para lo cual de cada muestra se tomaron 500 μL , se evaporó el agua y se reconstituyó con 500 μl de metanol, esto se realizó con la finalidad de poder aplicar un volumen mayor (50 μL), sin botar la sílica de la placa.

5.5.6.3 Determinación del fármaco retenido en la piel

Una vez terminada la permeación, la piel se lavó dos veces con agua para eliminar la formulación de la superficie y se cortó en fragmentos pequeños; éstos se colocaron en recipientes conteniendo 20 mL de metanol, el recipiente se tapó y se agitó durante 24 horas. Las soluciones se filtraron, se tomó una muestra de cada una y se analizaron por HPTLC.

5.5.7 Estudios de difusión *in vivo*

Los estudios de difusión pasiva *in vivo*, se realizaron por la técnica de *tape stripping*. Participaron 12 voluntarios sanos, a los que se les pidió que el día de la prueba no utilizaran ningún producto cosmético o farmacéutico. Sobre la parte interna del brazo se les colocó una celda de perfusión circular con un área de 9.62 cm^2 . En esta celda se agregó un volumen de los liposomas elásticos y/o la solución de fármaco (1.5 mL) para cubrir toda el área. Después de 1.0 hora, se retiró la celda, se lavó con agua y se realizó el stripping, con cintas adhesivas (3M) previamente pesadas, realizando 16 strippings sucesivos aplicando la misma presión en cada uno de ellos. Las cintas obtenidas se cortaron, se colocaron en recipientes con 6 ml de metanol y se agitaron durante 4 horas, posteriormente la cantidad de KT se cuantificó por HPTLC.

En la figura 15 se ejemplifica de manera general la técnica de *tape stripping* empleada para los estudios de permeación *in vivo*.

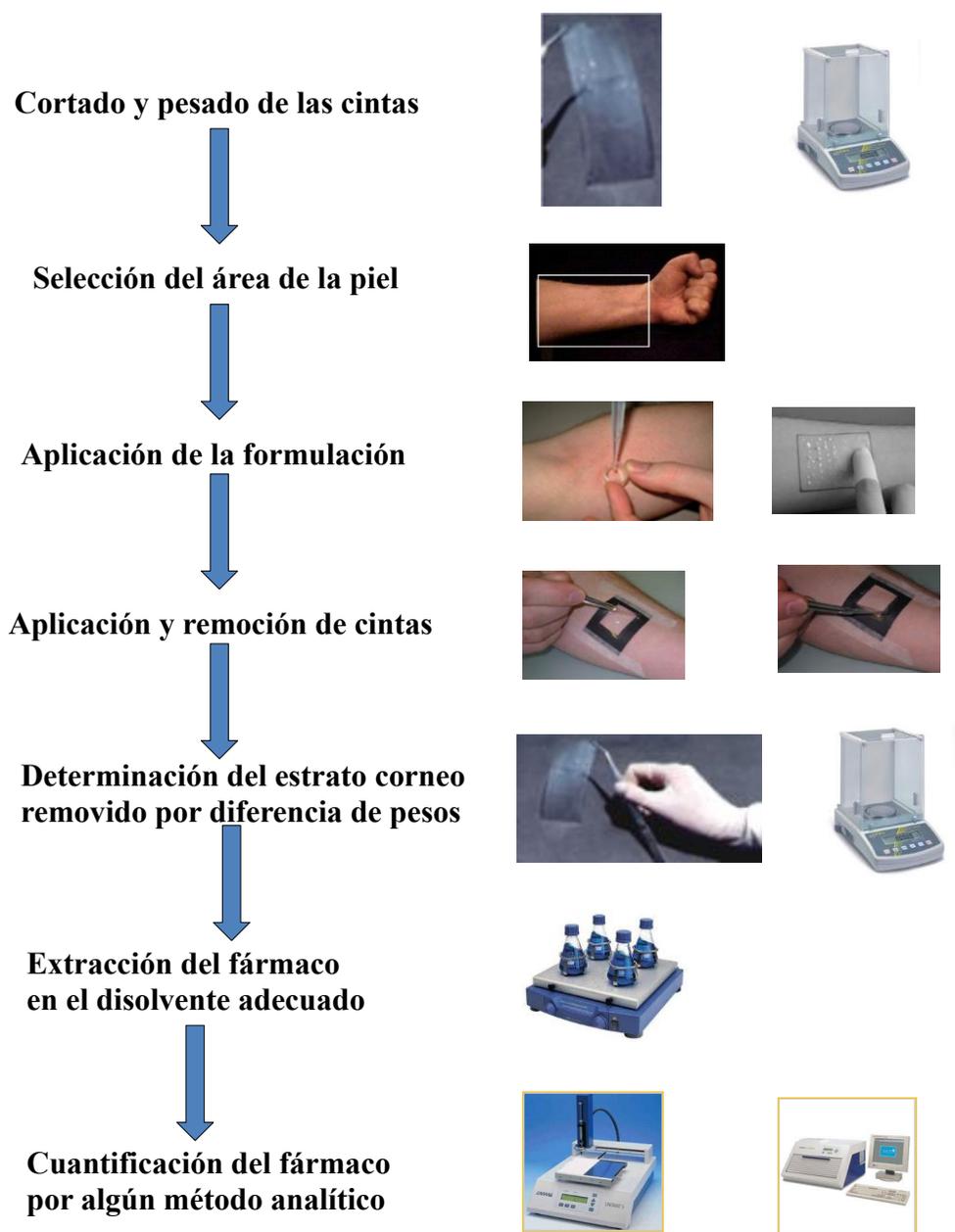


Figura 15. Esquema general de los estudios de permeación *in vivo* mediante la técnica de Tape stripping.

5.5.8 Estudios de difusión *in vivo* utilizando como promotor de absorción la iontoforesis

Estos estudios de difusión *in vivo*, se realizaron por la técnica de *tape stripping*. Participaron seis voluntarios sanos, a los que se les pidió que el día de la prueba no utilizaran ningún producto cosmético o farmacéutico.

Sobre la parte interna del brazo se fijaron los parches para iontoforesis. En el cátodo se colocó la solución del fármaco o la suspensión de vesículas, ambas con un contenido de 2 mg/mL de KT. El

área del parche es de 7.5625 cm², se aplicaron 0.25 mA/cm² durante 20 minutos, el parche se mantuvo hasta completar una hora.

Posteriormente se retiró el parche, se limpió el área tratada y se realizó el stripping, utilizando una cinta adhesiva 3M (No. De ref. 142-SP 3M) previamente pesada. Se realizaron un total de 16 strippings sucesivos. Las cintas obtenidas se cortaron, se colocaron en recipientes con 6 ml de metanol y se agitaron durante 4 horas, el contenido de fármaco permeado se cuantificó por HPTLC.

5.5.9 Determinación de la pérdida de agua transepidermal

Para evaluar el efecto de la iontoforesis sobre la función de barrera de permeabilidad de la piel se determinó la pérdida de agua transepidermal antes y después de aplicar una corriente eléctrica (0.25 mA/cm²) con la solución de fármaco o la suspensión de las vesículas durante 20 minutos. Las determinaciones se realizaron colocando el dispositivo del Tewameter® en los sitios de aplicación de las formulaciones. Todas las mediciones se efectuaron en una habitación ventilada a temperatura ambiente en seis voluntarios sanos.

5.5.10 Estabilidad de las vesículas al aplicarles una corriente eléctrica

A una suspensión de liposomas elásticos se aplicó una corriente eléctrica de 0.25 mA/cm² durante 20 minutos. Se midió el tamaño y la eficiencia de encapsulamiento antes y después de aplicar la corriente.

5.6 Métodos de cuantificación para el KT

5.6.1 Método utilizado para cuantificar el KT en las pruebas de: solubilidad y eficiencia de encapsulamiento

Las muestras obtenidas de los estudios de solubilidad, estabilidad y eficiencia de encapsulamiento, se evaluaron mediante HPTLC. Se utilizaron placas de sílica gel G60, y la fase móvil fue acetato de etilo: cloroformo: ácido acético (8:3:0.1).

Las muestras, una vez llevadas al volumen deseado, se colocaron en el aplicador del cromatógrafo (Automatic TLC Sampler III, CAMAG Suiza), se aplicaron 3000 nL en banda de 5 mm sobre la placa de sílica gel G60, con una distancia de 10 mm entre cada aplicación. La placa se colocó en la cámara de elución la cual contenía 10 mL de la fase móvil y se dejó correr a una altura de 4.5 cm. Una vez seca la placa, se leyó a 323 nm en el scanner 3 (CAMAG Suiza), evaluándose con el Software CATS 4 (CAMAG Suiza), el área bajo la curva (ABC) del pico correspondiente al KT. Se

validó el método evaluando los siguientes parámetros: linealidad, precisión del sistema y precisión del método, exactitud, límite de detección y cuantificación (Anexo 2.1).

5.6.2 Método utilizado para cuantificar el KT en los estudios de liberación

El contenido de fármaco en las muestras obtenidas en los estudios de liberación *in vitro* se determinó espectrofotométricamente. Para lo cual se realizó una curva de calibración en solución amortiguadora de fosfatos pH 5.5 (Anexo 2. 2).

5.6.3 Método utilizado para cuantificar el KT en los estudios de permeación pasiva *in vitro*

El contenido de fármaco en las muestras obtenidas en los estudios de difusión pasiva *in vitro* se determinó por HPTLC, empleando la misma fase móvil y placas que en el método anteriormente descrito. El método se realizó usando como disolvente, solución reguladora de fosfatos pH 7.4, en contacto con piel de oreja de cerdo.

Esto se llevó a cabo de la siguiente manera:

Se aisló piel de oreja de cerdo y se colocó en solución reguladora de fosfatos pH 7.4 con agitación constante durante 24 horas a 37°C. La solución obtenida se filtró. Esta solución se utilizó como medio de disolución (Anexo 2.3).

5.6.4 Método utilizado para cuantificar el KT retenido en piel.

Determinación de las condiciones para la extracción del principio activo de la piel

Una vez que la permeación ha terminado, se determina la cantidad de fármaco que no ha pasado a la fase receptora pero que se encuentra retenido en la piel. Para lo cual es necesario determinar las condiciones óptimas de extracción del fármaco a partir de la piel.

Se colocaron 100 µL de una solución etanólica de KT de concentración conocida en la superficie de pequeñas porciones de piel (diámetro de la celda) y se dejó evaporar el etanol a temperatura ambiente. Posteriormente se cortaron cada una de las porciones y se colocaron en matraces pequeños con 20 mL de etanol o metanol. Los matraces se mantuvieron a diferentes condiciones: a) temperatura ambiente y agitación por 24 horas y b) a 37°C en baño de agua por 48 horas en agitación constante. Las soluciones se filtraron y se cuantificó el contenido de fármaco por HPTLC. Las pruebas se realizaron por sextuplicado.

Una vez obtenidas las condiciones óptimas de extracción, se realizó una curva de calibración del KT en metanol, para cuantificar el principio activo retenido en la piel de oreja de cerdo. La solución que se utilizó como disolvente fue metanol en contacto con la piel de oreja de cerdo, durante 24 h a temperatura ambiente (Anexo 2.4).

5.6.5 Método utilizado para cuantificar el ketorolaco trometamina en los estudios *in vivo*.

Siguiendo la metodología anterior se realizó una curva de calibración del ketorolaco trometamina en metanol, para cuantificar el principio activo extraído en las cintas de Tape stripping. La solución que se utilizó como disolvente fue metanol en contacto y en agitación con las cintas provenientes de un voluntario al cual se le realizó tape stripping sin ningún tipo de tratamiento, el tiempo de contacto fue de 4 horas a temperatura ambiente (Anexo 2.5).

VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Optimización del método de preparación de los liposomas elásticos

Los LE se prepararon por el método de hidratación de película explicado previamente, como fosfolípido se utilizó fosfatidilcolina de soya no hidrogenada y como activador de superficie el monooleato de sorbitan polietoxilado (20) (Tween® 80), en una proporción 85:15 respectivamente. Para optimizar el método de preparación se evaluó la influencia del tiempo de ultrasonido y el número de extrusiones a través de membranas de policarbonato de 100 nm sobre el tamaño, índice de polidispersión (IPD) y potencial zeta.

En la figura 16 y 17, así como en la tabla 7 se presentan los resultados de tamaño de partícula e índice de polidispersión obtenidos con los diferentes factores estudiados: tiempo de ultrasonido y número de extrusiones a través de membranas de policarbonato con un tamaño de poro de 100 nm.

La figura 16 muestra que, como se esperaba, el tamaño de las vesículas disminuye con el número de extrusiones, encontrándose diferencias significativas ($P < 0.05$) al realizarse un análisis de varianza bifactorial, es decir, estos factores tienen un efecto estadísticamente significativo sobre el tamaño de las vesículas con un 95.0% de nivel de confianza. La prueba de rangos múltiples mostró que no existen diferencias estadísticamente significativas entre 3, 4 y 5 extrusiones. Pero si hay evidencia estadística que indica diferencias entre 1 y 2 extrusiones comparadas con 3, 4 y 5 extrusiones. De acuerdo al tiempo de ultrasonido, el tamaño de las vesículas se redujo cuando se incrementó el tiempo de ultrasonido, pero no se encontraron diferencias significativas, por lo que no es necesario someter las vesículas a tiempos de ultrasonido elevados o numerosas extrusiones (Anexo 3). En la figura 17 se muestra la tendencia del índice de polidispersión (IPD), el IPD es la proporción de la desviación estándar para el tamaño medio de partícula y da información sobre la uniformidad del tamaño de partícula dentro de la formulación (Gupta *et al.*, 2012). Se puede observar que conforme aumenta el número de extrusiones disminuye el IPD, esto concuerda con la literatura, que menciona que el objetivo de las extrusiones es, además de disminuir el tamaño de las vesículas, aumentar la homogeneidad de la dispersión, lo cual se ve reflejado en el valor del IPD.

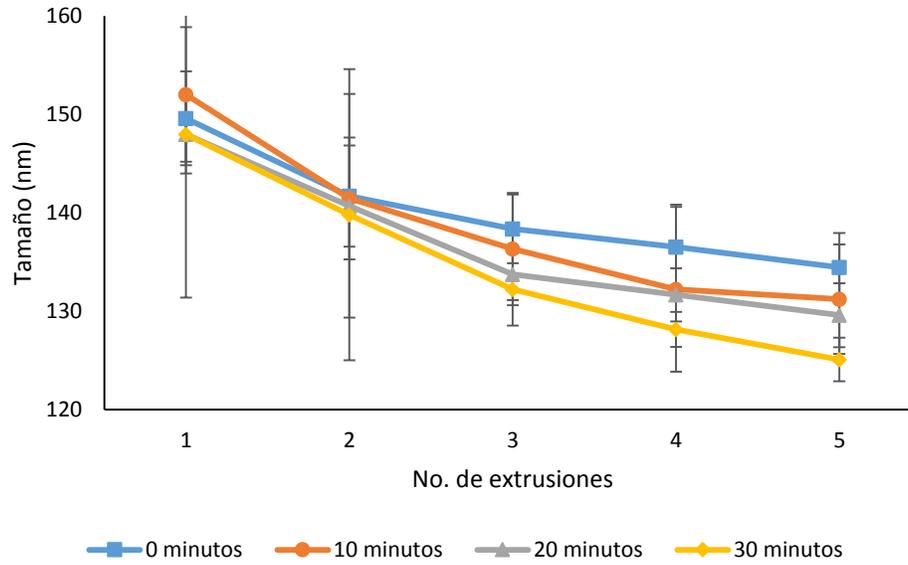


Figura 16. Influencia del tiempo de ultrasonido y número de extrusiones sobre el tamaño de las vesículas (n=9).

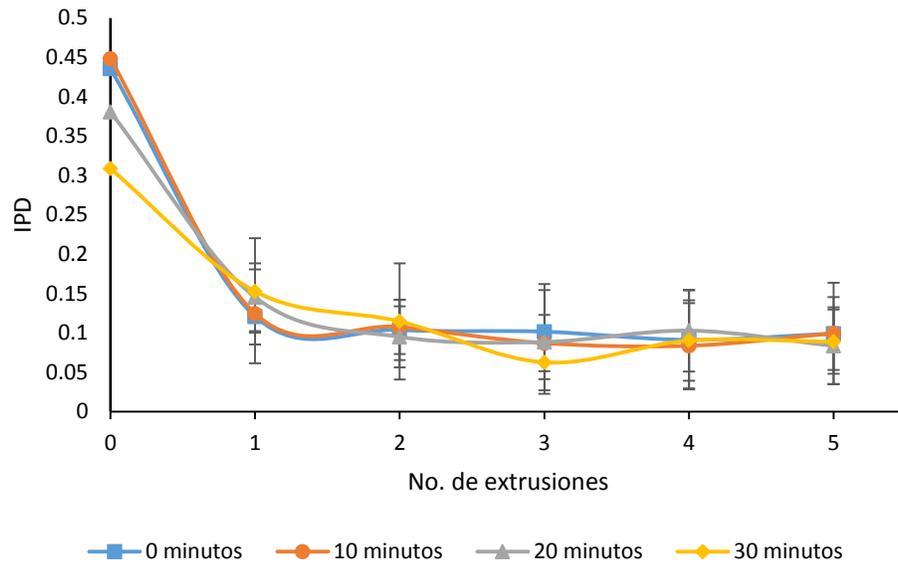


Figura 17. Influencia del tiempo de ultrasonido y número de extrusiones sobre el IPD (n=9).

Tabla 7. Tamaños promedio e IPD al variar el tiempo de ultrasonido y el número de extrusiones (n=9)

| Tiempo de ultrasonido (minutos) | 0 | | 10 | |
|---------------------------------|----------------------|---------------|----------------------|---------------|
| Número de extrusiones | Tamaño promedio (nm) | IPD | Tamaño promedio (nm) | IPD |
| 0 | 1079.4 ± 233.1 | 0.436 ± 0.356 | 1485 ± 484.05 | 0.448 ± 0.145 |
| 1 | 149.78 ± 3.87 | 0.121 ± 0.059 | 152.62 ± 1.44 | 0.125 ± 0.025 |
| 2 | 141.38 ± 3.62 | 0.104 ± 0.038 | 141.46 ± 2.77 | 0.108 ± 0.034 |
| 3 | 138.38 ± 3.71 | 0.102 ± 0.060 | 136.40 ± 1.69 | 0.087 ± 0.036 |
| 4 | 136.59 ± 4.55 | 0.091 ± 0.063 | 132.44 ± 1.51 | 0.084 ± 0.054 |
| 5 | 134.46 ± 3.50 | 0.099 ± 0.046 | 131.22 ± 2.39 | 0.099 ± 0.064 |
| Tiempo de ultrasonido (minutos) | 20 | | 30 | |
| Número de extrusiones | Tamaño promedio (nm) | IPD | Tamaño promedio (nm) | IPD |
| 0 | 1476 ± 500.8 | 0.381 ± 0.246 | 1781.1 ± 549.9 | 0.309 ± 0.168 |
| 1 | 147.48 ± 1.76 | 0.145 ± 0.043 | 148.01 ± 17.59 | 0.153 ± 0.067 |
| 2 | 140.84 ± 3.73 | 0.095 ± 0.039 | 140.20 ± 16.50 | 0.115 ± 0.074 |
| 3 | 133.62 ± 1.71 | 0.088 ± 0.066 | 132.89 ± 2.82 | 0.063 ± 0.035 |
| 4 | 131.68 ± 1.01 | 0.103 ± 0.052 | 128.04 ± 1.52 | 0.090 ± 0.051 |
| 5 | 129.66 ± 1.69 | 0.084 ± 0.049 | 125.03 ± 1.11 | 0.089 ± 0.041 |

El potencial zeta (PZ) expresa la movilidad electroforética de las vesículas dispersas en un líquido, el PZ puede ser definido como un valor electrocinético asociado a una magnitud objetiva de la carga superficial de las partículas (Honary y Zahir, 2013). El método de medición se basa en la aplicación de un campo eléctrico que produce la migración de las vesículas coloidales debida al potencial y a la carga. La figura 18 muestra el cambio de potencial zeta con respecto al tiempo de ultrasonido y al número de extrusiones, se puede observar que el potencial zeta cambia de valores negativos grandes a valores negativos más pequeños con el aumento en el tiempo de ultrasonido y el número de extrusiones, observándose una dependencia del tamaño de los liposomas elásticos con el potencial zeta.

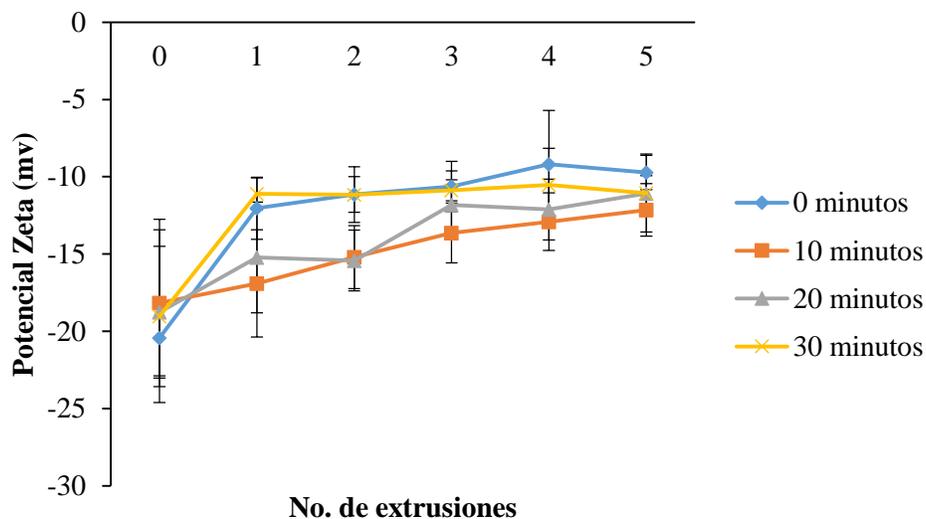


Figura 18. Influencia del tiempo de sonicación y número de extrusiones sobre el potencial zeta

También se evaluó la influencia del medio de dispersión sobre el tamaño de los liposomas elásticos obtenidos. Para lo cual se prepararon seis lotes de liposomas elásticos con el método optimizado, pero tres de ellos se hidrataron con una solución alcohólica al 7% y los otros tres con agua, midiéndose el tamaño de las vesículas. En la figura 19 se observa que los liposomas elásticos hidratados con una solución de etanol al 7% presentan un tamaño menor (125.2 ± 3.07 nm) que cuando se hidratan con agua (132.22 ± 4.6 nm), encontrándose diferencia significativa entre las medias ($P < 0.05$, anexo 3.4). Con ambos medios de hidratación se obtuvieron IPD menores a 0.15.

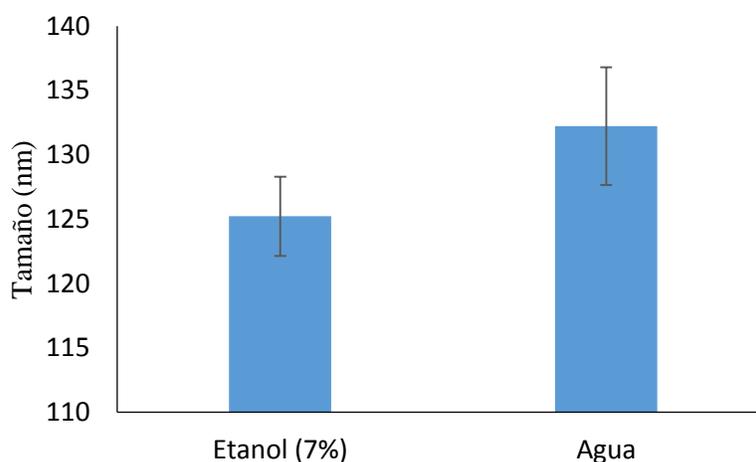


Figura 19. Influencia del medio de hidratación sobre el tamaño de los LE

De acuerdo a los resultados obtenidos se determinó que las condiciones óptimas de preparación de los LE fueron: 10 minutos de ultrasonido, 3 extrusiones a través de membranas de policarbonato de 100 nm y como medio de hidratación, etanol al 7%.

6.2 Caracterización de los liposomas conteniendo el fármaco

Los LE obtenidos se caracterizaron por tamaño de las vesículas, potencial zeta, morfología, eficiencia de encapsulamiento, elasticidad, estabilidad y liberación *in vitro*.

6.2.1 Tamaño de los liposomas elásticos

El tamaño de las vesículas es un factor clave en el rendimiento esperado de ellas, sobre todo si van dirigidas a la administración transdérmica. La disminución del tamaño es deseable para la penetración de las vesículas a través de la piel.

El análisis del tamaño de las vesículas (Figura 20) indica que el valor promedio fue de 123.3 ± 1.2 nm, con una distribución unimodal y un índice de polidispersión muy bajo, menor a 0.1, indicando una distribución estrecha del tamaño de vesícula y consecuentemente una distribución homogénea.

Por el mismo método se prepararon liposomas rígidos (sin tensioactivo) obteniendo vesículas con un tamaño promedio de 153 ± 3.5 nm.

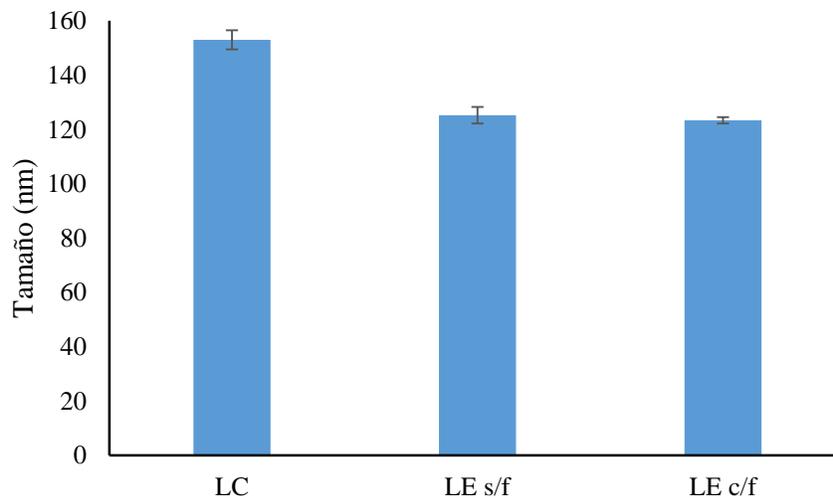


Figura 20. Tamaño de liposomas convencionales (LC), liposomas elásticos sin fármaco (LE s/f) y Liposomas elásticos con fármaco (LE c/f)

Como se puede observar los LE fueron más pequeños que los liposomas convencionales preparados ambos con el mismo método. Esta diferencia puede explicarse por el uso del Tween® 80 en la preparación de los liposomas elásticos, el cual puede interactuar con las bicapas lipídicas, modulando la rigidez de la membrana, incrementando la flexibilidad de las vesículas, lo que les permite pasar más fácilmente a través de los poros de la membrana de policarbonato durante la extrusión de las vesículas (Huang *et al.*, 2006; Ahad *et al.*, 2012).

Algunos autores han reportado que no hay diferencia significativa en el tamaño de los LE conteniendo diferentes tensioactivos, debido a que el método de preparación incluye la homogenización por extrusión a través de membranas de policarbonato (Jain *et al.*, 2003).

El Zaafarany *et al.* (2010) reportan que el uso de tensioactivos con elevado HLB da como resultado vesículas de mayor tamaño. En su trabajo, al utilizar colato de sodio para la preparación de los liposomas elásticos obtuvieron vesículas de mayor tamaño debido a su elevada hidrofilia, que cuando usaron un tensioactivo hidrofóbico. Sin embargo, Liu *et al.* (2013) obtuvieron vesículas más pequeñas al emplear Tween® 80 que al emplear Span® 20 a pesar de su elevado HLB (15 y 8.6 respectivamente) atribuyéndolo al aumento de la de la superficie de los liposomas elásticos producido por las cadenas de polioxietileno. Además se ha reportado que los tensioactivos no iónicos pueden proveer estabilización suficiente al sistema coloidal y reducir su tamaño.

6.2.2 Potencial zeta

En la figura 21 se muestra el potencial zeta de los liposomas obtenidos. Los liposomas convencionales presentaron un potencial zeta de -8.42 ± 2.66 mV, mientras que los liposomas elásticos sin contener el fármaco de -10.99 ± 4.89 mV y los liposomas elásticos con fármaco de -11.59 ± 2.79 mV. Puede observarse que la incorporación del fármaco no modificó el potencial zeta de los liposomas elásticos.

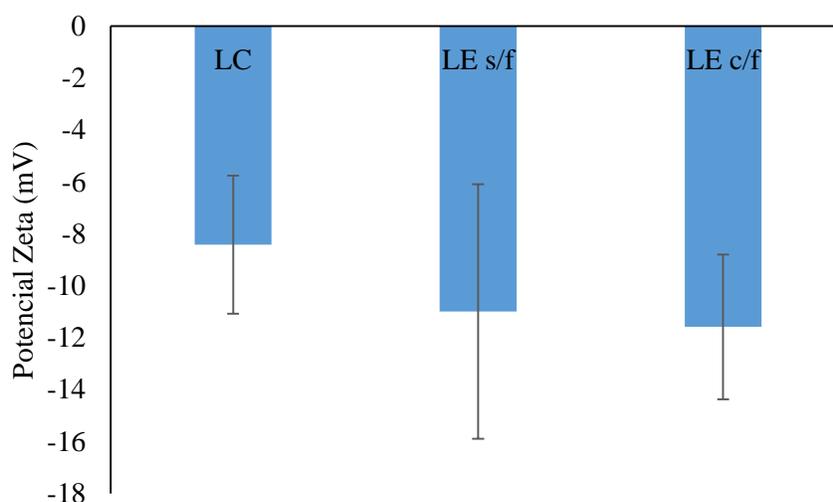


Figura 21. Potencial zeta de liposomas convencionales (LC), liposomas elásticos sin fármaco (LE s/f) y Liposomas elásticos con fármaco (LE c/f)

El potencial Z de los liposomas formados solo de fosfatidilcolina sin contener ningún fármaco tiende a ser negativo debido a la presencia de una capa de aniones adsorbida a los dipolos en las

cabezas polares de la fosfatidilcolina (Lanio et al., 2009). El potencial zeta que se obtuvo en los liposomas elásticos (~ -12 mV) es consistente con los reportados cuando se utiliza Tween® 80 como activador de superficie. (Lee *et al.*, 2005). Las vesículas preparadas con tensioactivos no iónicos tienden a presentar potenciales zeta negativos relativamente bajos comparados con los tensioactivos aniónicos. La incorporación de Tween® 80 dentro de la bicapa lipídica de los liposomas puede afectar el potencial zeta debido a la región polar del Tween® ($(\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-O})_n$), que puede producir una barrera estérica (Tasi *et al.*, 2003).

6.2.3 Morfología

El método de hidratación de película usado en la preparación de los liposomas elásticos conduce a la formación de vesículas multilamelares, pero después de someter las vesículas a ultrasonido y a extrusión, estas vesículas se convierten en vesículas unilamelares. Una de las técnicas más utilizadas para observar la morfología de los liposomas es la microscopía electrónica de transmisión con tinción negativa. Por medio de esta técnica se pueden observar los liposomas como manchas oscuras. En la figura 22, se observa la forma de una vesícula esférica elástica con un núcleo delimitado por un contorno.

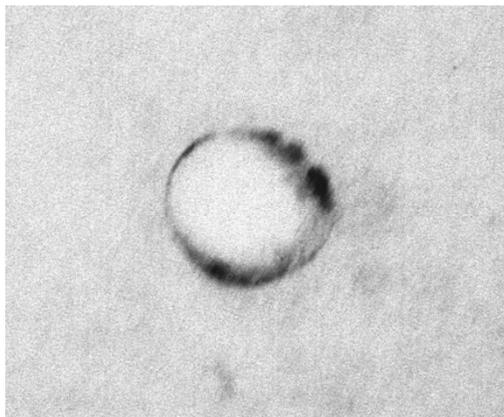


Figura 22. Imagen de Microscopía electrónica de transmisión (TEM por sus siglas en inglés) de liposomas elásticos cargados de KT (X 50, 000).

6.2.4 Eficiencia de encapsulamiento

La eficiencia de entrapamiento (también llamada eficiencia de encapsulamiento) es la fracción de fármaco (KT) incorporado dentro de los liposomas elásticos con respecto a la cantidad total adicionada de fármaco. Los resultados muestran que la cantidad encapsulada de KT en los liposomas elásticos no se incrementa al adicionar cantidades crecientes de fármaco (de 2 mg a 5 mg, Figura 23) encontrándose diferencias significativas ($P < 0.05$, anexo 3.5) al realizar la prueba t. El Zaafarany *et al.*, (2010) encontró algo similar al encapsular diclofenaco sódico en liposomas

elásticos, el incremento en la concentración de diclofenaco condujo a una disminución significativa en la eficiencia de encapsulamiento. El fármaco puede quedar atrapado tanto en las bicapas lipídicas como en los compartimentos acuosos de las vesículas (Lopes *et al.*, 2004). Por lo que la capacidad de encapsulamiento de las vesículas es limitada al saturarse los compartimentos acuosos y lipídicos con el fármaco, por lo tanto los LE son capaces de encapsular fármaco sólo en un grado óptimo, después de lo cual, cualquier incremento adicional en la concentración del fármaco no da lugar a un mayor encapsulamiento.

La máxima cantidad de KT incorporado dentro de las vesículas fue de 18.6 $\mu\text{g}/\text{mg}$ de fosfolípido (correspondiendo a una eficiencia de atrapamiento del $73.13 \pm 11.13 \%$). Esta eficiencia de atrapamiento es comparable con la obtenida para otros fármacos hidrofílicos, como el fumarato de ketotifeno formulado en vesículas elásticas ($74.51 \pm 0.86 \%$), usando Tween® 80 como activador de superficie (Elsayed *et al.*, 2006).

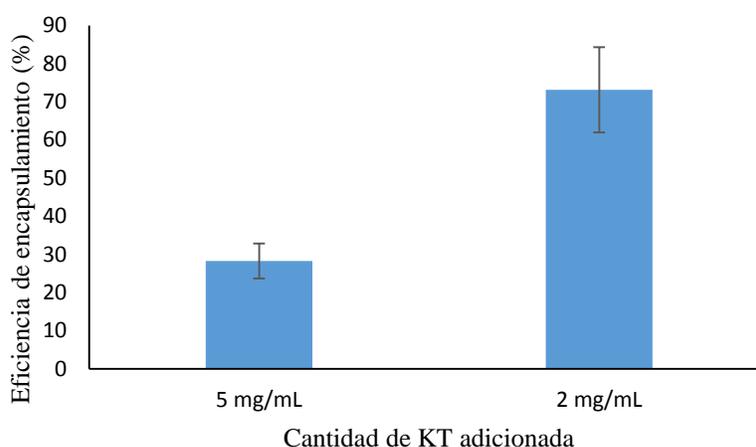


Figura 23. Efecto de la concentración de fármaco sobre la eficiencia de encapsulamiento (n=18)

Esta eficiencia de encapsulamiento es alta para un fármaco hidrofílico y probablemente es debida al tensioactivo utilizado como activador de superficie. Se ha reportado que se obtienen mayores eficiencias de encapsulamiento al emplear Tween® 80 que con Span® y colato de sodio. Las moléculas del tensioactivo se pueden intercalar dentro de la bicapa lipídica, alterando el empaquetamiento de la misma y la permeabilidad de la vesícula hacia los fármacos atrapados. La afinidad del Tween® 80 hacia los lípidos es relativamente baja, debido a que presenta un HLB de 15, el HLB refleja la proporción relativa de las regiones hidrofílicas y lipofílicas de la molécula. La región lipofílica del Tween® 80 es más corta que la región hidrofílica (cadena de polioxietileno), por lo que el grado en el que el Tween® 80 se inserta dentro de las bicapas no es

muy profunda, lo cual contribuye a incrementar la densidad de empaquetamiento de la interfase polar-no polar de la bicapa, obteniéndose una elevada eficiencia de encapsulamiento. (Liu *et al.*, 2013).

6.2.5 Elasticidad de las vesículas

El grado de deformabilidad es un parámetro crucial y único de los LE, a diferencia de otras vesículas lipídicas. La naturaleza elástica de los LE les permite pasar a través de los poros de la piel los cuales son mucho más pequeños en tamaño que el diámetro de las vesículas. Esta deformabilidad es lograda por la combinación de al menos dos componentes (lipofílico/anfifílico), con características diferentes de empaquetamiento dentro de una sola bicapa. En consecuencia, estas vesículas penetran en forma espontánea a través de membranas biológicas, experimentando cambios de forma, siempre que las deformaciones sean impuestas por el estrés o por espacios confinados, minimizando el riesgo de la ruptura de las vesículas al pasar por los poros de la piel (El Zaafarany *et al.*, 2010; Aggarwal y Goindi, 2012). El porcentaje de deformabilidad fue calculado usando la siguiente formula:

$$\% \text{ de deformabilidad} = \frac{\text{Tamaño de los LE antes de la extrusión} - \text{Tamaño de los LE despues de la extrusión}}{\text{Tamaño de los LE antes de la extrusión}} \times 100$$

La tabla 8, muestra el tamaño promedio obtenido antes y después de pasarlos a través de una membrana con tamaño de poro de 50 nm, así como el porcentaje de deformabilidad. El tamaño de los liposomas elásticos incluyendo al Tween® 80 cambia ligeramente después de pasarlos a través de una membrana con un tamaño de poro de 50 nm (~ 15% de deformabilidad), mientras que los liposomas rígidos permanecen en la superficie de la membrana, y no fue posible extruirlos manualmente.

Estos resultados evidencian la habilidad de estas vesículas para deformarse, debido a la presencia del Tween® 80, el cual permite que los liposomas cambien su forma cuando son sometidos a estrés sin ruptura de la vesícula. Este efecto puede ser atribuido a la propensión del Tween® 80 para formar estructuras altamente curvadas (e.g., micelas), disminuyendo así la energía requerida para la deformación de la vesícula. Es de esperarse que las vesículas rígidas se rompan y alcancen un tamaño cercano al de los poros de la membrana (en este caso 50 nm), sin embargo, en el caso de los liposomas convencionales, como se explicó antes, no pudieron pasar a través de la membrana cuando se aplicó presión manual.

Se ha observado que la deformabilidad de los liposomas elásticos es afectada por el tipo de activador de superficie usado, lo cual puede ser interpretado por las diferencias en sus estructuras químicas. El Zaafarany *et al.*, (2010) encontraron que los liposomas preparados con Tween® 80

presentaban mayor deformabilidad, debido probablemente a su elevada flexibilidad y a sus cadenas hidrocarbonadas no voluminosas (anexo 4).

Tabla 8. Tamaño promedio (nm) de los liposomas elásticos y liposomas convencionales antes y después de la extrusión manual a través de una membrana de policarbonato con un tamaño de poro de 50 nm (n=9)

| Formulación | Antes | Después | Deformabilidad (%) |
|---|----------------|------------------------------------|--------------------|
| Liposomas elásticos sin KT | 130.12 ± 2.917 | 110.07 ± 2.903 | 15.41 ± 1.60 |
| Liposomas elásticos con KT (Encapsulado y libre) | 127.88 ± 3.435 | 109.57 ± 2.641 | 14.29 ± 1.92 |
| Liposomas rígidos sin KT | 152.7 ± 1.749 | No pasaron a través de la membrana | No aplica |

6.2.6 Estabilidad de los liposomas elásticos

La estabilidad física de una suspensión de liposomas se determina por su comportamiento coloidal y su capacidad para retener las moléculas encapsuladas por largos períodos de tiempo, bajo diferentes condiciones de almacenamiento. Idealmente, los liposomas deben mantener su integridad a través del tiempo. Durante el almacenamiento de las dispersiones liposomales el control sobre el tamaño de vesícula es una variable importante en términos de estabilidad física. Las dispersiones de liposomas tienen una elevada energía superficial asociada a la enorme superficie que presentan. Desde el punto de vista termodinámico son inestables y tienden de forma natural a agregarse o fusionarse, para así disminuir su energía libre superficial y su área. Los liposomas pequeños son propensos a la fusión debido a la elevada curvatura de su membrana. En los liposomas grandes eléctricamente neutros, ocurre la agregación a través de las fuerzas de van der Waals debido a la gran área de contacto de la membrana (New, 1990). El fenómeno de coalición y agregación puede conducir al incremento del tamaño de los liposomas, por lo que el monitoreo del tamaño de vesícula es un parámetro útil para medir la estabilidad de estos sistemas. En la figura 24 se observa el cambio del tamaño de los LE almacenados a 4°C con respecto al tiempo. No se encontraron diferencias significativas ($p > 0.05$) en el tamaño durante las primeras siete semanas, sin embargo, después un año de almacenamiento a 4°C, el incremento del tamaño fue de aproximadamente 4.5 %. Encontrándose que este aumento si es estadísticamente significativo al realizarse un análisis de varianza y comparaciones múltiples ($P < 0.05$) con respecto al tamaño inicial (Anexo 5).

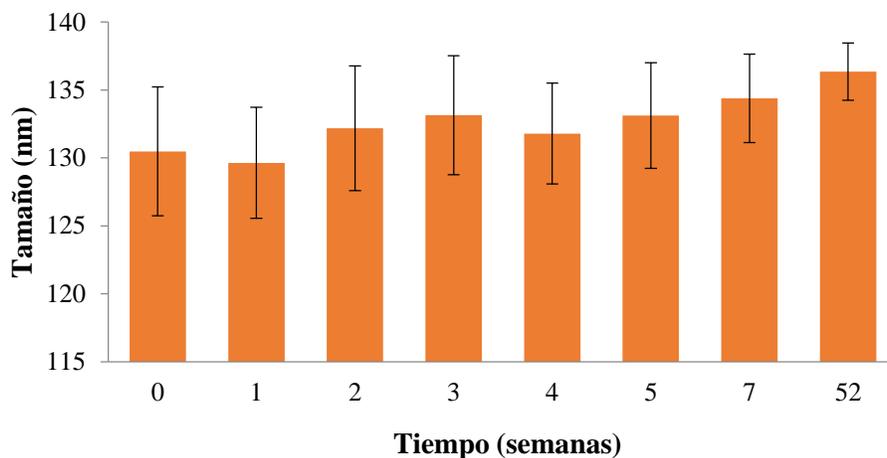


Figura 24. Tamaño de los liposomas elásticos en función del tiempo

Como se mostró en la figura 24 el tamaño promedio de las vesículas no se modificó de manera importante a lo largo de un año, sin embargo otro factor que se debe tomar en cuenta es el índice de polidispersión, el cual refleja la homogeneidad en el tamaño de las vesículas. En la figura 25 se muestra el cambio en el índice de polidispersión a través del tiempo, puede observarse que este no cambia significativamente ($p > 0.05$), manteniéndose por debajo de 0.1 indicando que se mantiene una distribución de tamaño homogénea. El aumento en el índice de polidispersión habría significado que aunque se mantuviese el tamaño promedio, se tendría un aumento en la diversidad de los tamaños, indicando la ruptura y/o fusión de los liposomas.

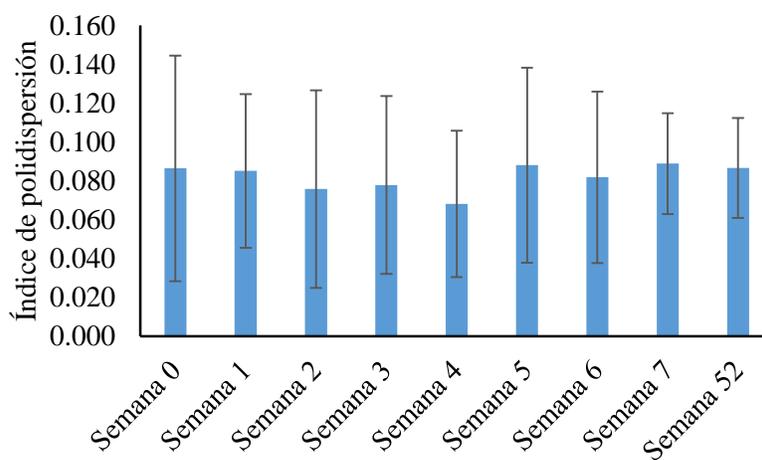


Figura 25. Cambio en el índice de polidispersión a través del tiempo

El potencial Z es un parámetro muy útil para monitorear la estabilidad de las vesículas liposomales y para verificar la reproducibilidad de diferentes lotes de una misma preparación ya que este es muy sensible a las transiciones de fase de los lípidos y a las modificaciones de la superficie de la

vesícula. La figura 26 muestra el cambio de potencial zeta respecto al tiempo. Como se puede observar, el almacenamiento a 4°C no afectó el potencial zeta de los LE durante 7 semanas. Este resultado no concuerda con lo encontrado por Lee *et al* (2005), quienes reportaron que el valor del potencial zeta cambia dramáticamente en 28 días a 4°C independientemente del activador de superficie empleado. Previamente, Olbrich y Muller (1999) reportaron que el colato de sodio usado como tensioactivo de recubrimiento de nanopartículas lipídicas sólidas aceleró la degradación de las mismas, mientras que el Tween® 80 causó un retraso en la degradación debido a la estabilización estérica. Una de las principales diferencias entre los liposomas rígidos y los liposomas elásticos es la elevada hidrofilia de estos últimos, lo cual permite a la membrana hincharse más que los liposomas convencionales. La hidrofilia y flexibilidad de los liposomas elásticos evitan la agregación y fusión observadas normalmente cuando los liposomas rígidos sufren estrés osmótico.

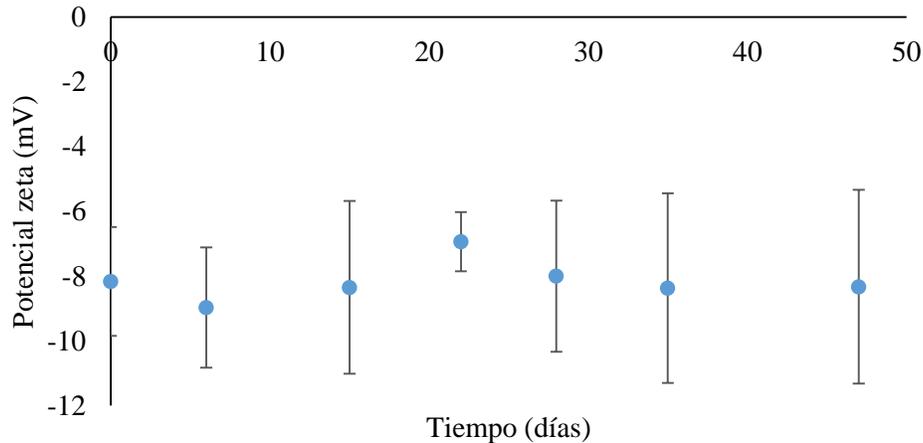


Figura 26. Cambio del Potencial Z de los liposomas elásticos en función del tiempo

El potencial zeta y el tamaño de partícula son parámetros importantes útiles para determinar la estabilidad de un sistema disperso. Valores elevados de potencial zeta, ya sean positivos o negativos, conducen a sistemas más estables debido a su fuerte repulsión electrostática. Aunque en este estudio los liposomas elásticos presentan un potencial zeta moderado (-12mV), mostraron ser estables por un año, lo cual puede ser atribuido a la estabilización estérica dada por el Tween® 80. Se ha mencionado que las cadenas alquílicas están presentes sobre la superficie de las vesículas, por lo que se espera una estabilización estérica en la proximidad de cada vesícula debido al ordenamiento de la cadena y a la disminución de la entropía.

También se evaluó la capacidad de los liposomas elásticos de retener en su interior al fármaco, manteniendo los liposomas elásticos a 4°C a las 1, 2, 3, 4 y 11 semanas. Como se muestra en la figura 27, el contenido de fármaco decrece aproximadamente 52 % después de 11 semanas de

almacenamiento con respecto al contenido inicial, no hubo diferencias significativas durante las tres primeras semanas (prueba de Duncan). Aunque las vesículas no experimentaron cambios en el tamaño, ni en el índice de polidispersión, ni en el potencial zeta bajo las condiciones de prueba ensayadas, los LE sólo mostraron ser capaces de retener el fármaco encapsulado durante tres semanas, lo cual puede indicar que la liberación del KT del sistema liposomal no fue resultado de procesos de agregación y fusión de las vesículas, sino debido a la permeabilidad de las bicapas lipídicas incrementada por la presencia del tensioactivo y a la naturaleza hidrofílica del fármaco.

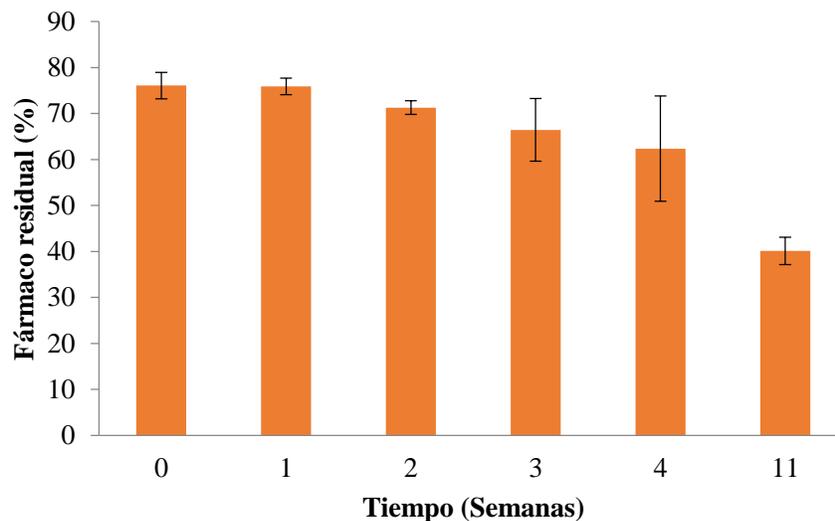


Figura 27. Cambio en la cantidad de fármaco encapsulado a través del tiempo

6.3 Liberación *in vitro*

Los aspectos importantes que se requiere investigar de un sistema de liberación transdérmico son: 1) las características de liberación del fármaco a partir del vehículo y 2) evaluar cuantitativamente el transporte del fármaco a través del estrato córneo. Los estudios de liberación se centran en la realización de experimentos de difusión utilizando una membrana no limitante para la velocidad de difusión (Fitzpatrick y Corish, 2005). En este trabajo, para verificar que la membrana de diálisis no afectaba el paso del fármaco, se realizó un estudio de difusión de la solución del fármaco en una bolsa de diálisis, como puede verse en la figura 28, más del 90% del KT se liberó en 2 horas, por lo que podemos decir que la membrana de diálisis no limita la difusión del fármaco.

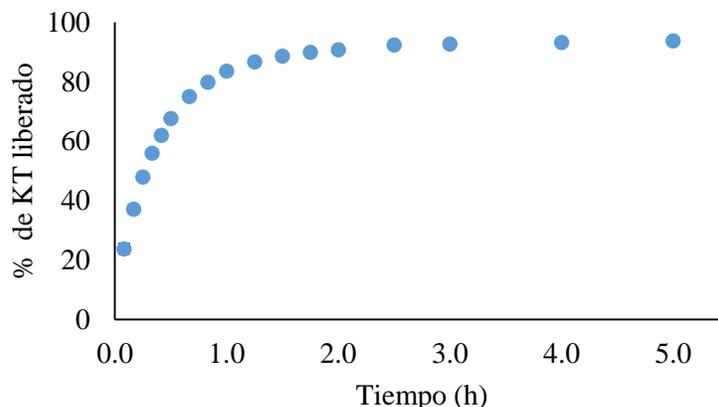


Figura 28. Prueba de difusión del KT en una bolsa de diálisis

Las condiciones de prueba fueron seleccionadas para respetar las condiciones *sink* en el compartimento receptor. Es importante señalar que las cinéticas de liberación son muy sensibles al mantenimiento de las condiciones *sink* pues cualquier factor capaz de perturbar estas condiciones alterarán el perfil de liberación. La solubilidad del KT en el medio receptor fue de 570.7 mg/mL que es mucho mayor a 10 veces la máxima concentración de KT que puede ser encontrada en el medio receptor.

Como se sabe, el grado de difusión y el coeficiente de permeabilidad (P) de un soluto a través de una membrana semipermeable es gobernada por el gradiente de concentración entre el donador y el sitio receptor. El grado de difusión del fármaco en la fase receptora puede ser descrito por la cinética de primer orden (bajo condiciones *sink*), pero la difusión del fármaco a partir del sistema disperso está gobernada por la transferencia de la molécula a partir de los LE hacia la fase externa acuosa y luego por la difusión de la molécula a través de la membrana de diálisis hacia la solución receptora. Solo las moléculas presentes en la fase acuosa externa son capaces de permear a través de la membrana (Trotta *et al.*, 2004; Larsen *et al.*, 2006; Larsen *et al.*, 2007).

La figura 29 muestra el perfil de liberación *in vitro* del KT a partir de los liposomas elásticos y de una solución acuosa con el mismo contenido de fármaco, usando regulador de biftalato de potasio pH 5.5 como solución receptora. Los perfiles de liberación exhiben un efecto meseta después de 4 horas de difusión para la solución y 8 horas para los LE. Esta meseta es debida a la depleción de la fase donadora, lo cual ocurre cuando la proporción del fármaco que ha difundido es grande en relación a la cantidad aplicada (dosis finita).

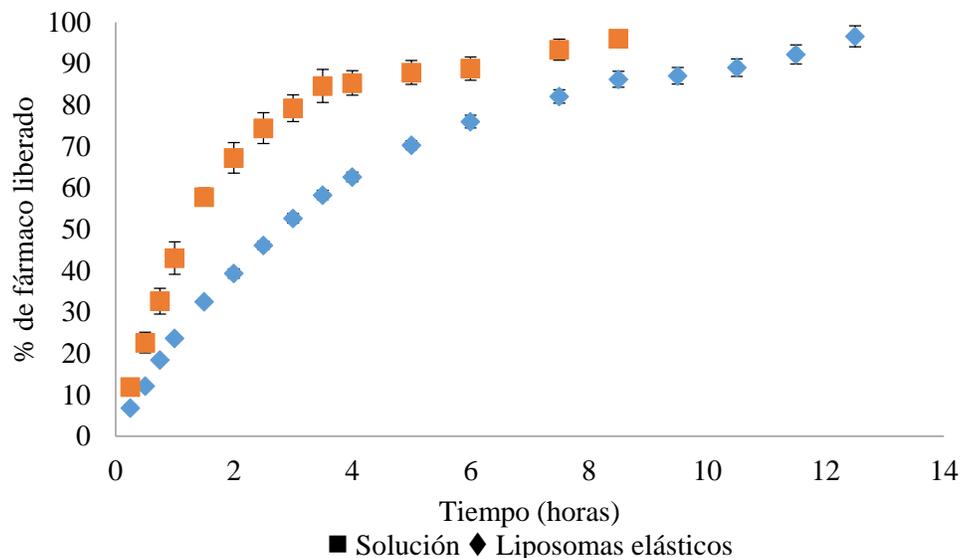


Figura 29. Perfiles de liberación del KT a partir de una solución y de liposomas elásticos.

Se puede observar que la liberación del KT a partir de los liposomas elásticos es más lenta, comparándola con la solución, estos resultados concuerdan con la conclusión general de que la encapsulación de fármacos en liposomas produce una liberación sostenida del mismo.

Se observó que el KT difundió rápidamente a partir de la solución. De hecho 85.3 % del activo estaba presente en el medio receptor a las 4 horas, a diferencia de la liberación a partir de los liposomas, en donde a las 4 horas se había liberado el 62.6 %. Al calcular el factor de similitud ($f_2 = 35$), se puede concluir que ambos perfiles son diferentes (Anexo 6).

En la solución se liberó el 97% en 8.5 horas, mientras que los LE liberaron esa misma cantidad a las 12.5 horas. En la tabla 9 se resume lo anteriormente expuesto.

Zhao *et al.* (2013) encontraron resultados similares, la solución de curcumina dio una liberación más alta y más rápida al no presentar encapsulación e interacción con los liposomas. Por el contrario los liposomas elásticos mantuvieron un crecimiento relativamente estable en el comportamiento de liberación del fármaco.

Tabla 9. Porcentajes de liberación de KT a diferentes tiempos

| Tiempo (horas) | % liberado de fármaco | |
|----------------|-----------------------|---------------------|
| | Solución | Liposomas elásticos |
| 2 | 67.25 ± 3.72 | 39.33 ± 1.09 |
| 4 | 85.34 ± 2.96 | 62.66 ± 1.15 |
| 6 | 88.82 ± 2.82 | 76.04 ± 1.54 |
| 8.5 | 96.08 ± 1.57 | 86.24 ± 1.94 |

Se ha demostrado que la liberación de fármacos a partir de LE es altamente dependiente de su afinidad por la fase lipofílica. Se ha reportado que la liberación de diclofenaco sódico a partir de LE siguió el orden: Tween® 80 > colato de sodio (Liu *et al.*, 2013), mientras que la liberación de dexametasona a partir de LE siguió el siguiente orden: Span® 80 > deoxicolato de sodio > Tween® 80 (Jain *et al.*, 2003). Indicando que una diferencia en la naturaleza del fármaco puede afectar su dinámica de liberación. En este caso, aunque la inclusión del KT en los liposomas elásticos retarda su liberación, siendo más lenta que la difusión del fármaco en solución acuosa, la naturaleza hidrofílica del KT provoca una rápida liberación de este.

Los estudios de cinética de liberación fueron ajustados en varios modelos cinéticos: orden, primer orden y modelo de Higuchi. En la tabla 10 se muestran los coeficientes de correlación para los modelos propuestos.

Tabla 10. Coeficientes de correlación de los diferentes modelos ajustados

| Modelo | R ² |
|--------------|-----------------|
| Orden cero | 0.8845 ± 0.0017 |
| Primer orden | 0.9955 ± 0.0004 |
| Higuchi | 0.9975 ± 0.0004 |

Como puede verse la liberación se ajusta mejor al modelo de Higuchi. Esto indica que el mecanismo de liberación a partir de los LE fue debido a la difusión. Resultados similares se encontraron para la liberación de sertralina a partir de liposomas deformables cuyo perfil se ajustó al modelo de Higuchi (Gupta *et al.*, 2012), y para la liberación de diclofenaco sódico a partir de diferentes formulaciones de liposomas elásticos (El Zaafarany *et al.*, 2010).

6.4 Permeación *in vitro* y deposición en la piel del KT

Debido a su baja absorción percutánea, no hay formulaciones tópicas de KT en el mercado, por lo que es comúnmente administrado por vía oral o parenteral.

La permeación a través de la piel *in vitro* fue llevada a cabo en celdas verticales tipo Franz, la figura 30 muestra la permeación *in vitro* del KT formulado en liposomas elásticos y en solución acuosa. Contrario a lo que se esperaba, tanto los LE como la solución acuosa muestra el mismo perfil, permeando cantidades muy similares de KT a través de la piel. Esto significa que al menos *in vitro*, los liposomas elásticos no promueven la permeación del KT con respecto a la solución acuosa. Es importante enfatizar que el KT fue detectado en la solución receptora 12 horas después de iniciado el experimento, mostrando un tiempo de latencia muy largo. La cantidad residual de KT en la piel al final de la permeación fue mayor para la solución de fármaco ($70.15 \pm 24.25 \mu\text{g}$) que para el KT

encapsulado en los liposomas elásticos (12.61 ± 2.19 µg).

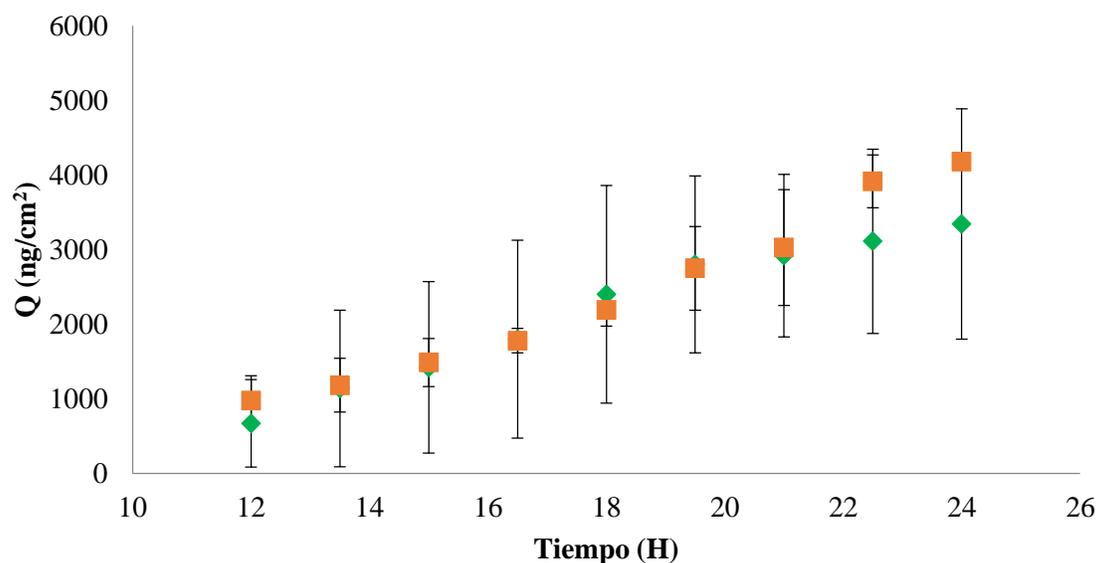


Figura 30. Permeación transdérmica de KT (■ liposomas elásticos, ◆ solución).

Una de las estrategias propuestas para mejorar la liberación transdérmica de fármacos es el uso de sistemas vesiculares, entre ellos, las vesículas elásticas aparecen como una muy interesante opción. Reportes previos han analizado la influencia del tamaño de las vesículas sobre su habilidad de penetrar dentro y a través de la piel; vesículas menores a 300 nm son capaces de liberar su contenido en capas profundas de la piel (Verma *et al.*, 2003). Por lo que liposomas de menor tamaño son considerados potencialmente útiles para la liberación de fármacos a través de la piel. En nuestro estudio, vesículas significativamente más pequeñas fueron obtenidas, con un tamaño promedio de 123 nm, por lo que se hubiese esperado un aumento en la capacidad de estas vesículas de penetrar a través de la piel.

Una posible explicación de la baja acumulación de KT en la piel después de la aplicación de LE se puede relacionar con las condiciones experimentales seguidas en el estudio. Dado que las vesículas permanecen bajo condiciones no oclusivas por un periodo de tiempo prolongado, a 32 °C, se promovió una excesiva deshidratación, y se formó una película sobre la superficie de la piel. De acuerdo con esto, nuestras vesículas no siguen el gradiente de hidratación sugerido como el mecanismo promotor, en su lugar, se fusionaron formando una película la cual retarda la penetración del fármaco.

Los resultados de flexibilidad pueden sugerir elasticidad de las vesículas, pero no demuestran la permeación a través de la piel.

Otra explicación es que estas vesículas elásticas no penetran a través de la piel, y que la penetración del fármaco ocurre una vez que éste es liberado a partir del sistema de liberación. Considerando que el KT es de naturaleza hidrofílica y que su absorción a través de la piel es muy pobre, una liberación rápida a partir del sistema no favorecería la partición del KT dentro del estrato córneo y por lo tanto la permeación del fármaco. Finalmente, es muy probable que el modelo *in vitro* utilizado en este trabajo (celdas de Franz) no es el mejor modelo para estudiar el transporte de los liposomas elásticos, debido a la falta de un gradiente de hidratación similar al que se encuentra en condiciones *in vivo* (Jacobi *et al.*, 2005).

Nuestros resultados están de acuerdo con los reportados por Elsayed y colaboradores, quienes evaluaron la permeación *in vitro* de ketotifen formulado en liposomas deformables (DL) a través de piel del pabellón de la oreja de conejo, usando Tween® 80 como activador. Evaluaron tres formulaciones: DL con fármaco libre y encapsulado (DL-in/out), DL solo con fármaco encapsulado (DL-in) y DL solo con fármaco libre (DL-out: solución de fármaco adicionado a las vesículas). Encontrando que solo los sistemas que contenían fármaco libre mejoraron significativamente la permeación del fármaco y la deposición del fármaco en la piel después de 24 horas. Esto sugiere que, fármacos hidrófilos pueden no ser encapsulados para lograr efectos óptimos, por el contrario, la encapsulación de fármacos hidrofílicos pueden resultar en una lenta liberación en la superficie de la piel, donde los fosfolípidos pueden formar una barrera lipídica (Elsayed *et al.*, 2006). En nuestro caso, se observó una película lipídica sobre la piel una vez que la formulación se deshidrató. Otros estudios han también demostrado que la formulación de fármacos hidrofílicos en liposomas elásticos tienen poco o nulo efecto sobre la permeación percutánea (El Maghraby *et al.*, 2001; Trotta *et al.*, 2002). Por otra parte, Bahia y colaboradores encontraron que las vesículas elásticas formadas por fosfatidilcolina y colato de sodio reducen el flujo transdérmico de calceína y que la permeación de la calceína es principalmente controlada por su liberación a partir de las vesículas. Los autores determinaron que la calceína es capaz de permear si está únicamente en forma no encapsulada (Bahia *et al.*, 2010). Cevc y colaboradores determinaron que el secado de la formulación (vesículas elásticas conteniendo ketoprofeno) en la superficie de la piel, podría incrementar la asociación del fármaco con el acarreador, resultando en una disminución del fármaco libre y consecuentemente en su permeación a través de la piel (Cevc *et al.*, 2008).

6.5 Estudios de permeación *in vivo*

6.5.1 Estudios de permeación pasiva *in vivo*

Al aplicar liposomas sobre la piel estos quedan confinados en el estrato córneo y no penetran profundamente, pero promueven la penetración de fármacos hidrofílicos y particularmente de

fármacos hidrofóbicos. Se han sugerido varias hipótesis del efecto promotor de los liposomas, una de ellas es la fluidización de los lípidos intercelulares, por lo que la promoción de la penetración que se ha observado cuando el fármaco es encapsulado en vesículas puede ser debido a modificaciones estructurales del EC y no a un mecanismo de vehiculización donde los liposomas pudieran penetrar en capas profundas de la piel.

En este trabajo se aplicaron los liposomas elásticos o una solución de fármaco sobre la piel y se determinó la cantidad de KT recuperada de cada cinta o grupo de cintas. Se calculó la cantidad total de KT en el EC (de la cinta 2 a la 16, la primera cinta fue eliminada) para determinar la capacidad reservorio de esta capa de la piel. Debido a razones analíticas, las cintas adhesivas se colectaron en viales de acuerdo al siguiente esquema: del vial 1 al 6 solo una cinta y del 7 al 16 dos cintas. Vial 1 = primer strip, vial 2 = Segundo strip..... vial 7 = 7-8 strips, vial 8 = 9-10 strips, vial 9 = 11-12 strips, vial 10 = 13-14 strips, vial 11 = 15-16 strips.

La cantidad acumulada de KT permeado en función del número de cinta se observa en la figura 31, se muestran los resultados de los seis voluntarios. Como puede observarse existe una elevada variabilidad entre los sujetos. Se puede observar que en algunos sujetos el KT formulado en liposomas elásticos permeó en mayor cantidad que cuando se aplicó en solución (voluntarios 2, 4 y 6; estadísticamente significativa excepto para el voluntario 4, anexo análisis estadístico), mientras que en los voluntarios 1 y 3 se observó una mayor penetración del KT cuando este se encontraba en solución (estadísticamente significativo, anexo 7) y para el voluntario 5 la cantidad permeada de KT fue prácticamente la misma para ambas formulaciones. Esto es debido en parte a la variación inherente entre la piel de los seis individuos, pero también se puede atribuir al hecho de que no se remueven cantidades reproducibles de estrato córneo como se mencionó previamente.

En la figura 32, se presentan los valores medios obtenidos de los seis voluntarios y los valores de las desviaciones estándar en la cantidad de KT en el EC son también similares para ambas formulaciones (liposomas elásticos y solución). La forma de las curvas obtenidas indica una relación logarítmica entre la cantidad acumulada de KT y las diferentes cintas. Se realizó el análisis de regresión logarítmico, y en la tabla 11 se muestran los parámetros a , m y el coeficiente de determinación R^2 .

Tabla 11. Parámetros matemáticos de la ecuación y coeficientes de determinación para los gráficos de la figura 3

| Formulación | m | a | R² |
|----------------------------|----------|----------|----------------------|
| Liposomas elásticos | 7.6402 | 5.419 | 0.9899 |
| Solución | 6.7315 | 4.533 | 0.9966 |

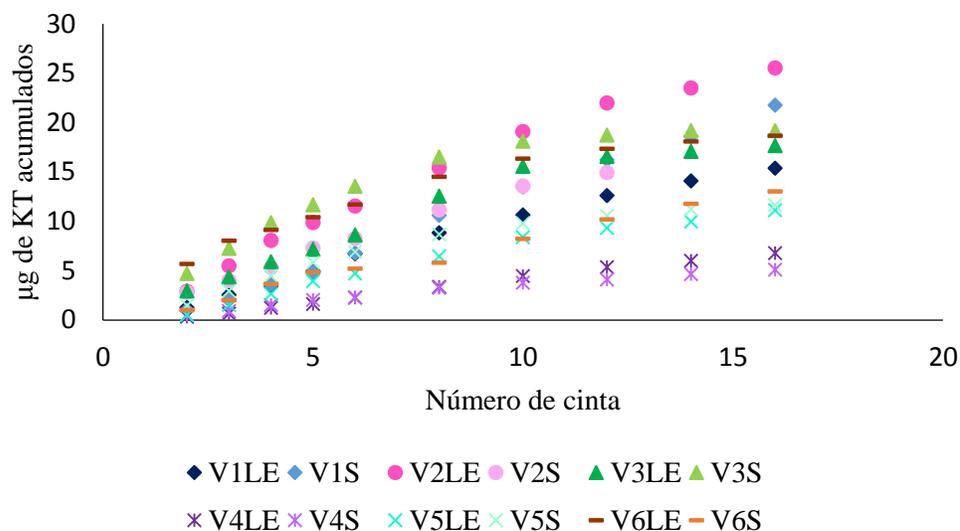


Figura 31. Perfil de permeación pasiva *in vivo* del KT formulado en vesículas elásticas y en solución (V = voluntario, LE = liposomas elásticos y S = solución)

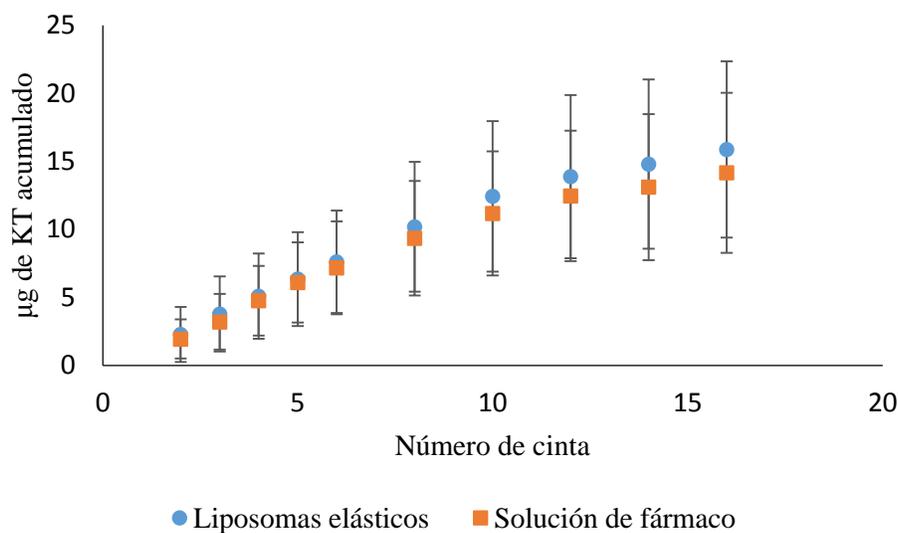


Figura 32. Valores medios del perfil de permeación pasiva *in vivo* del KT formulado en vesículas elásticas y en solución.

Se puede ver que ambas formulaciones se ajustan a la línea recta teniendo elevados coeficientes de correlación. La pendiente representa la tasa de penetración en el interior del estrato córneo, esta es ligeramente mayor para los liposomas elásticos, aunque esta diferencia no es significativamente diferente. Por lo que se puede concluir que el grado de penetración del KT en la piel es similar independientemente del vehículo.

El peso de las capas de EC se usó para calcular el espesor del EC y así obtener el perfil de profundidad de la concentración de fármaco. El espesor del EC se puede calcular mediante la siguiente ecuación (Dragicevic *et al.*, 2010):

$$T = \frac{d}{a * \rho}$$

Donde T es el espesor de EC removido (μm), d es la diferencia en el peso de las cintas antes y después de realizar el “stripping” (μg), a es el área de stripping (μm^2) y ρ es la densidad del EC ($10^6 \mu\text{g}/\text{cm}^3$). Usando esta ecuación se puede estimar el espesor acumulativo del EC. La figura 34 muestra la cantidad de KT en el EC como función de la profundidad en la piel. Se muestra de manera individual ya que debido a las diferencias en la cohesividad del EC en cada voluntario resulta en diferentes cantidades removidas de EC con cada cinta. El perfil de penetración del fármaco muestra una gran variabilidad inter-individual, lo cual puede ser atribuido al tipo y a las propiedades de barrera de la piel de cada persona. Se midió la pérdida de agua transepidermal (TEWL) a cada voluntario antes del tratamiento como se muestra en la figura 33, Los valores de TEWL varían de 8.8 a 15.95 $\text{g}/\text{m}^2\text{h}$, por lo que no es sorprendente encontrar la variabilidad interindividual, tomando en cuenta el mecanismo de penetración de las vesículas elásticas y su relación con el gradiente de hidratación. La figura 34 muestra el perfil promedio ($n = 6$) de concentración del KT a través del EC humano. Puede verse que no hay diferencia significativa al aplicar el KT en liposomas elásticos o en solución. La cantidad de KT permeada en cada cinta o stripping en los voluntarios tratados con ambas formulaciones (liposomas elásticos y solución) es significativamente diferente ($P < 0.05$), sin embargo no hay diferencia significativa entre las formulaciones ($P > 0.05$), (Tabla 12).

Tabla 12. Análisis de Varianza para μg - Suma de Cuadrados Tipo III (pasiva)

| Fuente | Suma de Cuadrados | Gl | Cuadrado Medio | Razón-F | Valor-P |
|----------------------|-------------------|-----|----------------|---------|---------|
| EFFECTOS PRINCIPALES | | | | | |
| A: No. De cinta | 78.7752 | 10 | 7.87752 | 4.07 | 0.0001 |
| B: Formulación | 0.543851 | 1 | 0.543851 | 0.28 | 0.5971 |
| RESIDUOS | 232.395 | 120 | 1.93663 | | |
| TOTAL (CORREGIDO) | 311.714 | 131 | | | |

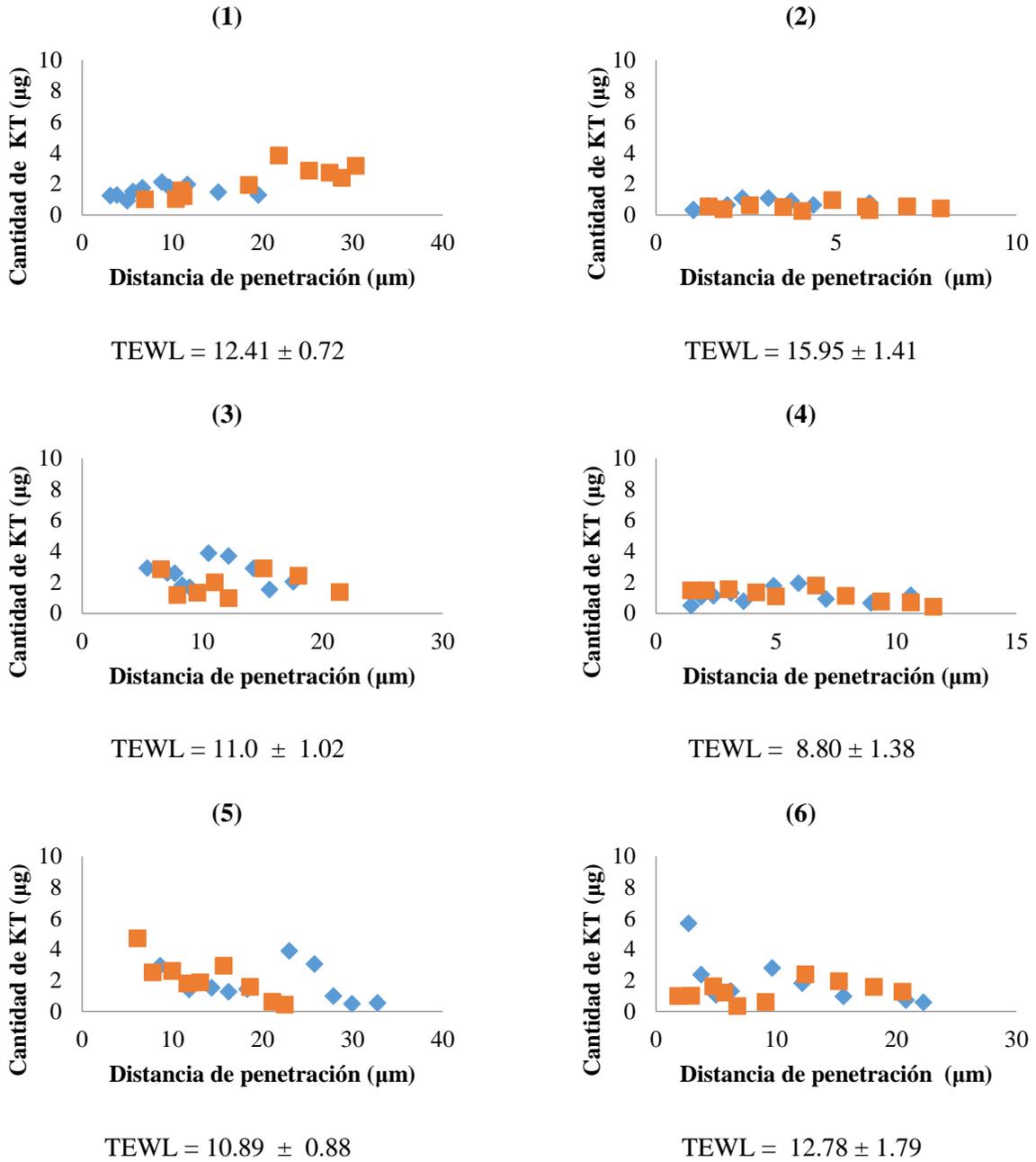


Figura 33. Cantidad de KT vs profundidad de EC después de una hora de tratamiento para los voluntarios, 1, 2, 3, 4, 5 y 6. (◆ = LE; ■ = S). Medida del TEWL (g/m^2h) antes del tratamiento.

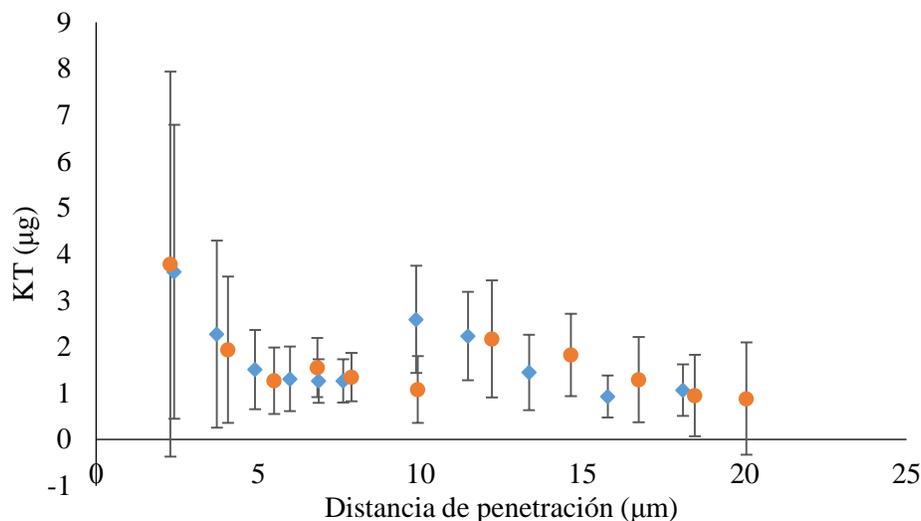


Figura 34. Perfil de penetración a través de EC humano *in vivo* de KT formulado en liposomas elásticos (◆) y en solución (●), n = 6

La cantidad total permeada de fármaco al aplicar los liposomas elásticos (figura 35) y la distancia de penetración (figura 36) contra los valores de TEWL individuales revelan una buena correlación. A pesar de la variabilidad asociada a los experimentos de permeación *in vivo*, la regresión lineal de los datos resultan en un valor de r^2 de 0.8779 para la cantidad permeada en relación con el TEWL y un promedio de r^2 de 0.5266 para la distancia de penetración del KT dentro del estrato córneo en relación con el TEWL, la dependencia de la absorción transdérmica del fármaco (tanto para fármacos lipofílicos como hidrofílicos) con la hidratación de la piel ha sido previamente demostrada (se obtiene una relación lineal entre la penetración transdérmica de fármacos y el TEWL en el sitio de absorción (Rougier *et al.*, 1989)), el trabajo presente confirma que el mecanismo de penetración de los liposomas elásticos está relacionado con el gradiente de hidratación transcutáneo.

Las diferencias encontradas entre los estudios *ex vivo* e *in vivo* se relacionan con las condiciones de la prueba, la viabilidad del tejido y las características inter-especies. Después de una hora de contacto, la cantidad total permeada de KT *in vivo* al aplicarlo en liposomas elásticos fue de $15.93 \pm 6.42 \mu\text{g}$. Aunque las condiciones de las pruebas *ex vivo* e *in vivo* son diferentes y hacen que una comparación sea difícil, se puede estimar un flujo de $1.65 \pm 0.66 \mu\text{g}/\text{cm}^2 \text{ h}$ para la permeación *in vivo*. Este valor es seis veces más grande que el flujo obtenido *ex vivo* (a través de piel de oreja de cerdo) el cual fue de $0.278 \pm 0.1 \mu\text{g}/\text{cm}^2 \text{ h}$ después de doce horas de contacto. Lodén *et al* (2004) reportaron resultados similares al evaluar la permeación *in vitro* e *in vivo* de ketoprofeno formulado en un gel.

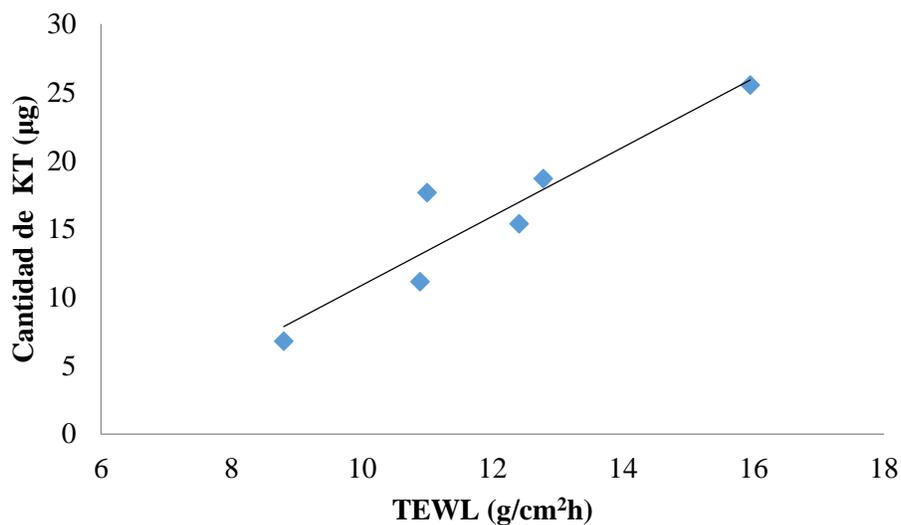


Figura 35. Correlación entre la pérdida de agua transepidérmica de los voluntarios y la cantidad total permeada del KT

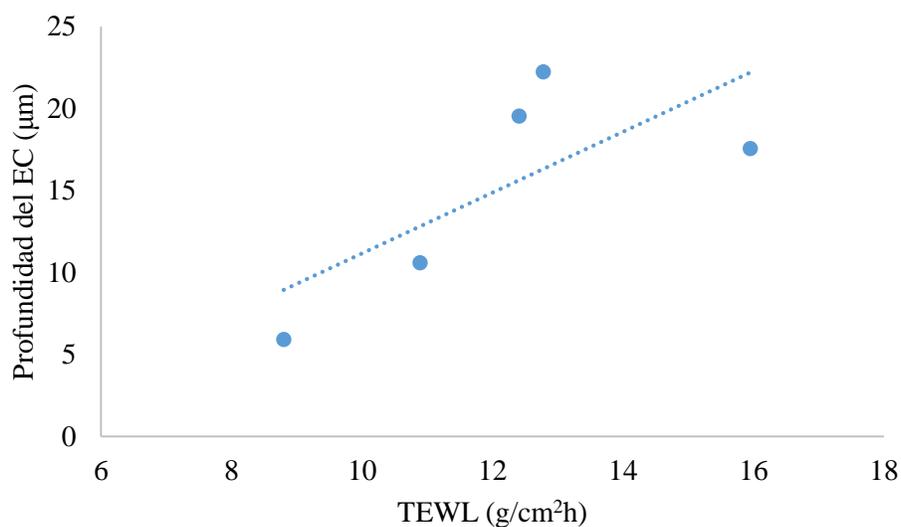


Figura 36. Correlación entre la pérdida de agua transepidérmica de los voluntarios y la distancia de penetración

6.5.2 Estudios de permeación *in vivo* utilizando como promotor de absorción la iontoforesis

Los promotores de permeación son a menudo usados en combinación, especialmente si sus mecanismos de acción son diferentes ya que se espera que actúen sinérgicamente y que por lo tanto la promoción de la liberación transdérmica sea superior en comparación con la utilización de cada promotor de manera individual. Además se piensa que se puede mejorar la seguridad sobre el uso

de los promotores, pues si ocurre sinergismo entonces se podrían usar con protocolos menos severos (ej. iontoforesis: menor corriente aplicada o concentraciones más bajas en el caso de los promotores químicos). En este trabajo se estudió el efecto que tiene el uso conjunto de liposomas elásticos e iontoforesis sobre la permeación transdérmica de KT.

La combinación de ambos sistemas puede proporcionar una tasa constante de entrada de fármaco sin las restricciones de los dispositivos transdérmicos tradicionales basados en la difusión, tales como el tamaño molecular y la lipofilia (Fang *et al.*, 1999).

La cantidad acumulada de KT permeado en función del número de cinta se observa en la figura 37 para la solución y en la figura 38 para los liposomas elásticos.

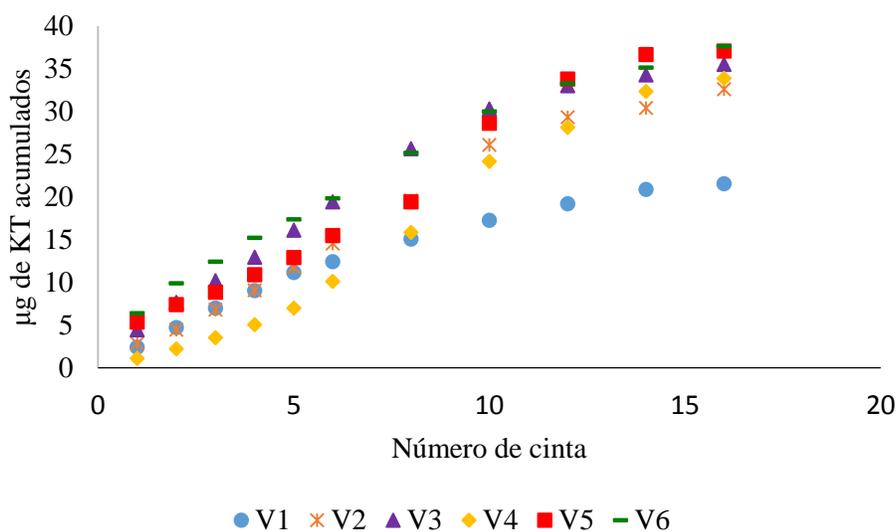


Figura 37. Perfil de permeación iontoforética *in vivo* del KT formulado en solución (V = voluntario).

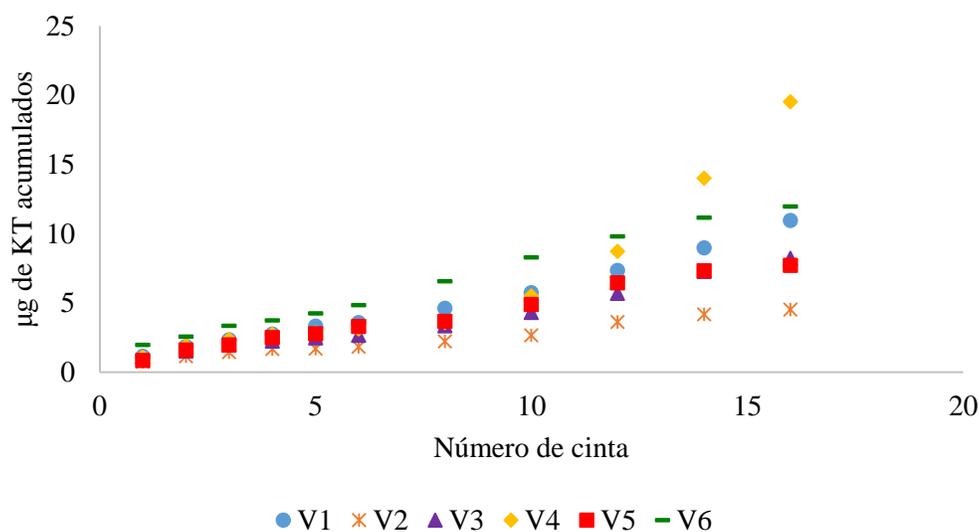


Figura 38. Perfil de permeación iontoforética *in vivo* del KT formulado en liposomas elásticos (V = voluntario).

En las figuras 39 y 40 se observa que la aplicación de la iontoforesis disminuyó la variación interindividual con respecto a la cantidad acumulada de fármaco en relación a la permeación pasiva. En la figura 41 se muestran los valores medios de los seis voluntarios y los valores de las desviaciones estándar en la cantidad de KT en el EC. Al aplicar la iontoforesis el fármaco penetró en mayor proporción cuando se administró en solución que en los liposomas elásticos (diferencias estadísticamente significativas). A diferencia de la permeación pasiva, la forma de la curva obtenida indica una relación lineal entre la cantidad acumulada de fármaco y las diferentes cintas (R^2 para la solución de 0.9811 y para los liposomas elásticos de 0.9654).

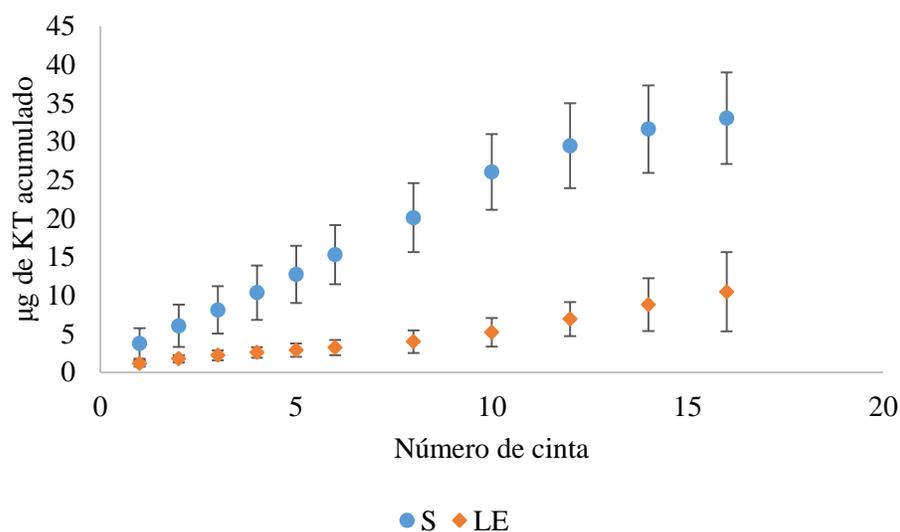


Figura 39. Valores medios del perfil de permeación iontoforética *in vivo* del KT formulado en vesículas elásticas y en solución.

La figura 41 muestra los valores individuales de la cantidad de KT en el EC como función de la profundidad en la piel cuando se aplica en solución o en liposomas elásticos por medio de la iontoforesis. El perfil de penetración del fármaco mostró una gran variabilidad inter-individual, lo cual puede ser atribuido al tipo y a las propiedades de barrera de la piel de cada persona. El análisis de varianza (tipo III) mostró que existía diferencia significativa entre aplicar la solución de fármaco o liposomas elásticos por cada voluntario, encontrándose diferencias significativas ($P < 0.05$, anexo 8). Ello indica que el KT administrado iontoforéticamente en solución permeó en mayor cantidad que cuando se administró en LE.

La figura 42 muestra el perfil promedio ($n = 5$) de concentración del KT a través del EC humano al aplicar iontoforesis. Puede verse que hay diferencia significativa al aplicar el KT en liposomas elásticos o en solución. La cantidad de KT permeada en cada cinta o stripping en los voluntarios

tratados con ambas formulaciones (liposomas elásticos y solución) es significativamente diferente ($P < 0.05$), también hay diferencia significativa entre las formulaciones ($P < 0.05$), (Tabla 13).

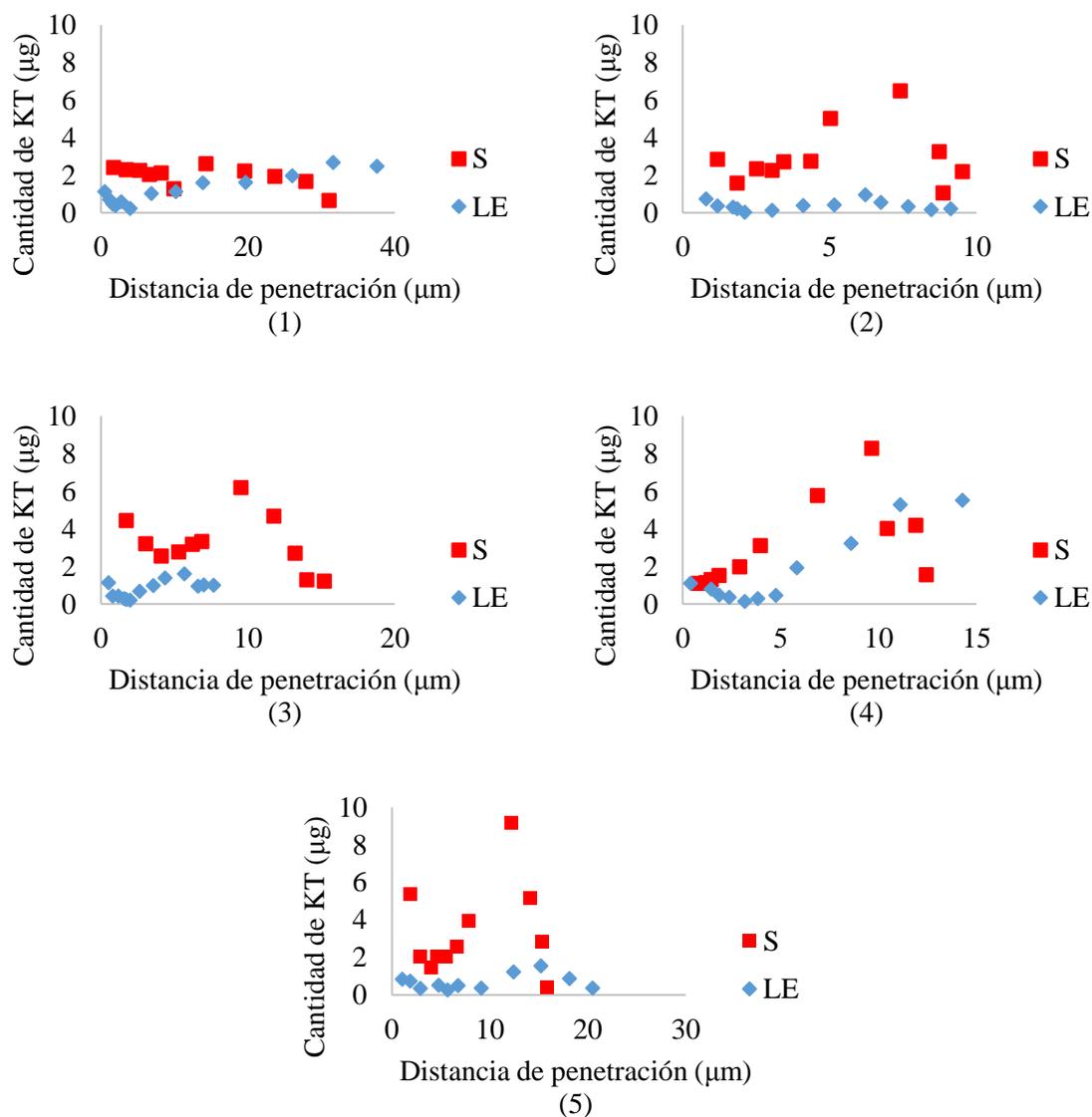


Figura 40. Cantidad de KT vs profundidad de EC después de aplicar 20 minutos de iontoforesis (0.25 mA/cm²) seguida de 40 minutos de difusión pasiva para los voluntarios, 1, 2, 3, 4 y 5 (♦ = LE; ■ = S). Nota. Para el voluntario 6 no se pudieron obtener las distancias de penetración.

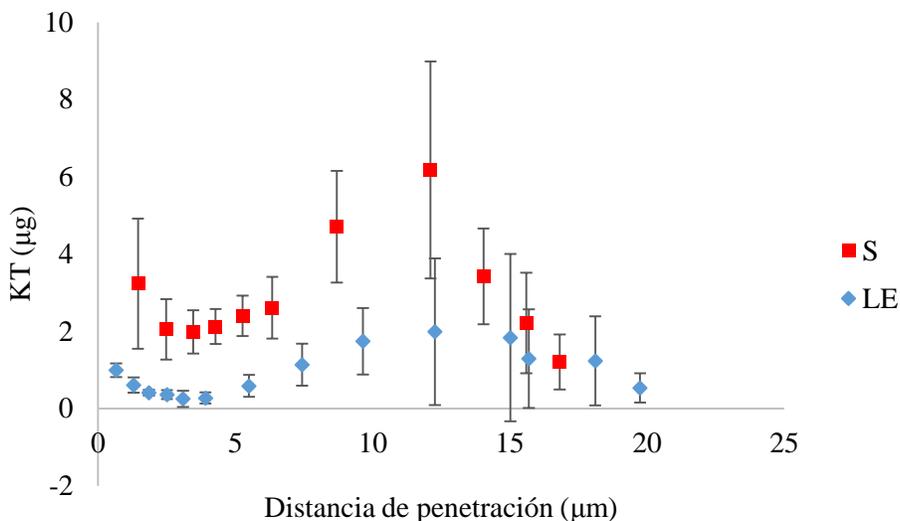


Figura 41. Perfil promedio de penetración a través de EC humano *in vivo* de KT formulado en liposomas elásticos (♦) y en solución (■) aplicando iontoforesis, n = 5

Tabla 13. Análisis de Varianza para µg - Suma de Cuadrados Tipo III para la cantidad permeada iontoforéticamente en los voluntarios tratados con liposomas elásticos y solución

| Fuente | Suma de Cuadrados | de Gl | Cuadrado Medio | Razón-F | Valor-P |
|----------------------|-------------------|-------|----------------|---------|---------|
| EFFECTOS PRINCIPALES | | | | | |
| A:No. Cinta | 61,2977 | 10 | 6,12977 | 3,45 | 0,0007 |
| B:Formulación | 109,454 | 1 | 109,454 | 61,57 | 0,0000 |
| RESIDUOS | 174,212 | 98 | 1,77768 | | |
| TOTAL (CORREGIDO) | 344,964 | 109 | | | |

La figura 42 muestra la cantidad total permeada de KT de las dos formulaciones (LE y solución) siguiendo la administración pasiva o iontoforética del fármaco *in vivo*. Los experimentos *in vivo* muestran que cuando se administra iontoforéticamente el KT en solución penetra en mayor cantidad ($32.13 \pm 6.15 \mu\text{g}$) que cuando se administra en liposomas elásticos ($10.18 \pm 5.70 \mu\text{g}$). La administración de la solución de KT iontoforéticamente también es superior a la administración pasiva del fármaco en solución ($14.29 \pm 5.89 \mu\text{g}$) y en liposomas elásticos ($15.87 \pm 6.48 \mu\text{g}$). La comparación estadística (ANOVA de un factor) seguida de la prueba de Tukey para estos datos sustenta los resultados encontrados: Se encontró diferencia significativa entre la aplicación del fármaco en solución por iontoforesis y la difusión pasiva de la solución del fármaco; así como entre la administración del fármaco en liposomas elásticos por difusión pasiva o por iontoforesis. Con respecto a la distancia de penetración acumulada (Figura 43) no se encontraron diferencias

significativas ($p > 0.05$) entre los cuatro estudios realizados: difusión pasiva (solución y liposomas elásticos) e iontoforesis (solución y liposomas elásticos).

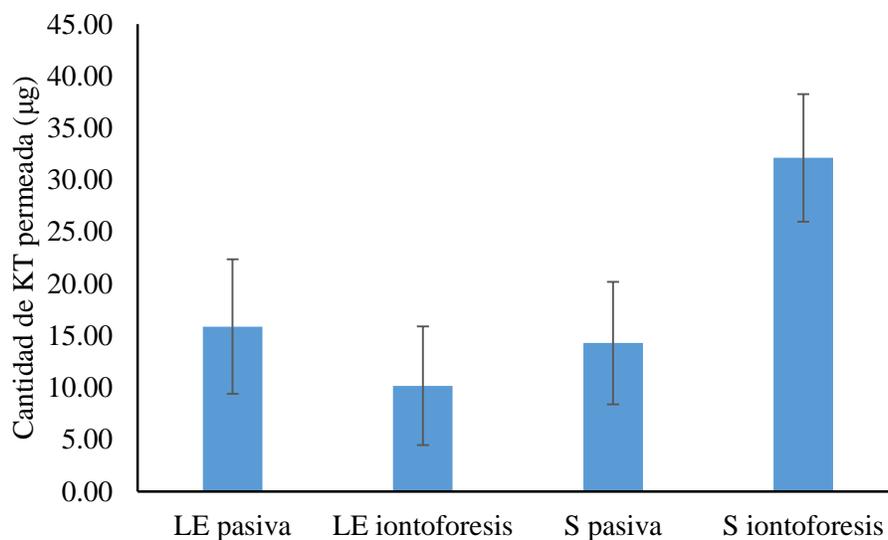


Figura 42. Cantidad total permeada de KT a través de piel humana (*in vivo*) en solución (S) o LE por difusión pasiva e iontoforesis

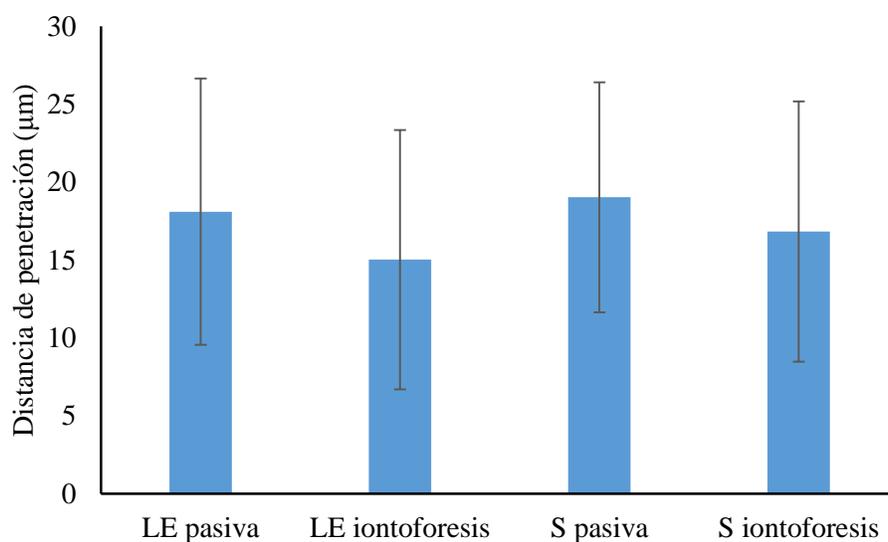


Figura 43. Distancia de penetración del KT en piel humana (*in vivo*) al administrarlo en solución (S) o LE por difusión pasiva e iontoforesis

En la tabla 14 se mencionan algunos estudios en los que se ha observado un efecto sinérgico con el uso conjunto de iontoforesis y liposomas. Sin embargo hay algunos reportes en los que no se observa este mismo efecto. Vutla *et al.* (1995) evaluaron el transporte iontoforético *in vitro* de una

formulación liposomal de [Leu⁵]encefalina a través de piel humana, utilizando una intensidad de corriente de 0.5 mA/cm², encontrando que la permeación fue la misma o menor (liposomas catiónicos y aniónicos, respectivamente) que la permeación del fármaco en solución. Fang *et al.* (1999) demostraron que la inclusión de fosfolípidos con carga en los liposomas alteró el comportamiento transdérmico de enoxicam bajo iontoforesis anódica. La permeación de enoxicam se redujo al incorporar estearilamina en los liposomas (liposomas cargados positivamente). En otro trabajo se encontró que la combinación de electroporación y liposomas disminuía la liberación transdérmica del fármaco (estradiol) comparado con la electroporación y una solución de fármaco no liposomal. La reducción de la permeación del fármaco puede no obstante ser debido a la reparación de la piel electroporada por los fosfolípidos de los liposomas (Essa *et al.*, 2003). Es por ello, que el sinergismo, o efecto aditivo del uso de dos o más promotores, o de un acarreador y un promotor de absorción, no puede ser asumido.

La variedad de efectos de la combinación liposomas/iontoforesis se ha relacionado con diferentes mecanismos los cuales pueden operar simultáneamente. El incremento de la permeación de fármacos al usar de manera conjunta iontoforesis y liposomas puede ser atribuido a: 1) la fusión de los fosfolípidos liposomales con el estrato córneo, lo cual incrementa la permeabilidad (Fang *et al.*, 1999; Essa *et al.*, 2002); 2) disminución de la resistencia de la piel por las vesículas elásticas (Li *et al.*, 2001); 3) incremento de la deformabilidad de los liposomas ultradeformables por la electricidad conduciendo a una mayor penetración a través de la piel (Essa *et al.*, 2002) y 4) la influencia de la carga del fármaco y el liposoma sobre su movimiento electroforético (Essa *et al.*, 2002; Fang *et al.*, 1996).

Tabla 14. Estudios del empleo conjunto de iontoforesis y vesículas

| Molécula | Tipo de vesículas | Intensidad de corriente y duración | Modelo | Referencia |
|-----------------------------|---------------------------|---|------------------------------|--------------------------------|
| Enoxicam | Liposomas aniónicos | 0.3 mA/cm ² , | Rata, <i>in vitro</i> | Fang <i>et al.</i> , 1999 |
| Apomorfina | Vesículas elásticas | 0.5 mA/cm ² , 9 horas | Piel humana, <i>in vitro</i> | Li <i>et al.</i> , 2001 |
| Adriamicina | Liposomas catiónicos | 0.2 a 0.4 mA/cm ² , 20 a 30 minutos. | Rata, <i>in vitro</i> | Han <i>et al.</i> , 2004 |
| Ciclosporina A | Vesículas de lecitina | 0.57 mA/cm ² , 5 horas | Piel humana, <i>in vitro</i> | Boinpally <i>et al.</i> , 2004 |
| Insulina | Liposomas catiónicos | 0.45 mA/cm ² , 1 hora | Rata, <i>in vivo</i> | Kajimoto <i>et al.</i> , 2011 |
| Superóxido dismutasa | Liposomas catiónicos | No especificado | Rata, <i>in vivo</i> | Kigasawa <i>et al.</i> , 2012 |
| Finasteride | Invasomas, carga negativa | 0.5 mA/cm ² | Conejo, <i>in vivo</i> | Prasanthi y Lakshmi, 2013 |

Entre los factores que ocasionan una disminución de la permeación del fármaco al aplicar de manera simultánea iontoforesis y liposomas se encuentran : 1) La carga del fármaco y los liposomas, ya que pueden influir en su movimiento electroforético; 2) el incremento de la estabilidad de los liposomas por el campo eléctrico conduciendo a la reducción de la liberación y permeación (Fang *et al.*, 1996) y 3) la protección del fármaco atrapado contra el metabolismo en la piel, lo cual conduce a una permeación más lenta de moléculas grandes intactas (Vutla *et al.*, 1995).

Existen pocos estudios sobre el efecto de la aplicación simultánea de iontoforesis y liposomas elásticos. Essa *et al.* (2002) encontraron un incremento en la penetración *in vitro* de estradiol colocado en el cátodo y lo atribuyeron a la reducción de las propiedades de barrera durante la iontoforesis, apoyando la hipótesis de que el campo eléctrico puede perturbar el orden de los lípidos lamelares intercelulares en el EC, dando lugar a una membrana más permeable. También encontraron que el uso conjunto de la iontoforesis y de los liposomas aumentó la permeación *in vitro* de estradiol, la cual fue dependiente de la intensidad de corriente aplicada; es decir a mayor densidad de corriente mayor permeación del fármaco, las intensidades de corriente que utilizaron fueron 0.2, 0.5 y 0.8 mA/cm² durante seis horas. Tal promoción en el flujo fue atribuida a la fuerza de repulsión electrostática entre los liposomas cargados negativamente y el cátodo, venciendo la permselectividad catiónica de la piel. La fuerza de repulsión entre la corriente aplicada y los liposomas elásticos cargados negativamente (potencial zeta de -29 mV) mueve los liposomas hacia y dentro de la piel, además los fosfolípidos de los liposomas se pueden adherir y fundir con el EC, alterando las propiedades de barrera y produciendo una estructura más permeable. La promoción de la penetración también puede ser debida a la elevada deformabilidad de las vesículas, esta elasticidad vesicular podría permitir que algunas vesículas penetren a través de la piel bajo el estrés impartido por la corriente eléctrica aplicada (Essa *et al.*, 2004).

La medida del potencial zeta confirmó la carga negativa de los LE obtenidos, por lo que el tipo de iontoforesis que se usó fue la catódica.

Se observa que la iontoforesis promovió el transporte del KT en solución pero no así cuando se encuentra formulado en liposomas elásticos, lo cual puede ser debido al hecho de que en una solución acuosa simple, las moléculas del fármaco son más susceptibles a la corriente. Para obtener el efecto máximo de los liposomas elásticos se recomienda aplicarlos de manera no oclusiva con la finalidad de no eliminar el gradiente de hidratación transdérmico, el cual es la principal fuerza impulsora para la penetración de las vesículas en la piel (Cevc *et al.*, 1993). Sin embargo, la aplicación *in vivo* de la iontoforesis requiere el uso de parches en los cuales se pueda colocar la

formulación (estos pueden ser de gasa, esponja de celulosa u otro material absorbente), los cuales modifican el gradiente de hidratación de la piel.

La limitada permeación del KT formulado en LE (cargados negativamente) y aplicando iontoforesis también puede ser atribuido a la permeabilidad selectiva de la piel, debido a su carga negativa a pH fisiológico, lo cual dificultaría la penetración del fármaco a partir de las vesículas cargadas negativamente. En los estudios en los que se ha encontrado un aumento en la permeación con iontoforesis catódica aplican densidades de corriente elevadas (0.8 mA/cm^2) y por tiempos prolongados de 5 a 8 horas en animales de laboratorio, además los liposomas elásticos contenían como activador de superficie colato de sodio, confiriendo a las vesículas una carga negativa grande de alrededor de -29 mV (Essa *et al.*, 2003; 2004). En el presente trabajo se aplicó una densidad de corriente menor (0.25 mA/cm^2) (intensidades de corriente más grandes no fueron toleradas por los voluntarios) durante un tiempo muy corto (20 minutos) y los LE presentaban una carga negativa moderada ($\sim -13\text{mV}$), lo cual concuerda con lo reportado por Essa *et al.* (2004), quienes encontraron que la mayor penetración iontoforética de estradiol a partir de las vesículas ultradeformables se obtiene cuando los LE presentan un potencial zeta elevado.

Otro factor que puede influir para que no se dé el efecto sinérgico entre los liposomas y la iontoforesis, es la forma de aplicación de los mismos. Por ejemplo, la iontoforesis catódica de las vesículas de lecitina conteniendo ciclosporina resultó en una menor permeación a través de la epidermis, a pesar de que las vesículas presentaban carga negativa. La baja permeación fue atribuida a la presencia de colato de sodio (activador de superficie con carga negativa). En cambio, la permeación de ciclosporina formulada en vesículas de lecitina aumento cuando se aplicó iontoforesis anódica, debido al flujo electroosmótico (se ha reportado que este flujo domina el mecanismo por el cual se promueve el flujo de moléculas grandes). Aparte de la electroósmosis, la flexibilidad de las vesículas debida al colato de sodio facilita la permeación durante la iontoforesis (Boinpally *et al.*, 2004). Se ha encontrado que los liposomas que mostraron pobres resultados durante la permeación iontoforética son aquellos que presentan propiedades aniónicas (Han *et al.*, 2004).

6.5.3 Determinaciones de pérdida de agua transepidermal

En general, la iontoforesis transdérmica es considerada como un procedimiento seguro, asociada con eritema moderado y sensación de hormigueo. Sin embargo, asegurar que la barrera de la piel mantiene su integridad durante la iontoforesis es un factor esencial para incrementar su aplicabilidad clínica (Kumar y Lin, 2008).

La iontoforesis puede producir picazón y eritema en la piel cuando se administran algunas sustancias como histamina (Ikoma *et al.*, 2005) o solución salina (Singh *et al.*, 2000). El eritema observado inmediatamente después de la iontoforesis puede ser debido al efecto directo de la corriente eléctrica sobre los vasos sanguíneos cutáneos y/o a que la corriente induce la liberación de histamina, prostaglandinas u otros neurotransmisores conduciendo a la vasodilatación local en el área afectada. También se ha sugerido que la corriente eléctrica estimula clases específicas de nociceptores, causando la liberación de vasodilatadores potentes, como la sustancia P y el péptido relacionado con el gen de la calcitonina (Anigbogu *et al.*, 2000).

En este estudio se observó un ligero eritema y picazón en la zona de aplicación cuando se administró KT en solución acuosa, que disminuyó o desapareció cuando se administró el fármaco iontoforéticamente formulado en liposomas elásticos. Conjeevaram *et al.* (2003) encontraron que la aplicación conjunta *in vivo* de iontoforesis (0.1 mA/cm² aplicada durante dos horas a través de un parche reservorio) y liposomas conteniendo propranolol reducía la irritación en la piel de rata.

La piel puede restablecer sus funciones de barrera en poco tiempo después de terminada la aplicación de la corriente y no se dañará permanentemente. Una de las formas de evaluar la función de barrera de la piel es midiendo la pérdida de agua transepidérmica.

La epidermis sirve como una barrera de permeabilidad que regula el movimiento transcutáneo de agua y el transporte de electrolitos. La TEWL es una medida de la cantidad de agua que pasa a través del EC a la atmósfera circundante a través de procesos de difusión y evaporación. La medida de la TEWL es una técnica no invasiva para evaluar la integridad del EC y es utilizada como una medida indirecta de las funciones de barrera de la piel. La TEWL generalmente se expresa en g/m²h. En piel normal sana la barrera de la piel es completamente efectiva y hay una baja tasa de pérdida de agua dando valores de TEWL bajos. La función de barrera comprometida debido a un incremento en la hidratación y el daño físico del EC se relacionan directamente con valores elevados de TEWL. Debido a lo anterior la medida de la TEWL es un método de rutina en dermatología para evaluar la integridad de la barrera de la piel *in vivo*. Cuando la piel está dañada, su función de barrera se deteriora dando como resultado una mayor pérdida de agua (Netzlaff *et al.*, 2006).

En la figura 44 se muestran los resultados obtenidos de la TEWL para cada voluntario. La medida de TEWL se realizó dos minutos después de la remoción del parche iontoforético para permitir la redistribución del agua dentro del SC. En las gráficas se observa que, independientemente de la formulación aplicada, al aplicar la iontoforesis incrementó la TEWL con el tiempo, y con excepción del voluntario 4, los valores de TEWL se mantuvieron más elevados cuando se aplicó la solución y la iontoforesis que cuando se aplicó los LE y la iontoforesis.

En la figura 45 y en la tabla 15, se muestran el valor relativo de la TEWL (el valor de TEWL obtenido después de cada tratamiento entre el valor basal. Este último corresponde al valor de TEWL antes del tratamiento) en función de los voluntarios que participaron en el estudio. Debido a que se observa que los valores de TEWL comienzan a descender, estos se dividieron en dos grupos: los obtenidos a los tres minutos y los obtenidos hasta los 4.5 minutos. Esto se hizo con la finalidad de evidenciar más el efecto de la aplicación de las formulaciones y la iontoforesis.

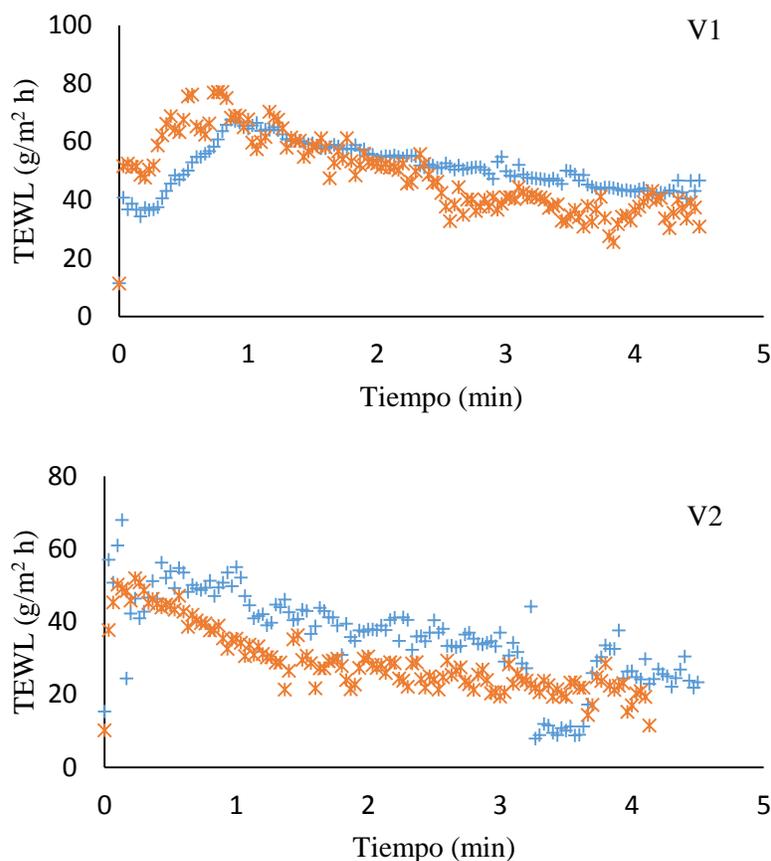
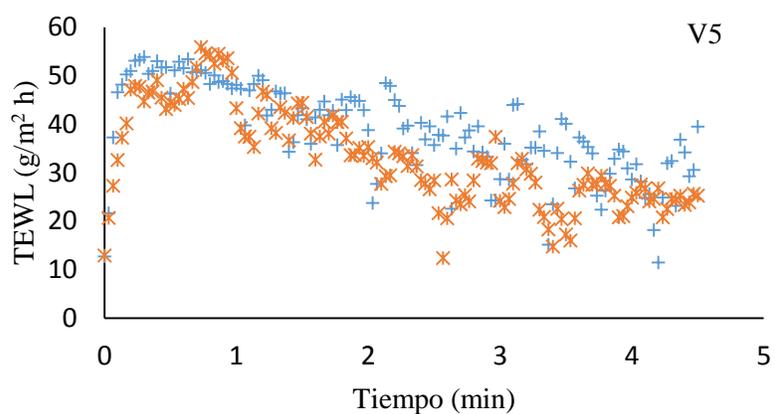
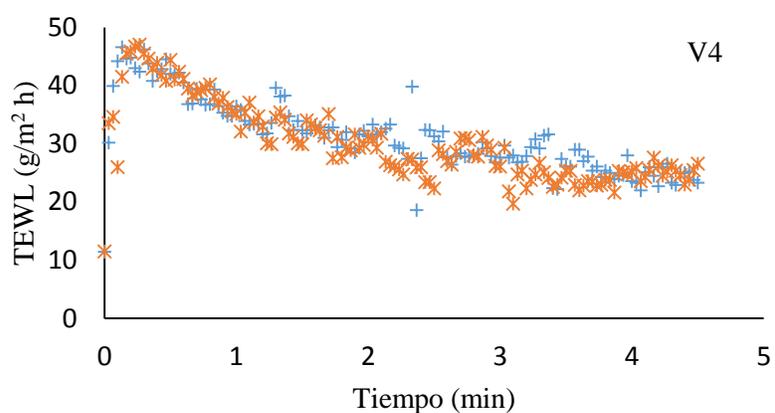
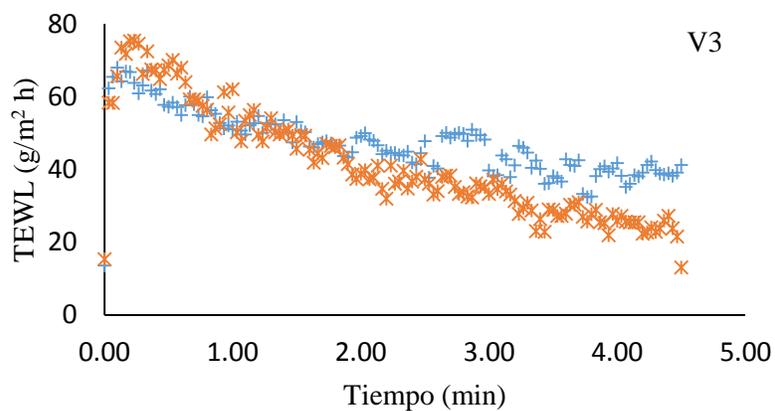


Figura 44. Valores de TEWL *in vivo*, obtenidos después de aplicar de manera conjunta una solución de fármaco (+) o liposomas elásticos (*) conteniendo KT e iontoforesis. TEWL a tiempo cero representa el valor basal (pre-tratamiento)



Continuación figura 44. Valores de TEWL *in vivo*, obtenidos después de aplicar de manera conjunta una solución de fármaco (+) o liposomas elásticos (*) conteniendo KT e iontoforesis. TEWL a tiempo cero representa el valor basal (pre-tratamiento)

Tabla 15. Valores relativos de TEWL. Seguimiento de la aplicación simultanea de iontoforesis con solución de fármaco o liposomas elásticos. Se reportan los valores obtenidos a los 3 min y a los 4.5 min.

| Voluntario | TEWL relativo (S, 3 min) | TEWL relativo (S, 4.5 min) | TEWL relativo (LE, 3 min) | TEWL relativo (LE, 4.5 min) |
|------------|--------------------------|----------------------------|---------------------------|-----------------------------|
| 1 | 4.74 ± 0.7 | 3.97 ± 0.23 | 4.69 ± 0.93 | 3.12 ± 0.36 |
| 2 | 2.76 ± 0.5 | 1.50 ± 0.59 | 3.17 ± 0.85 | 2.11 ± 0.35 |
| 3 | 3.79 ± 0.51 | 2.89 ± 0.23 | 3.19 ± 0.81 | 1.75 ± 0.27 |
| 4 | 2.99 ± 0.49 | 2.28 ± 0.22 | 2.89 ± 0.54 | 2.12 ± 0.15 |
| 5 | 3.34 ± 0.61 | 2.44 ± 0.54 | 2.92 ± 0.71 | 1.90 ± 0.31 |

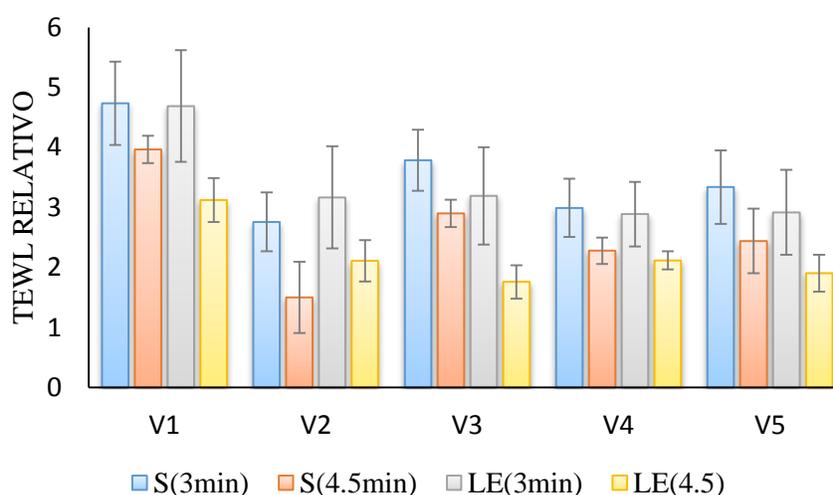


Figura 45. Valores relativos de TEWL después de aplicar KT formulado en solución o LE y aplicando iontoforesis. Se reportan los valores obtenidos a los 3 min y a los 4.5 min.

Como se puede apreciar (con excepción del voluntario 2), el retorno a valores más bajos de TEWL ocurre más rápido cuando se aplica LE y la iontoforesis, que cuando se aplica la solución de fármaco y la iontoforesis. Al realizar un análisis de varianza seguida de la prueba de Tukey se encontró que hay diferencias significativas en el TEWL relativo al aplicar una solución de fármaco o los LE ($P < 0.05$), también se encontraron diferencias significativas ($P < 0.05$, anexo 9) en el TEWL relativo para ambos tiempos.

Algunos autores atribuyen el aumento de la TEWL después de la aplicación de la iontoforesis a la oclusión del parche lo cual incrementa la hidratación de la piel y al calentamiento local asociado con la aplicación de la iontoforesis (Anigbogu *et al.*, 2000). Se ha reportado que la TEWL aumenta dependiendo de la intensidad y duración de la corriente aplicada (Brand *et al.*, 1997). La iontoforesis de bajo o moderado voltaje induce la formación de poros de manera reversible con un

tamaño semejante a los pre-existentes en la epidermis humana. La aplicación de corrientes grandes en la piel de conejo puede causar la formación de poros transitorios, dando como resultado el incremento del transporte de agua en la piel (Anigbogu *et al.*, 2000).

La iontoforesis (0.25 mA/cm², durante 3 horas) en combinación con el pretratamiento con un surfactante incrementa significativamente los valores de TEWL, pero no causan un daño permanente en la piel (Li *et al.*, 2005).

El que se recobrasen con mayor rapidez los valores de TEWL cuando se aplicó iontoforesis y LE, sugiere un proceso de reparación de la barrera por parte de los fosfolípidos de los liposomas. Este proceso de reparación ya ha sido reportado por otros autores. Essa *et al.* (2003) obtuvieron medidas bajas de TEWL después de un tratamiento conjunto de liposomas y electroporación y Dahlan *et al.* (2009) también obtuvieron valores de TEWL más bajos al aplicar de manera conjunta liposomas y ultrasonido, sugiriendo la reparación de los daños inducidos por estos tratamientos por los fosfolípidos de los liposomas. El mecanismo de esta reparación puede ser por la adsorción y fusión de los liposomas con la superficie de la piel, penetrando los fosfolípidos y bloqueando las regiones dañadas. También se observó que en el caso del ultrasonido los liposomas que fueron más eficientes en la reparación del daño fueron los de menor tamaño vesicular atribuido a que estos pueden penetrar de manera más eficiente en la piel y es posible que algunos liposomas penetren de manera intacta, incrementando el contenido lipídico de la piel y las propiedades de barrera contra el movimiento de vapor de agua en la misma, facilitando el retorno de la TEWL a los valores basales en menor tiempo. Aunque la reparación, fue dependiente del grado del daño ocasionado a la piel.

Cabe señalar que después de 30 minutos de aplicadas las formulaciones y la iontoforesis, todos los voluntarios regresaron a valores de TEWL basales, lo cual sugiere que si la función de barrera de la piel es ligeramente alterada después de la iontoforesis, la recuperación de la misma es rápida.

6.5.4 Estabilidad de los LE al aplicarles una corriente eléctrica

Para evaluar si la aplicación de una corriente eléctrica afectaba a los LE, se aplicó a una suspensión de liposomas una corriente de 0.5 mA/minuto durante 20 minutos (tiempo que se aplicó para los estudios de permeación aplicando iontoforesis) y posteriormente se midió el tamaño promedio de las vesículas y la eficiencia de encapsulamiento. En la figura 46 se muestra el cambio en el tamaño promedio que sufrieron los LE después de aplicarles la corriente eléctrica. Se puede observar una disminución en el tamaño (de 127.14 ± 2.08 a 121.92 ± 3.08), el cual es significativo ($P < 0.05$). Cabe señalar que no hay diferencia significativa en el IPD ($P > 0.05$), este se mantiene alrededor de 0.07 (Anexo 10).

La disminución en el tamaño puede atribuirse a la pérdida de material lipídico de los LE. El campo eléctrico puede causar movimiento de los electrolitos presentes así como de los lípidos. Por otra parte, el movimiento inducido por el campo eléctrico puede tener un efecto similar sobre el tamaño de las vesículas que el que tiene la aplicación de ultrasonido, liposomas grandes sometidos a ultrasonido reducen su tamaño y forman liposomas pequeños.

Essa *et al.*, (2003) evaluaron la estabilidad de liposomas elásticos al aplicarles impulsos eléctricos encontrando una tendencia a disminuir el tamaño de las vesículas después de aplicar el campo eléctrico (de 119 ± 4.2 nm a 113 ± 7.3 nm), indicando algún tipo de interacción entre los liposomas y el campo eléctrico, aunque esta reducción no fue significativa.

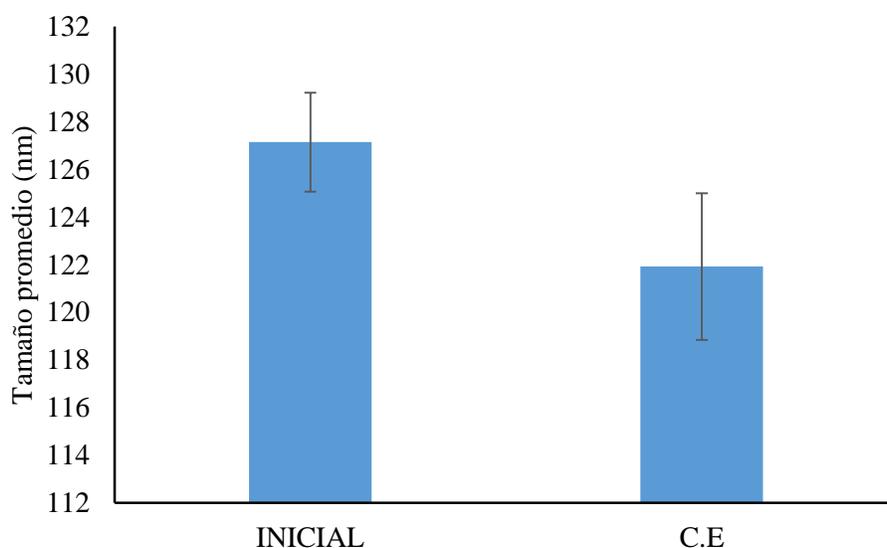


Figura 46. Tamaño promedio de los LE antes y después de aplicar una corriente eléctrica (C.E: corriente eléctrica)

También se evaluó si se promovía la liberación del fármaco a partir de los LE al aplicarles la corriente eléctrica. En la figura 47, se muestra el porcentaje de fármaco que se mantiene encapsulado después de aplicarles una corriente eléctrica de 0.5 mA/min, durante 20 minutos y puede observarse que no hay un cambio significativo ($p > 0.05$) en el porcentaje de fármaco que se mantiene encapsulado. Se esperaría que el porcentaje de fármaco encapsulado disminuyera después de aplicar la corriente eléctrica ya que se sabe que la aplicación de pulsos eléctricos puede inducir la ampliación o apertura de poros en las bicapas de fosfolípidos, dando como resultado la ruptura irreversible de los liposomas y la salida del fármaco. Sin embargo, en el presente estudio, el porcentaje de encapsulación del KT fue similar antes y después de aplicar la corriente eléctrica. Lo cual concuerda con lo reportado por Fang *et al.* (1999), quienes encontraron que después de aplicar

durante 6 h una corriente eléctrica de 0.5 mA, los porcentajes de encapsulación de enoxicam en liposomas aumentaron ligeramente, atribuyéndolo a que la aplicación de un campo eléctrico puede estabilizar e inhibir la apertura de los poros de las bicapas bajo ciertas condiciones. Y que para que ocurra el ensanchamiento de los poros y la ruptura de los liposomas se necesitan densidades de corriente mayores a la utilizada en este estudio.

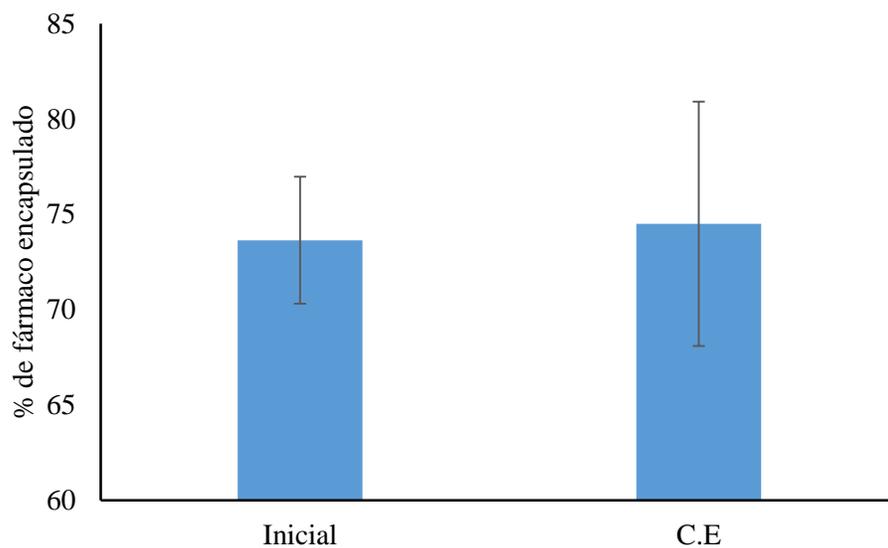


Figura 47. Porcentaje de KT encapsulado en LE antes y después de aplicar una corriente eléctrica (C.E: corriente eléctrica)

VII. CONCLUSIONES

La combinación del método convencional de hidratación de película con el de extrusión, junto con el establecimiento de las condiciones óptimas de preparación como: tiempo de exposición al ultrasonido (sonicación) y número de extrusiones a través de membranas de policarbonato, permitió obtener liposomas elásticos con excelente eficiencia de encapsulamiento de cerca de 73%. Los liposomas elásticos cargados con ketorolaco trometamina presentan un tamaño adecuado (123.3 ± 1.2 nm) y distribución estrecha (índice de polidispersión menor a 0.2). La reducción del tamaño de los liposomas elásticos con respecto a los liposomas convencionales preparados por el mismo método, se puede atribuir a la incorporación del Tween® 80 en la formulación. Además, los liposomas elásticos son estables a 4°C durante al menos dos meses (sin cambios en el tamaño y potencial zeta) y tienen características de flexibilidad.

Los estudios de liberación muestran que los liposomas elásticos retardan la liberación del ketorolaco trometamina. Sin embargo, no se encontró diferencia en los perfiles de permeación a través de piel de oreja de cerdo *in vitro* para los liposomas elásticos y la solución del fármaco.

Los experimentos de difusión pasiva *in vivo* demostraron una correlación entre la capacidad de permeación de los liposomas elásticos y la pérdida de agua transepidermal de los voluntarios: En los voluntarios que presentaron valores elevados de pérdida de agua transepidermal se obtuvo una mejor penetración (mayor cantidad de fármaco permeada y mayores distancias de penetración). Lo cual confirma que la penetración de los LE está relacionada con el gradiente de hidratación natural de la piel.

La iontoforesis aumentó la cantidad permeada *in vivo* de fármaco en solución, sin embargo, no hubo un efecto sinérgico al aplicar iontoforesis (a dosis fisiológicamente tolerables y cortos periodos de tiempo) y el fármaco incluido en los liposomas elásticos. Aunado a esto el daño a la barrera de permeabilidad de la piel medido por la TEWL ocasionado por la iontoforesis fue solo transitorio recuperándose rápidamente.

Se demostró la estabilidad de las vesículas obtenidas al aplicarles una corriente eléctrica: No hubo cambio en la cantidad encapsulada del fármaco y no se encontró diferencia en el tamaño de vesícula.

VIII. REFERENCIAS

1. Ahad, A., Aquil, M., Kohli, K., Sultana, Y., Mujeeb, M. y Ali, A. (2010). Transdermal drug delivery: the inherent challenges and technological advancements. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 5(6), 276-288.
2. Ahad, A., Aqil, M., Kohli, K., Sultana, Y., Mujeeb, M. y Ali, A. (2012). Formulation and optimization of nanotransfersomes using experimental design technique for accentuated transdermal delivery of valsartan. *Nanomedicine: NBM*, 8, 237-249.
3. Aggarwal, N. y Goindi, S. (2012). Preparation and evaluation of antifungal efficacy of griseofulvin loaded deformable membrane vesicles in optimized guinea pig model of *Microsporum canis*—Dermatophytosis. *International Journal of Pharmaceutics*, 437, 277–287.
4. Anigbogu, A., Patil, S., Singh, P., Liu, P., Dinh, S. y Maibach, H. (2000). An in vivo investigation of the rabbit skin responses to transdermal iontophoresis. *International Journal of Pharmaceutics*, 200, 195–206.
5. Avinash, K., Abha, D. y Mukesh, S. (2011). Transferosome: The drug loaded ultradeformable vesicles for transdermal drug delivery, *International Research Journal of Pharmacy*, 2(11): 40-42.
6. Badkar, A.V., Betageri, G.V., Hofmann, G.A. y Banga, A.K. (1999). Enhancement of transdermal iontophoretic delivery of a liposomal formulation of colchicines by electroporation. *Journal of Drug Delivery*, 6, 111–115.
7. Bahia, A.P.C.O., Azevedo, E.G., Ferreira, L.A.M. y Frézard, F. (2010). New insights into the mode of action of ultradeformable vesicles using calcein as hydrophilic fluorescent marker. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 39, 90–96.
8. Bhatia, K.S. y Singh, J. (1998). Mechanism of transport enhancement of LHRH through porcine epidermis by terpenes and iontophoresis: permeability and lipid extraction studies. *Pharmaceutical Research*, 15, 1857–1862.
9. Barry, B.W. (2001). Novel mechanisms and devices to enable successful transdermal drug delivery. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 14, 101–114.
10. Barry, B. W. (2004). Breaching the skin's barrier to drugs. *Nature Biotechnology*, 22(2), 165-167.
11. Bhatia, K.S. y Singh, J. (1998). Mechanism of transport enhancement of LHRH through porcine epidermis by terpenes and iontophoresis: permeability and lipid extraction studies. *Pharmaceutical Research*, 15, 1857-1862.
12. Boinpally, R.R., Zhou, S.L., Devraj, G., Anne, P.K., Poondru, S. y Jasti, B.R. (2004). Iontophoresis of lecithin vesicles of cyclosporin A. *International Journal of Pharmaceutics*, 274, 185–190.

13. Bouwstra, J.A., Loan Honeywell-Nguyen, P., Gooris, G.S. y Ponec, M. (2003). Structure of the skin barrier and its modulation by vesicular formulations. *Progress in Lipid Research*, 42, 1–36.
14. Brand, R.M., Singh, P., Aspe-Carranza, E., Maibach, H.b. y Guy, R.H. (1997). Acute effects of iontophoresis on human skin in vivo: cutaneous blood flow and transepidermal water loss measurements, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 43, 133- 138.
15. Chiarello, K. (2004). Breaking the Barrier. *Advances in Transdermal Technology. Pharmaceutical Technology*, October, 46-56.
16. Cevc, G. (1997). Drug delivery across the skin. *Expert Opinion on Investigational Drugs*, 6, 1887- 1937.
17. Cevc, G. (2003). Transfersomes: Innovative Transdermal drug carriers. En Rathbone, M.J., Hadgraft, J. y Roberts, M.S. (Eds.), *Modified release drug delivery technology* (pp. 533-560). Marcel Dekker Inc.
18. Cevc, G. (2004). Lipid vesicles and other colloids as drug carriers on the skin. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 56, 675– 711.
19. Cevc, G. y Blume, G. (1992). Lipid vesicles penetrate into intact skin owing to the transdermal osmotic gradients and hydration force. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1104, 226-232.
20. Cevc, G., Schätzlein, A. y Blume, G. (1995). Transdermal drug carriers: basic properties, optimization and transfer efficiency in the case of epicutaneously applied peptides, *Journal of Controlled Release*, 36, 3 – 16.
21. Cevc, G., Blume, G., Schätzlein, A., Gebauer, D. y Paul, A. (1996). The skin: a pathway for systemic treatment with patches and lipid-based agent carriers. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 349-378.
22. Cevc, G., Gebauer, D., Stieber, J., Schätzlein A. y Blume, G. (1998). Ultraflexible vesicles, Transfersomes, have an extremely low pore penetration resistance and transport therapeutic amounts of insulin across the intact mammalian skin. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1368, 201–215.
23. Cevc, G. y Blume, G. (2001). New, highly efficient formulation of diclofenac for the topical, transdermal administration in ultradeformable drug carriers, Transfersomes, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1514, 191-205.
24. Cevc, G. y Blume, G. (2003). Biological activity and characteristics of triamcinolone-acetonide formulated with the self-regulating drug carriers, Transfersomes®. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1614, 156– 164.
25. Cevc, G. y Blume, G. (2004). Hydrocortisone and dexamethasone in very deformable drug carriers have increased biological potency, prolonged effect, and reduced therapeutic dosage. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1663, 61– 73.

26. Cevc, G., Gebauer, D., Stieber, J., Schätzlein, A. y Blume, G. (1998). Ultraflexible vesicles, Transfersomes, have an extremely low pore penetration resistance and transport therapeutic amounts of insulin across the intact mammalian skin. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1368, 201–215.
27. Cevc, G., Schätzlein, A. y Richardsen, H. (2002). Ultradeformable lipid vesicles can penetrate the skin and other semi-permeable barriers unfragmented. Evidence from double label CLSM experiments and direct size measurements. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1564, 21–30.
28. Cevc, G., Vierl, U. y Mazgareanu, S. (2008). Functional characterisation of novel analgesic product based on self-regulating drug carriers. *International Journal of Pharmaceutics*, 360, 18–28.
29. Chen, M., Li, X. R., Zhou, Y. X., Yang, K. W., Chen, X. W., Deng, Q., Liu, Y. y Ren, L. J. (2009). Improved absorption of salmon calcitonin by ultraflexible liposomes through intranasal delivery. *Peptides*, 30, 1288–1295.
30. Chen M. (2011). Skin Drug Delivery From Different Lipid Vesicular Systems, Faculty of Biology and Pharmacy of the Friedrich-Schiller-Universität Jena. Tesis doctoral.
31. Conjeevaram, R, Sunkara, G. y Banga, A.K. (2003). Iontophoretic in vivo transdermal delivery of beta-blockers in hairless rats and reduced skin irritation by liposomal formulation. *Pharmaceutical Research*, 20(9), 1496-1501.
32. Cordero, J.A., Camacho, M., Obach, R., Domenech, J. y Vila, L. (2001). In vitro based index of topical anti-inflammatory activity to compare a series of NSAIDs. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 51, 135-142.
33. Coderch, L., Oliva, M., Pons, M., de la Maza, A., Manich, A.M. y Parra, J.L. (1996). Percutaneous penetration of liposomes using the tape stripping technique. *International Journal of Pharmaceutics*, 139, 197-203.
34. Dahlan, A., Alpar, H. O. y Murdan, S. (2009). An investigation into the combination of low frequency ultrasound and liposomes on skin permeability. *International Journal of Pharmaceutics*, 379, 139–142.
35. Devarajan, P.V., Gore, S.P. y Chavan, S.V. (2000). HPTLC determination of ketorolac tromethamine, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 22, 679–683.
36. Dhamecha, D.L., Rathi, A.A., Saifee, M., Lahoti, S.R. y Dehghan, M.H.G. (2009). Drug vehicle based approaches of penetration enhancement, *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 1(1): 24-46.
37. Doh, H.J., Cho, W.J., Yong, C.S., Choi, H.G., Kim, J.S., Lee, C.H. y Kim, D.D. (2003). Synthesis and Evaluation of Ketorolac Ester Prodrugs for Transdermal Delivery. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 92(5), 1008-1017.
38. Egbaria, K. y Weiner, N. (1990). Nanoparticulate Systems for Drug Delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 5(3), 287-300

39. El Maghraby, G.M., Williams, A.C. y Barry, B.W. (1999). Skin delivery of oestradiol from deformable and traditional liposomes: mechanistic studies. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 51, 1123-1134.
40. El Maghraby, G. M. M., Williams, A. C. y Barry B. W. (2000). Oestradiol skin delivery from ultradeformable liposomes: refinement of surfactant concentration. *International Journal of Pharmaceutics*, 196, 63–74.
41. El Maghraby, G.M., Williams, A.C. y Barry, B.W. (2001). Skin delivery of 5-fluorouracil from ultradeformable and standard liposomes in-vitro. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 53, 1069–1077.
42. El Maghraby, G.M., Williams, A.C. y Barry, B.W. (2006). Can drug bearing liposomes penetrate intact skin? *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 58, 415–429.
43. El Maghraby, G.M., Barry, B.W. y Williams, A.C. (2008). Liposomes and skin: From drug delivery to model membranes. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 34, 203–222.
44. Elsayed, M.M., Abdallah, O.Y., Naggar, V.F. y Khalafallah, N.M. (2006). Deformable liposomes and ethosomes: mechanism of enhanced skin delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, 322, 60–66.
45. Elsayed, M.M., Abdallah, O.Y., Naggar, V.F. y Khalafallah, N.M. (2007). Lipid vesicles for skin delivery of drugs: reviewing three decades of research. *International Journal of Pharmaceutics*, 332, 1-16.
46. El Zaafarany, G. M., Awad G. A. S., Holayel S. M. y Mortada, Nahed, D. (2010). Role of edge activators and surface charge in developing ultradeformable vesicles with enhanced skin delivery. *International Journal of Pharmaceutics*. 397, 164–172.
47. Essa, E. A., Bonner, M. C. y Barry, B. W. (2003). Electroporation and ultradeformable liposomes; human skin barrier repair by phospholipid. *Journal of Controlled Release*, 92, 163–172.
48. Essa, E. A., Bonner, M. C. y Barry, B. W. (2004). Electrically assisted skin delivery of liposomal estradiol; phospholipid as damage retardant. *Journal of Controlled Release*, 95, 535– 546.
49. Essa, E. A., Bonner, M. C. y Barry, B. W. (2002). Iontophoretic estradiol skin delivery and tritium exchange in ultradeformable liposomes. *International Journal of Pharmaceutics*, 240, 55–66.
50. Fahr, A. y Chen, M. (2010). Liposomes as Promising Tools for the Skin Delivery and Protection of Damaged Skin. En Monteiro-Riviere, N.A. (Ed.), *Toxicology of the Skin*, (pp. 289-300). Informa Healthcare: 289-300.
51. Fang, J.Y., Sung, K.C., Lin, H.H. y Fang, C.L. (1999). Transdermal iontophoretic delivery of enoxacin from various liposome-encapsulated formulations. *Journal of Controlled Release*, 60, 1–10.

-
52. Fitzpatrick, D. y Corish, J. (2005). Release characteristics of anionic drug compounds from liquid crystalline gels I: Passive release across non-rate-limiting membranes. *International Journal of Pharmaceutics*, 301, 226–236.
53. Food and Drug Administration: Safety. Available online: <http://www.fda.gov/Safety/MedWatch/SafetyInformation/Safety-RelatedDrugLabelingChanges/ucm125303.htm> (consultada el 12 Mayo de 2009).
54. Garg, T., Jain, S., Singh, H. P., Sharma, A. y Tiwary, A. K. (2008). Elastic Liposomal Formulation for Sustained Delivery of Antimigraine Drug: In Vitro Characterization and Biological Evaluation, *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 34, 1100–1110.
55. Gillet, A., Grammenos, A., Compère, P., Evrard, B. y Piel, G. (2009). Development of a new topical system: Drug-in-cyclodextrin-in-deformable liposome. *International Journal of Pharmaceutics*, 380, 174–180.
56. Green P.G. (1996). Iontophoretic delivery of peptide drugs. *Journal of Controlled Release*, 41, 33-48.
57. Gupta, A., Aggarwal, G., Singla, S. y Arora, R. (2012). Transfersomes: A Novel Vesicular Carrier for Enhanced Transdermal Delivery of Sertraline: Development, Characterization, and Performance Evaluation. *Scientia Pharmaceutica*, 80, 1061–1080.
58. Han, I., Kim, M. y Kim, J. (2004). Enhanced transfollicular delivery of adriamycin with a liposome and iontophoresis. *Experimental Dermatology*, 13(2), 86-92.
59. Hofer, C., Randenborgh, H., Lehmer, A., Hartung, R. y Breul, J. (2004). Transcutaneous IL-2 uptake mediated by Transfersomes® depends on concentration and fractionated application. *Cytokine*, 25, 141-146.
60. Honary, S. y Zahir, F. (2013). Effect of Zeta Potential on the Properties of Nano-Drug Delivery Systems - A Review (Part 1). *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 12 (2), 255-264.
61. Honeywell-Nguyen, P.L. y Bouwstra, J.A. (2005). Vesicles as a tool for transdermal and dermal delivery. *Drug Discovery Today: Technologies*, 2(1), 67-74.
62. Honeywell-Nguyen, P. L., Gooris, G. S. y Bouwstra, J. A. (2004). Quantitative Assessment of the Transport of Elastic and Rigid Vesicle Components and a Model Drug from these Vesicle Formulations into Human Skin In Vivo. *Journal of Investigative Dermatology*, 123, 902-910.
63. Huang, Y.Z., Gao, J.Q., Chen, J.L. y Liang, W.Q. (2006). Cationic liposomes modified with non-ionic surfactants as effective non-viral carrier for gene transfer. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 49, 158–164.
64. Ikoma, A., Handwerker, H., Miyachi, Y. y Schmelz, M. (2005). Electrically evoked itch in humans. *Pain*, 113, 148–154.

65. Jacobi, U., Taube, H., Schäfer, U.F., Sterry, W. y Lademann, J. (2005). Comparison of four different in vitro systems to study the reservoir capacity of the stratum corneum. *Journal of Controlled*, 103, 61–71.
66. Jain, S., Jain, P., Umamaheshwari, R.B. y Jain, N.K. (2003). Transfersomes—a novel vesicular carrier for enhanced transdermal delivery: development, characterization, and performance evaluation. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 29, 1013–1026.
67. Kajimoto, K., Yamamoto, M., Watanabe, M., Kigasawa, K., Kanamura, K., Harashima, H. y Kogure, K. (2011). Noninvasive and persistent transfollicular drug delivery system using a combination of liposomes and iontophoresis. *International Journal of Pharmaceutics*, 403(1-2), 57-65.
68. Kalia, Y.N. y Guy, R.H. (2001). Modeling transdermal drug release. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 48(2-3), 159-172.
69. Kalia, Y.N., Naik, A., Garrison, J. y Guy, R.H. (2004). Iontophoretic drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 56, 619– 658.
70. Kari, B. (1986). Control of blood glucose levels in alloxan-diabetic rabbits by iontophoresis of insulin. *Diabetes*, 35, 217– 221.
71. Kigasawa, K., Miyashita, M., Kajimoto, K., Kanamura, K., Harashima, H. y Kogure, K. (2012). Efficient intradermal delivery of superoxide dismutase using a combination of liposomes and iontophoresis for protection against UV-induced skin damage. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 35(5), 781-785.
72. Kim, A., Lee, E. H., Choi, S. H. y Kim, C. K. (2004). In vitro and in vivo transfection efficiency of a novel ultradeformable cationic liposome. *Biomaterials*, 25, 305–313.
73. Kim, B.Y., Doh, H.J., Le, T.N., Cho, W.J., Yong, C.S., Choi, H.G., Kim, J.S., Lee, C.H. y Kim, D.D. (2005). Ketorolac amide prodrugs for transdermal delivery: stability and in vitro rat skin permeation studies. *International Journal of Pharmaceutics*, 293 (2005) 193–202.
74. Kulkarni, S.B., Banga, A.K. y Betageri, G.V. (1996). Transdermal iontophoretic delivery of colchicines encapsulated in liposomes. *Journal of Drug Delivery*, 3, 245–250.
75. Kumar, M.G. y Lin, S. (2008). Transdermal iontophoresis: impact on skin integrity as evaluated by various methods. *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 25(4), 381-401.
76. Kumar, A., Pathak, K. y Bali, V. (2012). Ultra-adaptable nanovesicular systems: a carrier for systemic delivery of therapeutic agents. *Drug Discovery Today*, 17(21/22), 1233-1241.
77. Lanio, M.E., Luzardo, M.C., Laborde, R., Sánchez, O., Cruz-Leal, Y., Pazos, F., Tejuca, M., Valle, A., Alonso, M.E., Fernández, L.E. y Alvarez, C. (2009). Las vesículas liposomales: obtención, propiedades y aplicaciones potenciales en la biomedicina. *Revista Cubana de Física*, 26(1), 23-30.

78. Larsen, S. W., Østergaard, J., Friberg-Johansen, H., Jessen M. N. B. y Larsen, C. (2006). In vitro assessment of drug release rates from oil depot formulations intended for intra-articular administration. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 29, 348–354.
79. Larsen, S. W., Østergaard, J., Poulsen, S. V., Schulz, B. y Larsen, C. (2007). Diflunisal salts of bupivacaine, lidocaine and morphine Use of the common ion effect for prolonging the release of bupivacaine from mixed salt suspensions in an in vitro dialysis model. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 31,172–179.
80. Lee, E. H., Kim, A., Oh, Y. K. y Kim, C. K. (2005). Effect of edge activators on the formation and transfection efficiency of ultradeformable liposomes. *Biomaterials*, 26, 205–210.
81. Li, G.L., Danhof, M. y Bouwstra, J.A. (2001). Effect of Elastic Liquid-State Vesicle on Apomorphine Iontophoresis Transport through Human Skin *In Vitro*. *Pharmaceutical Research*, 18(11), 1627-1630.
82. Li, G.L., Van-Steeg, T.J., Putter, H., Van Der Spek, J., Pavel, S., Danhof, M. y Bouwstra, J.A. (2005). Cutaneous side-effects of transdermal iontophoresis with and without surfactant pretreatment: a single-blinded, randomized controlled trial. *British Journal of Dermatology*, 153(2), 404-412.
83. Liu, D., Hu, H., Lin, Z., Chen, D., Zhu, Y., Hou, S. y Shi, X. (2013). Quercetin deformable liposome: Preparation and efficacy against ultraviolet B induced skin damages in vitro and in vivo. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 127, 8-17.
84. Lodén, M., Åkerström, U., Lindahl, K. y Berne, B. (2004). Bioequivalence determination of topical ketoprofen using a dermatopharmacokinetic approach and excised skin penetration. *International Journal of Pharmaceutics*, 284, 23–30.
85. Lopes, L.B., Scarpa, M.V., Silva, G.V.J., Rodrigues, D.C., Santilli, C.V. y Oliveira, A.G. (2004). Studies on the encapsulation of Diclofenac in small unilamellar liposomes of soya phosphatidylcholine. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 39, 151-158.
86. López-Alarcón, M.D. de Andrés, J. y Grau F. (1998). Ketorolaco: Indicaciones terapéuticas y vías alternativas a las contempladas en la ficha farmacológica. *Revista de la Sociedad Española del Dolor*, 5, 159-165.
87. Lu, G.W. y Flynn, G.L. (2009). Cutaneous and Transdermal Delivery-Processes and Systems of Delivery. En: Florence, A.T., Siepmann, J. (Eds.), *Modern pharmaceutics* (pp. 43-99). New York: Marcel Dekker Inc.
88. Mathew, S.T., Devi, S.G. y Sandhya, K.V. (2007). Formulation and Evaluation of Ketorolac Tromethamine-loaded Albumin Microspheres for Potential Intramuscular Administration. *AAPS PharmSciTech*, 8(1), E100-E108.
89. Mills, P.C. y Cross, S.E. (2006). Transdermal drug delivery: Basic principles for the veterinarian. *The Veterinary Journal*, 172, 218–233.

90. Mishra, D., Dubey, V., Asthana, A., Saraf, D.K. y Jain, N.K. (2006). Elastic liposomes mediated transcutaneous immunization against Hepatitis B, *Vaccine*, 24(22), 4847-4855.
91. Menon, G.K. (2002). New insights into skin structure: scratching the surface. *Advanced Drug Delivery Review*, 54, Suppl 1:S3-17.
92. Montanari, J., Roncaglia, D.I., Lado, L.A., Morilla, M.J. y Romero, E.L. (2009). Avoiding failed reconstitution of ultradeformable liposomes upon dehydration. *International Journal of Pharmaceutics*, 372, 184–190.
93. Monteiro-Riviere, N.A. (2006). Structure and Function of Skin. En: Riviere, J.E. (Ed.), *Dermal Absorption Models in Toxicology and Pharmacology*, (pp. 1-20). Boca Raton: Taylor & Francis imprint.
94. Montenegro, L., Panico, A.M., Ventimiglia, A. y Bonina, F.P. (1996). *In vitro* retinoic acid release and skin permeation from different liposome formulations. *International Journal of Pharmaceutics*, 133, 89–96.
95. Netzlaff, F., Kostka, K.H., Lehr, C.M. y Schaefer, U.F. (2006). TEWL measurements as a routine method for evaluating the integrity of epidermis sheets in static Franz type diffusion cells in vitro. Limitations shown by transport data testing, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 63, 44–50.
96. Neubert, R.H.H. (2011). Potentials of new nanocarriers for dermal and transdermal drug delivery, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 77, 1–2.
97. New, R. R. C. (1990) *Liposomes: a practical approach*, Oxford, IRL Press.
98. Olbrich, C. y Muller, R. H. (1999). Enzymatic degradation of SLN-effect of surfactant and surfactant mixtures. *International Journal of Pharmaceutics*, 180, 31–39.
99. Orlandini, S., Furlanetto, S., Pinzauti, S., D’Orazio, G. y Fanali, S. (2004). Analysis of ketorolac and its related impurities by capillary electrochromatography, *Journal of Chromatography A*, 1044, 295–303.
100. Paillet-Mattei, C., Pavan, S., Vargiolu, R., Pirot, F., Falson, F. y Zahouani, H. (2007). Contribution of stratum corneum in determining bio-tribological properties of the human skin. *Wear*, 263(7-12), 1038-1043.
101. Patel, M.N., Bharadia, P.D. y Patel, M.M. (2010). Skin Penetration Enhancement Techniques – Physical Approaches, *International Journal of Pharmaceutical and Applied Sciences*, 1(2), 62-72
102. Paul, A., Cevc, G. y Bachhawat, B.K. (1995). Transdermal immunization with large proteins by means of ultradeformable drug carriers. *European Journal of immunology*, 25, 3521-3524.
103. Paul, A., Cevc, G. y Bachhawat, B.K. (1998). Transdermal immunisation with an integral membrane component, gap junction protein, by means of ultradeformable drug carriers, transfersomes. *Vaccine*, 16(213), 188-195.

104. Petruzzelli, M., Vacca, M., Moschetta, A., Sasso, R.C., Palasciano, G., van Erpecum, K.J. y Portincasa, P. (2007). Intestinal mucosal damage caused by non-steroidal anti-inflammatory drugs: Role of bile salts. *Clinical Biochemistry*, 40(8), 503-510.
105. Phipps, J.B., Scott, E.R., Gyory, J.R. y Padmanabhan, R.V. (2002). Iontophoresis. En: Swarbrick, J. y Boylan, J.C. (Eds.), *Encyclopedia of Pharmaceutical Technology* (pp. 1573-1587). New York: Marcel Dekker, Inc.
106. Prasanthi, D.K. y Lakshmi, P. (2013). Iontophoretic Transdermal Delivery of Finasteride in Vesicular Invasomal Carriers. *Pharmaceutical Nanotechnology*, 1(2), 136-150.
107. Priyanka, R. y Shipra, D. (2012). Transferosomes: A novel Carrier for transdermal drug delivery system, *International Journal of Pharmacy and Technology*, 4(1): 1854-1865.
108. Rainsford, K.D. (2007). Anti-Inflammatory Drugs in the 21st Century. En Harris, R.E. (Ed.), *Inflammation in the Pathogenesis of Chronic Diseases* (pp. 3-27). New York: Springer.
109. Rokhade, A.P., Agnihotri, S.A., Patil, S.A., Mallikarjuna, N.N., Kulkarni, P.V. y Aminabhavi, T.M. (2006). Semi-interpenetrating polymer network microspheres of gelatin and sodium carboxymethyl cellulose for controlled release of ketorolac tromethamine, *Carbohydrate Polymers*, 65, 243–252.
110. Rougier, A., Lotte, C. y Maibach, H.I. (1989). *In Vivo* Relationship between Percutaneous Absorption and Transepidermal Water Loss. En: Bronaugh, R.L. y Maibach, H.I. (Eds.), *Percutaneous Absorption*, (pp. 175-190). New York: Marcel Dekker Inc.
111. Sage, B. H. y Riviere, J. E. (1992). Model systems in iontophoresis-Transport efficacy. *Advanced Drug Delivery Review*, 9, 265-287.
112. Salminen, W.R. y Roberts, S.M. (2000). Dermal and ocular toxicology: Toxic effects of the skin and eyes. En: Williams, P.L., James, R.C. y Roberts, S.M. (Eds.), *Principles of Toxicology: Environmental and Industrial Applications*, (pp. 157-168). New York: John Wiley & Sons.
113. Schäfer-Korting, M., Mehnert, W. y Korting, H.C. (2007). Lipid nanoparticles for improved topical application of drugs for skin diseases. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 59(6), 427-443
114. Simões, S.I., Delgado, T.C., Lopes, R.M., Jesus, S., Ferreira, A.A., Morais, J.A., Cruz, M.E.M., Corvo, M.L. y Martins, M.B.F. (2005). Developments in the rat adjuvant arthritis model and its use in therapeutic evaluation of novel non-invasive treatment by SOD in Transferosomes. *Journal of Controlled Release*, 103, 419–434.
115. Singh, J., Gross, M., Sage, B., Davis, H.T. y Maibach, H.I. (2000). Effect of saline iontophoresis on skin barrier function and cutaneous irritation in four ethnic groups. *Food and Chemical Toxicology*, 38(8), 717-726.
116. Sotgiu, M. L., Biella, G., Formaglio, F. y Marchettini, P. (1998). Central effect of Ketorolac involving NMDA receptors activity. *Brain Research*, 813, 223–226.

117. Strebhardt, K. y Ullrich, A. (2008). Paul Ehrlich's magic bullet concept: 100 years of progress. *Nature Reviews Cancer*, 8(6), 473-480.
118. Sturm, J.C., Canelo, H., Nufiez-Vergara, L.J. y Squella, J.A. (1997). Voltammetric study of ketorolac and its differential pulse polarographic determination in pharmaceuticals, *Talanta*, 44, 931-937.
119. Tasi, L. M., Liu, D. Z. y Chen, W. Y. (2003). Microcalorimetric investigation of the interaction of polysorbate surfactants with unilamellar phosphatidylcholines liposomes. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 213(1), 7-14.
120. Tiwari, S.B. y Udupa, N. (2003). Investigation into the potential of iontophoresis facilitated delivery of ketorolac. *International Journal of Pharmaceutics*, 260, 93-103.
121. Touitou, E., Dayan, N., Bergelson, L., Godin, B. y Eliaz, M. (2000). Ethosomes-novel vesicular carriers for enhanced delivery: characterization and skin penetration properties. *Journal of Control Release*, 65, 403-418.
122. Trommer, H. y Neubert, R.H.H. (2006). Overcoming the Stratum Corneum: The Modulation of Skin Penetration. *Skin Pharmacology and Physiology*, 19, 106-121.
123. Trotta, M., Peira, E., Debernardi, F. y Gallarate, M. (2002). Elastic liposomes for skin delivery of dipotassium glycyrrhizinate. *International Journal of Pharmaceutics*, 241, 319-327.
124. Trotta, M., Peira, E., Carlotti, M.E. y Gallarate, M. (2004). Deformable liposomes for dermal administration of methotrexate. *International Journal of Pharmaceutics*, 270, 119-125.
125. van den Bergh, B. A. I., Bouwstra, J. A., Junginger, H. E. y Wertz, P. W. (1999). Elasticity of vesicles affects hairless mouse skin structure and permeability. *Journal of Controlled Release*, 62, 367-379.
126. Vane, J.R. y Botting, R.M. (1998). Mechanism of Action of Nonsteroidal Anti-inflammatory Drugs. *The American Journal of Medicine*, 104(3^a), 2S-8S.
127. Variyar, P.S., Chatterjee S., Sharma A. (2011). Fundamentals and Theory of HPTLC-Based Separation. En Srivastava, M. (Ed.), *High-Performance Thin-Layer Chromatography (HPTLC)* (27-40). Nueva York: Springer
128. Verma, D.D., Verma, S., Blume, G. y Fahr, A. (2003). Liposomes increase skin penetration of entrapped and non-entrapped hydrophilic substances into human skin: a skin penetration and confocal laser scanning microscopy study. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 55, 271-277.
129. Villarino, N.F. y Landoni, M.F. (2006). Administración Transdérmica de Fármacos: una Alternativa Terapéutica. *Analecta Veterinaria*, 26(1), 28-37.

-
130. Vutla, N.B., Betageri, G.V. y Banga, A.K. (1995). Transdermal iontophoretic delivery of enkephalin formulated in liposomes. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 85, 5-8.
 131. Walters, K.A., y Roberts, M.S. (2002). The Structure and Function of Skin. En Walters, K.A. (Ed.), *Dermatological and Transdermal Formulations*, (pp. 1-39). New York: Marcel Dekker Inc.
 132. Wang, Z., Dsida, R.M. y Avram, M.J. (2001). Determination of ketorolac in human plasma by reversed-phase high-performance liquid chromatography using solid-phase extraction and ultraviolet detection, *Journal of Chromatography B*, 755, 383–386.
 133. Wang, Y., Thakur, R., Fan, Q. y Michniak, B. (2005). Transdermal iontophoresis: combination strategies to improve transdermal iontophoretic drug delivery. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 60, 179–191.
 134. Zavaleta, M., Rosete, A., Jiménez-Torres, N. y Zavala-García, C. (2007). Ketorolaco. *Medigraphic Artemisa en línea*, 14(1), 14-20.
 135. Zhao, Y.Z., Lu, C.T., Zhang, Y., Xiao, J., Zhao, Y.P., Tian, J.L., Xu, Y.Y., Feng, Z.G. y Xu, C.Y. (2013). Selection of high efficient transdermal lipid vesicle for curcuminskin delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, 454, 302–309.

IX ANEXOS

Anexo 1. Carta de Consentimiento Informado

CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

Protocolo: Liberación iontoforética transdérmica de ketorolaco trometamina a partir de vesículas lipídicas ultraflexibles.

Por medio de la presente yo: _____

he sido informado (a) en forma clara que el objetivo del estudio es evaluar el efecto del uso conjunto de la iontoforesis como promotor de absorción y de los liposomas elásticos como acarreador del ketorolaco trometamina sobre la permeación transdérmica del mismo. Por lo que se me propone participar en dicho proyecto de investigación que se realizara en el Laboratorio L-323 de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán Campo 1.

Es de mi conocimiento que los responsables de esta investigación son: Dra. Adriana Ganem Rondero y M en C. María Guadalupe Nava Arzaluz y cualquier duda o pregunta podrá ser contestada por ellas.

Se me ha informado que mi participación consistirá en permitir que se me aplique el fármaco en solución o formulado en liposomas elásticos durante una hora (cuando el estudio sea permeación pasiva) o 20 minutos de una corriente eléctrica de 0.25mA. Al concluir el tiempo, se limpiara la zona en que se me haya colocado la formulación y se procederá a la toma de 16 strippings con cinta adhesiva.

Toda la información que se obtenga del estudio será confidencial. No seré identificado (a) en ninguna publicación o presentación del estudio. Mi participación en el estudio es voluntaria. Puedo negarme a participar o puedo suspender mi participación en cualquier momento, si así lo decido.

He leído la información anterior y comprendo los propósitos del trabajo de investigación; también se que no habrá riesgos directos o potenciales por mi participación en el estudio. He tenido la oportunidad de que se me respondan las preguntas y aclaren las dudas, por tanto, **DOY MI LIBRE CONSENTIMIENTO** para ser participante en este estudio.

Nombre y firma del voluntario

Fecha

Nombre y firma de testigo

Fecha

Nombre y firma de testigo

Fecha

Anexo 2. Métodos analíticos

La cuantificación del KT para la evaluación de la eficiencia de encapsulamiento, la cantidad de fármaco permeada, la cantidad de fármaco retenida en la piel y la cantidad de fármaco en las cintas de *tape stripping* se realizó por cromatografía en capa fina de alta resolución (HPTLC).

Para la cuantificación del fármaco liberado a partir de los liposomas elásticos se empleó un método espectrofotométrico.

Métodos cromatográficos

Condiciones generales

Las muestras se aplicaron en placas de Sílica gel 60F254

Fase móvil: cloroformo-acetato de etilo-ácido acético (3:8:0.1 v:v:v)

Longitud de onda de máxima absorción

La longitud de onda óptima fue de 323 nm en diferentes medios, como se muestra en la figura 1, sin haber interferencias por parte de las matrices en las cuales el fármaco está contenido.

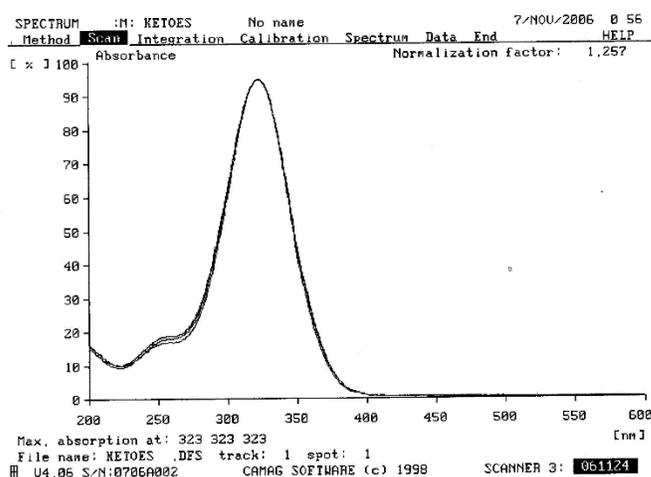


Figura 1. Espectro de absorción del fármaco

Determinación del factor de retención (R_f)

La posición de cualquier mancha de soluto en una placa de cromatografía se caracteriza por su factor de retención R_f . Este es un valor cualitativo fundamental y se expresa como:

$$R_f = \frac{\text{Distancia recorrida por el compuesto (X)}}{\text{Distancia recorrida por el eluyente (Y)}}$$

Valores de R_f de 1.0 indican que el analito migró con el frente de solvente y valores de 0.0 indican que el analito quedó retenido en el punto de aplicación (Variyar et al., 2011).

El valor de R_f obtenido fue de 0.56.

Anexo 2.1 Método analítico para la evaluación de la solubilidad y eficiencia de encapsulamiento

Se evaluaron los siguientes parámetros de validación: linealidad, exactitud, precisión (repetibilidad e inter-día), límite de detección y cuantificación.

Linealidad

En la tabla 1 se muestran las ABC obtenidas para cada nivel de cantidad aplicada del KT empleados para construir la curva de calibración. En la figura 2 se representa gráficamente la recta de calibrado resultante, mientras que en la tabla 2 se muestran los parámetros de regresión, los valores de F del análisis de varianza para evaluar la linealidad y los valores de t para la prueba de la ordenada al origen.

Tabla 1. Valores individuales de las respuestas cromatográficas obtenidas con cantidades crecientes de KT

| Cantidad (ng) | Respuesta analítica ABC | | |
|---------------|-------------------------|---------|---------|
| | 200.8 | 7355.4 | 7226 |
| 301.2 | 9013.5 | 9257.8 | 9034 |
| 401.6 | 10169 | 10415.2 | 10539.8 |
| 502 | 11566.6 | 11719.5 | 11688.4 |
| 602.4 | 12655.6 | 12690.1 | 12726.4 |
| 702.8 | 14201.1 | 14046.8 | 13840.2 |

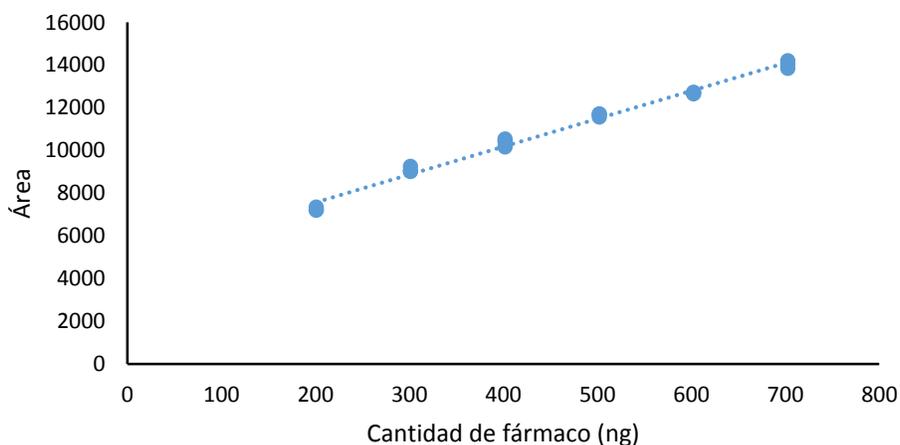


Figura 2. Curva de calibración de KT de 200 a 700 ng en agua:etanol (80:20)

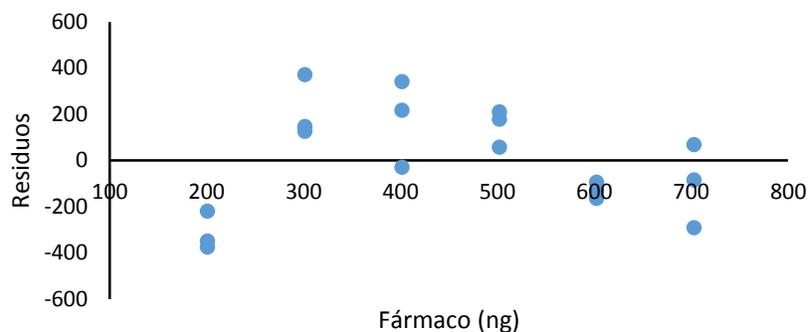


Figura 3. Gráfico de residuales

Tabla 2. Parámetros estadísticos calculados para la linealidad del sistema

| Parámetros estadísticos de la regresión | |
|---|----------------|
| Coefficiente de correlación (r) | 0.9952 |
| Coefficiente de determinación (r ²) | 0.9903 |
| Intercepto (b) | 4951.6 |
| Pendiente (m) | 13.0608 |
| Intervalo de confianza de la pendiente | 13.061 ± 0.684 |
| t _{calculado} | 31.7489 |
| t _{crítica} (α=0.05) | 1,740 |
| F _{calculada} | 1637.72 |
| F _{crítica} (α=0.01) | 8.53 |
| Coefficiente de variación (C.V., %) | 1.12 |

En la tabla 2 se observa a partir del análisis estadístico de regresión, que existe una relación lineal entre las cantidades que se aplicaron del KT y su respectiva ABC, teniendo así que 99.03% de la variación del ABC está explicada por los cambios en la cantidad de KT. Los valores de F del análisis de varianza para evaluar la linealidad indican que hay evidencia estadística significativa con un nivel de significancia del 0.01 de que la variación del ABC se explica por una variación en la cantidad aplicada de KT ($F_{calculada} > F_{crítica}$). Mientras que la prueba t nos indica que la ordenada al origen es diferente de cero. La gráfica 3 muestra que el modelo de regresión lineal simple es adecuado para ajustar los datos. De la tabla 2 y 3 se puede decir que el método analítico es lineal, exacto y preciso.

Tabla 3. Resultados de la validación para cuantificar el KT encapsulado

| Parámetro | |
|-------------------------------|---------------------|
| Exactitud | 101.5 %; C.V.:2.38% |
| Precisión | |
| Repetibilidad | 1.61 % |
| Inter-día | 1.65 % |
| Límite de detección (ng) | 24.2 |
| Límite de cuantificación (ng) | 73.32 |

Los límites de detección (LD) y cuantificación (LC) se determinaron matemáticamente mediante las siguientes ecuaciones:

$$LC = \frac{10 \text{ Desviación estándar de la ordenada al origen}}{\text{Pendiente de la curva de calibración}}$$

$$LD = \frac{3.3 \text{ Desviación estándar de la ordenada al origen}}{\text{Pendiente de la curva de calibración}}$$

Anexo 2.2 Método utilizado para cuantificar el KT en los estudios de liberación

Para los estudios de liberación del KT a partir de los liposomas elásticos se preparó una curva de calibración obteniéndose los siguientes resultados:

En la tabla 4 se muestran las absorbancias obtenidas para cada nivel de concentración de KT empleados para construir la curva de calibración. En la figura 4 se representa gráficamente la recta de calibrado resultante, mientras que en la tabla 4 se muestran los parámetros de regresión, los valores de F del análisis de varianza para evaluar la linealidad y los valores de t para la prueba de la ordenada al origen. La figura 5 muestra que el modelo de regresión lineal simple es adecuado para ajustar los datos.

Tabla 4. Valores individuales de las respuestas analíticas obtenidas con concentraciones crecientes de KT

| Concentración($\mu\text{g/mL}$) | Respuesta analítica | | |
|-----------------------------------|---------------------|--------|--------|
| | Absorbancia | | |
| 5.025 | 0.2854 | 0.2866 | 0.2844 |
| 8.05 | 0.4481 | 0.4507 | 0.4518 |
| 16.1 | 0.8833 | 0.8785 | 0.8842 |
| 24.15 | 1.3103 | 1.3129 | 1.3079 |
| 32.2 | 1.7638 | 1.7685 | 1.7766 |
| 40.25 | 2.2431 | 2.2304 | 2.2326 |

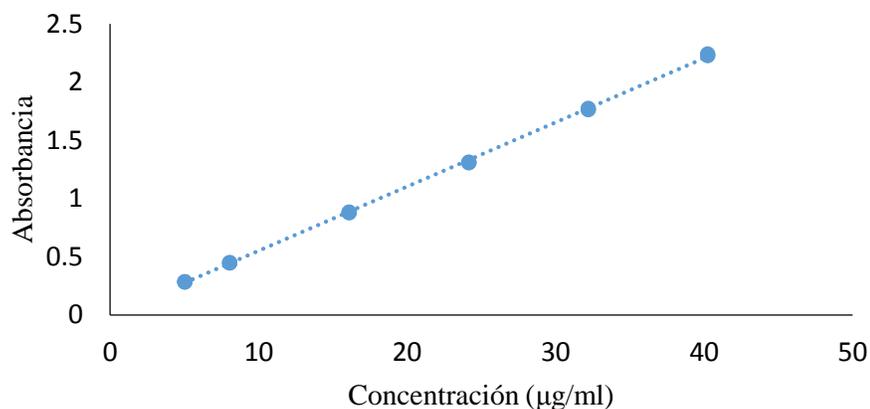


Figura 4. Curva de calibración de KT de 5 a 40 µg/mL

Tabla 4. Parámetros estadísticos calculados para la linealidad del sistema

| Parámetros estadísticos de la regresión | |
|---|-----------------|
| Coefficiente de correlación (r) | 0.999835 |
| Coefficiente de determinación (r ²) | 0.9997 |
| Intercepto (b) | -0.000082813 |
| Pendiente (m) | 0.0551265 |
| Intervalo de confianza de la pendiente | 0.055 ± 0.00053 |
| t _{calculado} | -0.0135147 |
| t _{crítica} (α=0.05) | 1.746 |
| F _{calculada} | 48417.61 |
| F _{crítica} (α=0.05) | 4.49 |
| Coefficiente de variación (C.V., %) | 1.54 |

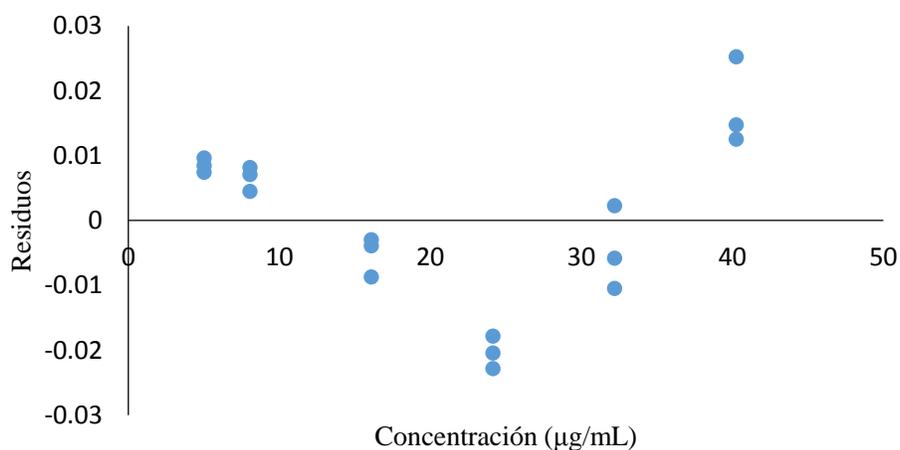


Figura 5. Residuos de la curva de calibración del KT

Anexo 2.3 Método utilizado para cuantificar el KT en los estudios de permeación pasiva *in vitro*

Los resultados de la validación parcial fueron:

Selectividad

En la figura 6 se muestra el cromatograma del KT en la matriz biológica, observándose que no hay interferencia de la matriz biológica con el factor de retención (R_F)

Linealidad

En la tabla 5 se muestran las ABC obtenidas para cada nivel de cantidad aplicada del KT empleados para construir la curva de calibración. En la figura 7 se representa gráficamente la recta de calibrado resultante, mientras que en la tabla 6 se muestran los parámetros de regresión, los valores de F del análisis de varianza para evaluar la linealidad y los valores de t para la prueba de la ordenada al origen.

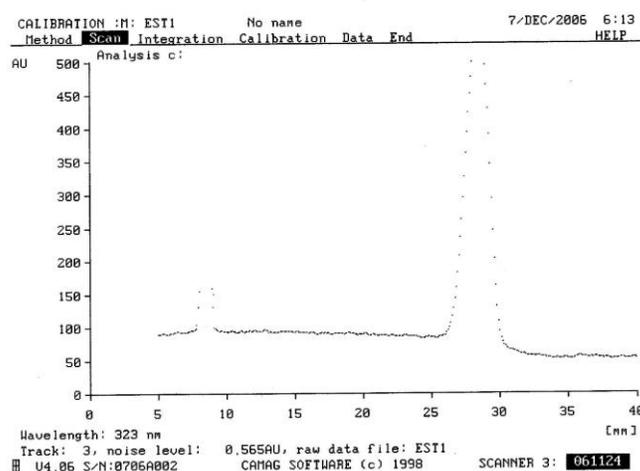


Figura 6. Cromatograma del KT en la matriz biológica

Tabla 5. Valores individuales de las respuestas cromatográficas obtenidas con cantidades crecientes de KT

| Cantidad (ng) | Respuesta analítica ABC | | |
|---------------|-------------------------|---------|---------|
| | 50.2 | 2888.4 | 2780.9 |
| 100.4 | 4388.2 | 4621.1 | 4580.7 |
| 200.8 | 7541.2 | 8081.5 | 7767 |
| 301.2 | 9805.1 | 10583.1 | 10305.8 |
| 401.6 | 11579.9 | 12468.4 | 12229.5 |

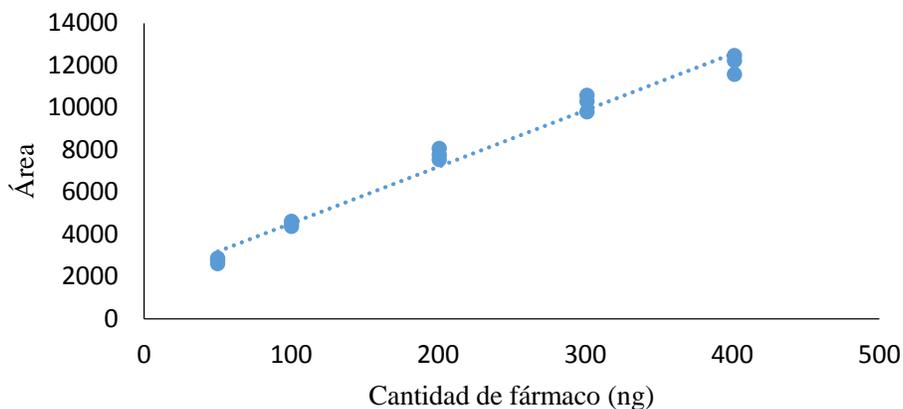


Figura 7. Curva de calibración de KT de 50 a 400 ng en solución amortiguadora de fosfatos pH 7.4 en contacto con piel

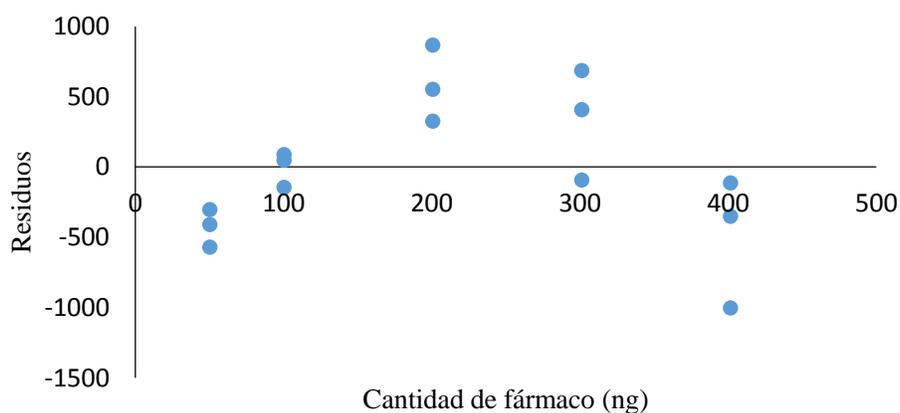


Figura 8. Gráfico de residuales de la curva de calibración en solución amortiguadora de fosfatos pH 7.4 en contacto con piel

Tabla 6. Parámetros estadísticos calculados para la linealidad del sistema

| Parámetros estadísticos de la regresión | |
|---|--------------|
| Coefficiente de correlación (r) | 0.9901 |
| Coefficiente de determinación (r ²) | 0.9803 |
| Intercepto (b) | 1848.5 |
| Pendiente (m) | 26.7228 |
| Intervalo de confianza de la pendiente | 26.72 ± 2.03 |
| t _{calculado} | 7.12308 |
| t _{crítica} (α=0.05) | 3.012 |
| F _{calculada} | 646.67 |
| F _{crítica} (α=0.01) | 4.67 |
| Coefficiente de variación (C.V., %) | 3.75 |

La figura 8 muestra que el modelo de regresión lineal simple es adecuado para ajustar los datos. De la tabla 6 y 7 se puede decir que el método analítico es lineal, exacto y preciso.

Tabla 7. Resultados de la validación para cuantificar el KT permeado.

| Parámetro | |
|-------------------------------|---------------------|
| Exactitud | 99.16 %; C.V.:8.61% |
| Precisión | |
| Repetibilidad | 2.51 % |
| Inter-día | 3.69 % |
| Límite de detección (ng) | 12.42 |
| Límite de cuantificación (ng) | 41.41 |

Anexo 2.4 Método utilizado para cuantificar el fármaco retenido en la piel

Para determinar la cantidad de fármaco retenido en la piel una vez que se ha concluido la permeación, primero se evaluó el porcentaje de recuperación aplicando una cantidad conocida de fármaco, cortando la piel en pequeños trozos y colocándola en agitación con diferentes medios y evaluando diferentes tiempos de agitación y temperatura: etanol a 24 h y temperatura ambiente (t.a.); etanol 48 h a 37°C y metanol 24 h a t.a. Como puede verse en la figura 9, se obtuvo un mayor porcentaje de extracción al emplear metanol como disolvente, además de que se necesitó un menor tiempo de agitación y condiciones más suaves (t.a.)

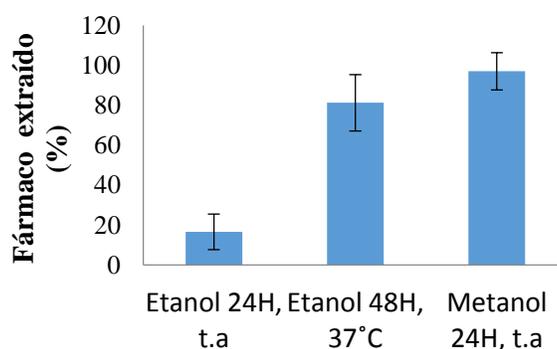


Figura 9. Porcentaje de recuperación de fármaco a partir de la piel

Una vez seleccionado el metanol como disolvente para la extracción del fármaco retenido en piel, se desarrolló un método con las mismas condiciones en las cuales se encontraba la muestra, para lo cual se emplearon secciones de piel que estuvieron en contacto con metanol por 24 h con agitación constante, la solución resultante se filtró y se empleó para evaluar los siguientes parámetros de validación: linealidad, exactitud, precisión (repetibilidad e inter-día), límite de detección y cuantificación.

Linealidad

En la tabla 8 se muestran las ABC obtenidas para cada nivel de cantidad aplicada del KT empleados para construir la curva de calibración. En la figura 10 se representa gráficamente la recta de

calibrado resultante, mientras que en la tabla 9 se muestran los parámetros de regresión, los valores de F del análisis de varianza para evaluar la linealidad y los valores de t para la prueba de la ordenada al origen.

La figura 11 muestra que el modelo de regresión lineal simple es adecuado para ajustar los datos. A partir de lo reportado en la tabla 9 y 10, se puede decir que el método es lineal, exacto y preciso.

Tabla 8. Valores individuales de las respuestas cromatográficas obtenidas con cantidades crecientes de KT

| Cantidad (ng) | Respuesta analítica ABC | | |
|---------------|-------------------------|---------|---------|
| | 202.6 | 7052.9 | 7385.4 |
| 303.9 | 9268.8 | 9119.8 | 8571.8 |
| 405.2 | 10394.4 | 10081.8 | 10127.5 |
| 506.5 | 11683.7 | 11225.3 | 11616 |
| 607.8 | 12966.7 | 12760.7 | 12809.7 |

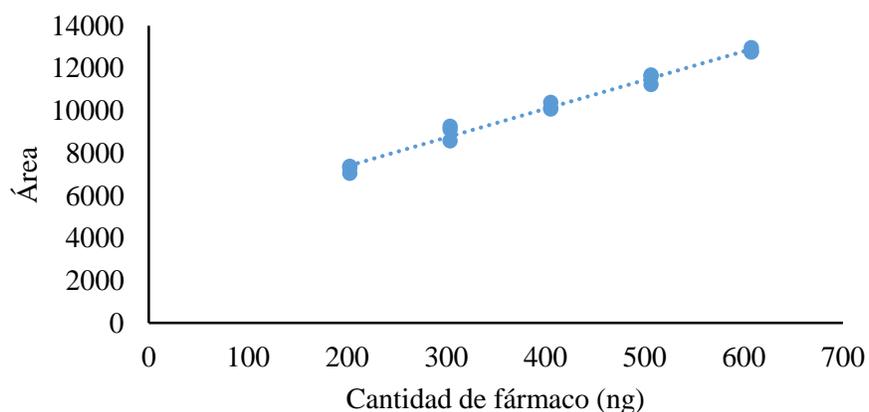


Figura 10. Curva de calibración de KT de 200 a 600 ng en metanol en contacto con piel

Tabla 9. Parámetros estadísticos calculados para la linealidad del sistema

| Parámetros estadísticos de la regresión | |
|---|--------------|
| Coefficiente de correlación (r) | 0.9934 |
| Coefficiente de determinación (r ²) | 0.9869 |
| Intercepto (b) | 4677.67 |
| Pendiente (m) | 13.5282 |
| Intervalo de confianza de la pendiente | 13.52 ± 0.84 |
| t _{calculado} | 25.1655 |
| t _{crítica} (α=0.05) | 2.977 |
| F _{calculada} | 978.41 |
| F _{crítica} (α=0.05) | 4.67 |
| Coefficiente de variación (C.V., %) | 2.23 |

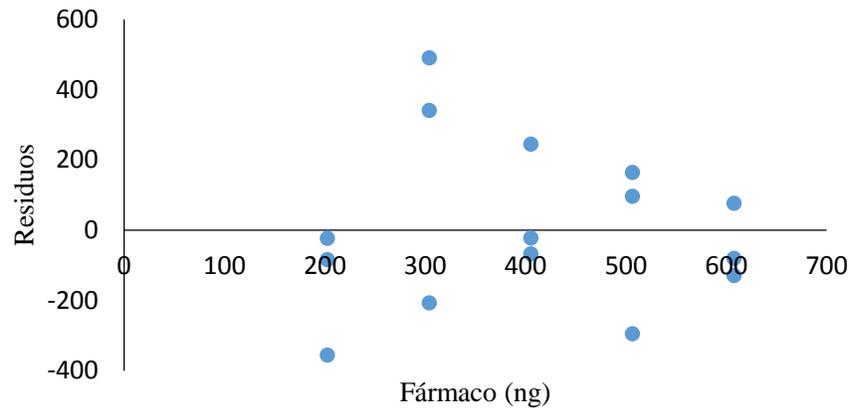


Figura 11. Gráfico de residuales para la curva de calibración preparada con metano-piel

Tabla 10. Resultados de la validación para cuantificar el KT retenido en la piel

| Parámetro | |
|-------------------------------|-----------------------|
| Exactitud | 100.07 %; C.V.: 2.58% |
| Precisión | |
| Repetibilidad | 3.64 % |
| Inter-día | 9.12 % |
| Límite de detección (ng) | 57.46 |
| Límite de cuantificación (ng) | 191.55 |

Anexo 2.5 Método utilizado para cuantificar el KT en los estudios *in vivo*

Para determinar la cantidad de fármaco en las cintas de *tape stripping* de los estudios realizados *in vivo*. Se evaluó el porcentaje de recuperación aplicando una cantidad conocida de fármaco, cortando las cintas en pequeños trozos y colocándolas en agitación con 6 mL de metanol durante 3 h y 6 h. En la figura 12 se observa que no hay evidencia significativa al agitar 3 o 6 h, a ambos tiempos se extrae casi el 100% del fármaco adicionado, por lo que el tiempo de agitación que se usó fue de 3 h.

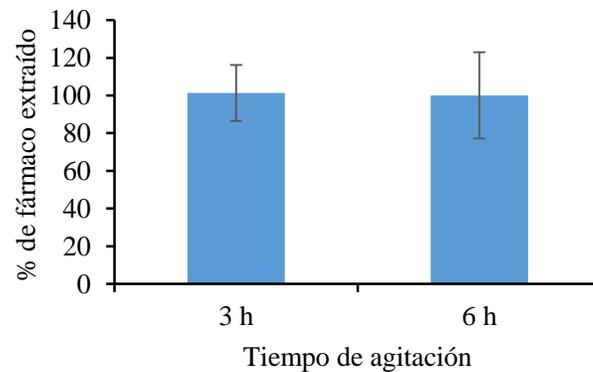


Figura 12. Porcentaje extraído de fármaco a partir de las cintas

Una vez seleccionado el tiempo de agitación en metanol para la extracción del fármaco retenido en las cintas, se evaluaron los siguientes parámetros de validación: linealidad, exactitud, precisión (repetibilidad e inter-día).

Linealidad

En la tabla 11 se muestran las ABC obtenidas para cada nivel de cantidad aplicada del KT empleados para construir la curva de calibración. En la figura 13 se representa gráficamente la recta de calibrado resultante, mientras que en la tabla 12 se muestran los parámetros de regresión, los valores de F del análisis de varianza para evaluar la linealidad y los valores de t para la prueba de la ordenada al origen.

Tabla 11. Valores individuales de las respuestas cromatográficas obtenidas con cantidades crecientes de KT

| Cantidad (ng) | Respuesta analítica ABC | | |
|---------------|-------------------------|---------|---------|
| | 50.8 | 3037.3 | 3018.6 |
| 101.6 | 4386.9 | 4546.1 | 4739.6 |
| 203.2 | 6740.1 | 6599.7 | 6504.6 |
| 304.8 | 8985.5 | 9117.9 | 8065 |
| 406.4 | 10503.3 | 10390.6 | 10734.2 |

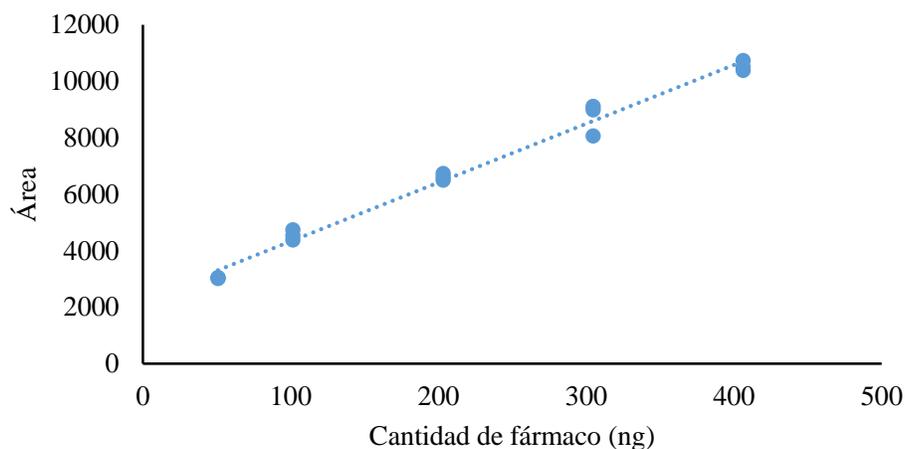


Figura 13. Curva de calibración de KT de 50 a 400 ng en metanol

La figura 14 muestra que el modelo de regresión lineal simple es adecuado para ajustar los datos. De las tablas 12 y 13 se puede decir que el método es lineal, preciso y exacto.

Tabla 12. Parámetros estadísticos calculados para la linealidad del sistema

| Parámetros estadísticos de la regresión | |
|---|--------------|
| Coefficiente de correlación (r) | 0.9940 |
| Coefficiente de determinación (r ²) | 0.9881 |
| Intercepto (b) | 2252.86 |
| Pendiente (m) | 20.8207 |
| Intervalo de confianza de la pendiente | 20.82 ± 1.23 |
| t _{calculado} | 14.2195 |
| t _{crítica} (α=0.05) | 2.977 |
| F _{calculada} | 1078.54 |
| F _{crítica} (α=0.05) | 4.67 |
| Coefficiente de variación (C.V., %) | 3.0 |

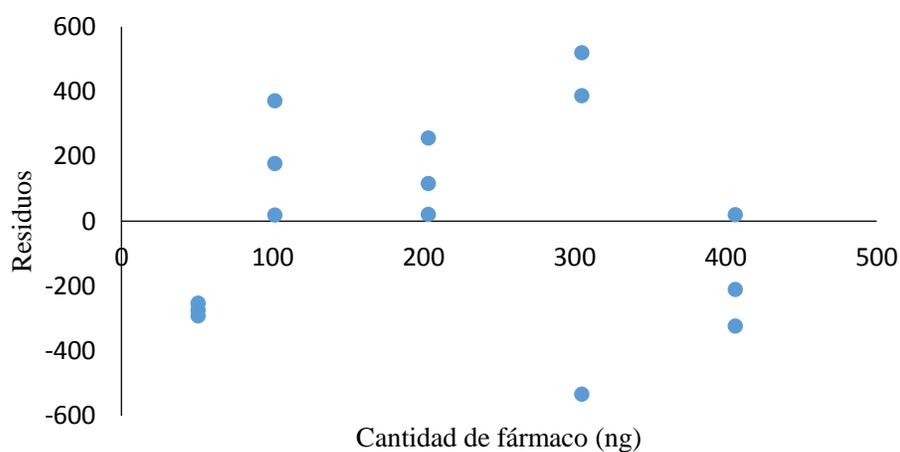


Figura 14. Gráfico de residuales para la curva de calibración preparada con metanol

Tabla 13 Resultados de la validación para cuantificar el KT en las cintas de tape stripping

| Parámetro | |
|-------------------------------|--------------------|
| Exactitud | 99.6%; C.V.: 5.48% |
| Precisión | |
| Repetibilidad (C.V.; %) | 2.9 |
| Límite de detección (ng) | 22.38 |
| Límite de cuantificación (ng) | 6.71 |

ANEXO 3. Análisis estadístico de la optimización del método de preparación de los LE

Tabla 1. Resultados obtenidos para la optimización del método de preparación de los LE

| No. De extrusiones | Tiempo de ultrasonido | Tamaño (nm) | IPD | Potencial Zeta (mV) |
|--------------------|-----------------------|-------------|-------|---------------------|
| 1 | 0 | 144 | 0.094 | -9.841 |
| 1 | 0 | 152 | 0.213 | -10.44 |
| 1 | 0 | 149 | 0.079 | -10.39 |
| 1 | 0 | 147 | 0.15 | -14.08 |
| 1 | 0 | 150 | 0.031 | -13.99 |
| 1 | 0 | 157 | 0.178 | -13.49 |
| 1 | 0 | 153 | 0.118 | -10.39 |
| 1 | 0 | 146.5 | 0.063 | -14.08 |
| 1 | 0 | 149.5 | 0.163 | -11.65 |
| 1 | 10 | 153 | 0.155 | -17.07 |
| 1 | 10 | 155 | 0.155 | -20.24 |
| 1 | 10 | 154 | 0.09 | -11.75 |
| 1 | 10 | 151 | 0.105 | -19.29 |
| 1 | 10 | 151.6 | 0.115 | -20.36 |
| 1 | 10 | 152 | 0.141 | -20.95 |
| 1 | 10 | 152 | 0.111 | -14.36 |
| 1 | 10 | 154 | 0.145 | -15.02 |
| 1 | 10 | 151 | 0.104 | -13.1 |
| 1 | 20 | 144.1 | 0.199 | -17.53 |
| 1 | 20 | 147 | 0.147 | -18.46 |
| 1 | 20 | 149.1 | 0.101 | -18.17 |
| 1 | 20 | 146 | 0.203 | -16.23 |
| 1 | 20 | 148.4 | 0.153 | -16.8 |
| 1 | 20 | 149.1 | 0.188 | -15.49 |
| 1 | 20 | 147 | 0.102 | -15.96 |
| 1 | 20 | 149.6 | 0.101 | -8.645 |
| 1 | 20 | 147 | 0.115 | -9.689 |
| 1 | 30 | 194.6 | 0.166 | -9.6 |
| 1 | 30 | 143.4 | 0.164 | -12.67 |
| 1 | 30 | 139.2 | 0.139 | -11.99 |
| 1 | 30 | 143.9 | 0.127 | -10.89 |
| 1 | 30 | 144.1 | 0.172 | -10.66 |
| 1 | 30 | 138.7 | 0.301 | -9.664 |
| 1 | 30 | 142.4 | 0.049 | -11.79 |
| 1 | 30 | 144.1 | 0.108 | -11.22 |
| 1 | 30 | 141.7 | 0.149 | -11.48 |

Continuación tabla 1

| No. De extrusiones | Tiempo de ultrasonido | Tamaño (nm) | IPD | Potencial Zeta (mV) |
|--------------------|-----------------------|-------------|-------|---------------------|
| 2 | 0 | 137 | 0.101 | -10.5 |
| 2 | 0 | 139 | 0.116 | -9.393 |
| 2 | 0 | 146 | 0.146 | -11.26 |
| 2 | 0 | 148 | 0.163 | -11.55 |
| 2 | 0 | 140 | 0.127 | -11.32 |
| 2 | 0 | 139 | 0.092 | -12.84 |
| 2 | 0 | 143 | 0.077 | -10.5 |
| 2 | 0 | 139.3 | 0.041 | -11.393 |
| 2 | 0 | 141.1 | 0.071 | -11.28 |
| 2 | 10 | 142 | 0.166 | -14.2 |
| 2 | 10 | 143 | 0.107 | -15.68 |
| 2 | 10 | 146 | 0.109 | -17.33 |
| 2 | 10 | 138.3 | 0.08 | -17.02 |
| 2 | 10 | 138.9 | 0.096 | -18.25 |
| 2 | 10 | 138.9 | 0.061 | -15.04 |
| 2 | 10 | 144 | 0.158 | -13.78 |
| 2 | 10 | 139 | 0.105 | -12.16 |
| 2 | 10 | 143 | 0.086 | -13.3 |
| 2 | 20 | 143 | 0.087 | -15.39 |
| 2 | 20 | 146 | 0.131 | -16.86 |
| 2 | 20 | 146 | 0.139 | -16.36 |
| 2 | 20 | 138 | 0.115 | -15.58 |
| 2 | 20 | 137.6 | 0.042 | -14.48 |
| 2 | 20 | 136 | 0.042 | -19.28 |
| 2 | 20 | 143 | 0.059 | -14.8 |
| 2 | 20 | 139 | 0.112 | -13.41 |
| 2 | 20 | 139 | 0.128 | -12.63 |
| 2 | 30 | 135.4 | 0.081 | -13.11 |
| 2 | 30 | 135.4 | 0.178 | -13.81 |
| 2 | 30 | 135.3 | 0.063 | -9.784 |
| 2 | 30 | 136.8 | 0.103 | -12.45 |
| 2 | 30 | 184.1 | 0.276 | -10.69 |
| 2 | 30 | 133.4 | 0.096 | -9.619 |
| 2 | 30 | 134.1 | 0.131 | -8.684 |
| 2 | 30 | 133.7 | 0.028 | -12.31 |
| 2 | 30 | 133.6 | 0.075 | -9.955 |
| 3 | 0 | 142 | 0.101 | -9.686 |
| 3 | 0 | 138 | 0.081 | -12.09 |

Continuación tabla 1

| No. De extrusiones | Tiempo de ultrasonido | Tamaño (nm) | IPD | Potencial Zeta (mV) |
|--------------------|-----------------------|-------------|-------|---------------------|
| 3 | 0 | 141 | 0.048 | -7.765 |
| 3 | 0 | 136 | 0.144 | -11.75 |
| 3 | 0 | 141 | 0.068 | -11.42 |
| 3 | 0 | 133 | 0.109 | -11.02 |
| 3 | 0 | 137.3 | 0.046 | -9.686 |
| 3 | 0 | 143.4 | 0.077 | -12.09 |
| 3 | 0 | 133.7 | 0.24 | -10.14 |
| 3 | 10 | 137 | 0.102 | -12.63 |
| 3 | 10 | 135 | 0.108 | -15.97 |
| 3 | 10 | 135 | 0.132 | -14.34 |
| 3 | 10 | 136 | 0.072 | -12.22 |
| 3 | 10 | 138 | 0.025 | -17.42 |
| 3 | 10 | 134 | 0.129 | -12.18 |
| 3 | 10 | 138 | 0.047 | -12.78 |
| 3 | 10 | 139 | 0.078 | -11.62 |
| 3 | 10 | 135.6 | 0.09 | -13.58 |
| 3 | 20 | 135.4 | 0.109 | -13.38 |
| 3 | 20 | 135.8 | 0.038 | -8.072 |
| 3 | 20 | 133 | 0.014 | -8.264 |
| 3 | 20 | 134 | 0.095 | -12.94 |
| 3 | 20 | 132 | 0.163 | -11.47 |
| 3 | 20 | 132.2 | 0.207 | -12.5 |
| 3 | 20 | 135.3 | 0.03 | -13.92 |
| 3 | 20 | 130.9 | 0.104 | -12.3 |
| 3 | 20 | 134 | 0.036 | -13.6 |
| 3 | 30 | 133.9 | 0.023 | -10.02 |
| 3 | 30 | 131.2 | 0.023 | -11.23 |
| 3 | 30 | 130.8 | 0.09 | -11.61 |
| 3 | 30 | 133.4 | 0.03 | -9.776 |
| 3 | 30 | 130.1 | 0.046 | -10.16 |
| 3 | 30 | 131 | 0.094 | -11.38 |
| 3 | 30 | 138.6 | 0.05 | -11.31 |
| 3 | 30 | 135.8 | 0.115 | -11.24 |
| 3 | 30 | 131.2 | 0.092 | -11.15 |
| 4 | 0 | 139 | 0.213 | -4.39 |
| 4 | 0 | 144 | 0.078 | -6.66 |
| 4 | 0 | 137 | 0.076 | -7.45 |
| 4 | 0 | 136 | 0.017 | -11.66 |

Continuación tabla 1

| No. De extrusiones | Tiempo de ultrasonido | Tamaño (nm) | IPD | Potencial Zeta (mV) |
|--------------------|-----------------------|-------------|-------|---------------------|
| 4 | 0 | 142 | 0.08 | -12.13 |
| 4 | 0 | 129.7 | 0.16 | -12.79 |
| 4 | 0 | 135.5 | 0.027 | -9.61 |
| 4 | 0 | 132.3 | 0.114 | -7.43 |
| 4 | 0 | 133.8 | 0.055 | -10.58 |
| 4 | 10 | 132 | 0.08 | -14.06 |
| 4 | 10 | 134 | 0.116 | -14.25 |
| 4 | 10 | 132 | 0.165 | -15.2 |
| 4 | 10 | 131 | 0.018 | -13.65 |
| 4 | 10 | 135 | 0.122 | -13.29 |
| 4 | 10 | 134 | 0.016 | -10.41 |
| 4 | 10 | 132 | 0.086 | -13.68 |
| 4 | 10 | 131 | 0.127 | -12.05 |
| 4 | 10 | 131 | 0.023 | -9.57 |
| 4 | 20 | 130.9 | 0.004 | -14.22 |
| 4 | 20 | 130.7 | 0.127 | -9.865 |
| 4 | 20 | 131.7 | 0.097 | -9.736 |
| 4 | 20 | 131 | 0.087 | -12.16 |
| 4 | 20 | 133 | 0.103 | -12.11 |
| 4 | 20 | 131.2 | 0.138 | -10.48 |
| 4 | 20 | 130.7 | 0.191 | -15.29 |
| 4 | 20 | 132.9 | 0.117 | -13.73 |
| 4 | 20 | 133 | 0.062 | -11.45 |
| 4 | 30 | 129.1 | 0.081 | -14.17 |
| 4 | 30 | 129.5 | 0.069 | -11.47 |
| 4 | 30 | 126.8 | 0.064 | -13.23 |
| 4 | 30 | 129.7 | 0.099 | -8.173 |
| 4 | 30 | 129.3 | 0.08 | -8.611 |
| 4 | 30 | 125.7 | 0.123 | -6.985 |
| 4 | 30 | 128.5 | 0.006 | -10.7 |
| 4 | 30 | 126.2 | 0.095 | -11.63 |
| 4 | 30 | 127.6 | 0.196 | -9.854 |
| 5 | 0 | 131 | 0.105 | -9.23 |
| 5 | 0 | 135 | 0.124 | -10.44 |
| 5 | 0 | 136 | 0.079 | -7.94 |
| 5 | 0 | 139 | 0.062 | -11.23 |
| 5 | 0 | 137 | 0.146 | -9.69 |
| 5 | 0 | 139 | 0.128 | -9.75 |

Continuación tabla 1

| No. De extrusiones | Tiempo de ultrasonido | Tamaño (nm) | IPD | Potencial Zeta (mV) |
|--------------------|-----------------------|-------------|-------|---------------------|
| 5 | 0 | 131.3 | 0.012 | -9.75 |
| 5 | 0 | 131.2 | 0.077 | -9.61 |
| 5 | 0 | 130.6 | 0.159 | -9.75 |
| 5 | 10 | 131 | 0.159 | -12.39 |
| 5 | 10 | 131 | 0.188 | -11.13 |
| 5 | 10 | 126 | 0.031 | -11.6 |
| 5 | 10 | 131 | 0.029 | -11.13 |
| 5 | 10 | 131 | 0.179 | -12.43 |
| 5 | 10 | 131 | 0.078 | -12.84 |
| 5 | 10 | 133 | 0.107 | -11.03 |
| 5 | 10 | 135 | 0.097 | -10.6 |
| 5 | 10 | 132 | 0.027 | -16.19 |
| 5 | 20 | 127 | 0.04 | -13.25 |
| 5 | 20 | 128.4 | 0.023 | -11.52 |
| 5 | 20 | 132 | 0.142 | -10.89 |
| 5 | 20 | 130 | 0.126 | -10.72 |
| 5 | 20 | 129.7 | 0.09 | -9.988 |
| 5 | 20 | 131.6 | 0.079 | -11 |
| 5 | 20 | 129.2 | 0.156 | -10.08 |
| 5 | 20 | 131 | 0.063 | -12.52 |
| 5 | 20 | 128 | 0.033 | -9.843 |
| 5 | 30 | 124.9 | 0.106 | -11.45 |
| 5 | 30 | 124.3 | 0.073 | -10.24 |
| 5 | 30 | 125.9 | 0.109 | -9.317 |
| 5 | 30 | 124.6 | 0.043 | -15.45 |
| 5 | 30 | 126.1 | 0.174 | -12.67 |
| 5 | 30 | 123.2 | 0.063 | -6.471 |
| 5 | 30 | 124.5 | 0.083 | -12.87 |
| 5 | 30 | 124.9 | 0.105 | -10.32 |
| 5 | 30 | 126.9 | 0.043 | -10.71 |

Anexo 3.1 Análisis estadístico del tamaño (respuesta) en función del número de extrusiones y tiempo de ultrasonido

Análisis de Varianza para Tamaño - Suma de Cuadrados Tipo III

| Fuente | Suma de Cuadrados | Gl | Cuadrado Medio | Razón-F | Valor-P |
|-----------------------------|-------------------|-----|----------------|---------|---------|
| EFFECTOS PRINCIPALES | | | | | |
| A: No. De extrusiones | 8753.25 | 4 | 2188.31 | 61.45 | 0.0000 |
| B: Tiempo de ultrasonido | 736.74 | 3 | 245.58 | 6.90 | 0.0002 |
| INTERACCIONES | | | | | |
| AB | 337.949 | 12 | 28.1625 | 0.79 | 0.6594 |
| RESIDUOS | 5697.8 | 160 | 35.6113 | | |
| TOTAL (CORREGIDO) | 15525.7 | 179 | | | |

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

Pruebas de Múltiple Rangos para Tamaño por No. de extrusiones

Método: 95.0 porcentaje LSD

| No. De extrusiones | Casos | Media LS | Sigma LS | Grupos Homogéneos |
|--------------------|-------|----------|----------|-------------------|
| 5 | 36 | 130.092 | 0.994586 | X |
| 4 | 36 | 132.189 | 0.994586 | X |
| 3 | 36 | 135.322 | 0.994586 | X |
| 2 | 36 | 140.969 | 0.994586 | X |
| 1 | 36 | 149.472 | 0.994586 | X |

| Contraste | Sig. | Diferencia | +/- Límites |
|-----------|------|------------|-------------|
| 1 - 2 | * | 8.50278 | 2.77782 |
| 1 - 3 | * | 14.15 | 2.77782 |
| 1 - 4 | * | 17.2833 | 2.77782 |
| 1 - 5 | * | 19.3806 | 2.77782 |
| 2 - 3 | * | 5.64722 | 2.77782 |
| 2 - 4 | * | 8.78056 | 2.77782 |
| 2 - 5 | * | 10.8778 | 2.77782 |
| 3 - 4 | * | 3.13333 | 2.77782 |
| 3 - 5 | | 2.23056 | 2.77782 |
| 4 - 5 | | 2.09722 | 2.77782 |

* indica una diferencia significativa.

Pruebas de Múltiple Rangos para Tamaño por Tiempo

Método: 95.0 porcentaje LSD

| Tiempo | Casos | Media LS | Sigma LS | Grupos Homogéneos |
|--------|-------|----------|----------|-------------------|
| 30 | 45 | 134.836 | 0.88307 | X |
| 20 | 45 | 136.656 | 0.88307 | XX |
| 10 | 45 | 138.829 | 0.88307 | XX |
| 0 | 45 | 140.116 | 0.88307 | X |

| Contraste | Sig. | Diferencia | +/- Límites |
|-----------|------|------------|-------------|
| 0 - 10 | | 1.28667 | 2.46505 |
| 0 - 20 | * | 3.46 | 2.46505 |
| 0 - 30 | * | 5.28 | 2.46505 |
| 10 - 20 | | 2.17333 | 2.46505 |
| 10 - 30 | * | 3.99333 | 2.46505 |
| 20 - 30 | | 1.82 | 2.46505 |

* indica una diferencia significativa.

Anexo 3.2 Análisis estadístico del IPD (respuesta) en función del número de extrusiones y tiempo de ultrasonido

Análisis de Varianza para IPD - Suma de Cuadrados Tipo III

| Fuente | Suma de Cuadrados | Gl | Cuadrado Medio | Razón-F | Valor-P |
|-----------------------------|-------------------|-----|----------------|---------|---------|
| EFFECTOS PRINCIPALES | | | | | |
| A:No. De extrusiones | 0.0590888 | 4 | 0.0147722 | 5.56 | 0.0003 |
| B:Tiempo | 0.000234889 | 3 | 0.0000782963 | 0.03 | 0.9932 |
| INTERACCIONES | | | | | |
| AB | 0.0186347 | 12 | 0.00155289 | 0.58 | 0.8527 |
| RESIDUOS | 0.425279 | 160 | 0.002658 | | |
| TOTAL (CORREGIDO) | 0.503238 | 179 | | | |

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

Pruebas de Múltiple Rangos para IPD por No. De Extrusiones

Método: 95.0 porcentaje LSD

| No. De extrusiones | Casos | Media LS | Sigma LS | Grupos Homogéneos |
|--------------------|-------|-----------|------------|-------------------|
| 3 | 36 | 0.0848889 | 0.00859263 | X |
| 4 | 36 | 0.092 | 0.00859263 | X |
| 5 | 36 | 0.0927222 | 0.00859263 | X |
| 2 | 36 | 0.105222 | 0.00859263 | X |
| 1 | 36 | 0.135944 | 0.00859263 | X |

| Contraste | Sig. | Diferencia | +/- Límites |
|-----------|------|--------------|-------------|
| 1 - 2 | * | 0.0307222 | 0.0239987 |
| 1 - 3 | * | 0.0510556 | 0.0239987 |
| 1 - 4 | * | 0.0439444 | 0.0239987 |
| 1 - 5 | * | 0.0432222 | 0.0239987 |
| 2 - 3 | | 0.0203333 | 0.0239987 |
| 2 - 4 | | 0.0132222 | 0.0239987 |
| 2 - 5 | | 0.0125 | 0.0239987 |
| 3 - 4 | | -0.00711111 | 0.0239987 |
| 3 - 5 | | -0.00783333 | 0.0239987 |
| 4 - 5 | | -0.000722222 | 0.0239987 |

* indica una diferencia significativa.

Pruebas de Múltiple Rangos para IPD por Tiempo

Método: 95.0 porcentaje LSD

| Tiempo | Casos | Media LS | Sigma LS | Grupos Homogéneos |
|--------|-------|----------|------------|-------------------|
| 10 | 45 | 0.100444 | 0.00757319 | X |
| 30 | 45 | 0.1018 | 0.00757319 | X |
| 20 | 45 | 0.103067 | 0.00757319 | X |
| 0 | 45 | 0.103311 | 0.00757319 | X |

| Contraste | Sig. | Diferencia | +/- Límites |
|-----------|------|-------------|-------------|
| 0 - 10 | | 0.00286667 | 0.0211402 |
| 0 - 20 | | 0.000244444 | 0.0211402 |
| 0 - 30 | | 0.00151111 | 0.0211402 |
| 10 - 20 | | -0.00262222 | 0.0211402 |
| 10 - 30 | | -0.00135556 | 0.0211402 |
| 20 - 30 | | 0.00126667 | 0.0211402 |

* indica una diferencia significativa.

Anexo 3.3 Análisis estadístico del potencial zeta (respuesta) en función del número de extrusiones y tiempo de ultrasonido

Análisis de Varianza para Potencial Zeta - Suma de Cuadrados Tipo III

| Fuente | Suma de Cuadrados | Gl | Cuadrado Medio | Razón-F | Valor-P |
|----------------------|-------------------|-----|----------------|---------|---------|
| EFFECTOS PRINCIPALES | | | | | |
| A:No. De extrusiones | 228.05 | 4 | 57.0124 | 12.58 | 0.0000 |
| B:Tiempo | 407.289 | 3 | 135.763 | 29.95 | 0.0000 |
| RESIDUOS | 779.776 | 172 | 4.53358 | | |
| TOTAL (CORREGIDO) | 1415.11 | 179 | | | |

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

Pruebas de Múltiple Rangos para Potencial Zeta por No. De Extrusiones

Método: 95.0 porcentaje LSD

| No. De extrusiones | Casos | Media LS | Sigma LS | Grupos Homogéneos |
|--------------------|-------|----------|----------|-------------------|
| 1 | 36 | -13.8175 | 0.35487 | X |
| 2 | 36 | -13.2222 | 0.35487 | X |
| 3 | 36 | -11.7419 | 0.35487 | X |
| 4 | 36 | -11.1868 | 0.35487 | X |
| 5 | 36 | -11.0011 | 0.35487 | X |

| Contraste | Sig. | Diferencia | +/- Límites |
|-----------|------|------------|-------------|
| 1 - 2 | | -0.595306 | 0.990604 |
| 1 - 3 | * | -2.07556 | 0.990604 |
| 1 - 4 | * | -2.63069 | 0.990604 |
| 1 - 5 | * | -2.81639 | 0.990604 |
| 2 - 3 | * | -1.48025 | 0.990604 |
| 2 - 4 | * | -2.03539 | 0.990604 |
| 2 - 5 | * | -2.22108 | 0.990604 |
| 3 - 4 | | -0.555139 | 0.990604 |
| 3 - 5 | | -0.740833 | 0.990604 |
| 4 - 5 | | -0.185694 | 0.990604 |

* indica una diferencia significativa.

Pruebas de Múltiple Rangos para Potencial Zeta por Tiempo

Método: 95.0 porcentaje LSD

| Tiempo | Casos | Media LS | Sigma LS | Grupos Homogéneos |
|--------|-------|----------|----------|-------------------|
| 10 | 45 | -14.1587 | 0.317406 | X |
| 20 | 45 | -13.1347 | 0.317406 | X |
| 30 | 45 | -10.9461 | 0.317406 | X |
| 0 | 45 | -10.5361 | 0.317406 | X |

| Contraste | Sig. | Diferencia | +/- Límites |
|-----------|------|------------|-------------|
| 0 - 10 | * | 3.62258 | 0.886023 |
| 0 - 20 | * | 2.59862 | 0.886023 |
| 0 - 30 | | 0.409978 | 0.886023 |
| 10 - 20 | * | -1.02396 | 0.886023 |
| 10 - 30 | * | -3.2126 | 0.886023 |
| 20 - 30 | * | -2.18864 | 0.886023 |

* indica una diferencia significativa.

Anexo 3.4 Influencia del medio de hidratación sobre el tamaño de los LE

| Medio de dispersión | Etanol 7% | Agua | Etanol 7% | Agua |
|---------------------|-------------|--------|-----------|-------|
| Lote | Tamaño (nm) | | IPD | |
| 1 | 121 | 134 | 0.079 | 0.062 |
| | 126 | 140 | 0.092 | 0.111 |
| | 128 | 137 | 0.033 | 0.07 |
| 2 | 125 | 131 | 0.155 | 0.175 |
| | 126 | 131 | 0.137 | 0.027 |
| | 130 | 128 | 0.07 | 0.007 |
| 3 | 121 | 130 | 0.084 | 0.122 |
| | 127 | 134 | 0.222 | 0.206 |
| | 123 | 125 | 0.048 | 0.143 |
| Promedio | 125.22 | 132.22 | 0.102 | 0.102 |
| D.E. | 3.07 | 4.58 | 0.059 | 0.067 |

Análisis estadístico

Comparación de Medias

Intervalos de confianza del 95.0% para la media de Etanol 7%: 125.222 +/- 2.36226 [122.86, 127.584]

Intervalos de confianza del 95.0% para la media de Agua: 132.222 +/- 3.51783 [128.704, 135.74]

Intervalos de confianza del 95.0% intervalo de confianza para la diferencia de medias
suponiendo varianzas iguales: -7.0 +/- 3.89541 [-10.8954, -3.10459]

Prueba t para comparar medias

Hipótesis nula: media1 = media2

Hipótesis Alt.: media1 <> media2

suponiendo varianzas iguales: t = -3.80945 valor-P = 0.0015417

Se rechaza la hipótesis nula para alfa = 0.05.

Anexo 3.5 Influencia de la cantidad adicionada de fármaco sobre la eficiencia de encapsulamiento

| Cantidad adicionada de fármaco (mg) | Lote 1 | Lote 2 | Lote 3 |
|-------------------------------------|-----------------------------------|--------|--------|
| | Eficiencia de encapsulamiento (%) | | |
| 2 | 62.21 | 57.38 | 88.61 |
| | 55.09 | 51.54 | 72.70 |
| | 88.88 | 77.68 | 83.33 |
| | 87.23 | 72.49 | 76.67 |
| | 73.25 | 74.51 | 82.23 |
| | 69.81 | 68.03 | 74.59 |
| 5 | 31.97 | 25.19 | 30.50 |
| | 26.19 | 23.71 | 27.33 |
| | 26.69 | 29.18 | 21.84 |
| | 22.56 | 28.31 | 23.99 |
| | 37.25 | 28.51 | 39.16 |
| | 29.83 | 26.19 | 30.67 |

Comparación de Medias

Intervalos de confianza del 95.0% para la media de Col_1: 28.2829 +/- 2.29322 [25.9896, 30.5761]

Intervalos de confianza del 95.0% para la media de Col_2: 73.1262 +/- 5.53633 [67.5899, 78.6626]

Intervalos de confianza del 95.0% intervalo de confianza para la diferencia de medias

suponiendo varianzas iguales: -44.8434 +/- 5.77216 [-50.6155, -39.0712]

Prueba t para comparar medias

Hipótesis nula: media1 = media2

Hipótesis Alt.: media1 <> media2

suponiendo varianzas iguales: t = -15.7884 valor-P = 0

Se rechaza la hipótesis nula para alfa = 0.05.

Anexo 4. Evaluación estadística de la elasticidad

Tabla ANOVA

| Fuente | Suma de Cuadrados | Gl | Cuadrado Medio | Razón-F | Valor-P |
|---------------|-------------------|----|----------------|---------|---------|
| Entre grupos | 11017.4 | 4 | 2754.35 | 349.36 | 0.0000 |
| Intra grupos | 315.356 | 40 | 7.88389 | | |
| Total (Corr.) | 11332.8 | 44 | | | |

| Contraste | Sig. | Diferencia | +/- Límites |
|---------------|------|------------|-------------|
| Col_1 - Col_2 | * | 20.0556 | 3.78072 |
| Col_1 - Col_3 | | 2.23333 | 3.78072 |
| Col_1 - Col_4 | * | 20.5444 | 3.78072 |
| Col_1 - Col_5 | * | -21.9556 | 3.78072 |
| Col_2 - Col_3 | * | -17.8222 | 3.78072 |
| Col_2 - Col_4 | | 0.488889 | 3.78072 |
| Col_2 - Col_5 | * | -42.0111 | 3.78072 |
| Col_3 - Col_4 | * | 18.3111 | 3.78072 |
| Col_3 - Col_5 | * | -24.1889 | 3.78072 |
| Col_4 - Col_5 | * | -42.5 | 3.78072 |

* indica una diferencia significativa.

Anexo 5. Evaluación de la estabilidad de los liposomas a través del tiempo evaluando tamaño, potencial zeta y eficiencia de encapsulamiento

Evaluación de la estabilidad de los LE a través del tiempo evaluando el tamaño de las vesículas

| | Tiempo (semanas) | | | | | | | |
|------|------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 7 | 52 |
| Lote | Tamaño (nm) | | | | | | | |
| 1 | 123.7 | 129.8 | 125.9 | 126.2 | 130.4 | 135 | 128.6 | 135.1 |
| | 129.6 | 131.9 | 130.2 | 130.3 | 128.9 | 128.5 | 129.3 | 138.4 |
| | 124.7 | 131.6 | 130.4 | 127 | 129.2 | 126.2 | 133.6 | 132.1 |
| 2 | 132.7 | 132.7 | 134.4 | 136.3 | 136.8 | 132.3 | 138.6 | 136.4 |
| | 129 | 132.3 | 133.8 | 136.8 | 138 | 130.7 | 135 | 139.3 |
| | 131.4 | 128.2 | 130.8 | 136.7 | 132.6 | 135.2 | 138.1 | 137.9 |
| 3 | 133.4 | 127 | 133.7 | 137.7 | 132.4 | 130.3 | 133.6 | 135.8 |
| | 130.5 | 128.6 | 134 | 134.7 | 131.3 | 132.2 | 135.1 | 135.7 |
| | 131.4 | 126.2 | 128.9 | 132.5 | 126.5 | 133.5 | 132.7 | 136.5 |

Tabla ANOVA

| Fuente | Suma de Cuadrados | Gl | Cuadrado Medio | Razón-F | Valor-P |
|---------------|-------------------|----|----------------|---------|---------|
| Entre grupos | 311.738 | 7 | 44.534 | 4.28 | 0.0006 |
| Intra grupos | 666.367 | 64 | 10.412 | | |
| Total (Corr.) | 978.104 | 71 | | | |

Pruebas de Múltiple Rangos

Método: 95.0 porcentaje LSD

| | Casos | Media | Grupos Homogéneos |
|-----------|-------|---------|-------------------|
| 0 semanas | 9 | 129.6 | X |
| 1 semana | 9 | 129.811 | X |
| 2 semana | 9 | 131.344 | XX |
| 5 semana | 9 | 131.544 | XX |
| 4 semana | 9 | 131.789 | XX |
| 3 semana | 9 | 133.133 | X |
| 7 semana | 9 | 133.844 | XX |
| 52 semana | 9 | 136.356 | X |

| Contraste | Sig. | Diferencia | +/- Límites |
|-----------------------|------|------------|-------------|
| 0 semanas - 1 semana | | -0.211111 | 3.03877 |
| 0 semanas - 2 semana | | -1.74444 | 3.03877 |
| 0 semanas - 3 semana | * | -3.53333 | 3.03877 |
| 0 semanas - 4 semana | | -2.18889 | 3.03877 |
| 0 semanas - 5 semana | | -1.94444 | 3.03877 |
| 0 semanas - 7 semana | * | -4.24444 | 3.03877 |
| 0 semanas - 52 semana | * | -6.75556 | 3.03877 |
| 1 semana - 2 semana | | -1.53333 | 3.03877 |
| 1 semana - 3 semana | * | -3.32222 | 3.03877 |
| 1 semana - 4 semana | | -1.97778 | 3.03877 |
| 1 semana - 5 semana | | -1.73333 | 3.03877 |
| 1 semana - 7 semana | * | -4.03333 | 3.03877 |
| 1 semana - 52 semana | * | -6.54444 | 3.03877 |
| 2 semana - 3 semana | | -1.78889 | 3.03877 |
| 2 semana - 4 semana | | -0.444444 | 3.03877 |
| 2 semana - 5 semana | | -0.2 | 3.03877 |
| 2 semana - 7 semana | | -2.5 | 3.03877 |
| 2 semana - 52 semana | * | -5.01111 | 3.03877 |
| 3 semana - 4 semana | | 1.34444 | 3.03877 |
| 3 semana - 5 semana | | 1.58889 | 3.03877 |
| 3 semana - 7 semana | | -0.711111 | 3.03877 |
| 3 semana - 52 semana | * | -3.22222 | 3.03877 |
| 4 semana - 5 semana | | 0.244444 | 3.03877 |
| 4 semana - 7 semana | | -2.05556 | 3.03877 |
| 4 semana - 52 semana | * | -4.56667 | 3.03877 |
| 5 semana - 7 semana | | -2.3 | 3.03877 |
| 5 semana - 52 semana | * | -4.81111 | 3.03877 |
| 7 semana - 52 semana | | -2.51111 | 3.03877 |

* indica una diferencia significativa.

| | | |
|-----------------------|---|----------|
| 0 semanas - 7 semana | * | -4.24444 |
| 0 semanas - 52 semana | * | -6.75556 |
| 0 semanas - 3 semana | * | -3.53333 |
| 3 semana - 52 semana | * | -3.22222 |
| 4 semana - 52 semana | * | -4.56667 |
| 5 semana - 52 semana | * | -4.81111 |

Evaluación de la estabilidad de los LE a través del tiempo evaluando el potencial zeta

| Lote | 0 días | 6 días | 15 días | 22 días | 28 días | 35 días | 47 días |
|------|---------------------|--------|---------|---------|---------|---------|---------|
| | Potencial zeta (mV) | | | | | | |
| 1 | -6.924 | -7.738 | -6.147 | -7.429 | -6.884 | -5.334 | -8.551 |
| | -6.832 | -8.255 | -4.656 | -8.614 | -5.607 | -9.399 | -10.03 |
| | -8.254 | -7.807 | -13.87 | -6.588 | -5.321 | -4.768 | -10.27 |
| 2 | -6.463 | -8.571 | -8.106 | -6.481 | -8.569 | -7.418 | -6.114 |
| | -11.2 | -6.302 | -9.753 | -6.543 | -9.876 | -11.71 | -4.191 |
| | -7.049 | -8.479 | -7.548 | -6.96 | -5.577 | -11.93 | -5.889 |
| 3 | -10.3 | -10.44 | -7.168 | -5.325 | -7.876 | -9.289 | -14.16 |
| | -9.065 | -12.26 | -7.684 | -6.84 | -11.2 | -4.658 | -9.011 |
| | -7.415 | -10.9 | -10.17 | -7.66 | -11.08 | -10.83 | -6.714 |

Tabla ANOVA para el potencial zeta

| Fuente | Suma de Cuadrados | Gl | Cuadrado Medio | Razón-F | Valor-P |
|---------------|-------------------|----|----------------|---------|---------|
| Entre grupos | 20.5721 | 6 | 3.42868 | 0.64 | 0.6938 |
| Intra grupos | 297.716 | 56 | 5.31635 | | |
| Total (Corr.) | 318.288 | 62 | | | |

Evaluación de la estabilidad de los LE a través del tiempo evaluando el índice de polidispersión

| Lote | Tiempo (semanas) | | | | | | | |
|------|------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 7 | 52 |
| | Tamaño (nm) | | | | | | | |
| 1 | 0.181 | 0.12 | 0.127 | 0.091 | 0.024 | 0.022 | 0.099 | 0.13 |
| | 0.09 | 0.109 | 0.092 | 0.031 | 0.134 | 0.048 | 0.087 | 0.108 |
| | 0.18 | 0.099 | 0.158 | 0.109 | 0.052 | 0.016 | 0.107 | 0.097 |
| 2 | 0.097 | 0.059 | 0.024 | 0.138 | 0.063 | 0.084 | 0.083 | 0.066 |
| | 0.047 | 0.026 | 0.012 | 0.11 | 0.107 | 0.101 | 0.05 | 0.067 |
| | 0.019 | 0.076 | 0.057 | 0.069 | 0.043 | 0.14 | 0.175 | 0.065 |
| 3 | 0.048 | 0.118 | 0.121 | 0.002 | 0.022 | 0.115 | 0.067 | 0.064 |
| | 0.055 | 0.029 | 0.041 | 0.037 | 0.086 | 0.108 | 0.023 | 0.082 |
| | 0.061 | 0.13 | 0.05 | 0.114 | 0.082 | 0.159 | 0.046 | 0.121 |

Tabla ANOVA para el índice de polidispersión

| Fuente | Suma de Cuadrados | de Gl | Cuadrado Medio | Razón-F | Valor-P |
|---------------|-------------------|-------|----------------|---------|---------|
| Entre grupos | 0.0034601 | 8 | 0.000432512 | 0.23 | 0.9839 |
| Intra grupos | 0.134833 | 72 | 0.00187268 | | |
| Total (Corr.) | 0.138293 | 80 | | | |

Anexo 6. Estudios de liberación del KT a partir de los LE

Porcentajes de fármaco liberado a partir de LE a través del tiempo

| Tiempo (h) | % de fármaco liberado | | | promedio | D.E |
|------------|-----------------------|---------|---------|----------|------|
| | Celda 1 | Celda 2 | Celda 3 | | |
| 0.25 | 6.07 | 7.44 | 7.13 | 6.88 | 0.72 |
| 0.50 | 11.97 | 12.30 | 12.15 | 12.14 | 0.17 |
| 0.75 | 18.06 | 18.81 | 18.50 | 18.46 | 0.37 |
| 1.00 | 23.43 | 24.22 | 23.48 | 23.71 | 0.44 |
| 1.50 | 32.80 | 33.08 | 31.65 | 32.51 | 0.76 |
| 2.00 | 39.82 | 40.09 | 38.07 | 39.33 | 1.09 |
| 2.50 | 46.38 | 46.97 | 45.03 | 46.13 | 0.99 |
| 3.00 | 53.19 | 53.48 | 51.33 | 52.67 | 1.17 |
| 3.50 | 59.27 | 58.59 | 57.03 | 58.30 | 1.15 |
| 4.00 | 63.65 | 62.93 | 61.39 | 62.66 | 1.15 |
| 5.00 | 71.24 | 70.63 | 69.10 | 70.32 | 1.10 |
| 6.00 | 77.58 | 76.04 | 74.51 | 76.04 | 1.54 |
| 7.50 | 83.75 | 81.90 | 80.54 | 82.06 | 1.61 |
| 8.50 | 88.07 | 86.43 | 84.21 | 86.24 | 1.94 |
| 9.50 | 88.98 | 87.33 | 84.98 | 87.10 | 2.01 |
| 10.50 | 91.01 | 89.37 | 86.82 | 89.07 | 2.11 |
| 11.50 | 94.26 | 92.68 | 89.76 | 92.23 | 2.28 |
| 12.50 | 98.74 | 97.24 | 93.80 | 96.59 | 2.53 |
| 22.00 | 104.38 | 103.01 | 98.91 | 102.10 | 2.84 |

Porcentajes de fármaco difundido a partir de una solución de fármaco a través del tiempo

| Tiempo (h) | % de fármaco liberado | | | Promedio | D.E |
|------------|-----------------------|--------|--------|----------|-------|
| | | | | | |
| 0.25 | 9.856 | 12.999 | 13.022 | 11.959 | 1.821 |
| 0.50 | 19.786 | 24.518 | 23.572 | 22.625 | 2.504 |
| 0.75 | 29.158 | 35.200 | 33.584 | 32.647 | 3.128 |
| 1.00 | 38.702 | 46.221 | 44.250 | 43.058 | 3.899 |
| 1.50 | 55.400 | 58.833 | 59.208 | 57.814 | 2.099 |
| 2.00 | 62.973 | 69.002 | 69.779 | 67.251 | 3.726 |
| 2.50 | 70.114 | 76.306 | 76.828 | 74.416 | 3.735 |
| 3.00 | 75.512 | 80.874 | 81.331 | 79.239 | 3.236 |
| 3.50 | 79.986 | 86.705 | 87.155 | 84.615 | 4.015 |
| 4.00 | 81.959 | 86.612 | 87.457 | 85.342 | 2.961 |
| 5.00 | 84.529 | 89.660 | 89.391 | 87.860 | 2.888 |
| 6.00 | 85.578 | 90.661 | 90.235 | 88.825 | 2.819 |
| 7.50 | 90.430 | 94.814 | 94.838 | 93.361 | 2.538 |
| 8.50 | 94.726 | 97.806 | 95.700 | 96.077 | 1.575 |

Factor de similitud (f_2)

El factor de similitud se calcula para determinar si los perfiles de liberación son similares, cuando f_2 alcanza un valor entre 50 y 100, los perfiles son similares. Para calcular f_2 se empleó la siguiente fórmula:

$$f_2 = 50 * \log \left(\frac{1}{\sqrt{1 + \frac{\sum_{t=1}^n (R - T)^2}{n}}} * 100 \right)$$

Para obtener el valor de f_2 se utilizaron los siguientes datos:

| tiempo | % solución | % LE | (R-T) ² |
|--------|------------|-------|--------------------|
| 0.25 | 11.959 | 6.88 | 25.8 |
| 0.5 | 22.625 | 12.14 | 109.9 |
| 0.75 | 32.647 | 18.46 | 201.3 |
| 1 | 43.058 | 23.71 | 374.3 |
| 1.5 | 57.814 | 32.51 | 640.3 |
| 2 | 67.251 | 39.33 | 779.6 |
| 2.5 | 74.416 | 46.13 | 800.1 |
| 3 | 79.239 | 52.67 | 705.9 |
| 3.5 | 84.615 | 58.3 | 692.5 |
| 4 | 85.342 | 62.66 | 514.5 |
| 5 | 87.86 | 70.32 | 307.7 |
| 6 | 88.825 | 76.04 | 163.5 |
| 7.5 | 93.361 | 82.06 | 127.7 |
| 8.5 | 96.077 | 86.24 | 96.8 |

El valor de f_2 es de 35.03 por lo tanto los perfiles de liberación son diferentes.

Anexo 7. Resultados de la difusión pasiva *in vivo* del KT formulado en LE o en solución

Distancias (μm) de penetración acumuladas de KT en la piel de seis voluntarios (obtenidas mediante la técnica de tape stripping) cuando fue tratada con una dispersión de liposomas elásticos.

| No. De cinta | Voluntarios | | | | | | Promedio | Desviación estándar |
|--------------|-------------|---------|---------|--------|---------|---------|----------|---------------------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | | |
| 1 | 2.4945 | 3.9496 | 4.8851 | 0.5197 | 1.0394 | 1.5591 | 2.4079 | 1.7134 |
| 2 | 3.1181 | 5.4048 | 8.6268 | 1.0394 | 1.4551 | 2.7024 | 3.7244 | 2.8506 |
| 3 | 3.8457 | 7.0678 | 11.8489 | 1.0394 | 1.8709 | 3.7418 | 4.9024 | 3.9880 |
| 4 | 4.9890 | 7.6914 | 14.3434 | 1.4551 | 2.3906 | 4.9890 | 5.9764 | 4.6518 |
| 5 | 5.6126 | 8.3150 | 16.2143 | 1.7669 | 3.1181 | 6.1323 | 6.8599 | 5.1312 |
| 6 | 6.6520 | 8.9386 | 18.2930 | 1.9748 | 3.6378 | 6.2363 | 7.6221 | 5.7659 |
| 7-8 | 8.8347 | 10.4977 | 22.9702 | 2.3906 | 4.8851 | 9.6662 | 9.8741 | 7.1262 |
| 9-10 | 9.6662 | 12.1607 | 25.7765 | 3.1181 | 5.9244 | 12.1607 | 11.4678 | 7.8663 |
| 11-12 | 11.6410 | 14.2395 | 27.8553 | 3.7418 | 7.0678 | 15.5907 | 13.3560 | 8.3776 |
| 13-14 | 15.0710 | 15.5907 | 29.9341 | 4.3654 | 8.9386 | 20.7875 | 15.7812 | 8.9783 |
| 15-16 | 19.5403 | 17.5655 | 32.7404 | 5.9244 | 10.6016 | 22.2427 | 18.1025 | 9.3630 |

Distancias (μm) de penetración acumuladas de KT en la piel de seis voluntarios (obtenidas mediante la técnica de tape stripping) cuando fue tratada con una solución de fármaco.

| No. De cinta | Voluntarios | | | | | | Promedio | Desviación estándar |
|--------------|-------------|---------|---------|--------|---------|---------|----------|---------------------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | | |
| 1 | 3.8457 | 3.6378 | 3.6378 | 0.6236 | 0.9354 | 1.0579 | 2.2897 | 1.5610 |
| 2 | 6.9638 | 6.5481 | 6.1323 | 1.4551 | 1.4551 | 1.8512 | 4.0676 | 2.7337 |
| 3 | 10.3938 | 7.8993 | 7.7953 | 1.8709 | 2.0788 | 2.9091 | 5.4912 | 3.6486 |
| 4 | 11.0174 | 9.5623 | 9.9780 | 2.5984 | 3.0142 | 4.7603 | 6.8218 | 3.7857 |
| 5 | 11.2253 | 11.0174 | 11.6410 | 3.5339 | 4.1575 | 5.6860 | 7.8768 | 3.8142 |
| 6 | 18.5009 | 12.1607 | 13.0961 | 4.0536 | 4.9890 | 6.7438 | 9.9240 | 5.6135 |
| 7-8 | 21.8269 | 15.0710 | 15.6946 | 4.8851 | 6.6520 | 9.1240 | 12.2089 | 6.4324 |
| 9-10 | 25.1529 | 17.9812 | 18.6048 | 5.8205 | 7.8993 | 12.4298 | 14.6481 | 7.2871 |
| 11-12 | 27.4395 | 21.4112 | 21.0993 | 5.9244 | 9.3544 | 15.2066 | 16.7393 | 8.1139 |
| 13-14 | 28.7907 | 23.9057 | 22.4505 | 6.9638 | 10.6016 | 18.1157 | 18.4714 | 8.3227 |
| 15-16 | 30.3498 | 26.0884 | 24.0096 | 7.8993 | 11.5371 | 20.4959 | 20.0633 | 8.7010 |

Cantidades de KT (μg) permeadas en la piel de seis voluntarios (obtenidas mediante la técnica de tape stripping) cuando fue tratada con una dispersión de liposomas elásticos.

| No. De cinta | Voluntarios | | | | | | Promedio | Desviación estándar |
|--------------|-------------|--------|--------|--------|--------|--------|----------|---------------------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | | |
| 1 | 1.7653 | 5.4707 | 7.3158 | 0.4080 | 0.2559 | 6.4826 | 3.6164 | 3.1734 |
| 2 | 1.2591 | 2.9037 | 2.9474 | 0.3528 | 0.4948 | 5.6857 | 2.2739 | 2.0187 |
| 3 | 1.2987 | 2.5909 | 1.4208 | 0.3025 | 1.0540 | 2.3753 | 1.5071 | 0.8527 |
| 4 | 0.9192 | 2.5828 | 1.5401 | 0.5924 | 1.1210 | 1.0760 | 1.3052 | 0.6973 |
| 5 | 1.5051 | 1.8051 | 1.2725 | 0.3937 | 1.2934 | 1.2938 | 1.2606 | 0.4712 |
| 6 | 1.7567 | 1.6666 | 1.4467 | 0.6446 | 0.7586 | 1.3053 | 1.2631 | 0.4645 |
| 7-8 | 2.1201 | 3.8724 | 3.9179 | 1.0776 | 1.7549 | 2.8005 | 2.5906 | 1.1539 |
| 9-10 | 1.7922 | 3.6876 | 3.0599 | 1.0884 | 1.9307 | 1.8374 | 2.2327 | 0.9542 |
| 11-12 | 1.9689 | 2.8848 | 0.9982 | 0.9099 | 0.9211 | 0.9886 | 1.4452 | 0.8144 |
| 13-14 | 1.4731 | 1.5298 | 0.5085 | 0.6467 | 0.6626 | 0.7383 | 0.9265 | 0.4518 |
| 15-16 | 1.2903 | 2.0252 | 0.5622 | 0.7759 | 1.1459 | 0.5869 | 1.0644 | 0.5557 |

Cantidades de KT (μg) permeadas en la piel de seis voluntarios (obtenidas mediante la técnica de tape stripping) cuando fue tratada con una solución de fármaco.

| No. De cinta | Voluntarios | | | | | | Promedio | Desviación estándar |
|--------------|-------------|--------|---------|--------|--------|--------|----------|---------------------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | | |
| 1 | 1.3153 | 6.6728 | 10.9915 | 0.6927 | 1.6984 | 1.3270 | 3.7830 | 4.1552 |
| 2 | 1.0193 | 2.8378 | 4.7272 | 0.5477 | 1.4730 | 1.0023 | 1.9346 | 1.5785 |
| 3 | 1.0403 | 1.1677 | 2.5344 | 0.3625 | 1.4704 | 1.0254 | 1.2668 | 0.7191 |
| 4 | 1.5826 | 1.3223 | 2.6153 | 0.6276 | 1.5449 | 1.6201 | 1.5521 | 0.6393 |
| 5 | 1.2173 | 1.9782 | 1.8165 | 0.5056 | 1.3378 | 1.2195 | 1.3458 | 0.5215 |
| 6 | 1.9287 | 0.9749 | 1.8765 | 0.2526 | 1.0792 | 0.3503 | 1.0771 | 0.7187 |
| 7-8 | 3.8411 | 2.8796 | 2.9624 | 0.9647 | 1.7745 | 0.6055 | 2.1713 | 1.2634 |
| 9-10 | 2.8622 | 2.4151 | 1.5964 | 0.5367 | 1.1259 | 2.4067 | 1.8238 | 0.8903 |
| 11-12 | 2.7378 | 1.3597 | 0.6252 | 0.3144 | 0.7489 | 1.9631 | 1.2915 | 0.9209 |
| 13-14 | 2.3960 | 0.0000 | 0.4495 | 0.5606 | 0.6849 | 1.5899 | 0.9468 | 0.8804 |
| 15-16 | 3.1637 | 0.0000 | 0.0000 | 0.4293 | 0.4204 | 1.2715 | 0.8808 | 1.2109 |

Análisis de varianza para las cantidades acumuladas de KT con respecto al número de cinta por voluntario (Difusión pasiva *in vivo*)

La tabla ANOVA descompone la variabilidad de microgramos de fármaco acumulados ($\mu\text{g Ac}$) en contribuciones debidas a varios factores. Puesto que se ha escogido la suma de cuadrados Tipo III (por omisión), la contribución de cada factor se mide eliminando los efectos de los demás factores. Los valores-P prueban la significancia estadística de cada uno de los factores.

Voluntario 1

Análisis de Varianza para $\mu\text{g Ac}$ - Suma de Cuadrados Tipo III

| <i>Fuente</i> | <i>Suma de Cuadrados</i> | <i>de Gl</i> | <i>Cuadrado Medio</i> | <i>Razón-F</i> | <i>Valor-P</i> |
|----------------------|--------------------------|--------------|-----------------------|----------------|----------------|
| EFFECTOS PRINCIPALES | | | | | |
| A:No. Cinta | 686.54 | 9 | 76.2822 | 26.46 | 0.0000 |
| B:Formulación | 17.1358 | 1 | 17.1358 | 5.94 | 0.0375 |
| RESIDUOS | 25.9415 | 9 | 2.88239 | | |
| TOTAL (CORREGIDO) | 729.617 | 19 | | | |

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

Voluntario 2

Análisis de Varianza para $\mu\text{g Ac}$ - Suma de Cuadrados Tipo III

| <i>Fuente</i> | <i>Suma de Cuadrados</i> | <i>de Gl</i> | <i>Cuadrado Medio</i> | <i>Razón-F</i> | <i>Valor-P</i> |
|----------------------|--------------------------|--------------|-----------------------|----------------|----------------|
| EFFECTOS PRINCIPALES | | | | | |
| A:No. Cinta | 443.524 | 9 | 49.2804 | 1.18 | 0.4056 |
| B:Formulación | 289.372 | 1 | 289.372 | 6.92 | 0.0274 |
| RESIDUOS | 376.531 | 9 | 41.8368 | | |
| TOTAL (CORREGIDO) | 1109.43 | 19 | | | |

Voluntario 3

Análisis de Varianza para $\mu\text{g Ac}$ - Suma de Cuadrados Tipo III

| <i>Fuente</i> | <i>Suma de Cuadrados</i> | <i>de Gl</i> | <i>Cuadrado Medio</i> | <i>Razón-F</i> | <i>Valor-P</i> |
|----------------------|--------------------------|--------------|-----------------------|----------------|----------------|
| EFFECTOS PRINCIPALES | | | | | |
| A:No. Cinta | 538.957 | 9 | 59.8841 | 80.46 | 0.0000 |
| B:Formulación | 46.1421 | 1 | 46.1421 | 62.00 | 0.0000 |
| RESIDUOS | 6.69846 | 9 | 0.744273 | | |
| TOTAL (CORREGIDO) | 591.798 | 19 | | | |

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

Voluntario 4

Análisis de Varianza para $\mu\text{g Ac}$ - Suma de Cuadrados Tipo III

| <i>Fuente</i> | <i>Suma de Cuadrados</i> | <i>de Gl</i> | <i>Cuadrado Medio</i> | <i>Razón-F</i> | <i>Valor-P</i> |
|----------------------|--------------------------|--------------|-----------------------|----------------|----------------|
| EFFECTOS PRINCIPALES | | | | | |
| A:No. Cinta | 68.7174 | 9 | 7.63527 | 25.14 | 0.0000 |
| B:Formulación | 0.750715 | 1 | 0.750715 | 2.47 | 0.1503 |
| RESIDUOS | 2.73292 | 9 | 0.303658 | | |
| TOTAL (CORREGIDO) | 72.2011 | 19 | | | |

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

Voluntario 5

Análisis de Varianza para $\mu\text{g Ac}$ - Suma de Cuadrados Tipo III

| <i>Fuente</i> | <i>Suma de Cuadrados</i> | <i>de Gl</i> | <i>Cuadrado Medio</i> | <i>Razón-F</i> | <i>Valor-P</i> |
|----------------------|--------------------------|--------------|-----------------------|----------------|----------------|
| EFFECTOS PRINCIPALES | | | | | |
| A:No. Cinta | 241.403 | 9 | 26.8225 | 187.24 | 0.0000 |
| B:Formulación | 11.0055 | 1 | 11.0055 | 76.83 | 0.0000 |
| RESIDUOS | 1.28926 | 9 | 0.143252 | | |
| TOTAL (CORREGIDO) | 253.697 | 19 | | | |

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

Voluntario 6

Análisis de Varianza para $\mu\text{g Ac}$ - Suma de Cuadrados Tipo III

| <i>Fuente</i> | <i>Suma de Cuadrados</i> | <i>de Gl</i> | <i>Cuadrado Medio</i> | <i>Razón-F</i> | <i>Valor-P</i> |
|----------------------|--------------------------|--------------|-----------------------|----------------|----------------|
| EFFECTOS PRINCIPALES | | | | | |
| A:No. Cinta | 335.616 | 9 | 37.2906 | 47.27 | 0.0000 |
| B:Formulación | 206.509 | 1 | 206.509 | 261.80 | 0.0000 |
| RESIDUOS | 7.09925 | 9 | 0.788805 | | |
| TOTAL (CORREGIDO) | 549.224 | 19 | | | |

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

Anexo 8. Resultados de la difusión iontoforética *in vivo* del KT formulado en LE o en solución

Distancias (μm) de penetración acumuladas de KT en la piel de cinco voluntarios (obtenidas mediante la técnica de tape stripping) cuando fue tratada con una dispersión de liposomas elásticos.

| No. De cinta | Voluntarios | | | | | Promedio | Desviación estándar |
|--------------|-------------|--------|--------|---------|---------|----------|---------------------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | | |
| 1 | 0.5289 | 0.7934 | 0.5289 | 0.3967 | 1.0579 | 0.6612 | 0.2645 |
| 2 | 1.1901 | 1.1901 | 0.7934 | 1.4545 | 1.8512 | 1.2959 | 0.3900 |
| 3 | 1.5868 | 1.7190 | 1.1901 | 1.8512 | 2.9091 | 1.8512 | 0.6410 |
| 4 | 1.9835 | 1.8512 | 1.5868 | 2.3802 | 4.7603 | 2.5124 | 1.2888 |
| 5 | 2.7769 | 2.1157 | 1.7190 | 3.1736 | 5.6860 | 3.0942 | 1.5551 |
| 6 | 3.9669 | 3.0413 | 1.9835 | 3.8347 | 6.7438 | 3.9140 | 1.7681 |
| 7-8 | 6.8760 | 4.0992 | 2.6446 | 4.7603 | 9.1240 | 5.5008 | 2.5342 |
| 9-10 | 10.1818 | 5.1570 | 3.5702 | 5.8182 | 12.4298 | 7.4314 | 3.7159 |
| 11-12 | 13.8843 | 6.2149 | 4.3636 | 8.5950 | 15.2066 | 9.6529 | 4.7345 |
| 13-14 | 19.7025 | 6.7438 | 5.6860 | 11.1074 | 18.1157 | 12.2711 | 6.4159 |
| 15-16 | 26.0496 | 7.6694 | 6.6116 | 14.2810 | 20.4959 | 15.0215 | 8.3204 |

Distancias (μm) de penetración acumuladas de KT en la piel de cinco voluntarios (obtenidas mediante la técnica de tape stripping) cuando fue tratada con una solución de fármaco.

| No. De cinta | Voluntarios | | | | | Promedio | Desviación estándar |
|--------------|-------------|--------|---------|---------|---------|----------|---------------------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | | |
| 1 | 1.7190 | 1.1901 | 1.7190 | 0.7934 | 1.8512 | 1.4545 | 0.4484 |
| 2 | 3.4380 | 1.8512 | 3.0413 | 1.1901 | 2.9091 | 2.4860 | 0.9322 |
| 3 | 5.2893 | 2.5124 | 4.0992 | 1.4545 | 3.9669 | 3.4645 | 1.4943 |
| 4 | 6.6116 | 3.0413 | 5.2893 | 1.8512 | 4.6281 | 4.2843 | 1.8714 |
| 5 | 8.1983 | 3.4380 | 6.2149 | 2.9091 | 5.5537 | 5.2628 | 2.1493 |
| 6 | 9.9174 | 4.3636 | 6.8760 | 3.9669 | 6.6116 | 6.3471 | 2.3820 |
| 7-8 | 14.2810 | 5.0248 | 9.5207 | 6.8760 | 7.8017 | 8.7008 | 3.5165 |
| 9-10 | 19.5702 | 7.4050 | 11.7686 | 9.6529 | 12.1653 | 12.1124 | 4.5812 |
| 11-12 | 23.6694 | 8.7273 | 13.2231 | 10.4463 | 14.1488 | 14.0430 | 5.7997 |
| 13-14 | 27.9008 | 8.8595 | 14.0165 | 11.9008 | 15.3388 | 15.6033 | 7.2973 |
| 15-16 | 31.0744 | 9.5207 | 15.2066 | 12.4298 | 15.8678 | 16.8198 | 8.3554 |

Cantidades de KT (μg) permeadas en la piel de cinco voluntarios (obtenidas mediante la técnica de tape stripping) cuando fue tratada con una dispersión de liposomas elásticos.

| No. De cinta | Voluntarios | | | | | Promedio | Desviación estándar |
|--------------|-------------|--------|--------|--------|--------|----------|---------------------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | | |
| 1 | 1.1438 | 0.7552 | 1.1202 | 1.0943 | 0.8501 | 0.9927 | 0.1776 |
| 2 | 0.7153 | 0.3725 | 0.4111 | 0.7925 | 0.7448 | 0.6072 | 0.1991 |
| 3 | 0.4838 | 0.3034 | 0.4241 | 0.4678 | 0.3687 | 0.4096 | 0.0742 |
| 4 | 0.3936 | 0.2255 | 0.2876 | 0.3584 | 0.5292 | 0.3589 | 0.1152 |
| 5 | 0.5881 | 0.0340 | 0.2287 | 0.1251 | 0.2796 | 0.2511 | 0.2109 |
| 6 | 0.2427 | 0.1406 | 0.1921 | 0.2814 | 0.5143 | 0.2742 | 0.1443 |
| 7-8 | 1.0397 | 0.3915 | 0.6760 | 0.4605 | 0.3691 | 0.5874 | 0.2804 |
| 9-10 | 1.1281 | 0.4245 | 0.9677 | 1.9278 | 1.2323 | 1.1361 | 0.5410 |
| 11-12 | 1.6042 | 0.9705 | 1.3728 | 3.2148 | 1.5538 | 1.7432 | 0.8595 |
| 13-14 | 1.6291 | 0.5584 | 1.5986 | 5.2850 | 0.8853 | 1.9913 | 1.8980 |
| 15-16 | 1.9869 | 0.3344 | 0.9399 | 5.5204 | 0.3781 | 1.8319 | 2.1669 |

Cantidades de KT (μg) permeadas en la piel de cinco voluntarios (obtenidas mediante la técnica de tape stripping) cuando fue tratada con una solución de fármaco.

| No. De cinta | Voluntarios | | | | | Promedio | Desviación estándar |
|--------------|-------------|--------|--------|--------|--------|----------|---------------------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | | |
| 1 | 2.4159 | 2.8576 | 4.4434 | 1.0986 | 5.3578 | 3.2347 | 1.6840 |
| 2 | 2.3052 | 1.5893 | 3.2032 | 1.1341 | 2.0275 | 2.0519 | 0.7821 |
| 3 | 2.2656 | 2.3462 | 2.5373 | 1.2920 | 1.4722 | 1.9827 | 0.5607 |
| 4 | 2.0399 | 2.2657 | 2.7711 | 1.5147 | 2.0241 | 2.1231 | 0.4547 |
| 5 | 2.1267 | 2.7236 | 3.1623 | 1.9644 | 2.0272 | 2.4008 | 0.5218 |
| 6 | 1.2812 | 2.7595 | 3.3297 | 3.0956 | 2.5795 | 2.6091 | 0.7973 |
| 7-8 | 2.6176 | 5.0354 | 6.1867 | 5.7635 | 3.9393 | 4.7085 | 1.4464 |
| 9-10 | 2.2252 | 6.5084 | 4.6746 | 8.2855 | 9.1889 | 6.1765 | 2.8063 |
| 11-12 | 1.9437 | 3.2572 | 2.7051 | 4.0135 | 5.1836 | 3.4206 | 1.2430 |
| 13-14 | 1.6765 | 1.0660 | 1.2808 | 4.1828 | 2.8666 | 2.2145 | 1.3019 |
| 15-16 | 0.6569 | 2.2010 | 1.2165 | 1.5426 | 0.4151 | 1.2064 | 0.7125 |

Análisis de varianza para las cantidades acumuladas de KT con respecto al número de cinta por voluntario (Difusión iontoforética *in vivo*)

La tabla ANOVA descompone la variabilidad de microgramos de fármaco acumulados ($\mu\text{g Ac}$) en contribuciones debidas a varios factores. Puesto que se ha escogido la suma de cuadrados Tipo III (por omisión), la contribución de cada factor se mide eliminando los efectos de los demás factores. Los valores-P prueban la significancia estadística de cada uno de los factores.

Voluntario 1

Análisis de Varianza para mcg acum - Suma de Cuadrados Tipo III

| <i>Fuente</i> | <i>Suma de Cuadrados</i> | <i>de Gl</i> | <i>Cuadrado Medio</i> | <i>Razón-F</i> | <i>Valor-P</i> |
|----------------------|--------------------------|--------------|-----------------------|----------------|----------------|
| EFFECTOS PRINCIPALES | | | | | |
| A:Cinta | 459.954 | 10 | 45.9954 | 6.46 | 0.0034 |
| B:Formulación | 353.289 | 1 | 353.289 | 49.61 | 0.0000 |
| RESIDUOS | 71.2082 | 10 | 7.12082 | | |
| TOTAL (CORREGIDO) | 884.451 | 21 | | | |

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

Voluntario 2

Análisis de Varianza para mcg acum - Suma de Cuadrados Tipo III

| <i>Fuente</i> | <i>Suma de Cuadrados</i> | <i>de Gl</i> | <i>Cuadrado Medio</i> | <i>Razón-F</i> | <i>Valor-P</i> |
|----------------------|--------------------------|--------------|-----------------------|----------------|----------------|
| EFFECTOS PRINCIPALES | | | | | |
| A:Cinta | 753.174 | 10 | 75.3174 | 1.55 | 0.2502 |
| B:Formulación | 1190.54 | 1 | 1190.54 | 24.51 | 0.0006 |
| RESIDUOS | 485.696 | 10 | 48.5696 | | |
| TOTAL (CORREGIDO) | 2429.41 | 21 | | | |

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

Voluntario 3

Análisis de Varianza para mcg acum - Suma de Cuadrados Tipo III

| <i>Fuente</i> | <i>Suma de Cuadrados</i> | <i>de Gl</i> | <i>Cuadrado Medio</i> | <i>Razón-F</i> | <i>Valor-P</i> |
|----------------------|--------------------------|--------------|-----------------------|----------------|----------------|
| EFFECTOS PRINCIPALES | | | | | |
| A:Cinta | 929.163 | 10 | 92.9163 | 2.17 | 0.1184 |
| B:Formulación | 1619.27 | 1 | 1619.27 | 37.87 | 0.0001 |
| RESIDUOS | 427.54 | 10 | 42.754 | | |
| TOTAL (CORREGIDO) | 2975.97 | 21 | | | |

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

Voluntario 4

Análisis de Varianza para mcg acum - Suma de Cuadrados Tipo III

| <i>Fuente</i> | <i>Suma de Cuadrados</i> | <i>Gl</i> | <i>Cuadrado Medio</i> | <i>Razón-F</i> | <i>Valor-P</i> |
|----------------------|--------------------------|-----------|-----------------------|----------------|----------------|
| EFFECTOS PRINCIPALES | | | | | |
| A:Cinta | 1625.29 | 10 | 162.529 | 5.26 | 0.0074 |
| B:Formulación | 437.006 | 1 | 437.006 | 14.15 | 0.0037 |
| RESIDUOS | 308.816 | 10 | 30.8816 | | |
| TOTAL (CORREGIDO) | 2371.12 | 21 | | | |

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

Voluntario 5

Análisis de Varianza para mcg acum - Suma de Cuadrados Tipo III

| <i>Fuente</i> | <i>Suma de Cuadrados</i> | <i>Gl</i> | <i>Cuadrado Medio</i> | <i>Razón-F</i> | <i>Valor-P</i> |
|----------------------|--------------------------|-----------|-----------------------|----------------|----------------|
| EFFECTOS PRINCIPALES | | | | | |
| A:Cinta | 1055.1 | 10 | 105.51 | 2.17 | 0.1184 |
| B:Formulación | 1368.18 | 1 | 1368.18 | 28.18 | 0.0003 |
| RESIDUOS | 485.534 | 10 | 48.5534 | | |
| TOTAL (CORREGIDO) | 2908.82 | 21 | | | |

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

Comparación de la cantidad acumulada de KT permeada cuando se administra en solución o en liposomas elásticos

Resumen Estadístico

| | <i>Recuento</i> | <i>Promedio</i> | <i>Desviación Estándar</i> | <i>Coefficiente de Variación</i> | <i>Mínimo</i> | <i>Máximo</i> |
|-----------------|-----------------|-----------------|----------------------------|----------------------------------|---------------|---------------|
| LE pasiva | 6 | 15,8693 | 6,48164 | 40,8438% | 6,7845 | 25,5488 |
| LE iontoforesis | 5 | 10,1836 | 5,70315 | 56,0031% | 4,5105 | 19,5282 |
| S pasiva | 6 | 14,2907 | 5,89337 | 41,2393% | 5,1019 | 21,7891 |
| S iontoforesis | 5 | 32,1289 | 6,14641 | 19,1305% | 21,5544 | 37,0819 |
| Total | 22 | 17,8419 | 9,94698 | 55,7505% | 4,5105 | 37,0819 |

Tabla ANOVA

| <i>Fuente</i> | <i>Suma de Cuadrados</i> | <i>de Gl</i> | <i>Cuadrado Medio</i> | <i>Razón-F</i> | <i>Valor-P</i> |
|---------------|--------------------------|--------------|-----------------------|----------------|----------------|
| Entre grupos | 1412,85 | 3 | 470,951 | 12,75 | 0,0001 |
| Intra grupos | 664,935 | 18 | 36,9408 | | |
| Total (Corr.) | 2077,79 | 21 | | | |

Pruebas de Rangos Múltiple

Método: 95,0 porcentaje Tukey HSD

| | <i>Casos</i> | <i>Media</i> | <i>Grupos Homogéneos</i> |
|-----------------|--------------|--------------|--------------------------|
| LE iontoforesis | 5 | 10,1836 | X |
| S pasiva | 6 | 14,2907 | X |
| LE pasiva | 6 | 15,8693 | X |
| S iontoforesis | 5 | 32,1289 | X |

| <i>Contraste</i> | <i>Sig.</i> | <i>Diferencia</i> | <i>+/- Límites</i> |
|----------------------------------|-------------|-------------------|--------------------|
| LE pasiva - LE iontoforesis | | 5,68567 | 10,4058 |
| LE pasiva - S pasiva | | 1,57865 | 9,92151 |
| LE pasiva - S iontoforesis | * | -16,2596 | 10,4058 |
| LE iontoforesis - S pasiva | | -4,10702 | 10,4058 |
| LE iontoforesis - S iontoforesis | * | -21,9453 | 10,8685 |
| S pasiva - S iontoforesis | * | -17,8383 | 10,4058 |

* indica una diferencia significativa.

Comparación de la distancia de penetración del KT cuando se administra en solución o en liposomas elásticos

Resumen Estadístico

| | <i>Recuento</i> | <i>Promedio</i> | <i>Desviación Estándar</i> | <i>Coficiente de Variación</i> | <i>Mínimo</i> | <i>Máximo</i> |
|-----------------|-----------------|-----------------|----------------------------|--------------------------------|---------------|---------------|
| LE pasiva | 6 | 18,1025 | 9,36303 | 51,7224% | 5,92445 | 32,7404 |
| LE iontoforesis | 5 | 15,0215 | 8,32039 | 55,3899% | 6,61157 | 26,0496 |
| S pasiva | 6 | 19,024 | 8,0956 | 42,5548% | 7,89926 | 30,3498 |
| S iontoforesis | 5 | 16,8198 | 8,35541 | 49,676% | 9,52066 | 31,0744 |
| Total | 22 | 17,3621 | 8,07971 | 46,5366% | 5,92445 | 32,7404 |

Tabla ANOVA

| <i>Fuente</i> | <i>Suma de Cuadrados</i> | <i>Gl</i> | <i>Cuadrado Medio</i> | <i>Razón-F</i> | <i>Valor-P</i> |
|---------------|--------------------------|-----------|-----------------------|----------------|----------------|
| Entre grupos | 48,7221 | 3 | 16,2407 | 0,22 | 0,8805 |
| Intra grupos | 1322,19 | 18 | 73,4551 | | |
| Total (Corr.) | 1370,91 | 21 | | | |

Pruebas de Rangos Múltiple

Método: 95,0 porcentaje LSD

| | <i>Casos</i> | <i>Media</i> | <i>Grupos Homogéneos</i> |
|-----------------|--------------|--------------|--------------------------|
| LE iontoforesis | 5 | 15,0215 | X |
| S iontoforesis | 5 | 16,8198 | X |
| LE pasiva | 6 | 18,1025 | X |
| S pasiva | 6 | 19,024 | X |

Anexo 9. Análisis estadístico para la TEWL

Voluntario 1

Análisis de Varianza para TEWL relativo - Suma de Cuadrados Tipo III

| <i>Fuente</i> | <i>Suma de Cuadrados</i> | <i>Gl</i> | <i>Cuadrado Medio</i> | <i>Razón-F</i> | <i>Valor-P</i> |
|---------------------|--------------------------|-----------|-----------------------|----------------|----------------|
| EFECTOS PRINCIPALES | | | | | |
| A:Tiempo | 82,0287 | 1 | 82,0287 | 158,60 | 0,0000 |
| B:formulación | 6,52937 | 1 | 6,52937 | 12,62 | 0,0005 |
| RESIDUOS | 138,093 | 267 | 0,517201 | | |
| TOTAL (CORREGIDO) | 226,651 | 269 | | | |

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

Pruebas de Rangos Múltiples para TEWL relativo por Tiempo

Método: 95,0 porcentaje Tukey HSD

| Tiempo | Casos | Media LS | Sigma LS | Grupos Homogéneos |
|--------|-------|----------|-----------|-------------------|
| 2 | 90 | 3,54559 | 0,0758068 | × |
| 1 | 180 | 4,71484 | 0,0536035 | × |

| Contraste | Sig. | Diferencia | +/- Límites |
|-----------|------|------------|-------------|
| 1 - 2 | * | 1,16925 | 0,1828 |

* indica una diferencia significativa.

Pruebas de Rangos Múltiples para TEWL relativo por formulación

Método: 95,0 porcentaje Tukey HSD

| formulación | Casos | Media LS | Sigma LS | Grupos Homogéneos |
|---------------------|-------|----------|----------|-------------------|
| Liposomas elásticos | 135 | 3,9747 | 0,063801 | × |
| Solución | 135 | 4,28572 | 0,063801 | × |

| Contraste | Sig. | Diferencia | +/- Límites |
|--------------------------------|------|------------|-------------|
| Liposomas elásticos - Solución | * | -0,311017 | 0,172345 |

* indica una diferencia significativa.

Voluntario 2**Análisis de Varianza para TEWL relativo - Suma de Cuadrados Tipo III**

| Fuente | Suma de Cuadrados | Gl | Cuadrado Medio | Razón-F | Valor-P |
|----------------------|-------------------|-----|----------------|---------|---------|
| EFFECTOS PRINCIPALES | | | | | |
| A:Tiempo | 74,615 | 1 | 74,615 | 179,98 | 0,0000 |
| B:formulación | 14,2116 | 1 | 14,2116 | 34,28 | 0,0000 |
| RESIDUOS | 106,133 | 256 | 0,414582 | | |
| TOTAL (CORREGIDO) | 199,523 | 258 | | | |

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

Pruebas de Rangos Múltiples para TEWL relativo por Tiempo

Método: 95,0 porcentaje Tukey HSD

| Tiempo | Casos | Media LS | Sigma LS | Grupos Homogéneos |
|--------|-------|----------|-----------|-------------------|
| 2 | 79 | 1,79616 | 0,0726574 | × |
| 1 | 180 | 2,96434 | 0,047992 | × |

| Contraste | Sig. | Diferencia | +/- Límites |
|-----------|------|------------|-------------|
| 1 - 2 | * | 1,16818 | 0,171478 |

* indica una diferencia significativa.

Pruebas de Rangos Múltiples para TEWL relativo por formulación

Método: 95,0 porcentaje Tukey HSD

| formulación | Casos | Media LS | Sigma LS | Grupos Homogéneos |
|---------------------|-------|----------|-----------|-------------------|
| Solución | 135 | 2,14531 | 0,0572852 | × |
| Liposomas elásticos | 124 | 2,61519 | 0,0610738 | × |

| Contraste | Sig. | Diferencia | +/- Límites |
|--------------------------------|------|------------|-------------|
| Liposomas elásticos - Solución | * | 0,469883 | 0,158045 |

* indica una diferencia significativa.

Voluntario 3

Análisis de Varianza para TEWL relativo - Suma de Cuadrados Tipo III

| Fuente | Suma de Cuadrados | Gl | Cuadrado Medio | Razón-F | Valor-P |
|----------------------|-------------------|-----|----------------|---------|---------|
| EFFECTOS PRINCIPALES | | | | | |
| A:Tiempo | 80,9929 | 1 | 80,9929 | 234,71 | 0,0000 |
| B:formulación | 40,7622 | 1 | 40,7622 | 118,12 | 0,0000 |
| RESIDUOS | 92,1373 | 267 | 0,345084 | | |
| TOTAL (CORREGIDO) | 213,892 | 269 | | | |

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

Pruebas de Rangos Múltiples para TEWL relativo por Tiempo

Método: 95,0 porcentaje Tukey HSD

| Tiempo | Casos | Media LS | Sigma LS | Grupos Homogéneos |
|--------|-------|----------|-----------|-------------------|
| 2 | 90 | 2,32904 | 0,0619214 | X |
| 1 | 180 | 3,49089 | 0,0437851 | X |

| Contraste | Sig. | Diferencia | +/- Límites |
|-----------|------|------------|-------------|
| 1 - 2 | * | 1,16184 | 0,149317 |

* indica una diferencia significativa.

Pruebas de Rangos Múltiples para TEWL relativo por formulación

Método: 95,0 porcentaje Tukey HSD

| formulación | Casos | Media LS | Sigma LS | Grupos Homogéneos |
|---------------------|-------|----------|-----------|-------------------|
| Liposomas elásticos | 135 | 2,52142 | 0,0521146 | X |
| Solución | 135 | 3,29852 | 0,0521146 | X |

| Contraste | Sig. | Diferencia | +/- Límites |
|--------------------------------|------|------------|-------------|
| Liposomas elásticos - Solución | * | -0,7771 | 0,140777 |

* indica una diferencia significativa.

Voluntario 4

Análisis de Varianza para TEWL relativo - Suma de Cuadrados Tipo III

| Fuente | Suma de Cuadrados | Gl | Cuadrado Medio | Razón-F | Valor-P |
|----------------------|-------------------|-----|----------------|---------|---------|
| EFFECTOS PRINCIPALES | | | | | |
| A:Tiempo | 33,0624 | 1 | 33,0624 | 176,52 | 0,0000 |
| B:formulación | 1,01484 | 1 | 1,01484 | 5,42 | 0,0207 |
| RESIDUOS | 50,0103 | 267 | 0,187305 | | |
| TOTAL (CORREGIDO) | 84,0876 | 269 | | | |

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

Pruebas de Rangos Múltiples para TEWL relativo por Tiempo

Método: 95,0 porcentaje Tukey HSD

| Tiempo | Casos | Media LS | Sigma LS | Grupos Homogéneos |
|--------|-------|----------|-----------|-------------------|
| 2 | 90 | 2,19867 | 0,0456198 | X |
| 1 | 180 | 2,94099 | 0,032258 | X |

| Contraste | Sig. | Diferencia | +/- Límites |
|-----------|------|------------|-------------|
| 1 - 2 | * | 0,742321 | 0,110007 |

* indica una diferencia significativa.

Pruebas de Rangos Múltiples para TEWL relativo por formulación

Método: 95,0 porcentaje Tukey HSD

| formulación | Casos | Media LS | Sigma LS | Grupos Homogéneos |
|---------------------|-------|----------|-----------|-------------------|
| Liposomas elásticos | 135 | 2,50853 | 0,0383947 | × |
| Solución | 135 | 2,63114 | 0,0383947 | × |

| Contraste | Sig. | Diferencia | +/- Límites |
|--------------------------------|------|------------|-------------|
| Liposomas elásticos - Solución | * | -0,122616 | 0,103716 |

* indica una diferencia significativa.

Voluntario 5**Análisis de Varianza para TEWL relativo - Suma de Cuadrados Tipo III**

| Fuente | Suma de Cuadrados | Gl | Cuadrado Medio | Razón-F | Valor-P |
|----------------------|-------------------|-----|----------------|---------|---------|
| EFFECTOS PRINCIPALES | | | | | |
| A:Tiempo | 54,915 | 1 | 54,915 | 153,89 | 0,0000 |
| B:formulación | 14,2632 | 1 | 14,2632 | 39,97 | 0,0000 |
| RESIDUOS | 95,2798 | 267 | 0,356853 | | |
| TOTAL (CORREGIDO) | 164,458 | 269 | | | |

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

Pruebas de Rangos Múltiples para TEWL relativo por Tiempo

Método: 95,0 porcentaje Tukey HSD

| Tiempo | Casos | Media LS | Sigma LS | Grupos Homogéneos |
|--------|-------|----------|-----------|-------------------|
| 2 | 90 | 2,17372 | 0,0629685 | × |
| 1 | 180 | 3,13041 | 0,0445255 | × |

| Contraste | Sig. | Diferencia | +/- Límites |
|-----------|------|------------|-------------|
| 1 - 2 | * | 0,956687 | 0,151842 |

* indica una diferencia significativa.

Pruebas de Rangos Múltiples para TEWL relativo por formulación

Método: 95,0 porcentaje Tukey HSD

| formulación | Casos | Media LS | Sigma LS | Grupos Homogéneos |
|---------------------|-------|----------|-----------|-------------------|
| Liposomas elásticos | 135 | 2,42222 | 0,0529959 | × |
| Solución | 135 | 2,8819 | 0,0529959 | × |

| Contraste | Sig. | Diferencia | +/- Límites |
|--------------------------------|------|------------|-------------|
| Liposomas elásticos - Solución | * | -0,459681 | 0,143158 |

* indica una diferencia significativa.

Anexo 10. Estabilidad eléctrica de los liposomas elásticos al aplicarles una corriente eléctrica

Resultados obtenidos para el tamaño promedio (nm) e IPD de las vesículas

| Inicial | | Después de aplicar una corriente eléctrica de 0.5 mA/minuto, durante 20 minutos | | | | | |
|---------|-------|---|-------|--------|-------|--------|-------|
| Tamaño | IPD | Tamaño | IPD | Tamaño | IPD | Tamaño | IPD |
| 126.7 | 0.111 | 119.7 | 0.227 | 124.3 | 0.067 | 122.6 | 0.005 |
| 125.6 | 0.115 | 117.2 | 0.114 | 126.3 | 0.11 | 122.1 | 0.018 |
| 131.5 | 0.006 | 120.3 | 0.081 | 123.2 | 0.08 | 123.3 | 0.002 |
| 127.5 | 0.068 | 119.6 | 0.092 | 123.3 | 0.028 | 120 | 0.02 |
| 123.9 | 0.065 | 119 | 0.032 | 121.8 | 0.081 | 117.8 | 0.062 |
| 128.4 | 0.002 | 119.1 | 0.075 | 129.1 | 0.214 | 123.5 | 0.039 |
| 127 | 0.123 | 119.9 | 0.04 | 126.9 | 0.086 | 119.5 | 0.09 |
| 126.3 | 0.043 | 120 | 0.08 | 124.2 | 0.078 | 122.4 | 0.032 |
| 127.4 | 0.062 | 117.3 | 0.061 | 126.7 | 0.058 | 122.8 | 0.013 |

Comparación de medias del tamaño promedio

Intervalos de confianza del 95.0% para la media de INICIAL: 127.144 +/- 1.59816 [125.546, 128.743]

Intervalos de confianza del 95.0% para la media de C.E: 121.922 +/- 1.21688 [120.705, 123.139]

Intervalos de confianza del 95.0% intervalo de confianza para la diferencia de medias

suponiendo varianzas iguales: 5.22222 +/- 2.24717 [2.97505, 7.46939]

Prueba t para comparar medias

Hipótesis nula: media1 = media2

Hipótesis Alt.: media1 <> media2

suponiendo varianzas iguales: t = 4.72276 valor-P = 0.0000391884

Se rechaza la hipótesis nula para alfa = 0.05.

Comparación de desviaciones estándar

| | INICIAL | C.E |
|---------------------|---------|---------|
| Desviación Estándar | 2.07913 | 3.07613 |
| Varianza | 4.32278 | 9.46256 |
| Gl | 8 | 26 |

Razón de Varianzas= 0.456829

Intervalos de confianza del 95.0%

Desviación Estándar de INICIAL: [1.40436, 3.98313]

Desviación Estándar de C.E: [2.4225, 4.21562]

Razones de Varianzas: [0.167381, 1.79391]

Prueba-F para comparar Desviaciones Estándar

Hipótesis Nula: sigma1 = sigma2

Hipótesis Alt.: sigma1 <> sigma2

F = 0.456829 valor-P = 0.250328

No se rechaza la hipótesis nula para alfa = 0.05.

Comparación de medias del IPD

Intervalos de confianza del 95.0% para la media de Inicial: 0.0661111 +/- 0.0342909 [0.0318202, 0.100402]

Intervalos de confianza del 95.0% para la media de C.E: 0.0698148 +/- 0.0212045 [0.0486103, 0.0910193]

Intervalos de confianza del 95.0% intervalo de confianza para la diferencia de medias suponiendo varianzas iguales: -0.0037037 +/- 0.040384 [-0.0440877, 0.0366803]

Prueba t para comparar medias

Hipótesis nula: media1 = media2

Hipótesis Alt.: media1 <> media2

suponiendo varianzas iguales: t = -0.186382 valor-P = 0.853253

No se rechaza la hipótesis nula para alfa = 0.05.

Comparación de Desviaciones Estándar

| | <i>Inicial</i> | <i>C.E</i> |
|---------------------|----------------|------------|
| Desviación Estándar | 0.0446107 | 0.0536026 |
| Varianza | 0.00199011 | 0.00287323 |
| Gl | 8 | 26 |

Razón de Varianzas= 0.692638

Intervalos de confianza del 95.0%

Desviación Estándar de Inicial: [0.0301326, 0.0854637]

Desviación Estándar de C.E: [0.0422129, 0.0734586]

Razones de Varianzas: [0.25378, 2.7199]

Prueba-F para comparar Desviaciones Estándar

Hipótesis Nula: sigma1 = sigma2

Hipótesis Alt.: sigma1 <> sigma2

F = 0.692638 valor-P = 0.610926

No se rechaza la hipótesis nula para alfa = 0.05.

Resultados del porcentaje de fármaco que se mantiene encapsulado después de aplicarles una corriente eléctrica de 0.5 mA/min, durante 20 minutos.

| % de fármaco encapsulado | |
|--------------------------|---|
| Inicial | Después de aplicar la corriente eléctrica |
| 71.92 | 73.79 |
| 77.91 | 77.34 |
| 72.01 | 69.40 |
| 76.34 | 85.00 |
| 70.01 | 80.36 |
| | 77.05 |
| | 66.60 |
| | 67.01 |
| | 72.96 |

Comparación de Medias

Intervalos de confianza del 95.0% para la media de Inicial: 73.6393 +/- 4.13558 [69.5037, 77.7749]

Intervalos de confianza del 95.0% para la media de C.E: 74.5019 +/- 4.92451 [69.5774, 79.4264]

Intervalos de confianza del 95.0% intervalo de confianza para la diferencia de medias

suponiendo varianzas iguales: -0.862638 +/- 6.773 [-7.63564, 5.91036]

Prueba t para comparar medias

Hipótesis nula: media1 = media2

Hipótesis Alt.: media1 <> media2

suponiendo varianzas iguales: t = -0.277504 valor-P = 0.786116

No se rechaza la hipótesis nula para alfa = 0.05.

Comparación de Desviaciones Estándar

| | Inicial | C.E |
|---------------------|---------|---------|
| Desviación Estándar | 3.33066 | 6.40653 |
| Varianza | 11.0933 | 41.0437 |
| Gl | 4 | 8 |

Razón de Varianzas= 0.270281

Intervalos de confianza del 95.0%

Desviación Estándar de Inicial: [1.99551, 9.57085]

Desviación Estándar de C.E: [4.32734, 12.2734]

Razones de Varianzas: [0.0534931, 2.42701]

Prueba-F para comparar Desviaciones Estándar

Hipótesis Nula: sigma1 = sigma2

Hipótesis Alt.: sigma1 <> sigma2

F = 0.270281 valor-P = 0.221807

No se rechaza la hipótesis nula para alfa = 0.05.

Anexo 11. Publicaciones

Pharmaceutics 2011, 3, 954-970; doi:10.3390/pharmaceutics3040954

OPEN ACCESS

pharmaceutics

ISSN 1999-4923

www.mdpi.com/journal/pharmaceutics

Article

Formulation and *in Vitro*, *ex Vivo* and *in Vivo* Evaluation of Elastic Liposomes for Transdermal Delivery of Ketorolac Tromethamine

Guadalupe Nava *, Elizabeth Piñón, Luis Mendoza, Néstor Mendoza, David Quintanar and Adriana Ganem *

División de Estudios de Posgrado (Tecnología Farmacéutica), Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Universidad Nacional Autónoma de México, Av. 1° de Mayo S/N, Cuautitlán Izcalli, Estado de México, 54740, Mexico

* Authors to whom correspondence should be addressed; E-Mails: gpearz@hotmail.com (G.N.); ganemq@hotmail.com (A.G.); Tel.: +5255-56-23-20-65; Fax: +5255-56-23-20-43.

Received: 29 September 2011; in revised form: 3 December 2011 / Accepted: 6 December 2011 / Published: 15 December 2011

Abstract: The objective of the current study was to formulate ketorolac tromethamine-loaded elastic liposomes and evaluate their *in vitro* drug release and their *ex vivo* and *in vivo* transdermal delivery. Ketorolac tromethamine (KT), which is a potent analgesic, was formulated in elastic liposomes using Tween 80 as an edge activator. The elastic vesicles were prepared by film hydration after optimizing the sonication time and number of extrusions. The vesicles exhibited an entrapment efficiency of $73 \pm 11\%$, vesicle size of 127.8 ± 3.4 nm and a zeta potential of -12 mV. *In vitro* drug release was analyzed from liposomes and an aqueous solution, using Franz diffusion cells and a cellophane dialysis membrane with molecular weight cut-off of 8000 Da. *Ex vivo* permeation of KT across pig ear skin was studied using a Franz diffusion cell, with phosphate buffer (pH 7.4) at 32 °C as receptor solution. An *in vivo* drug permeation study was conducted on healthy human volunteers using a tape-stripping technique. The *in vitro* results showed (i) a delayed release when KT was included in elastic liposomes, compared to an aqueous solution of the drug; (ii) a flux of $0.278 \mu\text{g}/\text{cm}^2\text{h}$ and a lag time of about 10 h for *ex vivo* permeation studies, which may indicate that KT remains in the skin (with the possibility of exerting a local effect) before reaching the receptor medium; (iii) a good correlation between the total amount permeated, the penetration distance (both determined by tape stripping) and transepidermal water loss (TEWL) measured during the *in vivo* permeation studies. Elastic

liposomes have the potential to transport the drug through the skin, keep their size and drug charge, and release the drug into deep skin layers. Therefore, elastic liposomes hold promise for the effective topical delivery of KT.

Keywords: elastic liposomes; ketorolac tromethamine; skin permeation; tape stripping; TEWL

1. Introduction

Ketorolac tromethamine (KT) is a non-steroidal anti-inflammatory drug. The potency of KT is 800 times greater than commonly used aspirin [1]. Further, KT is a better analgesic agent than narcotic analgesics because of its non-addictive nature and absence of respiratory side effects (e.g., suppression of breathing) [2]. KT is commonly administered by oral, intramuscular or intravenous routes for short periods of time for the management of moderate to severe pain, including postoperative pain and visceral pain associated with cancer. The drug administered orally as 10 mg tablets shows a bioavailability of 90% with little first-pass hepatic metabolism. Nevertheless, the major drawbacks for its use include its short biological half-life (4–6 h), thereby necessitating frequent administrations to achieve the desired therapeutic effect. Frequent administrations of KT often lead to severe gastrointestinal side effects associated with cyclooxygenase inhibition; these side effects can lead to high patient non-compliance [3,4]. As a consequence, the FDA issued an alert about these side effects and recommended the inclusion of medication guide [5].

KT's potent analgesic activity and low molecular weight make it a good candidate for transdermal administration. Furthermore, KT previously exhibited good cyclooxygenase-2 inhibition in a dermal fibroblast culture, showing high anti-inflammatory activity and thus increasing the potential for a useful transdermal preparation [6]. Moreover, transdermal delivery of KT would reduce the dose required to achieve a therapeutic effect and would reduce the risk of adverse events in the gastrointestinal tract.

Although transdermal administration offers diverse advantages for non-invasive drug delivery, the drug must transit the lipidic stratum corneum and cross the aqueous epidermal and dermal layers before reaching the target tissues [7]. This requirement implies that the transdermal dosage form must allow the drug to penetrate deeply into the skin, which is important considering that KT is hydrophilic in nature and its absorption through the skin is poor. Therefore, a number of different methods have been investigated in order to enhance the transdermal delivery of KT. These methods include the use of both chemical (e.g., drug permeation enhancers) and physical (e.g., iontophoresis) enhancing methods [4,6,7]. Regardless of the technology, however, the drug must be formulated so as to enable a convenient transdermal administration. In this sense, colloidal carriers represent an alternative to conventional formulations [8,9].

Cevc [10,11] proposed a carrier able to overcome the former drawbacks: Transfersomes[®], ultra-deformable lipidic vesicles, also called elastic liposomes. These vesicles are flexible with promising new uses in the transdermal drug delivery field, due to their ability to penetrate the skin in a spontaneous manner, reaching deep subcutaneous tissues while preserving their physical integrity. A

combination of lipids and biocompatible membrane softeners facilitates the formation of flexible vesicles that are able to penetrate throughout the intercellular domain of the skin.

The mechanism by which elastic liposomes penetrate the skin relates to the natural transcutaneous hydration gradient. Once applied to the skin's surface, elastic liposomes dehydrate due to water evaporation, but their hydrophilicity causes the vesicles to be attracted to areas with high water content, e.g., the deep layers of the skin. The transepidermal osmotic gradient generated allows the vesicles to penetrate the intercellular spaces. This fact, as well as the ability of elastic liposomes to be deformed, results in the penetration of intact vesicles through spaces that are much smaller than their own size, carrying their load into the subcutaneous tissue [7]. Therefore, the aim of this work was to formulate elastic liposomes containing KT and to evaluate their *in vitro* drug release properties as well as their *ex vivo* and *in vivo* transdermal delivery capabilities.

2. Experimental Section

2.1. Materials

Epikuron 200 (containing 95% phosphatidylcholine) was a gift from Degussa BioActives GmbH & Co., Germany. Ketorolac tromethamine was provided by Globe Chemical México. Sephadex-G-10 and Tween 80 were purchased from Sigma Chemicals, USA. Cellophane membrane (Spectra/Por® Membrane, molecular porous MWCO: 6–8,000) was obtained from Spectrum Laboratories, Inc., USA. All other chemicals were reagent grade and used as received. Water was obtained from a Milli-Q System (Millipore®, USA).

2.2. Formation of KT-Loaded Elastic Liposomes

The elastic liposomes were prepared according to the thin-layer evaporation method. Briefly, 86 mg of Epikuron 200, 14 mg of Tween 80 (edge activator) and 4 mg of KT were placed in a round-bottom flask (these amounts were used to produce 2 mL of vesicle suspension), and the mixture was dissolved in a suitable volume of ethanol. The solvent was removed by rotary vacuum evaporation at 40 °C. Final traces of solvent were removed under vacuum overnight. The film formed was hydrated with a hydroalcoholic solution (ethanol in 7% distilled water, v/v) at room temperature with the help of a vortex for 15 min. The vesicle suspension obtained was swollen for two hours and was sonicated at room temperature for 10, 20, or 30 min at 40 kHz (Branson Ultrasonic Co., USA). The sonicated vesicles were extruded manually, either one, two, three, four or five times through 100 nm polycarbonate membrane filters (Millipore®, USA). The final lipid and drug concentrations were 5% w/v and 0.2% w/v, respectively.

2.3. Characterisation of KT Elastic Liposomes

The average diameter, size distribution (polydispersity index, PI) and zeta potential of liposomes were determined by Photon Correlation Spectroscopy (PCS) using a Zetasizer (Zetasizer 3000, Malvern, UK, using the software from Malvern Instruments Dispersion Technology and Light Scattering Systems, version 1.32). Measurements were carried out in triplicate by diluting the samples with distilled water.

Surface morphology of the elastic liposomes was examined using transmission electron microscopy (TEM). To prepare samples, a drop of the vesicle dispersion was applied onto a formvar-coated copper grid and left in contact for 2 min to form a thin film. A drop of phosphotungstic acid (1%) was added, wiping off the excess with filter paper. The grid was allowed to dry and samples were examined and images were taken using a transmission electron microscope (JEOL, JEM-100CX II).

Liposome elasticity was determined by measuring the size of the vesicles before and after manual extrusion through a polycarbonate microporous membrane with a pore size of 50 nm (Isopore, Millipore®). The experiment was carried out in triplicate. Conventional, non-elastic liposomes (prepared by the method described in point 2.2, excluding the surfactant) were used as a control.

To evaluate the long-term stability of KT elastic liposomes, liposomes without preservatives were stored at 4 °C for one year. At different time intervals, dispersions were subjected to macroscopic observation to find any evident sedimentation or aggregation. At the same time, particle size and polydispersity index were measured by PCS using a Zetasizer 3000 (Malvern, UK). Simultaneously, the ability of elastic liposomes to retain the drug was assessed by keeping the elastic liposome preparation at 4 °C. Samples were analysed for drug entrapment at different periods of time (1–11 weeks) by High Performance Thin Layer Chromatography (HPTLC) as described in Section 2.4.

2.4. HPTLC Analysis

Samples were analyzed for KT content by HPTLC. KT content was determined by spotting samples on TLC plates (Alugram® Sil G/UV₂₅₄, Macherey-Nagel, Germany) using the Automatic CAMAG TLC Sampler III (version 2.12, Switzerland). Standard solutions of increasing concentrations were applied for mass calibration. Separation was carried out in a developing chamber (CAMAG, Switzerland) saturated at room temperature with ethyl acetate:chloroform:acetic acid (8:3:0.1). After drying the plates, the plates were scanned with a CAMAG TLC Scanner 3 at 323 nm. According to the test required, the matrices of the samples had to be different (*i.e.*, for stability studies the solvent was ethanol; for entrapment efficiency, water; for *ex vivo* studies, pH 7.4 phosphate buffer solution; for *in vivo* studies, methanol). In each case, the method was validated using the corresponding solvent.

2.5. Drug Entrapment Efficiency of Elastic Liposomes

To determine the entrapment efficiency, free drug (not incorporated into the vesicles) was separated from the liposomes by gel permeation chromatography with a Sephadex G-10 column using the mini-column centrifugation method described elsewhere (12–14). Briefly, Sephadex G-10 was swollen in distilled water at ambient temperature with occasional agitation, for at least six hours. The gel obtained was then stored at 4 °C. The mini-column was prepared by placing a filter paper pad in the base of a 3 mL syringe and filling it with the gel. Any water excess was removed by centrifugation at 1500 rpm for three minutes. Next, 200 µL of the vesicle suspension was applied to the mini-column and centrifuged (1500 rpm for 3 min). Next, 400 µL of water was added and the centrifugation was repeated to elute the vesicles. It is important to mention that at this stage, free drug remained in the column and the eluate did not contain KT (this was previously proven by applying a saturated solution of KT instead of the vesicle suspension and repeating the same procedure; under these conditions, no drug was eluted). Once free KT was separated from the elastic liposomes, the percentage of KT

entrapped in the liposomes was determined by disrupting the vesicles with ethanol and using HPTLC (as described in Section 2.4) to quantify the amount of KT released. Entrapment efficiency (EE%) was calculated according to Equation (1).

$$EE\% = (\text{Entrapped drug} / \text{Total drug}) \times 100 \quad (1)$$

2.6. Evaluation of *in Vitro* KT Release from Elastic Liposomes

In vitro drug release was evaluated using Franz diffusion cells. A cellophane dialysis membrane with molecular weight cut-off of 8000 Da (Spectra/Por®) was hydrated with the receptor medium (pH 5.5 phthalate buffer) for 12 h before being fastened between the donor and receptor compartments. The donor medium consisted of either 1.5 mL of the elastic liposome suspension or a 2 mg/mL KT aqueous solution (this later was used only for comparison purposes). The receptor compartment was filled with 20 mL of pH 5.5 phthalate buffer and stirred with a magnetic bar. The available diffusion area was 5 cm². The temperature of the assay was controlled at 32 °C to mimic human skin. Four-milliliter aliquots were withdrawn at fixed time intervals and immediately replaced with an equal volume of fresh buffer. All samples were analyzed for KT content by spectrophotometry at 323 nm. No interference was found for any of the other components when a control test was done with empty liposome. The experiment was done in triplicate.

2.7. Ex Vivo Skin Permeation of KT

Experiments were performed under non-occluding conditions. Briefly, dermatomed (500 µm thickness) pig's ear skin (provided by a local slaughterhouse) was mounted between the donor and receptor compartments of vertical Franz-type diffusion cells with an effective permeation area of 1.5 cm². The receptor solution consisted of 2 mL of pH 7.4 phosphate buffer, constantly stirred with a magnetic bar. Skin surface temperature was maintained at 32 °C. Then, 200 µL of the elastic liposome suspension containing KT was added to the donor compartment. Five hundred-microliter aliquots of the receptor fluid were withdrawn periodically over 24 h, replacing them with an equivalent volume of fresh solution, and analyzed for drug content by HPTLC. At the end of the experiment and after the skin was cleaned 5 times with a cotton cloth soaked in methanol, the skin was finely divided and immersed for 24 h in 6 mL of methanol under constant stirring at room temperature to extract the drug. Extraction suspensions were centrifuged, and the supernatants were analyzed by HPTLC to determine drug deposition in the skin. Permeation experiments with a KT aqueous solution (2 mg/mL in a 7% v/v ethanolic solution) were carried out in the same manner.

2.8. In Vivo Skin Permeation of KT

In vivo permeation studies were carried out by the tape-stripping technique. The study is notable for its short duration, noninvasive nature and realistic conditions. Six healthy volunteers (2 females and 4 males, skin types 3 and 4 [Fitzpatrick classification], aged 22–32 years) with no history of dermatological disease participated in this study. The nature and purpose of the study were explained to the volunteers, and informed written consent was obtained from each participant. The subjects were

required to maintain the ventral forearm free from any application of cosmetic or pharmaceutical topical formulation for at least 12 h before the study and during the study.

A perfusion cell placed on the inner forearm of the volunteers. A volume of 1.5 mL of the elastic liposome suspension was added to cover the entire area (9.62 cm²) and the arm was wrapped with a polyester film, in order to fix the cell to the arm. The polyester film was removed from the exposed area of the cell with the intention to have a non-occlusive system. After 60 min of contact, the cell was removed, and the skin surface was wiped clean with a water-soaked cotton ball and dried gently with a gauze pad. Tape strips (Scotch Book tape No. 854 3M, USA) of equal size were cut and weighed. Each pre-weighed tape strip was placed on the treated surface area with homogeneous pressure and removed at once using forceps. Up to 16 strips were taken from each treated site such that the stratum corneum was never completely removed. The direction of strip removal was alternated from left to right. Tape strips were then weighed, and the amount of KT from each tape was extracted with methanol and quantified by HPTLC (as described in Section 2.4). The first tape was discarded, the following five tapes were extracted individually, and the remaining strips were extracted in groups of two in order to reach the detection threshold of the method.

2.9. Data Analysis and Statistics

Values were expressed as mean \pm SD. The results were analysed statistically using analysis of variance (ANOVA). Significance was determined at $P < 0.05$. Duncan's test was used to determine those average values that differed significantly from the set of averages when a significant F -value was found.

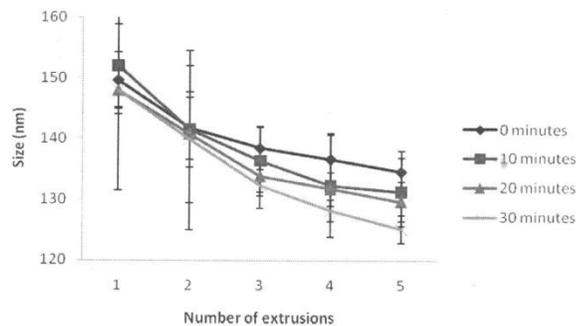
3. Results and Discussion

3.1. Preparation and Characterisation of KT-Containing Elastic Liposomes

A wide variety of conditions have been proposed to prepare elastic liposomes, including various sonication times (from no sonication to 60 min), number of filtrations (up to 30 times), and pore sizes of the filtering membrane. The effectiveness of pressure homogenisation to form elastic liposomes with desired size has also been reported [7,13–15]. In this study, the method to prepare KT-containing elastic liposomes was optimized by evaluating the influence of sonication time and number of filtrations. Three sonication times were assayed (10, 20, and 30 min), and vesicles were extruded up to 5 times through polycarbonate membranes with a pore size of 100 nm. Figure 1 shows that, as expected, vesicle size decreased with the number of filtrations. Significant differences ($P < 0.05$) were found when a bifactorial analysis of variance was carried out. The Duncan's multiple range test showed no differences when three to five extrusions were performed. Regarding sonication time, the vesicle's size was reduced as the sonication time increased, but no statistical differences were found. Therefore, optimal manufacturing conditions for KT-loaded elastic liposomes were sonication for 10 min followed by three extrusions through a polycarbonate membrane. Elastic liposomes are basically composed of a mixture of phospholipid and surfactant in an optimal proportion to give elasticity to the membrane. Different proportions of these two components have been investigated, but most studies concluded that the best ratio is 85:15 (phospholipid:surfactant). It has been reported that entrapment efficiency decreases as the surfactant proportion increases, and that elasticity diminishes

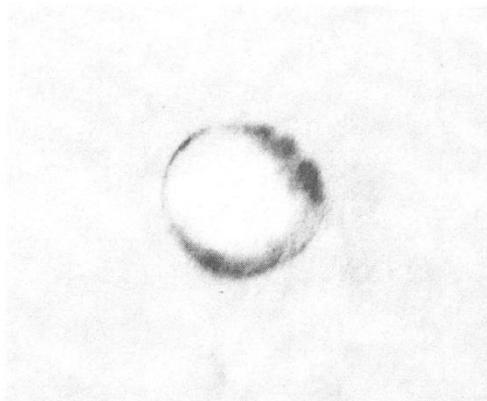
with lower surfactant proportions [13,16]. For this reason, the phospholipid:surfactant ratio was maintained at 86:14 in this study.

Figure 1. Influence of sonication time and number of extrusions on vesicle size.



Particle size analysis indicated that the average size of the elastic vesicles prepared was 127.8 ± 3.4 nm with a unimodal size distribution and a very low polydispersity index of less than 0.1, indicating a narrow size distribution. Rigid liposomes had a mean size of 152.7 ± 1.7 nm. The results demonstrated that incorporation of Tween 80 into elastic liposomes led to a slight decrease in particle size. Previous reports have analysed the influence of vesicle size on the ability of vesicles to penetrate into and through the skin. Vesicles up to 300 nm are able to release their cargo in the deep layers of the skin [17]. Therefore, liposomes of smaller size are considered potentially useful for the delivery of drugs through the skin. The morphology of elastic liposomes was examined by TEM. As shown in Figure 2, the liposomes appeared as unilamellar, spherical shaped vesicles.

Figure 2. Transmission electron microscope (TEM) image of Ketorolac tromethamine (KT)-loaded elastic liposome (X 50,000).



A zeta potential of -12 mV obtained in the current study is consistent with previous reports where Tween 80 was used as edge activator and implied a good physical stability [14]. High zeta potential values, either positive or negative, are expected to render a more stable system due to a strong electrostatic repulsion. Although elastic liposomes exhibited a moderate zeta potential in this study, they were shown to be stable for one year. This stability could be attributed to the steric stabilization provided by Tween 80. It has been reported that if alkyl chains are present on the vesicle surface, the hydrocarbon chain of surfactant could penetrate into the phospholipid bilayer, exposing the polyethylene oxide groups on the surface of the vesicles, thereby producing a steric stabilization, which could decrease vesicle fusion [18].

The results presented evidenced the ability of these vesicles to be deformed due to the presence of Tween 80, which enabled the liposomes to change their shape under stress without rupture. This effect could be attributed to the propensity of Tween to form highly curved structures (e.g., micelles), thus diminishing the energy required for globule deformation. The size of elastic liposomes (either KT-containing liposomes or encapsulated + free KT liposomes) containing Tween 80 changed slightly after passing them through a membrane with a pore size of 50 nm. No differences were found between these two kinds of vesicles, since both of them showed the same capability to pass through the membrane. Table 1 shows the average sizes obtained before and after passing the vesicles, through this membrane. Then, due to their flexibility, elastic liposomes can squeeze through the intercellular regions of the stratum corneum, being able to penetrate pores that are five-fold smaller than their own diameter [19,20]. In the case of conventional liposomes, they were not able to pass through the membrane (pore size of 50 nm) when manual pressure was applied. These results agreed with reports published elsewhere [16].

Figure 3A shows that under the storage conditions tested, elastic liposomes were stable without significant changes in vesicular size after one year of storage at 4 °C (size increase $\sim 4.5\%$). Figure 3B presents the zeta potential values that were monitored over a period of seven weeks. The zeta potential of elastic liposomes stored at 4 °C remained constant at around -12 mV. However, even if size and zeta potential did not change, the drug content fell $\sim 52\%$ after 11 weeks with regard to the initial content (Figure 4). There were no significant differences between the first 3 weeks (Duncan's Test). In general, aqueous liposomal dispersions may suffer a series of stability problems such as aggregation and leakage of the encapsulated drugs. In this sense, freeze-drying may offer an alternative for storing liposome suspension, by preserving them in a more stable dry state [21].

Figure 3. Size (A) and Z potential (B) of elastic liposomes as a function of time for determination of physical stability.

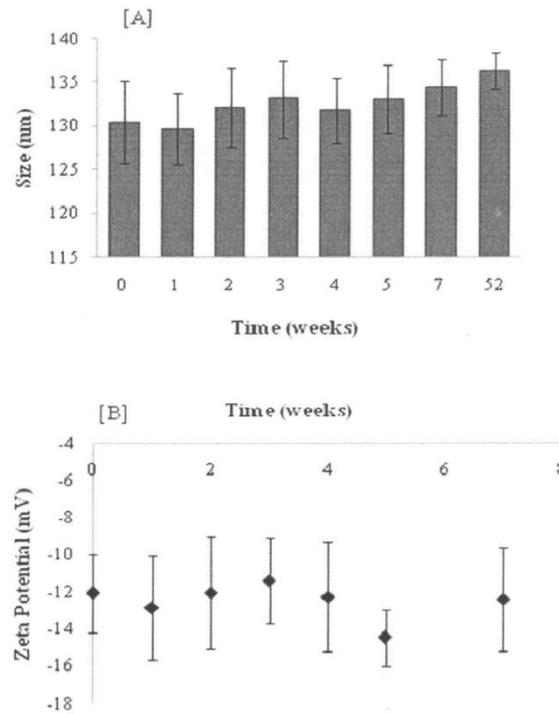
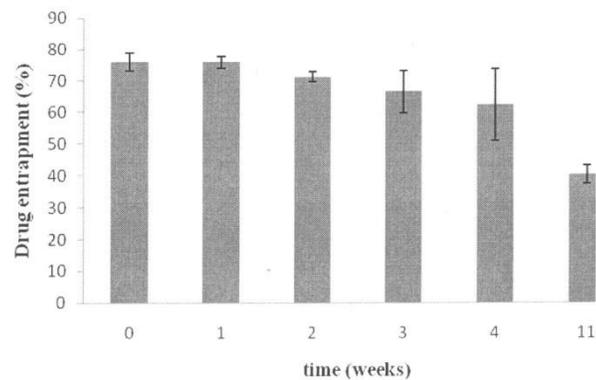


Figure 4. KT leakage from the elastic liposome formulation during storage (n = 4).



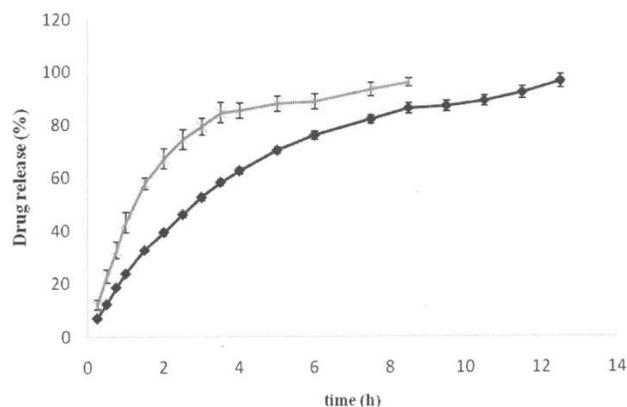
3.2. Entrapment Efficiency

Entrapment efficiency is the fraction of KT incorporated into the elastic liposomes compared to the total amount of KT. The results showed that the maximum amount of KT incorporated into the vesicles was approximately 18.6 $\mu\text{g}/\text{mg}$ of phospholipid (corresponding to an entrapment efficiency of $73.13 \pm 11.13\%$). This entrapment efficiency is comparable to those obtained for other hydrophilic drugs, such as ketotifen fumarate formulated in elastic vesicles, using Tween 80 as an edge activator [22].

3.3. In Vitro Drug Release

The role of the carrier (in this case elastic liposomes) is of particular importance, since it must efficiently release the drug and facilitate drug transport across the skin. The release of KT encapsulated in the elastic liposomes (free KT was previously separated as indicated in Section 2.5) was evaluated using vertical Franz diffusion cells with a synthetic membrane between the donor and receptor compartments. The use of Franz cells provides an accurate and reliable method for evaluating active compound release from topical formulations [23]. Figure 5 shows the *in vitro* release profile of KT from elastic liposomes and from an aqueous solution using a pH 5.5 phthalate buffer as the release medium. As can be seen, elastic liposomes delayed KT release, making them slower than the aqueous solution.

Figure 5. *In vitro* release profiles of KT from elastic liposomes (\blacklozenge) and an aqueous solution (\times) (means \pm SD, n = 3).

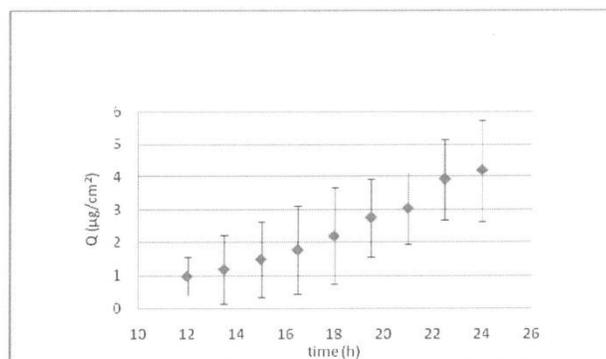


The diffusion of an entrapped molecule from a disperse system is governed by the transfer of the molecule from the delivery system to the external aqueous phase and by the diffusion of the molecule through the dialysis membrane into the release medium of receptor compartment. Only the molecules present in the external aqueous phase are able to permeate through the membrane [24,25]. As shown in Figure 5, the control formulation (KT solution) exhibited a rapid drug release behavior with 80% of KT released after 3 h. In contrast, KT-loaded elastic liposomes exhibited a more controlled drug release pattern over a period of 13 h.

3.4. Ex Vivo Skin Permeation of KT

Figure 6 shows the *ex vivo* skin permeation of KT formulated in elastic liposomes. A long lag time of about 10 h was obtained, suggesting that KT-loaded elastic liposomes could exert a local effect, as indicated by 12 h drug retention in the skin before reaching the receptor solution. After this period, a constant flux of $0.278 \mu\text{g}/\text{cm}^2\text{h}$ was obtained. However, at the end of permeation, the residual amount of KT in the skin was of $12.61 \pm 2.19 \mu\text{g}$, and the total amount permeated was $10 \mu\text{g}$. Therefore, after 24 h of permeation, about $269 \mu\text{g}$ remained in the donor solution (taking into account that $292 \mu\text{g}$ were placed in the donor solution at the beginning of the permeation) and only $\sim 7.74\%$ was able to permeate the skin.

Figure 6. Cumulative amount of KT (Q) permeated through the skin *ex vivo* from elastic liposomes (means \pm SD, n = 5).



The findings of the current study are in agreement with those reported by Elsayed and co-workers, who evaluated the *in vitro* permeation of ketotifen formulated in deformable liposomes through rabbit pinna skin using Tween 80 as the edge activator. The authors found that drug encapsulation of hydrophilic drugs can result in a slow release on the skin surface where phospholipids can form a lipid barrier [19]. In our case, permeation was performed only with encapsulated KT (non-encapsulated KT was previously separated, as explained in Section 2.5), and during permeation a lipid film was formed on the skin once the formulation was dehydrated, hindering drug release. This phenomenon could explain the low percentage permeated into and through the skin. These results agreed with other authors, such as Bahia and co-workers, who found that elastic vesicles formed by phosphatidylcholine and sodium cholate promote calcein permeation in essentially its non-encapsulated form [26]. Furthermore, Cevc *et al.* [27] determined that drying of the carrier formulation containing ketoprofen on the skin surface increases drug-carrier association, resulting in a decrease of its permeation through the skin. In the present study, permeation experiments with a hydroalcoholic solution of KT revealed a negligible amount of the drug in the receptor solution (below the quantification limit). However; the residual amount of KT in the skin at the end of permeation was higher for the drug solution ($70.15 \pm 24.25 \mu\text{g}$) than for KT encapsulated in elastic liposomes ($12.61 \pm 2.19 \mu\text{g}$). These results are

in accordance with those found by Nagarsenker *et al.* [8] who reported that inclusion of KT in conventional liposomes significantly reduced the transport of the drug through *in vitro* pig skin. One possible explanation for the low accumulation of KT in the skin upon application of elastic liposomes, is related to the experimental conditions, since vesicles remain under non-occlusive conditions for an extended period of time at 32 °C, promoting their fusion and excessive dehydration, and forming a film on the surface of the skin, creating a barrier that prevents further penetration of KT.

3.5. In Vivo Skin Permeation of KT

Most of the *in vivo* studies with elastic vesicles have been conducted in animals (e.g., mice, rats, rabbits). For studies in human beings, the tape-stripping technique has gained wide acceptability as a facile and minimally invasive method to evaluate skin drug permeation. Several reports are available in the literature [28,29] on this method. In this work, *in vivo* permeation of KT was evaluated using a well-established tape-stripping technique on six healthy human volunteers. As differences in stratum corneum cohesiveness results in different amounts of stratum corneum removed from each volunteer and therefore different stratum corneum depths, the quantity of KT in the stratum corneum as a function of depth in the skin is presented individually in Figure 7. Although the drug penetration profile showed a high inter-individual variability, this could be attributed to the individual skin type and to the barrier properties of each person. For this reason, Transepidermal Water Loss (TEWL) was recorded for all volunteers prior to treatment and as shown in Figure 7, TEWL values varied from 8.8 to 15.95 g/hm². Therefore, it was not surprising to find inter-individual variability, taking into account the penetration mechanism of elastic vesicles and its relationship to hydration gradient.

Figure 7. Amount of KT vs. stratum corneum depth after 1 hour of treatment for volunteers (A), (B), (C), (D), (E) and (F). TEWL (Transepidermal water loss, g/m²h) measurements were recorded before treatment.

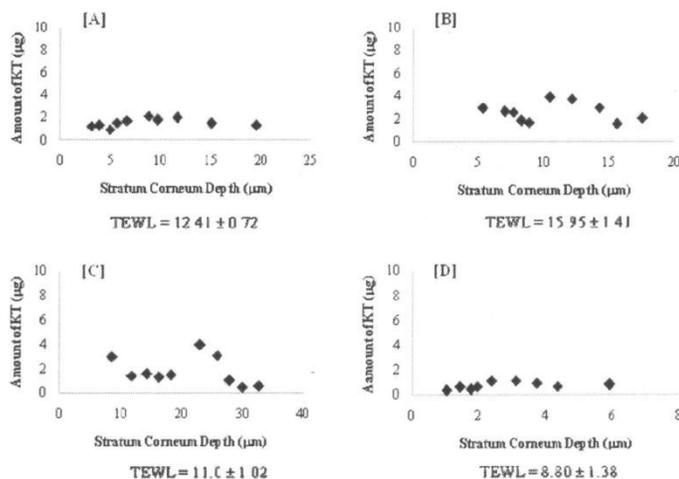
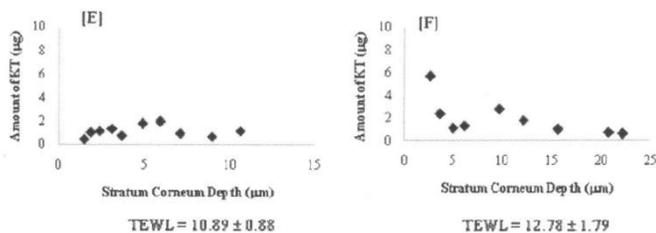


Figure 7. Cont.



According to the results shown in Figure 7, the total amount of KT permeated for the six volunteers was 7–26 µg with a penetration distance of 6–33 µm. Interestingly, the total amount permeated (Figure 8A) and the penetration distance (Figure 8B) vs. individual TEWL values revealed a good correlation. Despite the obvious variability associated with *in vivo* permeation experiments, linear regression of the data resulted in a good r^2 value (0.8779) for the amount permeated and an average r^2 (0.5266) for the penetration distance into the stratum corneum. Although the dependence of transdermal absorption of drug upon skin hydration has already been demonstrated (a linear relationship between transdermal penetration and TEWL at the site of absorption was demonstrated [30]), the present work confirmed that the penetration mechanism of elastic liposomes correlated to the transcutaneous hydration gradient.

Figure 8. Correlation between volunteer transepidermal water loss (TEWL) value and (A) total amount of KT permeated; (B) penetration distance. The lines are from simple linear regression. In (B), the point marked in red was not taken into account for r^2 calculation.

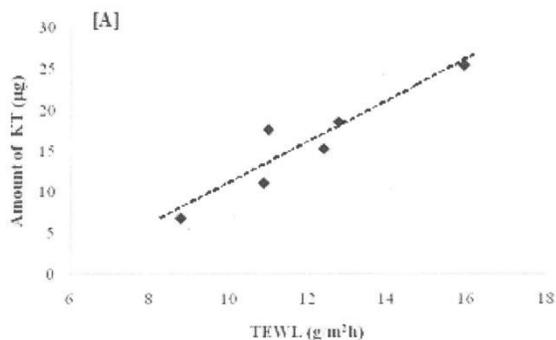
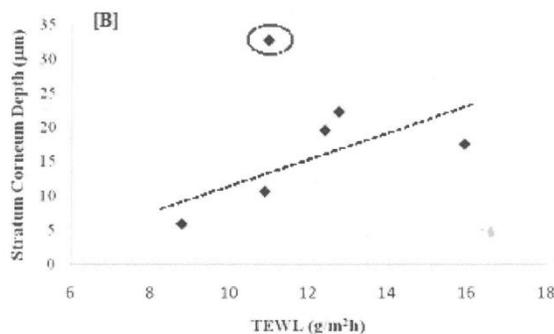


Figure 8. Cont.



The differences found between *ex vivo* and *in vivo* studies were related to the conditions of the test, the viability of the tissue and the inter-species characteristics. After 1 h of contact, a total amount of $15.93 \pm 6.42 \mu\text{g}$ of KT penetrated into the stratum corneum *in vivo*. Although the conditions of the *ex vivo* and *in vivo* tests made comparison difficult with this single time-point, a punctual flux of $1.65 \pm 0.66 \mu\text{g}/\text{cm}^2\text{h}$ was estimated. This value was six fold greater than the flux through excised pig skin ($0.278 \pm 0.1 \mu\text{g}/\text{cm}^2\text{h}$) after 12 h of contact. *Ex vivo*, a long contact time resulted in dehydration of the formulation with the formation of a film, hindering elastic liposome penetration and drug release. Similar results were reported by Lodén *et al.* [31], who studied the *in vitro* and *in vivo* permeation of ketoprofen formulated in a gel.

Table 1. Average size (nm) of elastic and rigid liposomes before and after manual extrusion through a polycarbonate membrane with a 50 nm pore size (n = 9).

| Formulation | Before | After |
|---|--------------------|--------------------|
| Elastic liposomes without KT | 130.12 ± 2.917 | 110.07 ± 2.903 |
| Elastic liposomes with KT (encapsulated and free) | 127.88 ± 3.435 | 109.57 ± 2.641 |
| Elastic liposomes with KT (only encapsulated) | 129.6 ± 4.084 | 100.13 ± 2.480 |
| Rigid liposomes without KT | 152.7 ± 1.749 | --- |

4. Conclusions

KT-loaded elastic liposomes were successfully prepared with an excellent loading efficiency of about 73%. The KT-loaded elastic liposomes exhibited adequate size, stability and flexibility characteristics. Furthermore, elastic liposomes extended the KT release time, achieving sustained release for almost 12 h. *In vivo* experiments demonstrated an interesting correlation between the permeation capability of elastic liposomes and the TEWL of volunteers: high TEWL values resulted in better penetration (*i.e.*, greater amount of drug and deeper penetration distance). These results confirm that penetration of elastic liposomes effectively correlate to the natural transcutaneous hydration

gradient. Thus, in an ideal situation, elastic liposomes should be able to transport the drug through the skin, keep their size and drug charge, and release the drug into deep skin layers. Elastic liposomes are a potentially suitable carrier for the transdermal delivery of KT. In-depth studies should be performed to confirm their therapeutic efficacy.

Acknowledgments

The authors acknowledge financial support from CONACyT (Ref. 129320) and PAPIIT/UNAM (Ref. IN209709), Mexico. María Guadalupe Nava-Arzaluz acknowledges a grant from CONACyT, Mexico. The authors are grateful to Mr. Rodolfo Robles for his technical assistance with the TEM.

Conflict of Interest

The authors declare no conflict of interest.

References

1. Buckley, M.M.T.; Brogden, R.N. Ketorolac: A review of its pharmacodynamics and pharmacokinetic properties, and therapeutic potential. *Drugs* **1990**, *39*, 86–109.
2. Litvak, K.M.; McEvoy, G.K. Ketorolac, an injectable nonnarcotic analgesic. *Clin. Pharm.* **1990**, *9*, 921–935.
3. Gillis, J.C.; Brogden, R.N. Ketorolac. A reappraisal of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties and therapeutic use in pain management. *Drugs* **1997**, *53*, 139–188.
4. Bo-Yeon, K.; Hea-Jeong, D.; Thanh-Nguyen, L.; Won-Jea, C.; Chul-Soon, Y.; Han-Gon, C.; Jung-Sun, K.; Chi-Ho, L.; Dae-Duk, K. Ketorolac amide prodrugs for transdermal delivery: Stability and *in vitro* rat skin permeation studies. *Int. J. Pharm.* **2005**, *293*, 193–202.
5. Food and Drug Administration: Safety. Available online: <http://www.fda.gov/Safety/MedWatch/SafetyInformation/Safety-RelatedDrugLabelingChanges/ucm125303.htm> (accessed on 12 May 2009).
6. Cordero, J.A.; Camacho, M.; Obach, R.; Domenech, J.; Vila, L. *In vitro* based index of topical anti-inflammatory activity to compare a series of NSAIDs. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2001**, *51*, 135–142.
7. Essa, E.A.; Bonner, M.C.; Barry, B.W. Electroporation and ultradeformable liposomes; human skin barrier repair by phospholipid. *J. Control. Release* **2003**, *92*, 163–172.
8. Nagarsenker, M.S.; Amin, L.; Date, A.A. Potential of cyclodextrin complexation and liposomes in topical delivery of ketorolac: *In vitro* and *in vivo* evaluation. *AAPS PharmSciTech* **2008**, *9*, 1165–1170.
9. Alsarra, I.A.; Bosela, A.A.; Ahmed, S.M.; Mahrous, G.M. Proniosomes as drug carrier for transdermal delivery of ketorolac. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2005**, *59*, 485–490.
10. Cevc, G.; Blume, G. Lipid vesicles penetrate into intact skin owing to the transdermal osmotic gradients and hydration force. *Biochim. Biophys. Acta* **1992**, *1104*, 226–232.

11. Cevc, G.; Gebauer, D.; Stieber, J.; Schätzlein, A.; Blume, G. Ultraflexible vesicles, Transfersomes, have an extremely low pore penetration resistance and transport therapeutic amounts of insulin across the intact mammalian skin. *Biochim. Biophys. Acta* **1998**, *1368*, 201–215.
12. Lee, E.H.; Kim, A.; Oh, Y.K.; Kim, C.K. Effect of edge activators on the formation and transfection efficiency of ultradeformable liposomes. *Biomaterials* **2005**, *26*, 205–210.
13. El Maghraby, G.M.M.; Williams, A.C.; Barry, B.W. Oestradiol skin delivery from ultradeformable liposomes: Refinement of surfactant concentration. *Int. J. Pharm.* **2000**, *196*, 63–74.
14. Jain, S.; Jain, P.; Umamaheshwari, R.B.; Jain, N.K. Transfersomes—A novel vesicular carrier for enhanced transdermal delivery: Development, characterization, and performance evaluation. *Drug Dev. Ind. Pharm.* **2003**, *29*, 1013–1026.
15. Kim, A.; Lee, E.H.; Choi, S.H.; Kim, C.K. *In vitro* and *in vivo* transfection efficiency of a novel ultradeformable cationic liposome. *Biomaterials* **2004**, *25*, 305–313.
16. Mishra, D.; Dubey, V.; Asthana, A.; Saraf, D.K.; Jain, N.K. Elastic liposomes mediated transcutaneous immunization against Hepatitis B. *Vaccine* **2006**, *24*, 4847–4855.
17. Verma, D.D.; Verma, S.; Blume, G.; Fahr, A. Particle size of liposomes influences dermal delivery of substances into skin. *Int. J. Pharm.* **2003**, *258*, 41–151.
18. Yang, T.; Cui, F.D.; Choi, M.K.; Cho, J.W.; Chung, S.J.; Shim, C.K.; Kim, D.D. Enhanced solubility and stability of PEGylated liposomal paclitaxel: *In vitro* and *in vivo* evaluation. *Int. J. Pharm.* **2007**, *338*, 317–326.
19. Elsayed, M.M.A.; Abdallah, O.Y.; Naggar, V.F.; Khalafallah, N.M. Deformable liposomes and ethosomes: Mechanism of enhanced skin delivery. *Int. J. Pharm.* **2006**, *322*, 60–66.
20. Montenegro, L.; Panico, A.M.; Ventimiglia, A.; Bonina, F.P. *In vitro* retinoic acid release and skin permeation from different liposome formulations. *Int. J. Pharm.* **1996**, *133*, 89–96.
21. El-Nesr, O.H.; Yahya, S.A.; El-Gazayerly, O.N. Effect of formulation design and freeze-drying on properties of fluconazole multilamellar liposomes. *Saudi Pharm. J.* **2010**, *18*, 217–224.
22. Larsen, S.W.; Østergaard, J.; Friberg-Johansen, H.; Jessen, M.N.B.; Larsen, C. *In vitro* assessment of drug release rates from oil depot formulations intended for intra-articular administration. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2006**, *29*, 348–354.
23. Larsen, W.; Østergaard, J.; Poulsen, S.V.; Schulz, B.; Larsen, C. Diflunisal salts of bupivacaine, lidocaine and morphine. Use of the common ion effect for prolonging the release of bupivacaine from mixed salt suspensions in an *in vitro* dialysis model. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2007**, *31*, 172–179.
24. Cevc, G.; Schätzlein, A.; Richardsen, H. Ultradeformable lipid vesicles can penetrate the skin and other semi-permeable barriers unfragmented. Evidence from double label CLSM experiments and direct size measurements. *Biochim. Biophys. Acta* **2002**, *1564*, 21–30.
25. Hofer, C.; van Randenborgh, H.; Lehmer, A.; Hartung, R.; Breul, J. Transcutaneous IL-2 uptake mediated by Transfersomes® depends on concentration and fractionated application. *Cytokine* **2004**, *25*, 141–146.
26. Bahia, A.P.C.O.; Azevedo, E.G.; Ferreira, L.A.M.; Frézard, F. New insights into the mode of action of ultradeformable vesicles using calcein as hydrophilic fluorescent marker. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2010**, *39*, 90–96.

27. Cevc, G.; Vierl, U.; Mazgareanu, S. Functional characterization of novel analgesic product based on self-regulating drug carriers. *Int. J. Pharm.* **2008**, *360*, 18–28.
28. Honeywell-Nguyen, P.L.; Gooris, G.S.; Bouwstra, J.A. Quantitative assessment of the transport of elastic and rigid vesicle components and a model drug from these vesicle formulations into human skin *in vivo*. *J. Invest. Dermatol.* **2004**, *123*, 902–910.
29. Sachdeva, V.; Kim, H.D.; Friden, P.M.; Banga, A.K. Iontophoresis mediated *in vivo* intradermal delivery of terbinafine hydrochloride. *Int. J. Pharm.* **2010**, *393*, 112–118.
30. Rougier, A.; Lotte, C.; Maibach, H.I. *In Vivo* Relationship between Percutaneous Absorption and Transepidermal Water Loss. In *Percutaneous Absorption*, 2nd ed.; Bronaugh, R.L., Maibach, H.I., Eds.; Marcel Dekker Inc.: New York, NY, USA, 1989; pp. 175–190.
31. Lodén, M.; Åkerström, U.; Lindahl, K.; Berne, B. Bioequivalence determination of topical ketoprofen using a dermatopharmacokinetic approach and excised skin penetration. *Int. J. Pharm.* **2004**, *284*, 23–30.

© 2011 by the authors; licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution license (<http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>).

Microneedles as Transdermal Delivery Systems: Combination with Other Enhancing Strategies

M.G. Nava-Arzaluz, I. Calderón-Lojero, D. Quintanar-Guerrero, R. Villalobos-García and A. Ganem-Quintanar*

División de Estudios de Posgrado (Tecnología Farmacéutica), Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Universidad Nacional Autónoma de México, Av. 1° de Mayo s/n, Cuautitlán Izcalli, 54704, Estado de México, Mexico

Abstract: Transdermal drug delivery has exhaustively been studied over the past decades due to its multiple advantages over other administration routes; however, drugs that can be administered by this via are few owing to the stratum corneum permeability properties. Recently, several strategies to bypass the upper-layer skin barrier have been developed. One of the latest advances in this area has been the use of micro-scale needles, which painlessly pierce skin, increasing the passage of drugs with unfavourable skin permeability (i.e., low potent, hydrophilic, high molecular drugs) by several orders of magnitude, by bypassing the stratum corneum. Microneedles have shown to be safe and easy-to-use for drug administration, a nouvelle alternative to hypodermic needle injections, and an array in which drugs can be included to attain a controlled release as to achieve a higher drug delivery. Several works have demonstrated that such devices dramatically increase transdermal delivery of large molecules, thus nowadays microneedles have been regarded as a potential technology approach to be employed alone or with other enhancing methods such as electroporation and iontophoresis, as well as with different drug carriers (e.g., lipid vesicles, micro- and nanoparticles). Hence, this review is mainly focused on presenting the results obtained when combining microneedles with a variety of strategies to ease drug diffusion through skin, including physical enhancers and drug carrier systems.

Keywords: Microneedles, skin, iontophoresis, electroporation, lipid vesicles, microparticles, nanoparticles.

INTRODUCTION

Although oral delivery is still the most common route for drug administration, it has various drawbacks such as degradation of the drug due to the acidic medium or as a consequence of the enzymes present in the gastrointestinal tract. Furthermore, numerous drugs undergo hepatic degradation. On the other hand, parenteral administration, either directly into the bloodstream or into the tissue, appears to be a good alternative for the effective delivery of drugs; however, it is not well accepted by patients because of being painful. Transdermal drug delivery has shown to be a good option, avoiding the above-mentioned limitations of oral and parenteral administration. However, this route is currently useful for only a small number of drugs, due to the impermeability of the outer layer of skin, the stratum corneum. Different strategies, including chemical and physical enhancers have shown, in many cases, a limited impact to overcome this disadvantage. In recent years, great attention has been paid to microneedles, which are hybrid systems between transdermal patches and hypodermic needles. The term microneedles refers to needles of micron dimensions, able to pierce the skin to effectively deliver drugs in a painless manner. Microneedles have found application in the pharmaceu-

tical field, not only to facilitate the administration of drugs with minimal invasion, but also for the extraction of biological fluids. Numerous works have found a marked increase in drug transport through the skin when using microneedle arrays alone, in combination with other enhancers (e.g., iontophoresis or electroporation) or even when including more sophisticated devices such as micropumps. Microneedles have shown great effectiveness in facilitating the passage of macromolecules, hydrophilic substances, and different carriers such as lipidic vesicles and nanoparticles.

The objective of this paper is to review the applications of microneedles as transdermal delivery devices, capitalizing on the results obtained when they are used in combination with carriers or other enhancing techniques.

WHAT ARE MICRONEEDLES?

The concept of using microneedles goes back to 1976, when Alza Corporation patented the idea [1]. Application of microneedles for transdermal delivery was then proposed by Henry *et al.* in 1998 [2]. Microneedles can be considered as hybrid systems, between hypodermic needles and transdermal patches (Fig. (1)). They are able to pierce the skin in a painless manner, passing through the stratum corneum, thus bypassing the most important permeability barrier of the skin. Depending on their structure, microneedles can act as a channel to direct the drug into the skin (e.g., hollow needles), or they can be the delivery system per se (e.g., polymeric microneedles containing the drug). This enables the admini-

*Address correspondence to this author at the División de Estudios de Posgrado (Tecnología Farmacéutica), Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Universidad Nacional Autónoma de México, Av. 1° de Mayo s/n, Cuautitlán Izcalli, 54704, Estado de México, Mexico; Tel: +52 55 56 23 20 65; Fax: +52 55 58 93 86 75; E-mail: ganemq@hotmail.com

stration of large proteins or even particles [3-6]. During the last decade, microneedles have encountered many applications in biomedical and optical areas. In the biomedical area, microneedle arrays offer good possibilities for gene and drug delivery [5-9]. They can also include microelectrodes [e.g., 10,11].

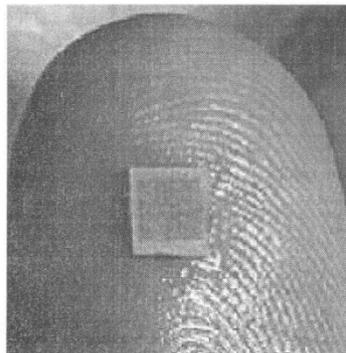


Fig. (1). Experimental microneedle array with 400 microneedles (Georgia Tech Research Corporation, Georgia Institute of Technology). Photographer: Stanley Leary, Georgia Tech Communications Division.

<http://gtresearchnews.gatech.edu/newsrelease/NEEDLES.html>

Hollow microneedles have been used in blood/cell sampling tests and microfluidic transdermal liquid transfer. They are employed for the extraction and analysis of biological fluids, using only capillary action. Therefore, they have shown to be useful for blood diagnostics (e.g., glucose, hormones or therapeutic drug levels) [6,12].

As shown in Fig. (2), microneedles can permeabilize the skin in the following manners: a) by piercing the skin, allowing the passage of a drug contained in a suitable delivery system or formulation, e.g., a patch ("poke with patch"); b) microneedles coated with drug ("coat and poke"); c) microneedles encapsulating the drug; d) drug injection through hollow microneedles.

Some of the advantages of microneedles as transdermal devices are the following:

- Reduction of both pain during insertion and tissue trauma (they are known to be painless).
- Minimally invasive.
- Decreased likelihood of infection occurring at the site of insertion.
- Microneedles dramatically increase the transport of drugs through the skin. They are particularly useful for large and hydrophilic compounds.
- Possibility of self-administration.
- Bolus or controlled release.
- Possibility of administering different formulations if the microneedle array possesses multiple outlet ports.

- Microneedles are drug delivery devices, but they are also a means for sampling biological fluids.
- Like other transdermal systems, they avoid degradation in the gastrointestinal tract and liver metabolism.
- Increased patient compliance.

MATERIALS USED FOR THE MANUFACTURING OF MICRONEEDLES

Due to the fact that microneedles must be sufficiently long and robust to penetrate the stratum corneum, but short enough to be painless, they have been manufactured using different materials such as metals (stainless steel, titanium, nickel-iron), silicon, silicon dioxide, polymers (e.g., polycarbonate, polylactic-coglycolic acid, carboxymethylcellulose) and other materials (e.g., maltose, dextrine) [6]. Although silicon is attractive, it is relatively expensive and brittle. On the other hand, metals are the material of choice for hollow needles, due to their structural strength and to the fact that most of them are inexpensive and biocompatible. Stainless steel has a well-established FDA safety record, with good mechanical strength and it is easy to cut with laser; however, laser-cut stainless steel produced microneedles with rough edges. To solve this, Gill and Prausnitz [13] proposed an electropolishing technique to remove any slags. Polymer needles are also biocompatible and may offer a good resistance. Biodegradable polymers provide additional safety since, in the event that the microneedle breaks off accidentally in the skin, it will be degraded and eliminated [4, 5, 14]. Regarding maltose, it has the problem of water absorption, which results in bending of the top of the microneedle, making insertion in the skin difficult. In addition, due to its melting point (103°C), maltose requires high temperatures to form microneedles, which limits the incorporation of peptides and proteins [15].

DIMENSIONS AND GEOMETRIES

Microneedles, whether hollow or solid, have different geometries such as circular, rectangular or square. Geometry is one of the major factors affecting the capability of microneedles to pierce the skin (a pressure of 3.183×10^6 Pa is required to pierce human skin) [2, 8]. Aggarwal and Johnston [8] compared the effect of geometry on the mechanical properties of silicon microneedles, and found that circular microneedles withstand more stress, followed by rectangular and square microneedles. A wide variety of microneedle geometries have been tested. Some microneedle designs can be inserted into the skin by hand, whereas others require high-velocity insertion [5, 16, 17]. Hollow microneedles are generally weaker than solids ones, and may be clogged by tissue once inserted into the skin. However they are useful to inject a drug formulation or to withdraw a biological fluid [12, 18]. Among other parameters, diameter and length have an impact on the efficacy of the system. A larger microneedle diameter can have different advantages: It improves transdermal drug transport, prevents potential problems with blood clogging, increases the available surface area for drug coating on the microneedle and provides better mechanical properties (less likelihood of breaking or buckling during piercing). On the other hand, microneedle length depends on the specific application, for example, a

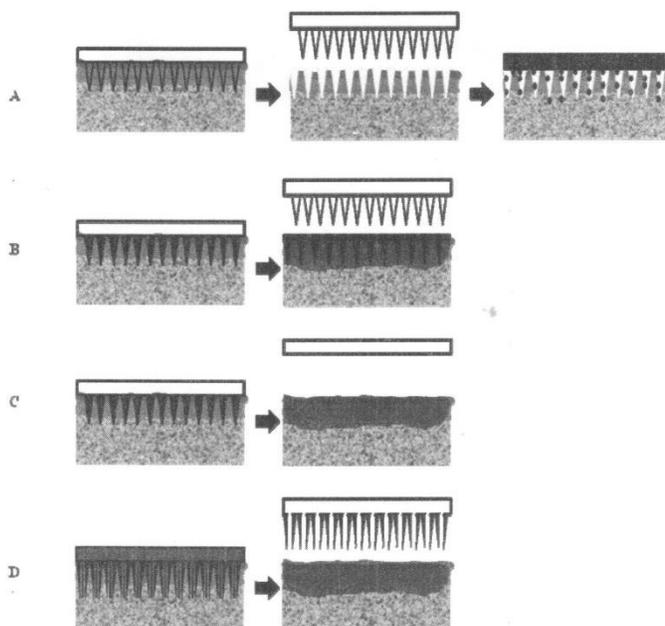


Fig. (2). Drug delivery using different microneedle designs: (A) "Poke with patch"; (B) coated microneedles; (C) drug-containing microneedles (biodegradable or soluble needles); (D) hollow microneedles.

minimum length of around 100 μm is necessary to penetrate the stratum corneum, whereas for blood drawing, a length between 500-2000 μm is required (microcirculation is located about 200 μm beneath the skin's surface). Microneedles must be long enough to reach the capillaries in the dermis, but small enough as to not reach the nerves responsible for pain. Length can serve as a means to define the precise site at which the drug will be delivered [16].

A key parameter for effective skin insertion is tip sharpness. A sharp tip reduces insertion force. Teo *et al.* [4] demonstrated the importance of this feature when they compared the *in vitro* and *in vivo* effect of microneedles on insulin release. The authors found that the *in vivo* skin viscoelasticity attributed to the cushioning effect of underlying fat and muscle, render skin piercing more difficult than *in vitro* if microneedles lack a very sharp tip. The authors recommend the use of an applicator (e.g., high velocity devices) in order to facilitate microneedle penetration.

Interesting modifications in microneedle types have been proposed in order to improve drug delivery, among them pocketed microneedles, which possess one or more pocket along the shaft, of different geometries. The idea is to fill the pockets with drug formulations. Drug formulation can be included in a portion of the microneedle shaft, targeting the drug delivery to a specific depth in the skin. Furthermore, this approach allows the protection of the drug by over-

coating the shaft with other material or even a second drug coating [13, 19]. A variation of this is the groove-embedded microneedle array [20].

An interesting comparison of different microneedle types has already been summarized by Teo *et al.* [4].

MANUFACTURING METHODS

Technologies of the microelectronics industry have been adapted to produce microarrays of silicon, metal or polymer. Microneedles are usually manufactured by the lithographic processes, involving chemical and physical etching, as well as chemical and physical deposition. Isotropic and anisotropic dry etching as well as anisotropic wet etching have been applied. An advantage of dry etching is the possibility of varying geometry and density. Although wet etching depends on crystal planes, it is less expensive and allows the manufacturing of a batch of wafers at the same time. However, other methods such as molding and electroplating are very common. Some of these methods are nevertheless time-consuming and/or very expensive, for example the semiconductor-based process [7]. Table 1 summarizes some of the microneedle types, the manufacturing methods, and some characteristics or results reported by the authors. As shown, most of the methods presented in Table 1 use lithographic and etching processes.

Table 1. Summary of Some Microneedle Manufacturing Methods

| Type | Material | Method | Outcome | Reference |
|-----------------------|---|---|---|-----------|
| Solid/ Hollow | Silicon | Standard etching techniques | Microneedles for insulin administration | [4] |
| Hollow | Silicon dioxide | Lithographic | Microneedles of different geometries with piezoelectric sensors to measure skin resistance. Circular needles are stronger than rectangular and square needles. | [8] |
| Solid | Stainless steel, titanium. | Etching process | Microprojection arrays with oligonucleotides. | [9] |
| Hollow | Silicon | Wet and dry etching | Silicon microneedle with electrode to monitor temperature and a fluidic system for drug delivery. | [10] |
| Hollow | Silicon | ----- | Microelectrodes for ECG measurement. | [11] |
| Hollow | Silicon | Deep Reactive Ion Etching (DRIE). | Microneedles with a microchip for glucose determination. | [12] |
| Solid/ coated | Stainless steel | Infrared laser cutting | Coating with microparticles, viruses, vitamin B, calcein, bovine serum albumin and plasmid DNA. Rapid dissolution of coatings. Protection during insertion, without wiping off onto the skin surface. | [13] |
| Solid | Biodegradable polymers (polylactic acid, polyglycolic acid and their copolymers). | Molding | Manufacturing of beveled-tip, chisel-tip and tapered-cone microneedles. Microneedles showed sufficient strength to be inserted into the skin. | [14] |
| Solid | Dextrine | Thread formation with polypropylene tips. | Self-dissolving microneedles for insulin delivery. They are better than maltose microneedles. | [15] |
| Solid | ----- | Modelled in 3D using FEMLAB (Comsol). | Effect of geometrical parameters of coated microneedles on skin permeability. Insulin is used as model drug. | [16] |
| Solid/ Hollow | Stainless steel/silicon | Hollow, metallic: From commercially available 30G hypodermic needles. Solid, metallic: From stainless steel wire. Hollow, silicon: Micromachining and silicon etching | Electrical microneedle applicator. Improvement of insertion (velocity 1-3 m/s). | [17] |
| Solid with pockets | Stainless steel | Cutting off stainless steel sheets with infrared laser. Pockets were filled by dip-coating. | Microneedles with pockets along their shafts, filled with drug. One or various pockets of different sizes and shapes. Possibility of including different drugs. | [19] |
| Grooves- embedded | Poly-L-lactic acid | UV lithography, Ni electroplating, PDMS replication and hot embossing. | Groove-embedded microneedles for vaccine administration. A larger number and deeper grooves result in higher antibody response. | [20] |
| Hollow | Titanium | LIGA process | Mechanical evaluation of different geometries. Insertion and rupture forces in skin. | [22] |
| Solid | Carboxymethyl cellulose, amylopectin, bovine serum albumin. | Casting a solution into a micro-mold with centrifugation. | Strong pyramidal microneedles. Encapsulation of sulforhodamine B, bovine serum albumin and lysozyme. Bolus or sustained release delivery. | [23] |
| Solid | Silicon | KOH wet etching | High accuracy, good reproducibility. Alternative to dry etching. | [25] |
| Hollow, solid | Silicon dioxide | Coherent porous silicon (CPS) etching | Obtention of microcapillaries/ microneedles. Easy manufacturing of arrays of ~ million needles/2 or 3 inch diameter wafer | [26] |

(Table 1) contd....

| Type | Material | Method | Outcome | Reference |
|------------------|-----------------------|--|---|-----------|
| Hollow | Silicon dioxide | Electrochemical etching | Obtention of microneedle arrays of different geometries and dimensions. | [27] |
| Solid | Metallic or polymeric | Laser ablation | Microneedles are obtained by electroforming (metallic) or by deposition (polymeric resins) on a glass substrate. | [28] |
| Pen-shaped | | Combination of anisotropic wet etching and dicing technology. | Possibility of changing the needle diameter easily by altering the groove profile formed in the dicing-saw process. | [29] |
| Solid | Maltose | Supplied by Texmac Inc. | Maltose microneedles for delivery of IgG and antibodies. Microneedles dissolve immediately. Channels remained open for 24 h. | [30] |
| Solid | Stainless steel | From commercially available 30G hypodermal needles. | Lengths of 550, 700 and 900 μm pierced dermatomed human skin. A length of 300 μm did not pierce the skin. | [31] |
| Solid/ hollow | Stainless steel | Purchased | Evaluation of the length and shape of the tip on erythema and TEWL. A length of up to 550 μm overcomes the barrier function with minimal irritation. Irritation is short lasting for all arrays. | [32] |
| Solid | Maltose | Purchased from Texmac, Inc. | Increased skin permeation of LMWH. | [33] |
| Solid | Polycarbonate | UV lithography and electroforming | Polycarbonate microneedles for the delivery of calcinein. | [34] |
| Solid | Zeolite | ----- | Excellent mechanical strength. Controlled drug delivery. | [35] |
| Solid/ Coated | Silicon | DRIE and Dry-coating | Coated microneedles for vaccine delivery | [36] |
| Solid | Titanium | Photochemical etching | Desmopressin-coated microneedles for the delivery of desmopressin. | [37] |
| Solid | Stainless steel | Laser-cutting | Microneedle arrays with insulin. | [38] |
| Hollow | Glass | Manufactured by pulling fire-polished borosilicate glass pipettes. | Evaluation of microneedle insertion and retraction distance, infusion pressure, tip geometry, hyaluronidase in the infusion fluid and time. Partial retraction increases flow rate. | [18,39] |
| Solid/ coated | Titanium | Acid-etched. Dry-film coating of antigen. | Responses similar to intradermal injection. | [40] |
| Solid | Silicon | Lithography and KOH etching. | Improved skin delivery of 5-aminolevulinic acid in photodynamic therapy. | [41] |
| Solid/ hollow | ----- | SKIN-CAD software | Optimization of geometrical parameters (radius, surface area). | [42] |

Among the manufacturing methods, those that use microelectromechanical systems (MEMS) have been employed to create mechanical or electrical devices, even of the same length scale as cells. When applied to the biomedical area, they are called BioMEMS [21].

It is also possible to produce microneedle arrays using the laser LIGA process [22]. In this process, a glass substrate is previously drilled by laser ablation. The substrate is used as a micromold, filling it with metals (e.g., Au, Co, Cr, Cu, Pd, Pt, Ti, W) by electroforming or with polymeric resins (a mixture of epoxy resin and hardener) by deposition. The

micromold is then removed by chemical or mechanical means.

Micromolds can be manufactured by photolithography and molding processes, using SU-8 photoresist to create microneedles by UV exposure (female master mold). The male master structure is created from polydimethylsiloxane (PDMS) using this mold. Then, a female PDMS replicate mold is created. Microneedles can be produced by casting a polymer into the female PDMS mold. Casting can be performed by centrifugation in order to fill microneedle mold cavities, as suggested by Lee *et al.* [23], who used car-

boxymethylcellulose, amylopectin and bovine serum albumin as microneedle matrix materials. These authors achieved bolus release by loading microneedle shafts, or sustained release by loading the shafts and the backing layer. The method proposed mild conditions, suitable for protein incorporation.

Biodegradable polymer microneedles are manufactured by micromolding using high-aspect-ratio SU-8 epoxy photoresist or polyurethane master structures to form polydimethyl siloxane molds. From these molds, microneedle replicates are produced [14]. The manufacturing method differs depending on the type of microneedle required (e.g., beveled-tip, chisel-tip, or tapered-cone master structures).

The molds obtained by the methods described above may be covered with pellets of polymer, vacuum can be used to remove entrapped bubbles. The polymer melts into the mold above the polymer melting point. Samples are then put into the freezer to facilitate polymer release from the mold. The molds can be saved for reuse. Reusable molds have been employed to produce polysilicon microneedles, combined with a pressurized reservoir to generate a drug delivery pump for insulin delivery [3, 24].

Microneedles can be coated with drugs or particles for a rapid delivery into the skin. Gill and Prausnitz [13] developed a dip-coating process including compounds such as calcein, vitamin B, bovine serum albumin, DNA and even microparticles. The authors demonstrated that the coating was delivered without wiping off during insertion. Examples of other works testing coated microneedles will be presented in the next section.

In general, manufacturing processes have to fulfill some important points: (i) Possibility of large scale production; (ii) low production costs (taking into account that microneedles are single-use, disposable devices); (iii) mild manufacturing conditions, in order to avoid degradation of drugs or denaturing of vaccines.

MICRONEEDLES AS TRANSDERMAL DRUG DELIVERY DEVICES

As was previously mentioned, microneedles are now at the head for transdermal drug delivery enhancement, owing to their minimal invasive indentation into the skin as well as to their great effect on facilitating drug diffusion by this route. It was already mentioned how microneedle characteristics, such as geometrical form (e.g., circular, rectangular or square), dimensions (i.e., length, diameter and thickness), drug coating depth, etc., can influence, on the one hand, microneedle capability to pierce the skin, and on the other hand, microneedles mechanical properties. Several *in vitro* and *in vivo* studies have been conducted to demonstrate the viability of microchannels as a non-natural pathway to the passage of a wide number of molecules, from low molecular weight compounds to some biotechnology drugs with high molecular weights (whose administration is performed almost exclusively by the parenteral route), and even nano- and microparticles.

As mentioned earlier, different types of microneedles have been proposed and consequently, a variety of ways to include drug molecules or even microparticles, depending on

the expected release (i.e., bolus or controlled release), have also been suggested. Drug molecules can be encapsulated within microneedles, manufactured from biocompatible materials such as carboxymethylcellulose or amylopectin, which dissolves in the skin for bolus (if the drug is encapsulated in the microneedle shaft) or sustained release (if the drug is included in the microneedle backing), as shown by Lee *et al.* [23] for sulforhodamine B, bovine serum albumin and lysozyme. Ito *et al.* [15] used dextrin to prepare self-dissolving microneedles, loaded with insulin. Administration to mice skin *in vivo* demonstrated a drop of plasma glucose with similar availabilities as with an i.v. solution. Furthermore, insulin was shown to be stable in microneedles for at least one month. Biodegradable materials such as maltose have included human IgG and a monoclonal antibody [30]. Stainless steel microneedles were used by Martanto *et al.* [38,39] to deliver insulin to diabetic hairless rats *in vivo*. Microneedles were inserted using a high-velocity injector. The authors found a decrease of 80 % in glucose levels over 4 h.

Drugs can also be coated on the needle surface, in this sense, Matriano *et al.* [40] delivered ovalbumin (model protein antigen) from dry-film coated microneedles into the skin of hairless guinea pigs *in vivo* (insertion was performed by a high-velocity injector). Antigen release occurs immediately, with antibody responses similar to those found with intradermal injection, and up to 50-fold greater than with subcutaneous or intramuscular injection. Interesting results are presented in the field of vaccine delivery by Han *et al.* [20] who studied intradermal immunization using groove-embedded microneedle arrays of poly-L-lactic acid, coated with ovalbumin. A higher antibody response was found as the number and depth of grooves increased. Chen *et al.* [36] proposed a silicon dry-coated microprojection array to deliver ovalbumin. The authors created a highly dense patch containing 20,000 microprojections per cm². These microprojections, with a length of less than 100 μm, offer a rapid release of ovalbumin and due to the high density of the array, the probability to reach the target (e.g., Langerhans cells) is greater than with longer but fewer projections. Mikszta *et al.* [43] used blunt-tipped microneedle arrays dipped into a DNA solution, and inserted them into mice skin *in vivo*. Using plasmid DNA encoding hepatitis B surface antigen, the induced responses were greater with microneedles than with hypodermic injection. Gill and Prausnitz [13] proposed a novel micro-dip-coating apparatus to coat microneedles with different molecules, from small compounds to DNA, and even microparticles. Microneedle coatings dissolved immediately once inserted into the skin. The authors proposed the use of "pocketed" microneedles to avoid the loss of formulation during insertion into the skin. In a related work, Gill and Prausnitz [19] used pocketed microneedles (needles with holes cut through the shafts). The authors found a rapid release of the model drugs tested within porcine cadaver skin (sulforhodamine, sodium fluorescein, luciferase plasmid DNA and vitamin B2), with the possibility of targeted release into a specific depth of the skin.

The ability of microneedles to deliver compounds of high molecular weight has also been demonstrated by Veerban *et al.* [31], who enhanced the transport of compounds up to 72 kDa by pretreating the skin with microneedle arrays. Effec-

tive permeation of molecules such as fluorescein isothiocyanate-dextran with molecular weights up to 42 kDa was demonstrated by Wu *et al.* [44], when puncturing the skin with the tip of conventional hypodermic needles inserted to a depth of 160 μm .

Zosano Pharma has developed a patch with an applicator system that delivers the drug via microprojections. The drug is included by dry coating on a titanium microprojection array. Zosano has one drug (parathyroid hormone) in phase II clinical trial, five in phase I (among them the influenza vaccine, desmopressin, insulin and LHRH), and more than 20 in preclinical studies.

Table 2 summarizes some of the results obtained when microneedles are used as delivery-enhancing systems.

MICRONEEDLES AND COMBINATION STRATEGIES TO IMPROVE TRANSDERMAL DRUG DELIVERY

Different strategies have been developed to increase skin permeability, like the employment of permeation enhancers, either chemical or physical. The mechanisms of action may vary, according to the enhancer (i.e., lipid extraction, lipid fluidization, pore formation etc.). However, all of them share the characteristic of modifying the structure of the stratum corneum, the main barrier to the permeation of substances. Although the use of permeation enhancers increases the penetration of drugs through the skin, in many cases this does not suffice to achieve therapeutic levels. This is the reason why the combination of two or even more enhancing strategies has been tested by different authors, in an attempt to obtain a synergistic effect, thus achieving the required effect.

As mentioned in a previous section, the use of microneedles allows the transdermal delivery of a wide range of therapeutic molecules, including drugs, macromolecules, immunogenic peptides and DNA. Although the release of drugs by microneedles and its combination with other strategies is attractive, few works have been performed in this field to date. This is at present an opportunity area to be developed by research groups. Table 3 summarizes the research carried out on this approach.

Microneedles in Combination with Iontophoresis

Transdermal iontophoresis involves the application of a low electric current, physiologically acceptable ($<0.5 \text{ mA/cm}^2$), to the skin, in order to promote the transfer of charged and polar substances through this membrane. The iontophoretic flux (J_d , in mol per unit of time) of drug (d) is dependent on the current intensity (I , in amperes) applied, in accordance with the Faraday's law described in equation 1.

$$J_d = \frac{t_d \cdot I}{F \cdot z_d} \quad (1)$$

Where t_d is the transport number, z_d the valency of the ion, and F is the Faraday's constant (coulombs/mol). The main mechanisms involved in iontophoretic transdermal transport are electromigration and electroosmosis. Electromigration is the movement of ionic species in response to the application of the electric field, and is the most important

mechanism for the delivery of ionic drugs. Electroosmosis is the aqueous flow that occurs during the movement of charged species, carrying all the dissolved drugs across the skin. This non-invasive technique has been applied in drug delivery and clinical diagnosis. An in-depth analysis of the transport mechanisms and the applications of this technique can be found in other specialized reviews [46-49].

Although iontophoresis offers an attractive alternative for the delivery of macromolecules this technique might be still limited by the molecular size of the drug candidate [50].

Microneedles can provide a minimally invasive means for drug delivery through the skin, creating microchannels to increase the permeation of high molecular weight compounds. The combination of barrier disruption by the use of microneedles and iontophoresis, could enlarge the variety of drugs that can be administered transdermally. Nevertheless, only few studies have reported the iontophoresis / microneedle combination, even though this combination provides the possibility of delivering macromolecules with a precise control [49].

Lin *et al.* [9] designed a combined transdermal delivery system: Macroflux[®] and iontophoresis, for the delivery of oligodeoxynucleotide ISIS 2302. Macroflux[®] is a patch that incorporates a stainless steel or titanium microprojection array. When applied to the skin, microprojections penetrate and create superficial pathways through the skin barrier for drug transport. The authors used an array of 2 cm^2 , with a microprojection density of $240/\text{cm}^2$ and a length of $430 \mu\text{m}$. They found that the flux of ISIS 2302 increases with the combined use of microprojection array and iontophoresis ($100 \mu\text{A/cm}^2$). The enhanced delivery by microprojections can be regulated through current density, duration time, active patch area and donor concentration. Delivery was found to be dependent on current density. Although oligodeoxynucleotides are negatively charged, the fluxes of these compounds when using only iontophoresis were found to be very low to have a therapeutic effect. In contrast, the microprojection patch in conjunction with iontophoresis was able to deliver therapeutic amounts of oligodeoxynucleotides into and through the skin.

Wu *et al.* [51] compared the permeability of high molecular weight compounds (Fluorescein isothiocyanate (FITC)-dextran: (FDs) FD-4, FD-10, FD-40, FD-70 and FD-2000; average molecular weights of 3.8, 10.1, 39.0, 71.2 and 200.0 kDa, respectively) through skin pretreated with microneedles before and after iontophoresis application. The combination of microneedle pretreatment and iontophoresis further enhanced the transdermal delivery of FDs. No significant increase was found in the iontophoretic transport of FDs through intact skin. The lag time showed a dependence on FDs molecular weight, i.e., a shorter lag time was observed for the compound with a smaller molecular weight.

Vemulapalli *et al.* [52] determined the effect of iontophoresis and its combination with microneedles on the *in vivo* delivery of salmon calcitonin (SCT), and they found that the serum concentration of SCT was higher under the microneedle and iontophoresis combination (a 57-fold increase was found with respect to microneedles alone). In another work, Vemulapalli *et al.* [53] used maltose microneedles (two

Table 2. Results of Some *in vitro* and *in vivo* Delivery Studies Performed with Microneedles

| Microneedle Type | Drug | Model | Outcome | Reference |
|--|---|---|---|-----------|
| Solid and hollow | Insulin | Rat skin, <i>in vitro</i> Diabetic rats, <i>in vivo</i> | <i>In vitro</i> : Transdermal transport increases 10-20 times, depending on microneedle length. <i>In vivo</i> : Not effective. | [4] |
| Stainless steel coated with drugs | Calcein, vit. B, albumine, plasmide DNA, vaccinia virus, microparticles | Cadaver skin, <i>in vitro</i> Human subjects, <i>in vivo</i> | Instantaneous release of solutes in the skin, without loss of formulation during insertion. | [13] |
| Dextrin coated | Insulin | Skin mice, <i>in vivo</i> | Similar availabilities as with i.v. solution. | [15] |
| Coated microneedles of different shapes | Insulin | Mathematical modelling | The most important parameters influencing drug permeability is microneedle penetration depth and centre-to-centre spacing of microneedles in the array. | [16] |
| Hollow and solid stainless steel and hollow silicon microneedles with an electrically driven applicator. | Cascade blue | Dermatomed and full thickness human skin from abdomen or breast | The impact insertion method dramatically improved piercing of the skin with microneedle arrays $\leq 300\mu\text{m}$. | [17] |
| Hollow glass microneedles | Sulforhodamine | Cadaver skin | A partial retraction of microneedles after insertion, a greater insertion depth, a larger infusion pressure, the use of a beveled tip and the presence of hyaluronidase, help to overcome the resistance imposed by dermal tissue. | [18] |
| Pocketed microneedles of stainless steel | Sulforhodamine, sodium fluorescein, luciferase plasmid DNA, vit. B2 | <i>In vitro</i> : Abdominal porcine cadaver skin | Rapid release of the model drugs at a targeted depth in the skin. | [19] |
| Grooves-embedded microneedle arrays of poly-L-lactic acid | Ovalbumin | <i>In vivo</i> mice | Microneedles coated with ovalbumin render higher antibody response as the number and depth of grooves increase. | [20] |
| Solid microneedles of CMC or amylopectin | Sulforhodamine B, Bovine serum albumin, lysozyme, | Cadaver skin | Bolus release with drugs encapsulated within shafts; sustained release with drugs encapsulated within microneedle backing. | [23] |
| Maltose | Human IgG, monoclonal antibody | Hairless rat skin, <i>in vitro</i> | IgG delivery increased with the length and number of needles, and concentration of solute. Significant enhancement of monoclonal antibody transdermal delivery. Micropores remain open for at least 24 h (<i>in vivo</i>). | [30] |
| Hollow stainless steel (550, 700 and 900 μm) | Cascade Blue, Dextran-Cascade Blue, FITC coupled Dextran | Dermatomed human skin from abdomen or breast | Increase in TEWL values. Microneedles of 300 μm did not pierce the skin. Pretreatment of skin with microneedles enhanced the transport of compounds ranging from 538 Da to 72 kDa. | [31] |
| Solid stainless steel microneedles (200, 300 and 400 μm). An electrical applicator was used. Assembled hollow stainless steel microneedle arrays (300 and 550 μm) | None | <i>In vivo</i> human skin | Higher TEWL values were obtained with assembled microneedle arrays than with solid microneedle arrays. Greater TEWL and redness with 400 μm than with 200 μm microneedles. For all microneedles application was painless with minimal irritation that lasted within 2h. | [32] |
| Solid polycarbonate microneedle arrays (200 and 500 μm) | Calcein | Excised rat skin | The highest permeability was obtained with 500 μm microneedles when applied simultaneously with the calcein gel. | [34] |

(Table 2) contd....

| Microneedle Type | Drug | Model | Outcome | Reference |
|---|--|--|---|-----------|
| Silicon dry-coated microprojections | Ovalbumin | <i>In vivo</i> mice | Patches with 20,000 microprojections per cm ² , less than 100µm in length, offer a rapid release of ovalbumin, while the coating remains intact during skin insertion. | [36] |
| Macroflux [®] (coated with the drug) | Desmopressin | Hairless guinea pigs | Bioavailability of 85%, T _{max} of 60 min. | [37] |
| Stainless steel | Insulin | Hairless rat, <i>in vivo</i> | Decrease of 80 % in glucose levels for 4 h. | [38] |
| Titanium microneedles dry-film coated with the drug | Ovalbumin (model protein antigen) | Hairless guinea pig, <i>in vivo</i> | Antibody responses similar to intradermal injection and 50-fold greater than subcutaneous or intramuscular injection. | [40] |
| Silicon microneedle arrays (270 µm) | 5-amino-levulinic acid (ALA) (as precursor in photodynamic therapy). | <i>In vitro</i> : Excised porcine skin, murine skin. <i>In vivo</i> : Nude mice | <i>In vitro</i> : increase delivery of ALA to the upper regions of skin, but similar concentrations as the control (ALA binding to the tissue). <i>In vivo</i> : Reduction of application time and ALA dose. | [41] |
| Solid and hollow microneedle arrays (different dimensions and geometries) | Calcein, insulin, bovine serum albumin, nanospheres | Software SKIN-CAD | Skin thickness is an important factor in designing microneedles. Optimization of transport parameters and physical dimensions of the system, allow an efficient drug delivery. | [42] |
| Coated blunt-tipped microneedles | DNA | Skin mice, <i>in vivo</i> | Stronger responses than with hypodermic injection. | [43] |
| Conventional hypodermic needles (27-gauge) | Fluorescein isothiocyanate-dextrans (4.3, 9.6 and 42 kDa) | Excised hairless rat skin | Puncture of skin surface with conventional needles (insertion of the tip to a depth of 160 µm) was compared with sandpaper abrasion. Needle puncture was safer than sandpaper abrasion. A parallel resistance model allows the prediction of skin permeability as a function of the pores number generated. | [44] |
| Coated microneedle array | Calcein & bovine serum albumin (BSA) in chitosan films. | Rat skin, <i>in vitro</i> | BSA permeation rate increased with the increase of BSA loading, but decreased as the chitosan concentration and film thicknesses increased. A controlled delivery of BSA can be achieved. | [45] |

Table 3. Results of the Delivery of Drugs to the Skin Via Microneedles in Combination with Carriers and/or Enhancers

| Microneedle Type | Enhancer | Carrier | Drug | Model | Outcome | Reference |
|--|--|---|---------------------------------------|--------------------------------------|--|-----------|
| Macroflux [®] stainless steel or titanium microprojection array | Iontophoresis (100µA/cm ²) | No | Oligodeoxynucleotide ISIS 2302 (ODNs) | Hairless guinea pigs, <i>in vivo</i> | Delivering of therapeutically relevant amounts of ODNs into and through the skin. | [9] |
| Silicon microneedle electrode arrays | Electroporation | No | No | No | A uniform drug release through hollow microneedle electrodes into tissue is expected to be achieved during electroporation. | [10] |
| Coated microneedles | No | 1-µm diameter barium sulfate particles and 10-µm diameter latex particles | No | Porcine skin, <i>in vitro</i> | Using appropriate microneedle design and insertion methods, even relatively large microparticles can be delivered into the skin for controlled drug release. | [13] |

(Table 3) contd....

| Microneedle Type | Enhancer | Carrier | Drug | Model | Outcome | Reference |
|------------------------------------|---|-------------------------------|---|---|--|-----------|
| Soluble maltose microneedles | Iontophoresis 0.5mA/cm ² | No | Low molecular weight heparin (LMWH) | Hairless rat skin, <i>in vitro</i> | Increased skin permeation of LMWH with skin pre-treatment with microneedles followed by iontophoresis. | [33] |
| Microneedle array | Iontophoresis 0.3 mA/cm ² | No | Fluorescein isothiocyanate (FITC)-dextran | Hairless rat skin, <i>in vitro</i> | Enhanced transdermal delivery of dextrans. | [51] |
| Maltose microneedles | Iontophoresis 0.2mA/cm ² , 1h | No | Salmon Calcitonin (SCT) | Hairless rat skin, <i>in vivo</i> | The combination enabled the transdermal delivery of SCT, resulted in the highest delivery flux. | [52] |
| Soluble maltose microneedles | Iontophoresis (0.4 mA/cm ² for 1h) | No | Methotrexate | Hairless rat skin, <i>in vitro</i> and <i>in vivo</i> | Enhanced delivery by iontophoresis and microneedles, both <i>in vitro</i> and <i>in vivo</i> . | [53] |
| Soluble maltose microneedles | Iontophoresis 0.5mA/cm ² | No | Daniplestim | Hairless rat skin, <i>in vivo</i> | The combination approach yielded much higher flux values compared to iontophoresis alone | [54] |
| Coated microneedle array | Electroporation | No | Plasmid DNA | Mice, <i>in vivo</i> | Robust antibody responses. | [58] |
| Microneedle array | No | Elastic liposomes | Docetaxel (DTX) | Porcine skin, <i>in vitro</i> | Increased steady-state flux of DTX from all formulations after microneedle treatment. Shorter lag time when applying elastic liposomes through microneedle. | [64] |
| Derma-rollers® | No | Invasomes | Mannitol | Human abdominal skin, <i>in vivo</i> | Enhanced penetration and permeation of hydrophilic model drugs after skin perforation with Derma-rollers® particularly when combined with the invasive formulation. | [65] |
| Solid stainless microneedle arrays | Iontophoresis 0.2 mA/cm ² | Nanovesicles | Insulin | Pig skin, <i>in vitro</i> Rats, <i>in vivo</i> | Increased permeation of charged nanovesicles when microneedles and iontophoresis are applied. Comparable levels to subcutaneous injection of insulin. | [66] |
| Solid silicon | No | Polystyrene latex nanospheres | No | Human corpse epidermis, <i>in vitro</i> | A significant number of latex nanoparticles cross the skin. | [70] |
| Silicon microneedle arrays | No | Latex fluorescent nanospheres | Model to evaluate the potential use of microneedle-mediated delivery of lipid:polycation:pDNA | Human skin, <i>in vitro</i> | Topical application of nanospheres followed by treatment with the microneedle array resulted in the migration of the charged fluorescent particles into the microchannels, and to the cells of the viable epidermis. | [71] |
| Silicon-based microneedles | No | Polystyrene nanospheres | Model for non-viral gene delivery vectors | Heat-separated human epidermal sheets | Enhanced diffusion of 100 nm diameter fluorescent polystyrene nanospheres through epidermal sheets following membrane treatment with microneedles. | [72] |

(Table 3) contd....

| Microneedle Type | Enhancer | Carrier | Drug | Model | Outcome | Reference |
|--|----------|---|---|--|--|-----------|
| Silicon microneedles | No | Hydrogel / Fluorescent Nanoparticle Loaded | Model for non-viral gene delivery vectors | Human breast skin, <i>in vivo</i> | Nanoparticles were observed within the viable epidermis. The fluorescence due to the nanoparticles locates in the channels created by the microneedles. | [73] |
| Individual hollow microneedles, glass microneedles | No | Nanospheres of PLA with Nile red and latex fluorescein-labeled microspheres | No | Human corpse sclera, <i>in vitro</i> | Soluble molecules and nanoparticle suspensions were delivered into the sclera. Microparticles required the addition of a spreading enzymes. | [75] |
| Beveled-tip and tapered-cone microneedles | No | Microparticles | Calcein and bovine serum albumin | <i>In vitro</i> release test in saline | Slow release when calcein was doubly encapsulated: First, within PLA microparticles and then within PLGA microneedles. calcein exhibits an initial burst followed by slow release over a two month period. | [76] |

lines, 54 microneedles) alone or in combination with iontophoresis to evaluate the *in vitro* and *in vivo* permeation of methotrexate (a folic acid antagonist with anti-neoplastic activity, used in the treatment of psoriasis and rheumatoid arthritis). *In vitro* studies showed a higher delivery through microneedles than with iontophoresis, without differences between microneedles alone or in combination with iontophoresis. On the other hand, *in vivo* studies demonstrated that the combination of iontophoresis (0.4 mA/cm², applied for one hour) and microneedles resulted in a 25-fold enhancement of the delivery of methotrexate through the skin. The reasons for this discrepancy are not clear, but the authors attribute it to several possible factors, including skin hydration (which is higher *in vitro*), the fact that microneedles penetrate more deeply *in vitro* than *in vivo*, and that the diffusion length of the viable layer is shorter *in vivo* than *in vitro*.

Janke *et al.* [33] evaluated the *in vitro* transdermal permeation of low molecular weight heparin (LMWH). They observed that the passive transdermal delivery of heparin was minimal, while microneedle pretreatment in combination with iontophoresis demonstrated a synergistic effect. The LMWH flux obtained was 0.942 U/cm²h and this was 5.4-fold higher than the flux obtained with microneedles only. The enhanced delivery observed with the combined strategy may be attributed to the creation of new large aqueous channels upon pretreatment with microneedles and to the fact that LMWH is forced to pass by electrorepulsion under the influence of the externally applied electric field.

Katikaneni *et al.* [54] evaluated the effect of combining microneedles and iontophoresis to enhance permeation through the skin of a model protein molecule (daniplestim, DP, consisting of 112 amino acid residues, molecular weight: 13 kDa approximately). The combination delivered higher amounts of protein at all times compared to iontopho-

resis alone. The studies were carried out in two buffers (pH 4.0 and pH 7.5). DP was negatively charged at pH 7.5 and it was positively charged at pH 4.0. A 30-fold increase in the amount of DP permeated was seen at pH 4.0 with respect to pH 7.5 for the combined strategy.

Microneedles in Combination with Electroporation

Electroporation (or electroporabilization) involves the creation of transient aqueous pathways across lipid bilayer membranes by applying short (milliseconds), high intensity electric field pulses (typically, 50–1000 V/cm). A smoothed molecular transport through biological membranes like the skin was observed with this technique. Pulse properties such as wave form, rate and number, are some of the parameters that can affect drug delivery. This process is useful for delivering large hydrophilic drug species like small molecules, proteins, peptides and oligonucleotides, including biopharmaceuticals with molecular weights greater than 7 kDa.

Electroporation increases *in vitro* transdermal penetration of molecules such as metoprolol, lidocaine, tetracaine, vitamin C, timolol and fentanyl. Electroporation has been extensively studied in animals, but has received little attention in humans [55–57]. This technique may be useful when coupled with another enhancing method. The combined use of microneedles and electroporation may have a synergistic effect on the permeation of molecules through the skin, however, this strategy has been poorly studied.

Wilke *et al.* [10] designed a silicon microneedle/electrode array for electroporation with a temperature sensor and a fluidic system for drug delivery. The system was denominated "ENDOPORATOR". The authors expected to achieve a uniform drug release through hollow microneedle electrodes during electroporation, controlling temperature at the same time (a constant temperature is recommended for electroporation).

Hooper *et al.* [58] tested a novel device (Easy Vax™ vaccine delivery system) capable of targeting electroporation to the dermis, using a microneedle array for the administration of 4pox DNA vaccine. The plasmid DNA was dried onto the tips of microneedles (≤ 1 mm long), which were then inserted into the skin. There, DNA dissolved and was transferred into the cells by electroporation. Mice vaccinated in this way mounted robust antibody responses against the immunogens of interest. These mice produced higher levels of IgG1 than mice vaccinated by scarification (containing similar levels of IgG1 and IgG2). These findings indicate that the delivery of 4pox plasmids to the skin using microneedles and electroporation results in an antibody response similar to that elicited by the live virus. This novel device offers some advantages like: a) the DNA component is in its dry state and is therefore more stable, b) the amount of DNA required per vaccine is lower than with conventional injected DNA vaccines, c) pain is reduced.

Until now, there are not reports on the combined use of microneedles and other physical enhancers such as ultrasound, electromagnetism, photomechanical waves, and laser ablation, among other.

Microneedles in Combination with Nano- and Microstructures for Transdermal Drug Delivery

The development of nanotechnology has involved the manipulation of different materials such as polymers or lipids for the production of nanostructures, allowing a better handling and treatment of diseases than with conventional formulations. Some of the nanostructures studied so far are liposomes, nanoparticles, nano- and microemulsions, etc.

Microneedles and Combination with Vesicles

There have been several reports on the use of liposomes for transdermal drug delivery since these were proposed for topical application by Mezei and Gulasekharan in 1980. Lipid vesicles are still a controversial class of dermal and transdermal carriers. Elsayed *et al.* [59] reviewed the use of lipid vesicles for the transdermal delivery of drugs. The delivery mechanism related with liposomes is reported to be associated with the accumulation of the vesicle and the encapsulated drug in the stratum corneum, with little value as carriers for transdermal drug delivery because of their inability to penetrate the skin deep enough. As a consequence, other vesicular systems able to penetrate into deeper skin layers have been proposed, such as niosomes, which are vesicles composed of nonionic surfactants. Ethosomes, developed by Touitou *et al.* [60] are vesicles with high alcohol content. Transfersomes which were introduced by Cevc and Blume [61], are vesicles composed of phospholipids as their main ingredient, with 10-25% surfactant and 3-10% ethanol. The surfactant confers deformability to the vesicle, which squeezes through channels in the stratum corneum. Invasomes, vesicles formed by phospholipids, ethanol and terpenes as penetration enhancers, were introduced by Mura *et al.* [62].

Verma and Fahr [63] evaluated the potential of Dermaroller®, with different needle geometries, to deliver a lipophilic fluorescent compound encapsulated in liposomes across the human skin. Depending on the diameter and

height of microneedles, liposomes can be located in different parts of the skin. When microneedles of short height are used, liposomes remain on the surface of the stratum corneum, while longer microneedles lead liposomes into deeper skin layers.

Qiu *et al.* [64] studied the combination of elastic liposomes and microneedles for the transdermal delivery of a high molecular weight and poorly water soluble molecule, docetaxel, an anticancer drug. This combination may provide constant transdermal delivery. The microneedle array consisted of 484 needles over an area of 10 X 10 mm, with a height of 150 μ m. The steady state flux of docetaxel from all formulations following microneedle treatment was greater compared to passive permeation. The lag time observed when the elastic liposomes were applied through microneedle-treated porcine skin was significantly shorter (by 70%) than with conventional liposomes. Furthermore, conventional liposomes needed more time to reach steady-state compared with elastic liposomes. These results suggest that combination of elastic liposomes and microneedle pretreatment can be a useful method to increase skin permeation of drugs with high molecular weight and poor water solubility.

The efficiency of microneedle treatment followed by the application of invasomes was evaluated by Badran *et al.* [65] who studied the delivery of mannitol into and through the skin. In order to investigate the ability of Dermarollers® (made from stainless steel and with different needle lengths: 150, 500 and 1500 μ m) to promote drug deposition in the skin, radiolabeled mannitol-loaded invasomes and a PBS solution were studied and compared with untreated skin.

Skin perforation with Dermarollers® enhanced drug penetration and permeation for both formulations tested. Yet, invasomes were more effective in delivering hydrophilic compounds into and through intact skin compared to the aqueous drug solution, but the combination with skin piercing further enhanced drug penetration and permeation. The amount of mannitol in the receptor fluid increased with longer needle lengths. Fluorescence microscopy images revealed that the application of invasomes resulted in a deeper skin penetration, particularly in combination with Dermaroller treatment.

Microneedles, Vesicles and Iontophoresis

Many attempts have been made to enhance the permeation rates of insulin through the skin. Nanovesicles combined with physical enhancing methods might be promising for the transdermal delivery of insulin. Chen *et al.* [66] report a strategy for enhancing the transdermal delivery of this drug using insulin-loaded nanovesicles with iontophoresis and microneedles. The results showed that nanovesicles of different sizes and zeta potentials are able to penetrate the skin, in contrast to an insulin solution (unable to penetrate the skin in 5h). Nevertheless, the amount of insulin permeated was not enough to achieve a therapeutic effect. With iontophoresis, insulin permeation from nanovesicles increased 3.3 – 5.3 fold compared with those without iontophoresis. Among the nanovesicles tested, those with a smaller size and positive zeta potential had higher permeation rates under iontophoresis. Although in general nanovesicles provide higher permeation rates than the control solution, the amount of insulin is

still limited. The solid stainless steel microneedle arrays used were arranged in rotundities with 8 needles around each cycle. Each array had an area of 2.0 cm² and contained 296 needles. The needles had a triangular shape with a length of 800 μm, a maximum width of 260 μm and a thickness of 80 μm. Nanovesicles showed higher permeation rates than the control solution when microneedles were used to pretreat the skin. When both strategies (microneedles and iontophoresis) were used, all formulations showed a significant increase in penetration. The permeation rates for insulin were 713.3 times higher when positive nanovesicles, iontophoresis and microneedles were used, showing a significant synergistic effect. *In vivo* studies showed that blood glucose levels of diabetic rats decreased 33.3% and 28.3% from its initial level at 4 h and 6 h, being comparable to the values observed for the subcutaneous injection of insulin.

Microneedles and Solid Particles (Nanoparticles and Microparticles)

In the last decades the interest in developing microparticles and nanoparticles as drug delivery systems has increased. Microparticles and nanoparticles not only differ in their size (micrometric and nanometric, respectively), but also in their biopharmaceutical properties and their therapeutic applications. These carriers can be constituted of biodegradable polymers or lipid materials.

A characteristic of some nanoparticle systems is their capability of diffusing into the cells, which makes them candidates to reach the drug target in a specific cellular compartment. Depending on the materials employed and on the method of preparation, nanospheres or nanocapsules of different sizes can be obtained. These systems have unusual properties that can be exploited in the delivery of macromolecules and genes. Another focus in the investigation of these systems is the development of strategies to improve their directionality. Microparticles and nanoparticles are versatile systems for the effective and targeted release of different therapeutic agents to different anatomical regions [67].

The use of drug carriers as vehicles for topical and transdermal drug delivery is a strategy to enhance drug permeation. Drug carriers can modify the physicochemical properties of the encapsulated drug, allowing permeation delivery. Micelles, liposomes, solid lipid nanoparticles, and polymeric nanoparticles are carriers that have been developed to increase the percutaneous absorption of drugs. Although there are some reports showing that polymeric nanoparticles and microparticles do not enhance drug permeation, other studies reveal that a reduction in the size of nanoparticles results in a dramatic increase in cellular uptake. Penetration of nanoparticles through human skin also depends on the material properties, on nanoparticle size and shape, etc. Very interesting reviews have focused on the application of lipid nanoparticles in transdermal drug delivery [68, 69].

Microneedles may create microchannels large enough to deliver drug-loaded nanostructures and even microparticles into the skin. However, the combined use of nanostructures and microparticles with microneedle pretreatment has received little attention.

McAllister *et al.* [70] were the first to report the ability of latex nanoparticles to cross the skin when applied by microneedles, suggesting the possibility of using microneedles to achieve a controlled release of the drugs included in particles.

Latex fluorescent nanospheres were used as models by Coulman *et al.* [71] to evaluate the potential use of microneedle-mediated delivery of lipid:polycation:pDNA (LPD complexes). The nanospheres used have a size comparable to that of the complexes, approximately 100 nm in diameter. Topical application of the nanospheres followed by treatment with the microneedle array resulted in the migration of the charged fluorescent particles into the microchannels, and to the cells of the viable epidermis. This behavior was not observed in intact skin. The diffusion experiments confirm that by increasing the diameter of a microchannel, a more rapid delivery of the colloidal formulation can be achieved. Similar results were previously obtained by Chabri *et al.* [72], who prepared silicon-based microneedles by a combination of isotropic etching and modified BOSCH reaction. These microneedles are capable of piercing human epidermal sheets, creating microchannels large enough to facilitate the intradermal delivery of polystyrene nanospheres of approximately 100 nm in diameter. In another work, when a hydrogel/nanoparticle formulation was applied to the skin in conjunction with microneedles, nanoparticles were found within the viable epidermis. The fluorescence was attributed to nanoparticles located in the channels created by microneedles [73].

Verbaan *et al.* [17] designed an electrical applicator that can insert short microneedles into the skin with a predefined speed, and evaluated the transport of cascade blue ant to visualize the conduits in skin pretreated with the solid metal microneedle arrays. Different speeds were evaluated, applying polystyrene nanoparticles with a size of 200 nm, containing fluorescein 5-isothiocyanate. They observed that fluorescent nanoparticles were able to enter the conduits, without any differences in penetration depth for the various application speeds tested.

These works used nanoparticles as a model for non-viral gene delivery vectors or to visualize the microconduits created by microneedles, however, they can also be used for skin delivery of other drugs with permeability and stability problems, encapsulated in nanoparticles. Coulman *et al.* [74] concluded that by maximizing the diameter of those conduits, a more rapid and complete nanoparticle permeation can be achieved. Other important parameters to be taken into account are the electrostatic interaction of the nanoparticle with the skin and the surface charge of particles.

Delivery of microparticles into the skin is still a challenge. In this sense, microneedles could facilitate the delivery of microparticles into the skin. Gill and Prausnitz [13] coated microneedles with particles having three different diameters: Barium sulfate particles (1 μm) and latex beads (10–20 μm) and found that by using appropriate microneedle design and insertion methods, even relatively large microparticles can be delivered into the skin. The authors recommended slow insertion speeds in the case of small microparticles and high insertion speeds for the large ones.

The conventional administration of drugs in the eye (eye drops) can transport drugs to the anterior segment of the eye, but only insufficient quantities reach the posterior segment. This fact makes the treatment of diseases affecting the retina, choroid, and vitreous body difficult. Jiang *et al.* [75] proposed the use of microneedles applied to the sclera to infuse solutions, nanoparticles and microparticles. The infusion of these carriers into the sclera could be useful for the controlled release of drugs, allowing extended therapies in the posterior segment of the eye.

Individual hollow microneedles (720 μm length) were inserted into human corpse sclera and then retracted. Aqueous solutions containing sulforhodamine or nanoparticle suspension (nanospheres of poly-lactic acid containing Nile red, with a diameter of 278 nm) or fluorescein-labeled microspheres (1.0 μm in diameter), were infused into the sclera at a constant pressure. Microneedles were found to be able to infuse the nanoparticle suspension into the sclera. Increasing the nanoparticle concentration in the infusion solution results in a greater nanoparticle delivery into the sclera and, at higher concentrations, nanoparticles spread in a larger volume within the scleral tissue. However, when microparticles were applied (1 μm in diameter), delivery was not achieved in the scleral tissue. Microparticles required the addition of spreading enzymes, hyaluronidase and collagenase to disrupt scleral tissue microstructure. This study suggests that hollow microneedles can be used to deliver drugs and particles into the sclera in a minimally invasive manner for rapid or controlled delivery to the eye [75].

Recently, the combination of microneedles and microparticles for controlled drug release was reported. Park *et al.* [76] used two different microneedles (beveled-tip microneedles and tapered-cone microneedles) for controlled drug delivery of calcein and bovine serum albumin (BSA) as model drugs. The drugs were single encapsulated within the needle matrix (made of poly-lactide-co-glycolide) or were doubly encapsulated by first encapsulating them within carboxymethylcellulose or poly-L-lactide microparticles and then encapsulating microparticles within the needles.

In vitro release studies showed a zero order kinetics for calcein included within the PLGA matrix of microneedles, within 4h, with 93% of calcein being released. The release of BSA from a similar formulation showed slower kinetics (80% released in 5 days).

With double encapsulation formulations, calcein showed a steady release over 4 days, demonstrating the usefulness of the double encapsulation with CMC to modulate release kinetics. When instead of CMC, calcein was encapsulated within PLA microparticles and then encapsulated within PLGA microneedles, calcein release was much slower, exhibiting an initial burst followed by a slow release over a two month period.

Perhaps the greatest shortcoming of controlled-release microneedles is the limited dose that can be administered. Since the drug is encapsulated within microneedles and microneedles are, of course, very small, the maximum total dose that can be administered is likely to be less than 1 mg [76].

MICRONEEDLES SAFETY

Microneedles are presented as a safe and painless alternative to administer drugs, avoiding hypodermic needles hazards [4, 23, 32]. However, when it comes to microneedles, different considerations need to be undertaken:

- i). Firstly, the issue of biocompatibility arises. As exposed previously, materials currently used to fabricate microneedles have relative inertness, which allow microneedles to be used as biomedical devices. Despite of the fact that microneedles have been fabricated with FDA-approved materials, dermatotoxicity and irritation tests need to be performed [4, 13, 32]. In the case of silicon, its surface oxidizes when exposed to air becoming into SiO_2 (i.e., glass). Even if this compound is not toxic, it may elicit a mild inflammatory response after repeated insertions of microneedles [10]. On the one hand, some metals are known to be biocompatible and are particularly attractive for hollow microneedles, but on the other hand, the use of biodegradable polymers or soluble biomaterials offers new possibilities to overcome the stratum corneum, and have control over release rate, if required. Furthermore, they provide additional safety, in view of the fact that they safely degrade when accidentally get broken in the skin [4, 14].
- ii). One of the advantages of microneedles is their size. Being short enough, insertion pain and tissue damage are reduced. This is important, since it decreases the possibility of infection at the site of insertion. Even though microneedles create disruptions of micron dimensions, which should readily allow transport of macromolecules and even microparticles, on a clinical length scale they remain small. Ito *et al.* [15] reported that the wound produced by a microneedle is cured 72h after insertion. Bal *et al.* [32] evaluated the irritation caused by microneedles of different length and shapes when inserted into the skin of healthy volunteers. The authors found that the sharpness of the tip is of crucial importance, i.e., the sharper the tip, the higher the disruption of the stratum corneum and the lower irritation induced. Furthermore, it was found that microneedles provoke minimal irritation in comparison with tape-stripping (considered as a non-invasive method), besides being short lasting (less than 2 h). The same authors proposed that in case of dermal vaccination, irritation may be an advantage, due to the release of cytokine, which induces an inflammatory response, favoring the capture of antigens by the Langerhans cells, hence starting the immune reaction. Overall, it is thought that these micron-scale holes are safer than the holes made by hypodermic needles or even minor skin abrasion produced in daily life [5]. Microneedles cause less damage to the skin than that provoked by sandpaper abrasion [44]. Although some works about optimization of microneedle arrays highlight the importance of having needle diameters as small as possible as to prevent bacteria or other foreign substances from entering the skin through micro-holes [42], in general, no infections in the skin treated with microneedles have been reported [6].
- iii). In case of some dermatological applications, microneedles aid to avoid undesirable systemic absorption of

a drug. This might be achieved by delivering the drug selectively in a specific region, evading the vascularized regions of the dermis [16, 19].

- iv). Microneedles do not produce biohazardous sharp medical waste and eliminate the danger associated with intentional re-use.

CONCLUSIONS

Even if microneedles are not a new concept, the interest they have aroused in recent years allow us to consider them as effective devices for the delivery of poorly permeable drugs. Several research groups have found in microneedles the solution for overcoming the barrier imposed by the stratum corneum, providing an efficient delivery through the skin, which implies the possibility of broadening the number of drugs able to be administered by this route. Microneedles offer a vast spectrum of possibilities. Not only a variety of geometries, dimensions and array structures are reported, but also different materials and manufacturing techniques. Recently, the use of self-dissolving or biodegradable materials to produce microneedles with an acceptable strength to be inserted into the skin, allows drug molecules or even particles to be included as part of the body of the needle, providing a sustained release. Coated microneedles offer the possibility of bolus release. Regarding dimensions, target release into a specific depth of the skin can be controlled by varying either shaft length or coating length.

Hollow microneedle arrays can serve as ducts through which drugs can be transported into the inner layers of the skin, once they are released from a delivery system assembled to the array, e.g., a patch. Interesting reports proposed hollow microneedles as a means to withdraw biological fluids, which is certainly a revolution in this field, mainly with the possibility of including microelectrodes in the needles. This brings us nearer to the concept of auto-controlled delivery systems, which are able to deliver the required amount of drug, once anomalous levels of a biological substrate have been determined (e.g., insulin or hormones).

Without any doubt, vaccine field is one of the greatest opportunity areas for microneedles. Comparable or better responses are obtained with microneedles than when using other administration devices. Furthermore, in some cases, a lower antigen dosage administered by microneedles elicited an immune response similar to higher antigen doses via other routes. At present, some vaccines are accomplishing clinical trials in humans.

As expounded in this paper, even if microneedles *per se* have shown to be effective in administering molecules over a broad molecular weight, very recent works focus on combining microneedles with other enhancing strategies or carriers, this can further enlarge the spectrum of molecules that can be delivered. Results are encouraging, showing a synergistic effect in most cases. A precise control of the release rate can be achieved when combining microneedles and some physical enhancers such as iontophoresis. Only few reports are found on electroporation-microneedles, where hollow microneedle electrodes can promote drug release during electroporation. No other physical enhancers such as ultrasound have been studied combined with microneedles. The inclu-

sion of drugs in carriers not only provides protection to the drug, but can result in a sustained release. Combination of carriers and microneedles results in greater drug fluxes and shorter lag times. The combination microneedle-nanovesicles-iontophoresis, which significantly increases drug permeation is of great interest. Microneedles are able to create channels large enough to deliver nanoparticles and even microparticles into the skin. The literature reviewed in this paper reveals few works on combined enhancing strategies, thus becoming a research opportunity area.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was funded by CONACYT (Ref. 81883) and PAPIIT/UNAM (Ref. IN209709).

REFERENCES

- [1] Gerstel, M.; Place, V.A. *Drug Delivery Device*, US Patent 3 964 482, June 22, 1976.
- [2] Henry, S.; McAllister, D.V.; Allen, M.G.; Prausnitz, M.R. Micro-fabricated microneedles: a novel approach to transdermal drug delivery. *J. Pharm. Sci.*, **1998**, *87*, 922-925.
- [3] Tao, S.L.; Desai, T.A. Microfabricated drug delivery systems: from particles to pores. *Adv. Drug Del. Rev.*, **2003**, *55*, 315-328.
- [4] Teo, A.L.; Shearwood, Ch.; Ng, K.Ch.; Lu, J.; Mochhala, Sh. Transdermal microneedles for drug delivery applications. *Mater. Sci. Eng. B*, **2006**, *132*, 151-154.
- [5] Prausnitz, M.R. Microneedles for transdermal drug delivery. *Adv. Drug Del. Rev.*, **2004**, *56*, 581-587.
- [6] Arora, A.; Prausnitz, M.R.; Mitragotri, S. Micro-scale devices for transdermal drug delivery. *Int. J. Pharm.*, **2008**, *364*, 227-236.
- [7] Reed, M.L.; Clarence, W.; James, K.; Watkins, S.; Vorp, D.A.; Nadeem, A. Micromechanical devices for intravascular drug delivery. *J. Pharm. Sci.*, **1998**, *87*, 1387-1394.
- [8] Aggarwal, P.; Johnston, C.R. Geometrical effects in mechanical characterizing of microneedle for biomedical applications. *Sensors Actuat. B*, **2004**, *102*, 226-234.
- [9] Lin, W.; Cormier, M.; Samiec, A.; Griffin, A.; Johnson, B.; Teng, C.; Hardee, G.E.; Daddona, P. Transdermal delivery of antisense oligonucleotides with microprojection patch (Macroflux) technology. *Pharm. Res.*, **2001**, *18*, 1789-1793.
- [10] Wilke, N.; Hibert, C.; O'Brien, J.; Morrissey, A. Silicon microneedle electrode array with temperature monitoring for electroporation. *Sensor Actuat. A: Phys.*, **2005**, *123-124*, 319-325.
- [11] Yu, L.M.; Tay, F.E.H.; Guo, D.G.; Xu, L.; Yap, K.L. A microfabricated electrode with hollow microneedles for ECG measurement. *Sensors Actuat. A: Phys.*, **2009**, *151*, 17-22.
- [12] Mukerjee, E.V.; Collins, S.D.; Isseroff, R.R.; Smith, R.L. Microneedle array for transdermal biological fluid extraction and *in situ* analysis. *Sensors Actuat. A*, **2004**, *114*, 267-275.
- [13] Gill, H.S.; Prausnitz, M.R. Coated microneedles for transdermal delivery. *J. Control. Release*, **2007**, *117*, 227-237.
- [14] Park, J.-P.; Allen, M.G.; Prausnitz, M.R. Biodegradable polymer microneedles: Fabrication, mechanics and transdermal drug delivery. *J. Control. Release*, **2005**, *104*, 51-66.
- [15] Ito, Y.; Hagiwara, E.; Saeki, A.; Sugioka, N.; Takada, K. Feasibility of microneedles for percutaneous absorption of insulin. *Eur. J. Pharm. Sci.*, **2006**, *29*, 82-88.
- [16] Davidson, A.; Al-Qallaf, B.; Das, D.B. Transdermal drug delivery by coated microneedles: Geometry effects on effective skin thickness and drug permeability. *Chem. Eng. Res. Des.*, **2008**, *86*, 1196-1206.
- [17] Verbaan, F.J.; Bal, S.M.; van den Berg, D.J.; Dijkstra, J.A.; van Hecke, M.; Verpoorten, H.; van den Berg, A.; Lutjge, R.; Bouwstra, J.A. Improved piercing of microneedle arrays in dermatomed human skin by an impact insertion method. *J. Control. Release*, **2008**, *128*, 80-88.
- [18] Martanto, W.; Moore, J.S.; Kashlan, O.; Kamath, R.; Wang, P.M.; O'Neal, J.M.; Prausnitz, M.R. Microinfusion using hollow microneedles. *Pharm. Res.*, **2006**, *23*, 104-113.
- [19] Gill, H.S.; Prausnitz, M.R. Pocketed microneedles for drug delivery to the skin. *J. Phys. Chem. Solids*, **2008**, *69*, 1537-1541.

- [20] Han, M.; Kim, D.K.; Kang, S.H.; Yoo, H.-R.; Kim, B.-Y.; Lee, S.S.; Kim, K.D.; Lee, H.G. Improvement in antigen-delivery using fabrication of a grooves-embedded microneedle array. *Sensors Actuators B*, **2009**, *137*, 274-280.
- [21] Shawgo, R.S.; Richards Grayson, A.C.; Li, Y.; Cima, M.J. BioMEMS for drug delivery. *Curr. Opin. Solid State Mater. Sci.*, **2002**, *6*, 329-334.
- [22] Davis, S.P.; Landis, B.J.; Adams, Z.H.; Allen, M.G.; Prausnitz, M.R. Insertion of microneedles into skin: measurement and prediction of insertion force and needle fracture force. *J. Biomech.* **2004**, *37*, 1155-1163.
- [23] Lee, J.W.; Park, J.-H.; Prausnitz, M.R. Dissolving microneedles for transdermal drug delivery. *Biomaterials*, **2008**, *29*, 2113-2124.
- [24] Zhan, J.D.; Peshmukh, A.A.; Pisano, A.P.; Liepmann, D. Continuous on-chip micropumping through a microneedle. In: *Int. 14th Conf. MEMS*, **2001**, pp. 503-506.
- [25] Wilke, N.; Mulcahy, A.; Ye, S.-R.; Morrissey, A. Process optimization and characterization of silicon microneedles fabricated by wet etch technology. *Microelectron. J.*, **2005**, *36*, 650-656.
- [26] Rajaraman, S.; Henderson, H.T. A unique fabrication approach for microneedles using coherent porous silicon technology. *Sensors Actuators B*, **2005**, *105*, 443-448.
- [27] Rodríguez, A.; Molinero, D.; Valera, E.; Trifonov, T.; Marsal, L.F.; Pallarés, J.; Alcubilla, R. Fabrication of silicon oxide microneedles from macroporous silicon. *Sensors Actuators B*, **2005**, *109*, 135-140.
- [28] Tseng, A.A.; Chen, Y.-T.; Chao, Ch.-L.; Ma, K.-J.; Chen, T.P. Recent developments on microablation of glass materials using excimer lasers. *Opt. Laser Eng.*, **2007**, *45*, 975-992.
- [29] Shikida, M.; Ando, M.; Ishihara, Y.; Ando, T.; Sato, K.; Asaumi, K. Non-photolithographic pattern transfer for fabricating pen-shaped microneedle structures. *J. Micromech. Microeng.*, **2004**, *14*, 1462-1467.
- [30] Li, G.; Badkar, A.; Nema, S.; Kolli, Ch.S.; Banga, A.K. *In vitro* transdermal delivery of therapeutic antibodies using maltose microneedles. *Int. J. Pharm.*, **2009**, *368*, 109-115.
- [31] Verbaan, F.J.; Bal, S.M.; van der Berg, D.J.; Goenink, W.H.H.; Verpoorten, H.; Lüttge, R.; Bouwstra, J.A. Assembled microneedle arrays enhance the transport of compounds varying over a large range of molecular weight across human dermatomed skin. *J. Control. Release*, **2007**, *117*, 238-245.
- [32] Bal, S.M.; Caussin, J.; Pavel, S.; Bouwstra, J.A. *In vivo* assessment of safety of microneedle arrays in human skin. *Eur. J. Pharm. Sci.*, **2008**, *35*, 193-202.
- [33] Lanke, S.S.S.; Kolli, C.S.; Strom, J.G.; Banga, A.K. Enhanced transdermal delivery of low molecular weight heparin by barrier perturbation. *Int. J. Pharm.*, **2009**, *365*, 26-33.
- [34] Oh, J.-H.; Park, H.-H.; Do, K.-Y.; Han, M.; Hyun, D.-H.; Kim, Ch.-G.; Kim, Ch.-H.; Lee, S.S.; Hwang, S.-J.; Shin, S.-Ch.; Cho, Ch.-W. Influence of the delivery systems using a microneedle array on the permeation of a hydrophilic molecule, calcein. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **2008**, *69*, 1040-1045.
- [35] Wong, L.W.; Sun, W.Q.; Chan, N.W.; Lai, W.Y.; Leung, W.K.; Tsang, J.C.; Wong, Y.H.; Yeung, K.L. Zeolite microneedles for transdermal drug delivery. *Stud. Surf. Sci. Catal.*, **2007**, *170*, 525-530.
- [36] Chen, X.; Prow, T.W.; Crichton, M.L.; Jenkins, D.W.K.; Roberts, M.S.; Frazer, I.H.; Fernando, G.J.P.; Kendall, M.A.F. Dry-coated microprojection array patches for targeted delivery of immunotherapeutics to the skin. *J. Control. Release*, **2009**, *139*, 212-220.
- [37] Cormier, M.; Johnson, B.; Ameri, M.; Nyam, K.; Libiran, L.; Zhang, D.D.; Daddona, P. Transdermal delivery of desmopressin using a coated microneedle array patch system. *J. Control. Release*, **2004**, *97*, 503-511.
- [38] Martanto, W.; Davis, S.; Holiday, N.; Wang, J.; Gill, H.; Prausnitz, M. Transdermal delivery of insulin using microneedles *in vivo*. In: *Proceedings of International Symposium on Controlled Release Bioactive Materials*, No. 666, **2003**.
- [39] Martanto, W.; Moore, J.S.; Couste, T.; Prausnitz, M.R. Mechanism of fluid infusion during microneedle insertion and retraction. *J. Control. Release*, **2006**, *112*, 357-361.
- [40] Matriano, J.A.; Cormier, M.; Johnson, J.; Young, W.A.; Buttery, M.; Nyam, K.; Daddona, P.E. Macroflux microprojection array patch technology: a new and efficient approach for intracutaneous immunization. *Pharm. Res.*, **2002**, *19*, 63-70.
- [41] Donnelly, R.F.; Morrow, D.I.J.; McCarron, P.A.; Woolfson, A.D.; Morrissey, A.; Juzenas, P.; Juzeniene, A.; Iani, V.; McCarthy, H.O.; Moan, J. Microneedle-mediated intradermal delivery of 5-aminolevulinic acid: Potential for enhanced topical photodynamic therapy. *J. Control. Release*, **2008**, *129*, 154-162.
- [42] Al-Qallaf, B.; Das, D.B. Optimization of square microneedle arrays for increasing drug permeability in skin. *Chem. Eng. Sci.*, **2008**, *63*, 2523-2535.
- [43] Mikszta, J.A.; Alarcon, J.B.; Brittingham, J.M.; Sutter, D.E.; Pettis, R.J.; Harvey, N.G. Improved genetic immunization via micromechanical disruption of skin-barrier function and targeted epidermal delivery. *Nat. Med.*, **2002**, *8*, 415-419.
- [44] Wu, X.-M.; Todo, H.; Sugibayashi, K. Effects of pretreatment of needle puncture and sandpaper abrasion on the *in vitro* skin permeation of fluorescein isothiocyanate (FITC)-dextran. *Int. J. Pharm.*, **2006**, *316*, 102-108.
- [45] Xie, Y.; Xu, B.; Gao, Y. Controlled transdermal delivery of model drug compounds by MEMS microneedle array. *Nanomed. Nanotechnol., Biol. Med.*, **2005**, *1*, 184-190.
- [46] Green, P.G. Iontophoretic delivery of peptide drugs. *J. Control. Release*, **1996**, *41*, 33-48.
- [47] Pikal, M.J. The role of electroosmotic flow in transdermal iontophoresis. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **2001**, *46*, 281-305.
- [48] Kalia, Y.N.; Naik, A.; Garrison, J.; Guy, R.H. Iontophoretic drug delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **2004**, *56*, 619-658.
- [49] Wang, Y.; Thakur, R.; Fan, Q.; Michniak, B. Transdermal iontophoresis: combination strategies to improve transdermal iontophoretic drug delivery. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **2005**, *60*, 179-191.
- [50] Cazares-Delgado, J.; Naik, A.; Ganem-Rondero, A.; Quintanar-Guerrero, D.; Kalia, Y.N. Transdermal delivery of cytochrome C-A 12.4 kDa protein - across intact skin by constant - current iontophoresis. *Pharm. Res.*, **2007**, *24*, 1360-1368.
- [51] Wu, X.M.; Todo, H.; Sugibayashi, K. Enhancement of skin permeation of high molecular compounds by a combination of microneedle pretreatment and iontophoresis. *J. Control. Release*, **2007**, *118*, 189-195.
- [52] Vemulapalli, V.; Kim, H.; Davis, S.P.; Friden, P.M.; Banga, A.K. *In vivo* iontophoretic delivery of salmon calcitonin across microporated skin. The AAPS Journal, AAPS Meeting Abstracts **2007**, www.aapsj.org/abstracts/AM_2007/AAPS2007-002166.PDF (Accessed July 28, 2011).
- [53] Vemulapalli, V.; Yang, Y.; Friden, P.M.; Banga, A.K. Synergistic effect of iontophoresis and soluble microneedles for transdermal delivery of methotrexate. *J. Pharm. Pharmacol.*, **2008**, *60*, 27-33.
- [54] Katikaneni, S.; Badkar, A.; Nema, S.; Banga, A.K. Molecular charge mediated transport of a 13 kD protein across microporated skin. *Int. J. Pharm.*, **2009**, *378*, 93-100.
- [55] Naik, A.; Kalia, Y.N.; Guy, R.H. Transdermal drug delivery: overcoming the skin's barrier function. *Pharm. Sci. Technol. Today*, **2000**, *3*, 318-326.
- [56] Kumar, R.; Philip, A. Modified transdermal technologies: Breaking the barriers of drug permeation via the skin. *Trop. J. Pharm. Res.*, **2007**, *6*, 633-644.
- [57] Prausnitz, M.R.; Langer, R. Transdermal drug delivery. *Nat. Biotechnol.*, **2008**, *26*, 1261-1268.
- [58] Hooper, J.W.; Golden, J.W.; Ferro, A.M.; King, A.D. Smallpox DNA vaccine delivered by novel skin electroporation device protects mice against intranasal poxvirus challenge. *Vaccine*, **2007**, *25*, 1814-1823.
- [59] Elsayed, M.M.A.; Abdallah, O.Y.; Naggar, V.F.; Khalafallah, N.M. Lipid vesicles for skin delivery of drugs: Reviewing three decades of research. *Int. J. Pharm.*, **2007**, *332*, 1-16.
- [60] Touitou, E.; Dayan, N.; Bergelson, L.; Godin, B.; Eliaz, M. Ethosomes - novel vesicular carriers for enhanced delivery: characterization and skin penetration properties. *J. Control. Release*, **2000**, *65*, 403-418.
- [61] Cevc, G.; Blume, G. Lipid vesicles penetrate into intact skin owing to the transdermal osmotic gradient and hydration force. *Biochim. Biophys. Acta*, **1992**, *1104*, 226-232.
- [62] Mura, S.; Manconi, M.; Sinico, C.; Valenti, D.; Fadda, A.M. Penetration enhancer-containing vesicles (PEVs) as carriers for cutaneous delivery of minoxidil. *Int. J. Pharm.*, **2009**, *380*, 72-79.
- [63] Verma, D.D.; Fahr, A. Investigation on the efficacy of a new device for substance deposition into deeper layers of the skin. *Dermaroller®*. Institut für Pharmazeutische Technologie und Biophar-

Combination of Microneedles and Other Enhancing Strategies

Current Drug Delivery, 2012, Vol. 9, No. 1 73

- mazie. Philipps-Universität Marburg. www.beautyroller.se/pdf/needelbeautyroller.pdf (Accessed July 28, 2011).
- [64] Qiu, Y.; Gao, Y.; Hu, K.; Li, F. Enhancement of skin permeation of docetaxel: A novel approach combining microneedle and elastic liposomes. *J. Control. Release*, **2008**, *129*, 144-150.
- [65] Badran, M.M.; Kuntsche, J.; Fahr, A. Skin penetration enhancement by a microneedle device (DermaRoller®) *in vitro*: Dependency on needle size and applied formulation. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **2009**, *36*, 511-523.
- [66] Chen, H.; Zhu, H.; Zheng, J.; Mou, D.; Wan, J.; Zhang, J.; Shi, T.; Zhao, Y.; Xu, H.; Yang, X. Iontophoresis-driven penetration of nanovesicles through microneedle-induced skin microchannels for enhancing transdermal delivery of insulin. *J. Control. Release*, **2009**, *139*, 63-72.
- [67] Orive, G.; Gascón, A.R.; Hernández, R.M.; Domínguez-Gil, A.; Pedraz, J.L. Techniques: New approaches to the delivery of biopharmaceuticals. *Trends Pharmacol. Sci.*, **2004**, *25*, 382-387.
- [68] Pardeike, J.; Hommoss, A.; Müller, R.H. Lipid nanoparticles (SLN, NLC) in cosmetic and pharmaceutical dermal products. *Int. J. Pharm.*, **2009**, *366*, 170-184.
- [69] Schäfer-Kortingert, W.; Korting, H.C. Lipid nanoparticles for improved topical application of drugs for skin diseases. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **2007**, *59*, 427-443.
- [70] McAllister, D.V.; Wang, P.M.; Davis, S.P.; Park, J.H.; Canatella, P.J.; Allen, M.G.; Prausnitz, M.R. Microfabricated needles for transdermal delivery of macromolecules and nanoparticles: Fabrication methods and transport studies. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2003**, *100*, 13755-13760.
- [71] Coulman, S.A.; Barrow, D.; Anstey, A.; Gateley, C.; Morrissey, A.; Wilke, N.; Allender, C.; Brain, K.; Birchall, J.C. Minimally invasive cutaneous delivery of macromolecules and plasmid DNA via microneedles. *Curr. Drug Deliv.*, **2006**, *3*, 65-75.
- [72] Chabri, F.; Bouris, K.; Jones, T.; Barrow, D.; Hann, A.; Allender, C.; Brain, K.; Birchall, J. Microfabricated silicon microneedles for nonviral cutaneous gene delivery. *Brit. J. Dermatol.*, **2004**, *150*, 869-877.
- [73] Pearton, M.; Allender, C.; Brain, K.; Anstey, A.; Gateley, C.; Wilke, N.; Morrissey, A.; Birchall, J. Gene delivery to the epidermal cells of human skin explants using microfabricated microneedles and hydrogel formulations. *Pharm. Res.*, **2008**, *25*, 407-416.
- [74] Coulman, S.A.; Anstey, A.; Gateley, C.; Morrissey, A.; McLoughlin, P.; Allender, C.; Birchall, J.C. Microneedle mediated delivery of nanoparticles into human skin. *Int. J. Pharm.*, **2009**, *366*, 190-200.
- [75] Jiang, J.; Moore, J.S.; Edelhofer, H.F.; Prausnitz, M. R. Intraclear drug delivery to the eye using hollow microneedles. *Pharm. Res.*, **2009**, *26*(2), 395-403.
- [76] Park, J.H.; Allen, M.G.; Prausnitz, M.R. Polymer microneedles for controlled-release drug delivery. *Pharm. Res.*, **2006**, *23*, 1008-1019.

Received: October 21, 2009 Revised: February 23, 2010 Accepted: June 11, 2010