



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

ESTUDIO DE LA LIBERACIÓN TRANSDÉRMICA DE
CLORHIDRATO DE PAROXETINA

TESIS

PARA OPTAR POR EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA

QFB. Laura Gisela González Iglesias

Dra. Adriana Ganem Rondero
Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán

México, Cd. Mx. Octubre 2016



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.

AGRADECIMIENTOS OFICIALES

A la Universidad Nacional Autónoma de México, que a lo largo de mi vida ha sido un segundo hogar, por acogerme en sus aulas y brindarme la mejor educación.

Al CONACYT por la beca 335993 otorgada para realizar mis estudios de maestría y por el apoyo de beca mixta 291062 para realizar mi estancia de investigación.

Al proyecto PAPIIT/UNAM IN216016 y PIAPI 1641 por los recursos otorgados para la realización de este proyecto.

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

A mi tutora, la Dra. Adriana Ganem por su apoyo incondicional, guía y consejo en la realización de esta tesis y en mi formación profesional.

Al Dr. Yogeshvar Kalia de la Universidad de Ginebra por darme la oportunidad de ser parte de su grupo y acogerme con calidez. Por su apoyo y consejo en la realización de esta tesis.

A la Dra. María Guadalupe Nava por su consejo y guía en la realización de este trabajo.

Al Dr. Cesar Serna por su guía, apoyo y amistad durante la estancia realizada.

A los miembros del jurado por sus observaciones y consejos que enriquecieron esta tesis.

DEDICATORIAS

“Por los momentos difíciles, por los buenos momentos, por los amigos, por mi familia, por los errores cometidos, por lo que de ti eh aprendido, por todo lo que me has dado, por lo que está por venir y por estar siempre a mi lado. Gracias Dios Mío”.

A mis padres Carlos y Gina, porque soy muy afortunada por tenerlos guiando mi camino. Por siempre apoyarme en cada proyecto que emprendo, por su incondicional consejo y amor.

A mi mejor amiga Marlen, porque crecer contigo fue lo más maravilloso que me pudo haber pasado, porque eres parte de mi vida y de la persona que soy. Gracias por ser mi hermanita.

A mis queridos hermanitos Carlos y Alan, por compartir conmigo bromas, secretos y pensamientos. Por siempre creer en mí y apoyarme.

A mi latoso compañero de juegos: Mi sobrino Carlitos, porque me alegras con tu risa y tus abrazos.

A la doctora Adriana Ganem por su calidez humana y amistad.

A mí querido amigo Eduardo Serrano por su cariño y amistad, por tu constante ánimo y apoyo. Por hacer de la maestría una aventura divertida e inolvidable.

A mis compañeros y amigos del laboratorio L-322: Guadalupe Nava, Rosario López, Adriana Pérez, Fabiola Reyes, Angélica Villanueva, Teresa Pineda, Irene Martínez, Sergio Bernal y Marcela Vargas, por sus consejos y apoyo. Por las risas y buenos momentos compartidos que convirtieron mis estudios en una de las experiencias más gratas.

A mis compañeros y amigos de la Universidad de Ginebra: Cesar Serna, Sergio del Rio, Si Gou, Vasundhra Tyagi, Verena Santer, María Lapteva, Ivonne Arnold, Naowal Dahmana, Mayank Singhal y Somath Kandekar, por su amistad, hospitalidad, enseñanzas y apoyo en mi estancia.

JURADO ASIGNADO

Presidente	Dra. Helgi Helen Francisca Jung Cook
Primer vocal	Dr. Francisco Hernández Luis
Segundo vocal	Dra. María Josefa Bernad Bernad
Tercer vocal	Dr. Carlos Tomás Quirino Barreda
Secretario	Dra. Elizabeth Piñón Segundo

El presente trabajo de investigación se realizó en el laboratorio de Investigación y Posgrado en Tecnología Farmacéutica, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM.

Presentaciones en congresos:

15° Congreso **Internacional “Perspectives in percutaneous Penetration”**

La Grande Motte, Francia, marzo 2016

Cartel **“Study of transdermal permeation of paroxetine hydrochloride”**

Segundo Congreso de Ciencia, Educación y Tecnología.

Facultad de estudios superiores Cuautitlán, Edo. De México, México, Junio 2016

Cartel “Estudio de liberación transdérmica de clorhidrato de paroxetina”

XLIX Congreso Nacional y VII Internacional de Ciencias Farmacéuticas

Huatulco, México, Septiembre 2016

Cartel “Estudio de liberación transdérmica de clorhidrato de paroxetina”

CONTENIDO

RESUMEN	1
1. INTRODUCCIÓN	2
2. MARCO TEÓRICO	4
2.1 Clorhidrato de paroxetina (PAX)	4
2.1.1 Farmacocinética de PAX	5
2.1.2 Mecanismo de acción de PAX	6
2.1.3 Efectos adversos de PAX	8
2.2 Administración transdérmica de fármacos	9
2.3 Estructura y función de la piel	11
2.3.1 Epidermis	12
2.3.2 Dermis	13
2.3.3 Hipodermis	14
2.3.4 Anexos cutáneos	14
2.3.5 Funciones de la piel	16
2.3.6 Vías de penetración cutánea	17
2.4 Estrategias para incrementar la absorción transdérmica de fármacos	19
2.4.1 Promotores químicos de la absorción	20
2.4.2 Promotores físicos de la absorción	23
2.5 Microemulsiones	30
2.5.1 Aplicaciones	32
2.5.2 Métodos de preparación de microemulsiones	33
2.5.3 Caracterización de microemulsiones	34
3. JUSTIFICACIÓN	35
4. HIPÓTESIS	35
5. OBJETIVOS	36
5.1 Objetivo general	36
5.2 Objetivos particulares	36
6. METODOLOGÍA	37
6.1 Reactivos	37
6.2 Material	38
6.3 Equipos e Instrumentos	38

6.4	Cuantificación de PAX mediante espectrofotometría UV	39
6.5	Cuantificación de PAX mediante HPTLC (Cromatografía en capa fina de alta resolución).....	39
6.6	Cuantificación de PAX mediante HPLC (Cromatografía líquida de alta resolución)	39
6.7	Cuantificación de PAX mediante UPLC MS/MS (cromatografía de líquidos de ultra-alta resolución acoplada a un detector de masas).....	40
6.8	Determinación de la solubilidad de PAX en excipientes.....	40
6.9	Determinación del medio receptor.....	41
6.10	Formulación de microemulsiones.....	41
6.11	Evaluación de la solubilidad de PAX en la microemulsión seleccionada	42
6.12	Preparación de microemulsiones cargadas con PAX	43
6.13	Caracterización de microemulsiones	43
6.14	Determinación del medio de extracción de PAX a partir de piel.....	43
6.15	Estudio de estabilidad de PAX en la solución receptora y en contacto con piel.....	44
6.16	Estudio de permeación pasiva.....	44
6.16.1	Preparación de la piel.....	44
6.16.2	Experimentos de difusión pasiva	45
6.16.3	Extracción de PAX a partir de la piel.....	46
6.16.4	Análisis de los datos de permeación de las microemulsiones preparadas	47
6.17	Estudio de biodistribución de PAX en las capas de la piel	47
6.18	Evaluación del efecto de la microporación láser en la permeación de PAX a partir de una microemulsión ..	48
6.19	Evaluación del efecto de la iontoforesis en la permeación de PAX a partir de una microemulsión.....	49
6.19.1	Determinación de la contribución de los mecanismos de electroósmosis y electromigración.....	50
6.20	Análisis estadístico de los resultados	51
7.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	52
7.1	Validación de métodos analíticos.....	52
7.1.1	Resultados de cuantificación de PAX mediante HPTLC (anexo 1).....	52
7.1.2	Resultados de cuantificación de PAX mediante HPLC (anexo 2).....	52
7.1.3	Resultados de cuantificación de PAX mediante UPLC/MS-MS (anexo 3).....	52
7.1.4	Resultados de cuantificación de ACM mediante HPLC (anexo 4).....	53
7.2	Resultados de extracción y estabilidad de las muestras	53
7.3	Pruebas de solubilidad y formulación de las microemulsiones.	56
7.4	Resultados de las pruebas de permeación pasiva y deposición de PAX en la piel.....	62
7.4.1	Efecto del componente oleoso	67
7.4.2	Efecto del co-tensoactivo.....	69
7.4.3	Efecto de la proporción tensoactivo/co-tensoactivo	70

7.4.4	Efecto del tipo de microemulsión	72
7.5	Efecto de la microporación láser en la permeación de PAX a partir de una microemulsión.....	74
7.6	Efecto de la iontoforesis en la permeación de PAX a partir de una microemulsión.....	77
7.7	Comparación del uso de técnicas físicas	81
8.	CONCLUSIONES	82
9.	PERSPECTIVAS	83
10.	BIBLIOGRAFÍA	84
11.	ANEXOS	89
Anexo 1.....		89
Anexo 2.....		95
Anexo 3.....		100
Anexo 4.....		104

RESUMEN

El clorhidrato de paroxetina es el más potente inhibidor de la recaptura de serotonina (ISRS) clínicamente disponible, está aprobado para el tratamiento de la depresión, trastorno de ansiedad generalizada, trastorno obsesivo compulsivo, trastorno de pánico, fobia social y trastorno de estrés post-traumático. La administración transdérmica de este fármaco se propuso con el objetivo de reducir los efectos adversos relacionados a la administración oral, las fluctuaciones de los niveles plasmáticos y también para evitar el amplio metabolismo de primer paso del fármaco y mejorar su biodisponibilidad. La optimización de la formulación y su combinación con métodos físicos como la iontoforesis y la microporación, para modificar la piel, son métodos a los que se recurrió en este trabajo para superar esta barrera y suministrar eficientemente el clorhidrato de paroxetina a través de la piel.

Se construyeron diagramas pseudoternarios utilizando mezclas compuestas por distintas proporciones de tensoactivo(s) (Tween® 80, Kolliphor® EL) y co-tensoactivo (Transcutol® P, etanol), componentes oleosos (miristato de isopropilo, ácido oleico, Labrafac™ lipophile WL, NovoI™, Capryol™ 90, Maisine™ 35-1) y agua, excipientes que tienen propiedades promotoras sobre la permeación de principios activos. La mayor área de predominio de la microemulsión se obtuvo al utilizar Kolliphor® EL/ Transcutol® P (proporción 1:1, 1:2), Capryol™ 90 y agua. En base a dichos diagramas se prepararon y caracterizaron microemulsiones w/o (agua en aceite) y o/w (aceite en agua), las cuales permitieron solubilizar hasta 96 mg de PAX/mL. El efecto de las microemulsiones preparadas se evaluó mediante estudios de permeación *in vitro* utilizando piel de oreja de cerdo montada en celdas de Franz, en donde se cuantificó la cantidad de PAX permeada a diferentes intervalos de tiempo durante 24 h y la cantidad depositada en la piel al término del estudio, mediante HPTLC, HPLC o UPLC. El ajuste de los datos experimentales a la ecuación de Scheuplein permitió determinar que el uso de NovoI™, Capryol™ 90 y Kolliphor® EL/Transcutol® P (proporción 1:2,1:1), conducen a la administración de una mayor cantidad de PAX en la piel, ya que producen un aumento en el flujo (J_{ss}), coeficiente de permeación (K_p), coeficiente de reparto (KH), así como difusión (D/H^2). El tipo de microemulsión afectó la permeación de PAX, siendo las de tipo o/w con las que se obtuvo una mayor permeación, ya que el flujo (J_{ss}), K_p y KH obtenidos son mayores en comparación con las microemulsiones w/o.

Se evaluó el uso conjunto de la microemulsión optimizada con técnicas físicas. La creación de microporos de 200 μm de profundidad se realizó con el sistema P.L.E.A.S.E (fluencia de 88.9 J/cm^2), los cuales se caracterizaron mediante microscopía y tomografía de coherencia óptica. Mientras que para evaluar el uso de iontoforesis se utilizó una corriente de 0.5 mA/cm^2 durante 24 h, caracterizando el mecanismo de transporte mediante co-iontoforesis con acetaminofén. La combinación de estas técnicas con la microemulsión formulada aumentó la cantidad total de PAX administrada 13 y 15 veces, respectivamente, y modificó el perfil de distribución de PAX en las distintas capas de la piel.

1. INTRODUCCIÓN

La depresión (trastorno depresivo mayor o depresión clínica) es un trastorno del estado de ánimo común pero grave, el cual representa un importante problema de salud pública. Se caracteriza por tristeza, a veces irritabilidad (especialmente en niños), pérdida de interés o placer, sentimientos de culpa o baja autoestima, alteraciones del sueño o el apetito, sensación de cansancio y falta de concentración (World Health Organization 2016, National Institute of Mental Health 2016). Esta enfermedad puede ser de larga duración o recurrente, perjudicando de forma sustancial la capacidad de un individuo para desempeñarse en el trabajo o escuela o hacer frente a la vida diaria. En su forma más grave, la depresión puede llevar al suicidio (World Health Organization 2016, Center for Disease Control and Prevention 2016). La carga económica de la depresión, incluyendo los costos laborales, costos directos y los costos relacionados con el suicidio, se estimó en 210.5 billones en 2010 (Center for Disease Control and Prevention 2016). No existe una causa única conocida para este padecimiento. Más bien, ésta parece ser el resultado de una combinación de factores genéticos, bioquímicos, y psicológicos (Instituto Nacional de Salud Mental 2009).

La depresión coexiste en un alto grado con otras condiciones médicas como enfermedad cardíaca, enfermedades autoinmunes, derrame cerebral, cáncer, VIH/SIDA, diabetes, y la enfermedad de Parkinson, así como en poblaciones especiales como personas mayores de 65 años de edad (15 %) (Katon y Ciechanowsky 2002) y mujeres embarazadas (antes y durante el embarazo-8.7 y 6.9% y después del parto-10.4 %) (Chávez-Leon, Ontiveros-Uribe y Serrano-Gómez 2008). Estudios han demostrado que las personas que padecen depresión además de otras enfermedades, tienden a presentar síntomas más graves de ambas, a adaptarse con mayor dificultad a su condición médica, y a tener que afrontar costos médicos más altos que aquellas que no tienen depresión coexistente (Katon y Ciechanowsky 2002).

Desde finales de los años setenta, los programas de investigación han tratado de mejorar los tratamientos para la depresión y otros padecimientos como el trastorno obsesivo-compulsivo (TOC), trastorno de pánico y fobia social, los cuales muestran una cierta respuesta a los fármacos antidepresivos. La paroxetina es un potente y selectivo inhibidor de la recaptura de serotonina (ISRS), que está aprobado para el tratamiento de la depresión a nivel mundial (Bourin, Chue y Guillon 2001). Se asocia con un perfil de efectos secundarios favorables, baja toxicidad en sobredosis y es bien tolerado en poblaciones especiales, incluyendo los ancianos (Bourin, Chue y Guillon 2001).

La administración transdérmica de fármacos presenta múltiples ventajas sobre las rutas tradicionales. Sin embargo, la composición y estructura del estrato córneo limitan el número de moléculas que pueden ser administradas a través de la piel a tasas terapéuticamente relevantes por difusión pasiva simple, a unos pocos elegidos que poseen las propiedades fisicoquímicas requeridas y propiedades farmacológicas. Por ello, ha habido un considerable énfasis en tecnologías que permitan comprometer esta capa más externa de la epidermis mediante procesos y mecanismos activos. Esto ha dado como resultado el desarrollo de métodos tanto químicos como físicos, con el fin de aumentar las tasas de permeación transdérmica. Este tipo de técnicas implican la aplicación de energía, ya sea para irrumpir la función de barrera del estrato córneo o mediante el transporte activo de las moléculas de fármaco (por ejemplo, iontoforesis) (Kalia, y otros 2004). Dentro de estas técnicas también se encuentra la creación de microporos ya sea por fuerza mecánica (microagujas), energía térmica, o mediante el uso de un láser (Dubey 2012). El desafío clave de cada una de estas tecnologías es deteriorar la función de barrera de manera reversible de modo que la tasa de transporte molecular sea suficiente para permitir la administración terapéutica causando el mínimo dolor e irritación (Yogeshwar, Heinrich y Yogeshvar 2011). La optimización de la formulación y su combinación con métodos físicos como la iontoforesis y la creación de poros para modificar la piel, son métodos a los que se recurrió en este trabajo para superar esta barrera y suministrar eficientemente fármacos a través de la piel.

Debido a que la depresión se presenta en distintas etapas de la vida y puede incluso encontrarse en combinación con otras afecciones, es frecuente la prescripción de fármacos antidepresivos en menores dosis para minimizar los riesgos de efectos secundarios e interacciones medicamentosas (Olgiati, Bajo y Serretti 2014). Sin embargo, esto muchas veces conduce a la falta de respuesta terapéutica, por lo que es necesario el uso de otras vías de administración. Se han reportado estudios en los que se administra paroxetina por vía transdérmica utilizando liposomas (El-Nabarawi, y otros 2013), una matriz polimérica (Patel, Patel y Patel 2013) o etosomas (Pathan, y otros 2016). En este trabajo se propone la administración transdérmica de paroxetina, por lo que se estudió y comparó el transporte a través de piel *in vitro* de paroxetina formulada en microemulsiones, empleando dos promotores de tipo físico: Energía eléctrica (iontoforesis) y radiación láser.

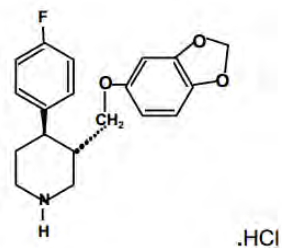
2. MARCO TEÓRICO

2.1 Clorhidrato de paroxetina (PAX)

La depresión es frecuentemente subdiagnosticada y no tratada. Incluso con tratamiento, sólo el 70% de los pacientes demuestra una respuesta adecuada a la terapia con fármacos antidepresivos. Sin embargo, un número significativo de pacientes logran remisión parcial con recaídas a largo plazo. Los costos individuales y sociales de la depresión no tratada son sustanciales (Bourin, Chue y Guillon 2001). Un factor clave en el éxito del tratamiento es el cumplimiento, sin embargo la presencia de efectos secundarios está asociada al abandono del tratamiento (F. Walker 2013).

El clorhidrato de paroxetina (PAX, figura 1), (3S-trans)-3-[(1,3-benzodioxol-5-yloxy) metil]-4-(4-fluorofenil)-piperidina clorhidrato/ (-)-(3S, 4R)-(4-(p-fluorofenil)-3-[[3,4- (metilendioxi) fenoxi] metil] piperidina clorhidrato (Germann, y otros 2013), es un inhibidor altamente potente y selectivo de la recaptura de serotonina (ISRS), perteneciendo así a una clase de fármacos no relacionados estructuralmente, como son la fluoxetina, fluvoxamina, sertralina, citalopram y escitalopram, los cuales constituyen el tratamiento farmacológico de primera elección en el tratamiento de la depresión mayor y distimia (Chávez-Leon, Ontiveros-Urbe y Serrano-Gómez 2008). Se produce como sal de clorhidrato para aumentar su solubilidad (Germann, y otros 2013).

Aunque su mecanismo de acción es esencialmente el mismo, cada uno de los ISRS tienen un perfil ligeramente diferente con actividad clínica y efectos secundarios distintos e interacciones farmacológicas particulares. La paroxetina ha probado ser efectiva también en el tratamiento de trastorno de ansiedad generalizada, trastorno obsesivo compulsivo, trastorno de pánico, fobia social, trastorno de estrés post-traumático, trastorno disfórico premenstrual, las manifestaciones vasomotoras de la menopausia, eyaculación precoz e incluso en el manejo del trastorno límite de personalidad (Lydiard y Bobes 2000, Bourin, Chue y Guillon 2001, Chávez-Leon, Ontiveros-Urbe y Serrano-Gómez 2008). También se ha estudiado en el tratamiento de la neuropatía diabética, síncope vasovagal y dolor crónico (Verdu, y otros 2008). El PAX ha demostrado ser más potente *in vitro* que la fluoxetina, fluvoxamina y sertralina (Tulloch y Johnson 1992, Germann, y otros 2013). En México PAX está disponible para su administración por vía oral, en tabletas convencionales (10, 15, 20, 30 y 40 mg) o tabletas de liberación prolongada (12.5 y 25 mg) (Thomson-PLM 2016).



Propiedades fisicoquímicas	
Peso molecular	365.83 mg/mol
pKa (base)	9.9
Solubilidad en agua	5.4 mg/mL
Log P	3.95
Punto de fusión	129-131 °C

Figura 1. Estructura química (Germann, y otros 2013) y propiedades fisicoquímicas del clorhidrato de paroxetina (Watts 2011, USP 2008, Germann, y otros 2013).

2.1.1 Farmacocinética de PAX

La dosis diaria inicial de PAX es de 20 mg y la dosis máxima es de 60 mg/día por vía oral (O'Donnell y Shelton 2012), tras su administración, se observa la máxima concentración plasmática en un tiempo promedio ($t_{máx}$) de 5 horas (0.5 a 11 h) (Bourin, Chue y Guillon 2001), sin modificaciones debidas a la dieta. La absorción de PAX en el tracto gastrointestinal es elevada; no obstante, la biodisponibilidad oral de PAX es de aproximadamente 50 % con la dosis inicial y de 64 % con dosis múltiples debido al extenso efecto de primer paso que experimenta (Bourin, Chue y Guillon 2001, Otero, y otros 1996). Después de administración continua exhibe saturación metabólica parcial conduciendo a una mayor biodisponibilidad, esta última con una amplia variabilidad inter-individual (Otero, y otros 1996). En la mayoría de los pacientes el tratamiento con dosis de 20 a 50 mg/día presenta una cinética lineal. A mayores dosis se observa un incremento no lineal de las concentraciones plasmáticas, debido a la saturación de la enzima CYP2D6, la cual además, presenta polimorfismo genético por lo que hay grandes posibilidades de interacciones farmacocinéticas con otros fármacos que sean metabolizados por ella o con inductores enzimáticos (Bourin, Chue y Guillon 2001, Otero, y otros 1996).

Debido a su liposolubilidad, PAX se distribuye rápidamente en el organismo difundiendo a través de la barrera hematoencefálica (Otero, y otros 1996). El volumen de distribución de PAX muestra una alta variación inter-individual con valores que van de 3.1 a 28 L/kg (Bourin, Chue y Guillon 2001), Solo una pequeña fracción del total del fármaco permanece en la circulación sistémica después de una administración intravenosa (Otero, y otros 1996). A concentraciones terapéuticas PAX presenta un 95% de unión a proteínas (Bourin, Chue y Guillon 2001).

PAX es extensamente metabolizada por oxidación hepática, formando metabolitos inactivos (Otero, y otros 1996), solo <5% del fármaco se elimina sin metabolizar. Los metabolitos se excretan en orina (65%) y heces (25%) (Bourin, Chue y Guillon 2001) (Otero, y otros 1996). La vida media de eliminación promedio es de 18-21 horas, alcanzando

el estado estacionario tras la administración de PAX por 7-14 días, sin reportes de acumulación de fármaco (Bourin, Chue y Guillon 2001).

En pacientes de mayor edad (<65 años), las concentraciones plasmáticas de PAX en el estado estacionario y el $t_{1/2}$ son mayores a las reportadas en pacientes jóvenes. El PAX se excreta en leche materna y atraviesa la placenta, por lo que durante el embarazo y lactancia debe evaluarse el empleo de este, en base a un análisis riesgo -beneficio (Bourin, Chue y Guillon 2001).

2.1.2 Mecanismo de acción de PAX

La hipótesis serotoninérgica de la depresión propone que en este padecimiento, la actividad de la serotonina es menor a la normal (Chávez-Leon, Ontiveros-Uribe y Serrano-Gómez 2008). Los ISRS son reconocidos por alterar la señalización monoaminérgica bloqueando la recaptura de 5-HT (Serotonina). Este tipo de fármacos exhiben una extremadamente alta afinidad por los transportadores 5-HTT, por lo que la unión de estos fármacos al transportador inhibe efectivamente la capacidad de las proteínas transportadoras para eliminar la 5-HT liberada en la hendidura sináptica. Mientras que comúnmente se supone que el bloqueo de 5-HTT aumenta los niveles sinápticos de 5-HT, el aumento extracelular real es bastante modesto (F. Walker 2013). De hecho, el bloqueo a corto plazo de la recaptura de 5-HT resulta en la inhibición de la descarga neuronal de 5-HT, disminución de la síntesis de 5-HT y disminución de la liberación de 5-HT. Estos efectos inhibidores son impulsados principalmente por el hecho de que el aumento de los niveles extracelulares de 5-HT induce un mecanismo de retroalimentación negativa que involucra a los autorreceptores 5-HT_{1A}, localizados en sitios somatodendríticos (figura 2a) (Chávez-Leon, Ontiveros-Uribe y Serrano-Gómez 2008, F. Walker 2013).

En contraste con estos efectos agudos, la administración persistente de los ISRS regula a la baja por lo que al transcurrir algunas semanas, ocurre la desensibilización de los receptores 5-HT_{1A}, disminuyendo eficazmente el nivel de retroalimentación negativa sobre la liberación de 5-HT. Esta situación provoca una reanudación progresiva de la descarga neuronal, y a su vez un aumento en la liberación de 5-HT lo cual aumenta los niveles sinápticos (figura 2b), en última instancia, se induce la desensibilización de los receptores 5-HT postsinápticos (F. Walker 2013, O'Donnell y Shelton 2012, Chávez-Leon, Ontiveros-Uribe y Serrano-Gómez 2008). La mayor disponibilidad de 5-HT reduce el grado de retroalimentación negativa ejercida sobre los potenciales de liberación, lo que aumenta la probabilidad de una mayor liberación de 5-HT (F. Walker 2013).

La teoría anterior es la más conocida y aceptada, sin embargo, debido a que no se ha encontrado un claro déficit de neurotransmisores monoaminérgicos en todos los pacientes con depresión, se continúa con la búsqueda de una explicación neurobiológica alternativa para este padecimiento. La literatura emergente a este respecto, ha demostrado que los ISRS presentan una significativa actividad antiinflamatoria en el cerebro, la cual se reportó por primera vez en 1993 (Martensson y Nassberger 1993); la amortiguación de la señalización inflamatoria puede promover la neurogénesis y la liberación de neurotrofina, reduciendo la generación del ácido quinolínico (agonista NMDA) y, finalmente, los ISRS reducen las perturbaciones de citocinas proinflamatorias en la depresión. Sin embargo el mecanismo molecular específico a través del cual se logran estos efectos aún no se ha descrito a fondo. La asociación entre depresión e inflamación plantea una línea de teorías y opciones terapéuticas a futuro (F. Walker 2013).

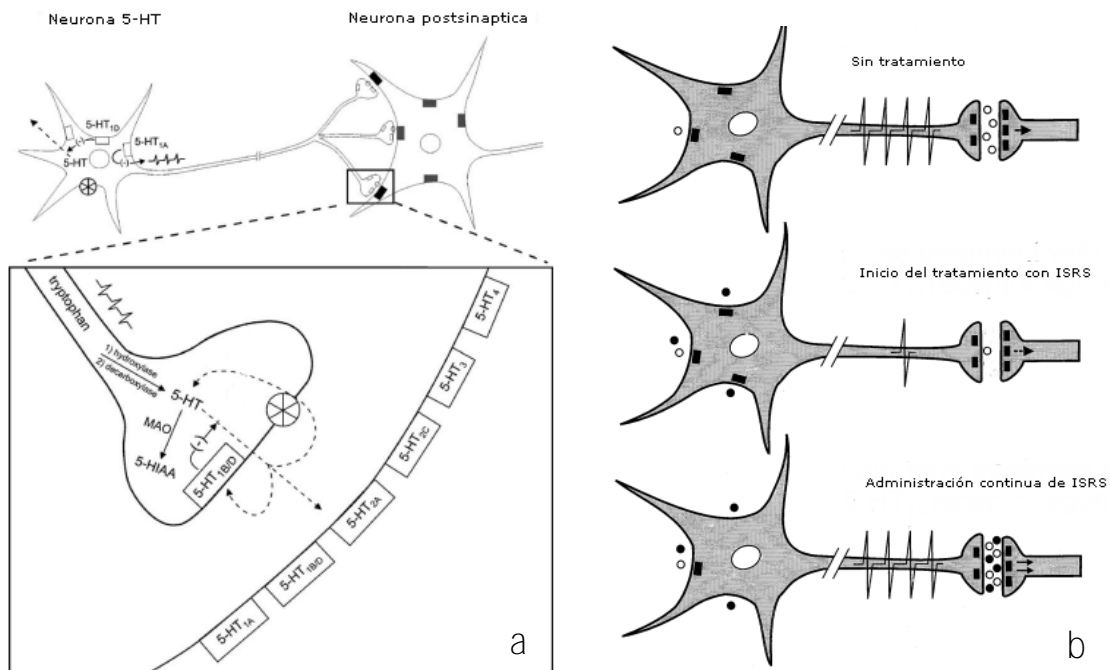


Figura 2. a) Factores presinápticos y postsinápticos que regulan la eficacia de la neurotransmisión de 5-HT (Modificada de Mansari et al. 2006), b) Diagramas de las neuronas serotonérgicas que representa su función alterada durante la administración aguda y de largo plazo de un ISRS (Modificada de Blier et al. 1998).

2.1.3 Efectos adversos de PAX

La razón más citada para preferir clínicamente el uso de los ISRS es su seguridad y tolerancia. Poseen un perfil distinto de efectos adversos, con menores niveles de actividad anticolinérgica. Por ello se reporta con menor frecuencia estreñimiento, retención urinaria y visión borrosa. También es reconocido que son menos perjudiciales que los antidepresivos tricíclicos en términos de sus efectos cardiovasculares, y en pocas ocasiones resultan fatales debido a sobredosis (F. Walker 2013, Blier y Montigny 1998).

Por otra parte, los ISRS son conocidos por inducir náuseas, dolor de cabeza, sequedad de boca, insomnio, agitación, sudoración, mareos, temblores y disfunción sexual, todos estos pueden contribuir a la falta de cumplimiento por parte del paciente.

El exceso de serotonina puede resultar en el potencialmente mortal “**síndrome serotoninérgico**”, un conjunto de síntomas que afectan a individuos que consumen antidepresivos. Se caracteriza por alteraciones del comportamiento cognitivo, inestabilidad autonómica y alteración neuromuscular, como son: desorientación, confusión, agitación, inquietud, fiebre, escalofríos, sudoración, diarrea, así como la ataxia, hiperreflexia, convulsiones y actividad mioclónica (F. Walker 2013, Chávez-Leon, Ontiveros-Uribe y Serrano-Gómez 2008). Su causa más habitual es la sobredosis o la interacción entre medicamentos que tienen la capacidad de aumentar la liberación de serotonina. Este síndrome clínico sobreviene por ejemplo cuando al administrar un ISRS aumenta la cantidad de serotonina mientras que el uso de un segundo fármaco, como por ejemplo inhibidores de la monoamino oxidasa, antidepresivos tricíclicos, antiparkinsonianos (e.g. Levodopa, amantadina), antimigrañosos (e.g. sumatriptán, zolmitriptán), drogas ilegales (cocaína, anfetaminas, LSD) u otros fármacos (e.g. litio, morfina, carbamazepina), modifican la liberación, metabolismo o recaptura de serotonina o estimulan receptores postsináptico produciendo una actividad serotoninérgica excesiva del sistema nervioso central y periférico (Hernández, Pla y Villanueva 1995, García del Busto 2004).

Los ISRS pueden ocasionar hemorragias en la piel (equimosis) o en el tubo digestivo debido a que la liberación de serotonina por las plaquetas desempeña un papel importante en la regulación de la respuesta homeostática a las lesiones vasculares, por lo que debe evaluarse el uso concomitante con antiinflamatorios no esteroideos (AINES) (Chávez-Leon, Ontiveros-Uribe y Serrano-Gómez 2008). La supresión brusca de un tratamiento de cuando menos 6 semanas con PAX da lugar al síndrome de discontinuación en un 50 a 66% de los pacientes (Chávez-Leon, Ontiveros-Uribe y Serrano-Gómez 2008).

2.2 Administración transdérmica de fármacos

La vía transdérmica presenta un significativo potencial para la administración no invasiva de agentes terapéuticos (Kalia, y otros 2004), incluso en los registros médicos más antiguos se relata la aplicación de preparaciones en la piel para tratar trastornos superficiales, sistémicos y como cosméticos (Hadgraft y Lane 2005), como por ejemplo se describe en las tablillas de arcilla sumerias, hace aproximadamente 100 000 años, el uso de preparados para decoración y protección de la piel, mientras que en Egipto y Babilonia se utilizaban pomadas, ungüentos, pociones e incluso parches (alrededor de 3000 aC). En el papiro de Ebers (1550 aC), se describe lo que puede ser la primera administración transdérmica; mediante aplicación tópica de incienso para “expulsar el dolor en la cabeza” y un producto aplicado en el vientre para “**expulsar** los dolores causado por *Taenia*”. El concepto del paso de ciertas sustancias a través de la piel parece haber sido aplicado por Avicena quien utilizaba emplastos de azufre y alquitrán (tratamiento de la ciática) y describió que al aplicarlos en la piel, la parte blanda penetra mientras que la parte dura no lo hace, por lo que el efecto no es solo local, sino que afecta también a los tejidos inmediatamente debajo y zonas remotas (efectos sistémicos) (Pastore, y otros 2015).

Otros precursores de los medicamentos transdérmicos modernos incluyen ungüentos mercuriales (tratamiento de la sífilis), emplastos de belladona (utilizado como analgésico local) y mostaza (como un irritante local efectivo) (Paudel, y otros 2010).

Hasta 1877 se seguía sugiriendo que la piel intacta era completamente impermeable a todas las sustancias, a pesar de que se reportaban casos de envenenamiento sistémico por aplicación tópica de belladona (Pastore, y otros 2015), pero durante 1900 se reportaron varios casos de envenenamiento debido a residuos de nitrobenzenu y anilina depositados en ropa y zapatos después de ser teñidos, así como por exposición tópica accidental de otras sustancias, con lo que se enfatizó la potencial absorción sistémica de los compuestos aplicados tópicamente y dio origen a la investigación de la piel como una vía de administración de medicamentos destinados a ejercer un efecto sistémico. A principios del siglo XX los estudios *in vivo* demostraron la absorción después de la administración tópica, mediante la cuantificación de niveles de fármaco en sangre, orina y heces. Sin embargo, el uso rutinario de los sistemas de administración transdérmica sólo se convirtió en una práctica común en el último tercio de ese siglo, cuando se desarrolló la tecnología para permitir la administración precisa y reproducible de fármacos a través de la piel para obtener efectos sistémicos (Pastore, y otros 2015).

Tabla 1. Beneficios y limitaciones asociados a la vía transdérmica (Brown, y otros 2006, Paudel, y otros 2010, Ganem-Rondero 2011).

VENTAJAS	LIMITACIONES
<ul style="list-style-type: none"> • Es de fácil acceso y gran área superficial. • Útil cuando se tiene absorción gastrointestinal errática o incompleta (e.g. pacientes pediátricos, geriátricos o comatosos) o cuando la administración oral es complicada a causa de náuseas, vomito o mala deglución. • No invasiva o mínimamente invasiva (e.g., microporación, etc.). • Posibilidad tanto de acción local, como de liberación sistémica. • Posibilidad de lograr una liberación sostenida y/o controlada por un periodo prolongado. • Evita degradación en tracto gastrointestinal por acción química o enzimática, el efecto de primer paso hepático y la variabilidad debida al vaciamiento gástrico. • Permite la obtención de niveles terapéuticos constantes de fármaco en sangre, eliminando las fluctuaciones en la concentración plasmática y con ello los efectos adversos asociados a las mismas. • Eliminación de restricciones dietarías asociadas a la vía oral. • Evita la irritación local del tubo digestivo. • Permite reducir la frecuencia de administración y las dosis de principio activo • Útil para fármacos con tiempos de vida media corta. • Buena aceptación y posibilidad de autoadministración. • Facilidad de interrupción de la dosis en caso de cualquier reacción adversa. • Reducción de la variabilidad inter e intra individual. 	<ul style="list-style-type: none"> • La principal limitante es la función de barrera de la piel, la cual protege de la penetración de agentes externos, limitando el número de activos capaces de ser administrados por esta vía. • La absorción transdérmica es relativamente lenta por lo que no se puede producir un efecto inmediato. • La variabilidad intra e inter-individual en la permeación asociada a variables como: raza, sitio, edad, estado, hidratación y temperatura de la piel. • Para que un fármaco pueda tener un efecto sistémico, se requiere tenga un log P entre 1-3, lo cual permite que pueda atravesar con éxito el SC y las capas acuosas subyacentes. • Un peso molecular <500 Da es esencial para asegurar la facilidad de difusión a través del SC. • Metabolismo pre-sistémico: la presencia de enzimas (e.g. peptidasas y esterases) pueden metabolizar el fármaco a una forma terapéuticamente inactiva. • Esta ruta sólo es aplicable para medicamentos muy potentes que requieren sólo pequeñas concentraciones en la sangre para generar un efecto terapéutico.

Hoy en día se estima que el mercado de productos transdérmicos es de aproximadamente 10 % (\$ 2 mil millones de dólares) del mercado total de fármacos, que es de 28 billones en EE.UU. (Alexander, y otros 2012). Sin embargo, sólo unos cuantos productos han podido ser comercializados debido a las limitaciones para la administración en la piel (tabla 1). No obstante, la administración transdérmica de fármacos ha experimentado una tasa de crecimiento anual del 25%, que supera a la administración oral (2%) (Alexander, y otros 2012). Esta vía de administración cuenta con múltiples ventajas sobre las vías oral y parenteral, las cuales se enlistan en la tabla 1.

Si bien los datos anteriores son alentadores, sigue existiendo una necesidad evidente de desarrollar mejores y más eficientes productos farmacéuticos para el tratamiento de enfermedades dermatológicas y para la administración transdérmica de fármacos destinados al tratamiento de inflamación local, subcutánea y diversas afecciones sistémicas (p. ej. analgesia, terapia de reemplazo hormonal, etc.) (Garvie-Cook 2016).

2.3 Estructura y función de la piel

La piel es la barrera protectora del organismo contra toda una batería de agresores ambientales tanto de origen natural o antropogénico. Protege principalmente contra la desecación, y por lo tanto hace posible la vida terrestre (Menon 2015). Es el órgano más grande y pesado del cuerpo humano, representa un 10-16% de la masa corporal promedio y tiene un área superficial de aproximadamente 2 m² (Roussel, y otros 2015, H. A. Benson 2012). El pH de la superficie se ha reportado en el intervalo de 5.4 a 5.9, el cual es importante en el mantenimiento de la función de barrera de la piel y la defensa contra infecciones y enfermedades. La piel también tiene una excelente capacidad de amortiguación frente a grandes cambios en el pH (Paudel, y otros 2010). Es una barrera resistente y elástica que cubre el cuerpo protegiendo el compartimento muscular y estructuras internas.

La estructura de la piel varía considerablemente entre las distintas áreas del cuerpo, incluyendo cambios en el espesor de sus componentes y en sus estructuras especializadas de origen epitelial (por ejemplo, cabello, uñas, glándulas sudoríparas y las glándulas sebáceas) (Norris 2012). Se compone de 3 capas básicas; epidermis, dermis e hipodermis (figura 3), en donde cada capa de tejido consiste de diferentes tipos de células que desempeñan distintas funciones (Roussel, y otros 2015).

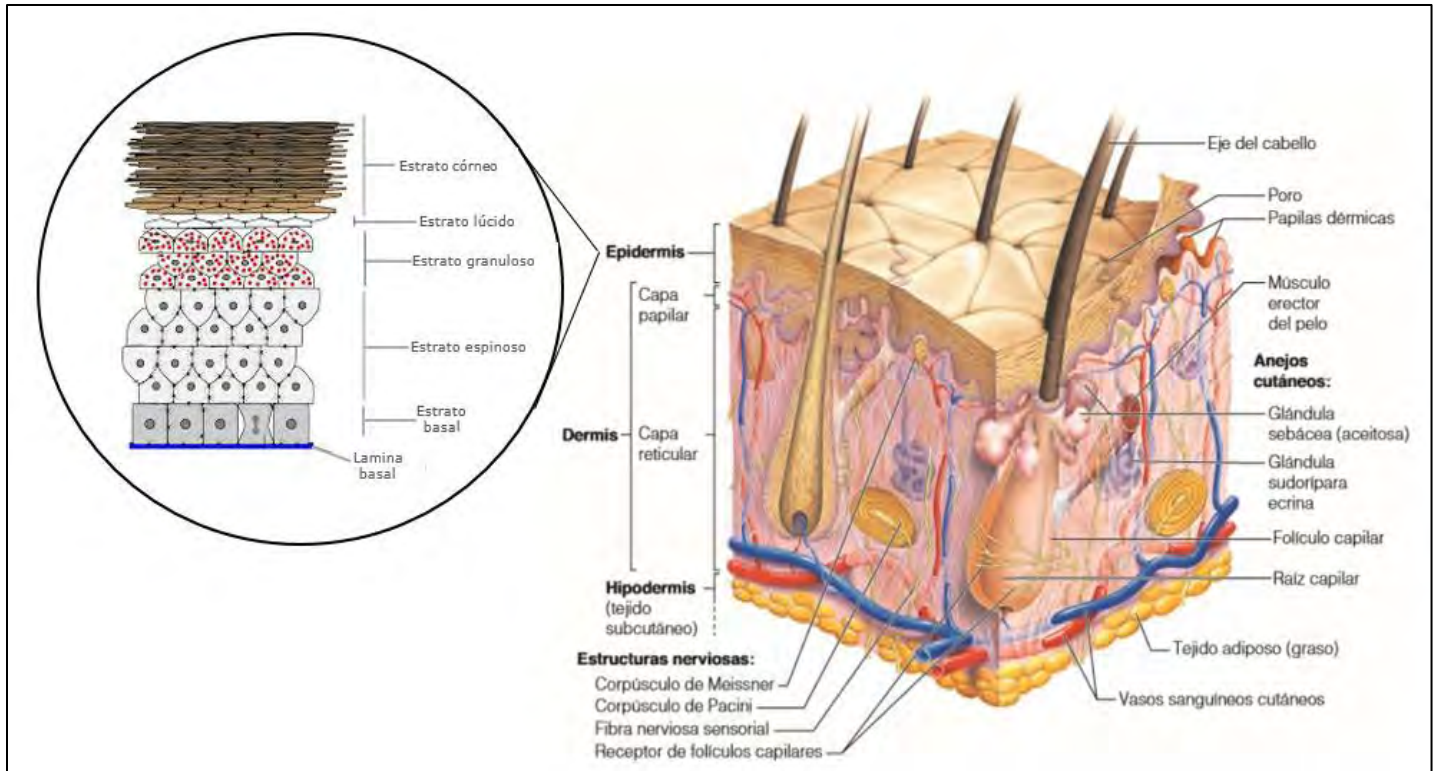


Figura 3. Estructura de la piel (Marieb 2008, Eucerin 2016).

2.3.1 Epidermis

La epidermis tiene un grosor de 60–800 μm (Garvie-Cook 2016) y está compuesta de epitelio escamoso poliestratificado que es capaz de queratinizarse y volverse más resistente. La epidermis es avascular, es decir, carece de suministro sanguíneo propio (Marieb 2008). Se compone predominantemente de queratinocitos, pero también contiene melanocitos, células de Merkel y células fagocíticas de Langerhans. Los queratinocitos producen proteínas estructurales tales como la queratina y los factores naturales de hidratación (NMF) (Menon 2015). Consta de hasta cinco capas o estratos, que de adentro hacia afuera son: estrato basal, espinoso, granuloso, lúcido y córneo (figura 3) (Marieb 2008).

El estrato basal o germinativo, se constituye por una sola capa de células epidérmicas que se encuentran conectadas a la dermis mediante la lámina basal. Esta capa recibe nutrientes mediante la difusión de estos desde la dermis. Estas células están dividiéndose constantemente y cada día se producen millones de células nuevas. Las células hijas migran hacia arriba, lejos de la fuente de nutrición, para pasar a formar parte de las capas epidérmicas más cercanas a la superficie de la piel. A medida que se alejan de la dermis y pasan a formar parte de las capas más superficiales, el estrato espinoso y después el estrato granuloso, se vuelven más finas y se llenan cada vez más de

queratina. Finalmente mueren, de modo que forman el terso estrato lúcido. Esta última capa epidérmica no se encuentra en todas las zonas cutáneas; sólo se produce donde la piel carece de vello y es más gruesa, es decir, en las palmas de las manos y las plantas de los pies (Marieb 2008).

La capa más externa, el estrato corneo (SC), tiene un grosor de entre 20 y 30 capas celulares (10-20 μm) (Schaefer, Redelmeier y Lademann 2011). Los remanentes celulares muertos a modo de placa, completamente llenos de queratina, se denominan cornificados. La queratina es una proteína excepcionalmente resistente. Su abundancia en el estrato córneo permite que la capa proporcione **un “abrigo” duradero para el cuerpo, que protege las células más profundas del entorno externo hostil (aire) y de las pérdidas de agua, y ayuda al cuerpo a resistir las agresiones biológicas, químicas y físicas.** El estrato córneo se frota y se descama lenta y continuamente. El contenido de agua del estrato córneo humano es típicamente alrededor de 15 a 20% del peso seco del tejido, aunque varía dependiendo de la humedad del ambiente y el estado de hidratación del individuo. Esta capa se sustituye por células producidas por la división de las células más profundas del estrato basal. Disponemos de una epidermis totalmente nueva cada 25 a 45 días (Marieb 2008).

La melanina, un pigmento que varía entre los colores amarillo, marrón y negro, se produce mediante células especiales con forma de araña denominadas melanocitos, que se encuentran principalmente en el estrato basal. Cuando la piel se expone a la luz solar, que estimula la producción del pigmento melanina por parte de los melanocitos, se produce el bronceado. A medida que los melanocitos producen melanina, ésta se acumula en ellos en los gránulos fijados a la membrana denominados melanosomas. A continuación, estos gránulos se desplazan hasta los extremos de los finos brazos de los melanocitos, donde son absorbidos por los queratinocitos más cercanos. Dentro de los queratinocitos, la melanina forma un pigmento de revestimiento en la parte superficial de sus núcleos para proteger su material genético de los efectos dañinos de la radiación ultravioleta de la luz solar (Marieb 2008).

2.3.2 Dermis

La dermis es la capa subyacente a la epidermis y tiene un grosor de 0.3–3 mm, se conforma de tejido conectivo denso en su mayor parte. La epidermis y la dermis están firmemente conectadas. No obstante, la aplicación de calor o fricción puede hacer que se separen (Marieb 2008). El tejido conectivo denso (fibroso) que forma la dermis consta de dos zonas principales: la papilar y la reticular. Al igual que la epidermis, la dermis varía en grosor. Por ejemplo es especialmente gruesa en las palmas de las manos y en las plantas de los pies, pero es bastante fina en los

párpados (Marieb 2008). La capa papilar es la zona dérmica superior; es irregular y cuenta con proyecciones de fijación desde la superficie superior, denominadas papilas dérmicas. Muchas de las papilas dérmicas contienen bucles capilares, que aportan nutrientes a la epidermis. Otras alojan receptores del dolor (terminaciones nerviosas libres) y entran en contacto con los receptores denominados corpúsculos de Meissner (Marieb 2008).

La capa reticular es la capa cutánea más profunda. Contiene vasos sanguíneos, glándulas sudoríparas y sebáceas y profundos receptores de presión denominados corpúsculos de pacini. Los fagocitos de esta zona (en realidad, de toda la dermis) actúan para evitar que las bacterias que hayan entrado a través de la epidermis penetren más en el organismo (Marieb 2008).

Tanto el colágeno como las fibras elásticas que se encuentran en toda la dermis, son responsables de la resistencia de la dermis; también atraen y fijan el agua y, así, ayudan a mantener la piel hidratada. Las fibras elásticas proporcionan a la piel su elasticidad (Marieb 2008).

La dermis recibe un abundante suministro de los vasos sanguíneos, que desempeñan una importante función en el mantenimiento de la temperatura corporal (homeostasis) (Marieb 2008).

2.3.3 Hipodermis

Por debajo de la dermis se encuentra el tejido subcutáneo o hipodermis, que es tejido adiposo principalmente, el cual fija la piel a los órganos subyacentes. El tejido subcutáneo actúa como un amortiguador de golpes y aísla los tejidos más profundos de los cambios de temperatura extremos que se producen fuera del organismo (Marieb 2008).

2.3.4 Anexos cutáneos

Los anexos cutáneos incluyen glándulas cutáneas, pelo y folículos capilares y uñas. Cada uno de estos apéndices surge de la epidermis y desempeña una función única en el mantenimiento de la homeostasis corporal (Marieb 2008).

2.3.4.1 Glándulas cutáneas

Las glándulas cutáneas son todas las glándulas exócrinas que liberan sus secreciones a la superficie cutánea mediante conductos. Se dividen en dos grupos: Glándulas sebáceas y glándulas sudoríparas. A medida que las células del estrato basal forman estas glándulas, éstas se introducen en las zonas más profundas de la piel y finalmente residen casi por completo en la dermis (Marieb 2008).

Las glándulas sebáceas o glándulas oleosas, se encuentran por toda la piel, excepto en las palmas de las manos y en las plantas de los pies. El producto de las glándulas sebáceas, el sebo, es una mezcla de sustancias aceitosas y células fragmentadas. El sebo es un lubricante que mantiene la piel suave y tersa y evita que el pelo se quiebre. El sebo también contiene sustancias químicas que evitan que las bacterias presentes en la superficie cutánea invadan las zonas más profundas de la piel (Marieb 2008).

Las glándulas sudoríparas están muy repartidas por la piel. Aunque su número varía, se estima que hay más de 2.5 millones por persona. Hay dos tipos de glándulas sudoríparas, ecrinas y apocrinas. Las glándulas ecrinas son mucho más numerosas y se encuentran por todo el cuerpo. Estas glándulas producen sudor, una secreción transparente formada principalmente por agua y algunas sales, vitamina C, restos de desperdicios metabólicos (amoníaco, urea, ácido úrico), y ácido láctico. El sudor posee un carácter ácido (pH de 4 a 6), una característica que inhibe el crecimiento de las bacterias. Estas glándulas sudoríparas son una parte importante y muy eficaz del sistema de regulación del calor corporal (Marieb 2008).

Las glándulas apocrinas están confinadas en gran medida a la zona de las axilas y a la zona genital del cuerpo. Su secreción contiene ácidos grasos y proteínas, así como todas las sustancias presentes en la secreción ecrina, por tanto puede tener un color lechoso o amarillento. Las glándulas apocrinas empiezan a funcionar durante la pubertad bajo la influencia de los andrógenos. También desempeñan una función ínfima en la regulación térmica (Marieb 2008).

2.3.4.2 Pelo y folículos capilares

El pelo es producido por un folículo capilar, una estructura epitelial flexible. La parte contenida en el folículo se denomina raíz, la parte que se proyecta desde la superficie del cuero cabelludo o de la piel se denomina eje. El pelo está formado por la división de las células epiteliales del estrato basal bien alimentado en la matriz (zona de crecimiento) del bulbo capilar del extremo inferior del folículo. A medida que las células hijas son expulsadas de la zona de crecimiento, se queratinizan y mueren. Así, la mayor parte del eje capilar es materia muerta y casi todo proteínas (Marieb 2008). Cada pelo consta de un núcleo central denominado médula, rodeado por una capa de corteza abultada. Por su parte, la corteza está encerrada por una cutícula más externa formada por una sola capa de células que se superponen entre sí como las tejas de un tejado. La cutícula es la zona más queratinizada, proporciona fortaleza y ayuda a mantener las capas capilares internas muy compactadas. Puesto que es más propensa a sufrir abrasiones, la cutícula tiende a desgastarse por la punta del eje, lo que hace que las fibrillas de

queratina de las zonas capilares internas se ricen, un fenómeno denominado “puntas abiertas”. El pigmento capilar lo componen los melanocitos del bulbo capilar, y se combinan cantidades variables de distintos tipos de melanina (amarilla, rojiza, marrón y negra) para producir todas las variedades de color capilar, desde el rubio claro hasta el negro (Marieb 2008).

2.3.5 Funciones de la piel

La piel y sus derivados desempeñan funciones críticas muy diversas, la mayoría de las cuales consisten en funciones de protección. (Norris 2012, Marieb 2008)

- **Protección:** Aísla y amortigua los órganos corporales más profundos y protege todo el organismo frente a daños mecánicos (golpes y cortes), daños químicos (como los de los ácidos y bases), daños térmicos (frío y calor), radiación ultravioleta (de la luz solar) y bacterias (Marieb 2008).
- **Termorregulación:** La sofisticada red capilar de la piel y las glándulas sudoríparas (ambas controladas por el sistema nervioso) desempeñan una importante función en la regulación de la pérdida de calor de la superficie corporal (Marieb 2008). La evaporación desde las glándulas ecrinas sudoríparas es crítica para la termorregulación. La dilatación y constricción vascular ayuda a regular el intercambio de calor en la piel para preservar el calor en climas fríos y eliminar el calor después del ejercicio (Norris 2012).
- **Respuesta inmunológica:** La piel es el arma más externa de la respuesta inmune y está diseñada para defender contra infecciones, células transformadas y toxinas por medio de la respuesta innata altamente desarrollada y la respuesta inmune adquirida local (Norris 2012). La piel también fabrica varias proteínas importantes para la inmunidad y sintetiza vitamina D (mediante la luz solar) (Marieb 2008).
- **Barrera a la pérdida de agua:** El estrato córneo es el componente crítico en la piel normal, el cual previene la pérdida de agua transepidermal (Norris 2012). Esta capa contiene grandes cantidades de queratina y está cornificada, o endurecida, para ayudar a evitar las pérdidas de agua de la superficie corporal (Marieb 2008).
- **Secreción de desechos:** Las glándulas sudoríparas ecrinas y apocrinas transportan desechos y también proporciona la excreción de sustancias odoríferas (Norris 2012). La piel actúa como un mini sistema excretor; la urea, las sales y el agua se pierden con el sudor (Marieb 2008).

- Sensación: La piel es el mayor órgano sensorial. La piel y membranas mucosas son los principales sitios de sensación placentera y también de sensaciones desagradables (Norris 2012). Los receptores sensoriales cutáneos, que en realidad forman parte del sistema nervioso, se encuentran en la piel. Estos diminutos sensores, entre los que se incluyen los receptores del tacto, presión, temperatura y dolor, proporcionan una gran cantidad de información sobre nuestro entorno externo. Nos alertan sobre golpes y la presencia de factores que dañan los tejidos al igual que nos hacen sentir el viento en el pelo y las caricias (Marieb 2008).

2.3.6 Vías de penetración cutánea

La absorción percutánea generalmente se refiere a la penetración de entidades extrañas en diferentes capas de la piel y, posteriormente, la permeación a través de la piel hasta alcanzar la circulación sistémica. La absorción percutánea depende de varios eventos; cuando un fármaco se aplica en la piel, éste difunde de forma pasiva desde la formulación y se particiona en el SC. El gradiente de concentración es el principal promotor para la administración transdérmica (Shahzad, y otros 2015).

Una vez que el fármaco se encuentra en el SC, hay tres vías principales por las que puede penetrar el SC: a través de los apéndices (transapendicular), a través de los dominios intercelulares (intercelular) y a través de las células (transcelular) (figura 4) (Alexander, y otros 2012, Schaefer, Redelmeier y Lademann 2011).

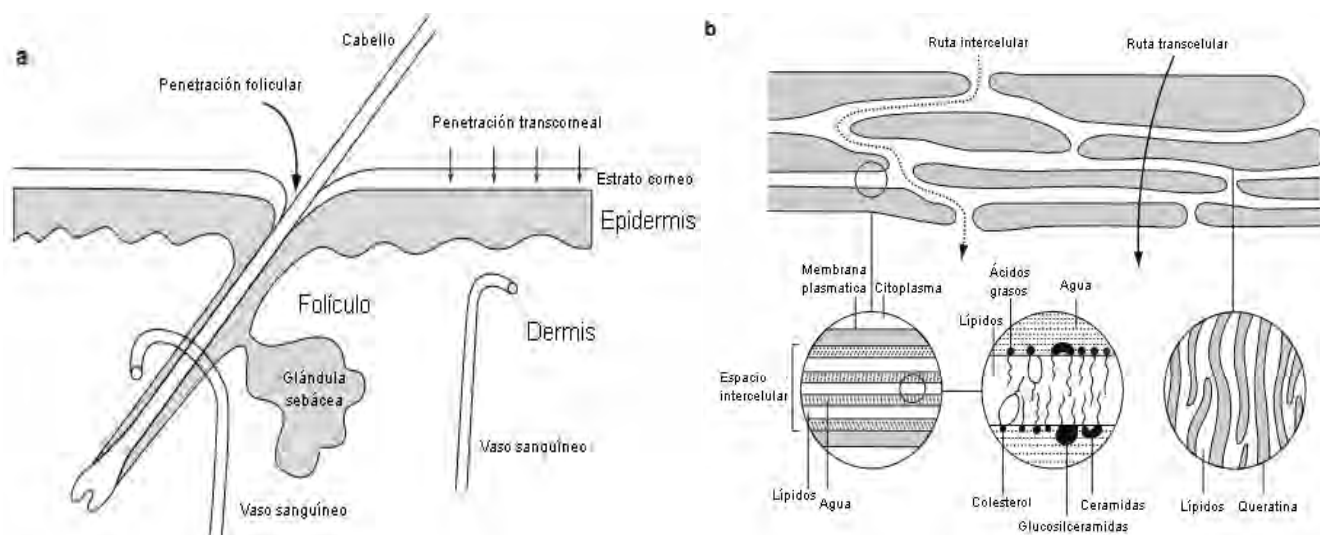


Figura 4. Diagrama representativo de las vías de penetración de fármacos. Modificada de Schaefer y col. 2011 (Schaefer, Redelmeier y Lademann 2011).

Estas vías no son mutuamente excluyentes, la mayoría de compuestos posiblemente entra o llega a circulación sistémica mediante una combinación de vías y la contribución relativa de cada una dependerá de las propiedades físico-químicas del fármaco (Hadgraft y Lane 2005, H. A. Benson 2012) y la densidad de apéndices en el sitio de aplicación (Garvie-Cook 2016, Alexander, y otros 2012).

La ruta transcelular requiere la penetración repetida del compuesto en y fuera de los corneocitos y los lípidos intercelulares. En esta ruta de permeación, por lo tanto, el compuesto debe difundirse a través de ambas regiones lipofílicas (lípidos) e hidrófilas (queratina hidratada dentro de corneocitos) del SC (Shahzad, y otros 2015, H. A. Benson 2012). La principal vía para la permeación de las moléculas pequeñas sin carga (<500 g/mol), es la intercelular. Los lípidos intercelulares, proporcionan la única fase continua dentro del SC, formando estructuras laminares entre corneocitos. La permeación de compuestos a través de esta ruta se cree que ocurre por difusión a lo largo de y/ o a través de las laminillas de lípidos que proporcionan el paso limitante (Schaefer, Redelmeier y Lademann 2011).

Los apéndices penetran en el SC y la epidermis, proporcionando una ruta para la penetración, que "no pasa por" la barrera. La densidad de apéndices varía, dependiendo de la localización anatómica, pero es consistentemente baja. Esta ruta que presenta una resistencia relativamente baja al transporte juega un papel importante en la iontoforesis y se piensa que es muy importante para los compuestos de baja difusividad en el EC, tales como compuestos hidrofílicos y de alto peso molecular (Schaefer, Redelmeier y Lademann 2011).

El transporte de fármacos a través del EC se produce por difusión pasiva (Alexander, y otros 2012). La permeación de una dosis infinita de una molécula aplicada a la superficie de la piel en un experimento *in vitro* se puede medir con el tiempo y se representa como la cantidad acumulada que penetra (Q) frente al tiempo. El flujo (J) de fármaco a través del EC en el estado estacionario, se puede ver de manera simple en base a la ley de difusión de Fick (ecuación 1) (Schaefer, Redelmeier y Lademann 2011, H. A. Benson 2012, Williams y Barry 2012):

$$J = \frac{dQ}{dt} = \frac{DPC}{h} \dots\dots\dots\text{Ecuación 1}$$

Donde Q es la cantidad que penetra por unidad de área, D es el coeficiente de difusión del fármaco en la piel, P es el coeficiente de reparto en la membrana, C es la concentración de fármaco, y h es el espesor de la membrana (H. A. Benson 2012). Debido a que el EC es la principal barrera para la mayoría de los fármacos, el coeficiente de difusión y la longitud del camino de la ruta intercelular a través del estrato córneo son más relevantes (H. A. Benson 2012).

2.4 Estrategias para incrementar la absorción transdérmica de fármacos

Debido a que el estrato corneo representa una excelente barrera, limita el número de moléculas que pueden ser administradas a través de la piel a tasas terapéuticamente relevantes por difusión pasiva, a unos pocos compuestos que poseen las propiedades fisicoquímicas y farmacológicas requeridas. Por ello, se ha realizado un extenso estudio para desarrollar estrategias para quebrantar, de una manera controlada y reversible, esta barrera (Alexander, y otros 2012).

Hoy en día se cuenta con métodos como los esquematizados en la figura 5, que permiten mejorar y controlar el transporte a través de la piel, y ampliar la cantidad de fármacos administrados por esta vía (fármacos hidrofóbicos, hidrofílicos y macromoléculas) (Paudel, y otros 2010). Estos métodos se dividen en químicos y físicos (Alexander, y otros 2012, Roussel, y otros 2015), y difieren respectivamente, en las estrategias utilizadas: 1) aumento de la permeabilidad mediante el uso de promotores de la permeación o de vehículos, matrices o estructuras que constituyen así mismo un promotor de la permeabilidad por difusión pasiva y/o 2) la generación de una fuerza motriz que actúa sobre el fármaco, las estructuras y apéndices de la piel. Así dentro de estas ingeniosas tecnologías desarrolladas podemos destacar en resumen desde potenciadores químicos hasta medios físicos como la iontoforesis, microporación y las ondas de presión generadas por los efectos de ultrasonido o la combinación sinérgica de técnicas (Alexander, y otros 2012). En cualquier caso es indispensable que la permeabilidad de la barrera se vea comprometida de manera reversible, recuperando su función una vez concluido el tratamiento (Ganem-Rondero 2011).

Además, han sido probadas varias combinaciones de métodos promotores y algunas de estas han dado lugar a un aumento en la penetración de fármacos en la piel. Muchas de estas combinaciones implican dos o tres métodos físicos, tales como la iontoforesis y la electroporación, electroporación y tratamiento con láser. Otros métodos comprenden combinaciones de un método eléctrico con potenciadores químicos. También se ha reportado el uso de métodos eléctricos con formulaciones a base del diseño de sistemas estructurados, tales como aquellas basadas en liposomas. En este contexto, sin embargo, existen sólo unos pocos estudios sobre la combinación de un método eléctrico con fármacos formulados en microemulsiones (Sintov y Brandys-Sitton 2006).

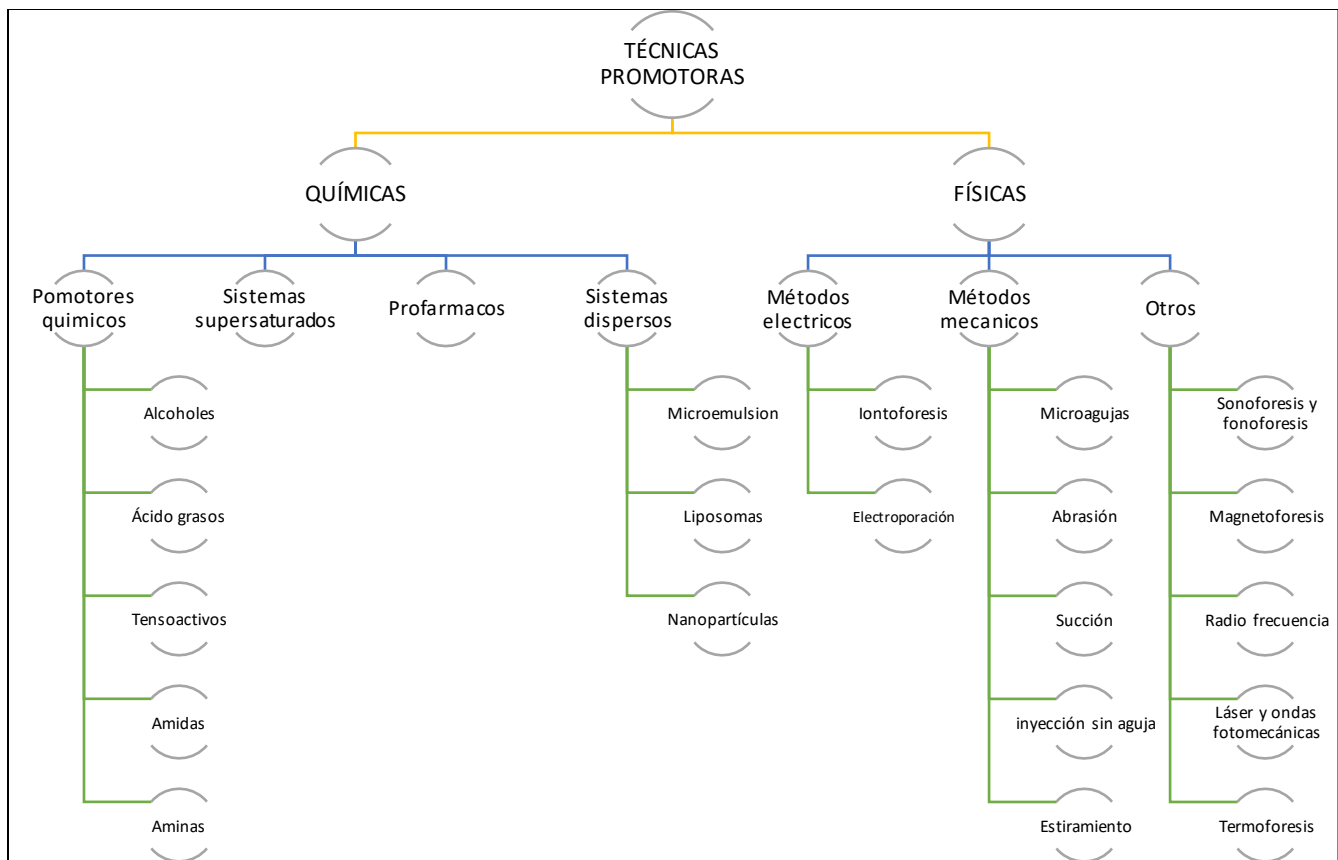


Figura 5. Algunas técnicas promotoras de la permeación (Brown, y otros 2006).

2.4.1 Promotores químicos de la absorción

Los promotores químicos o potenciadores químicos de la penetración, son compuestos farmacológicamente inactivos que interactúan con los componentes del SC, aumentando la permeabilidad de la piel de una manera temporal (H. A. Benson 2012, Alexander, y otros 2012). Estos compuestos se incorporan en una formulación para mejorar la difusividad y solubilidad de fármacos a través de la piel, lo cual reduce de forma reversible la resistencia de barrera de la piel, permitiendo que el fármaco penetre en los tejidos viables y llegue a la circulación sistémica (Alexander, y otros 2012, Williams y Barry 2012). Eludir esta barrera es un requisito previo para una eficaz administración dérmica/transdérmica de los fármacos (Dragicevic , Atkinson y Maibach 2015).

Las ventajas de los potenciadores químicos sobre los físicos (tales como iontoforesis, sonoforesis, electroporación, etc.), son: flexibilidad de diseño, facilidad de aplicación, posibilidad de autoadministración, administración de fármaco a través de sistemas de liberación prolongada, cumplimiento por parte del paciente y su incorporación en formulaciones simples y de bajo costo. Sin embargo, dentro de las desventajas de estos compuestos tenemos la

posibilidad de causar irritación en la piel; algunos tienen baja eficacia en los niveles terapéuticos utilizados, y no mejoran la administración de macromoléculas (Dragicevic , Atkinson y Maibach 2015). Algunas de las propiedades más deseables para los potenciadores de la penetración han sido reportadas como (Dragicevic , Atkinson y Maibach 2015, H. A. Benson 2012, Williams y Barry 2012):

- No debe irritar la piel y no debe ser tóxico ni alergénico.
- Debe tener un efecto rápido, reproducible y predecible, pero sin presentar actividad farmacológica.
- Debe trabajar unidireccionalmente, es decir, mejorar la penetración del fármaco en la piel, mientras que evita la salida de material endógeno del cuerpo.
- Tras la eliminación del potenciador, se espera una recuperación rápida y completa de las propiedades de la piel.
- Debe ser compatible con los fármacos y excipientes en la formulación.
- Debe ser cosméticamente aceptable cuando se aplica a la piel.

A pesar de mostrar algunas limitaciones, un grupo consistente de compuestos químicos se ha utilizado durante años con seguridad y eficacia en los sistemas dérmicos y transdérmicos (Dragicevic , Atkinson y Maibach 2015). El efecto **de estos promotores puede explicarse en parte por la teoría propuesta por Barry conocida como “Partición lípido-proteína” la cual propone que estas sustancias pueden** incrementar la administración transdérmica de fármacos mediante mecanismos como (Williams y Barry 2012):

- a) Interrupción de la bicapa lipídica intercelular (modificación de lípidos-figura 6)
- b) Interacción con las proteínas intracelulares del SC (modificación de proteínas)
- c) El aumento de la partición de un fármaco, co-promotor o co-disolvente en el SC (promoción de partición)

Sin embargo también pueden modificar la actividad termodinámica del fármaco en la formulación transdérmica (H. A. Benson 2012), pudiendo ser clasificados en base a la relación estructural que presentan (tabla 2) y a menudo funcionan bien cuando se usan juntos, es decir, que muestran efectos sinérgicos en la mejora de la penetración del fármaco en y a través de la piel (Williams y Barry 2012).

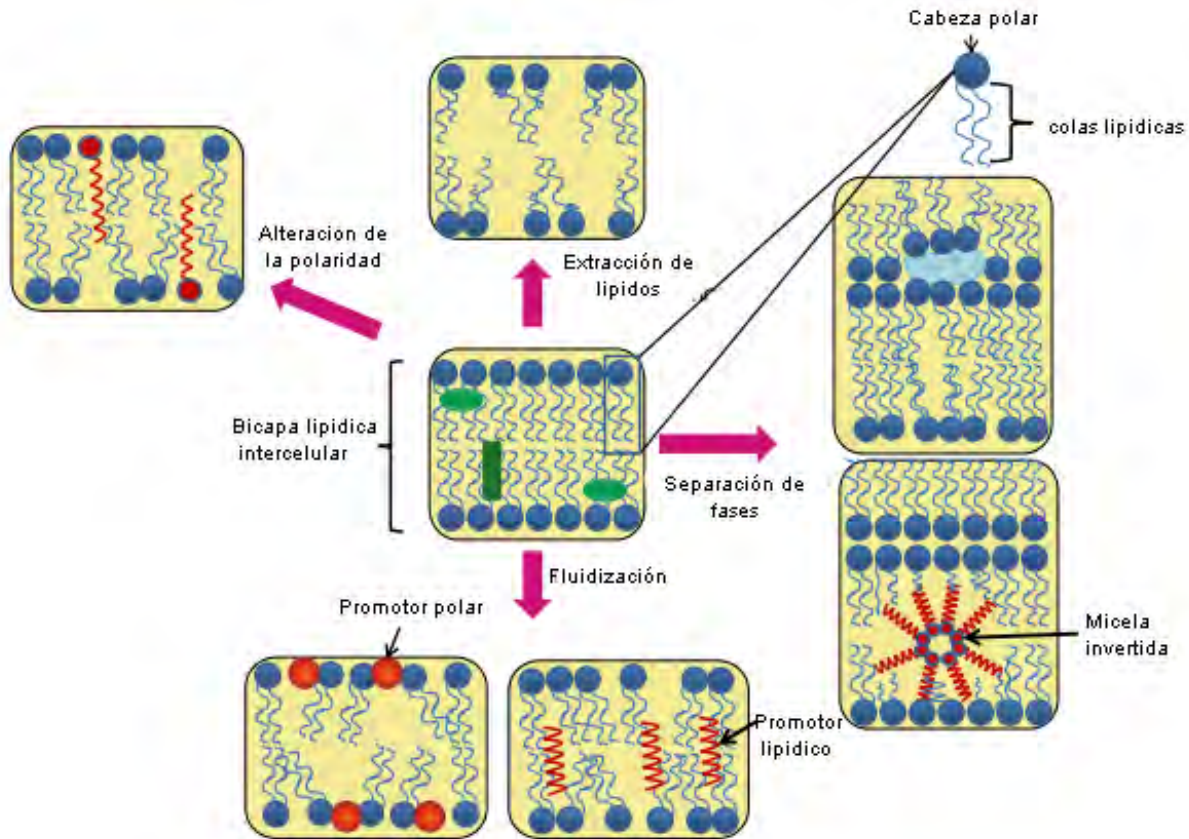


Figura 6. Posibles efectos de los potenciadores químicos de la penetración en la estructura de la bicapa lipídica (Roussel, y otros 2015).

Tabla 2. Clasificación de algunos promotores químicos, ejemplos y mecanismos de acción.

Promotor	Ejemplos	Mecanismo	REF.
Alcoholes	Etanol Novo™ (Alcohol oleico)	<ul style="list-style-type: none"> Extracción y fluidización de lípidos Extracción de proteínas Hinchamiento de la capa córnea Aumento de la partición del fármaco, solubilidad del fármaco y el cambio de la actividad termodinámica del fármaco 	(Karande y Mitragotri 2009, Roussel, y otros 2015, Dragicevic , Atkinson y Maibach 2015)
Amidas	Azone® Cicloamidas	<ul style="list-style-type: none"> Fluidificación de los lípidos estructurales del EC o el cambio de la fuerza impulsora termodinámica través de la piel 	(Dragicevic , Atkinson y Maibach 2015, H. A. Benson 2012, Chen, y otros 2014)
Ácidos grasos	Ácido oleico	<ul style="list-style-type: none"> Perturbación de la bicapa lipídica Fluidificación de los lípidos estructurales del EC 	(Walker y Smith 1996, H. A. Benson 2012)
Esteres	Miristato de isopropilo, Palmitato de isopropilo	<ul style="list-style-type: none"> Aumento de la fluidez de la bicapa lipídica Incremento de la solubilidad del fármaco en el EC 	(H. A. Benson 2012, Walker y Smith 1996)
Alcoholes de éter	Transcutol®	<ul style="list-style-type: none"> Incremento de la solubilidad del fármaco en el EC 	(Dragicevic , Atkinson y Maibach 2015, H. A. Benson 2012, Williams y Barry 2012)

Tensoactivos	Tensoactivos no iónicos Polisorbatos (Tween® 20, Tween® 80, Brij®, Kolliphor® EL, etc.)	<ul style="list-style-type: none"> • Aumento de la fluidez de la bicapa lipídica, solubilización y extracción de los lípidos • Interacciones con los filamentos de queratina en los corneocitos • Cambio de la actividad termodinámica del fármaco, lo que permite la penetración más eficaz en la piel 	(Dragicevic , Atkinson y Maibach 2015, Karande y Mitragotri 2009, Williams y Barry 2012)
Sulfóxidos y análogos	Dimetilsulfoxido (DMSO)	<ul style="list-style-type: none"> • Extracción de lípidos de la piel e interacción con las cadenas alquilo • Interacciones con la queratina, cambio de la conformación helicoidal α a β • Desplazamiento de las moléculas de agua presentes en las proteínas y de los grupos polares de los lípidos 	(Walker y Smith 1996, H. Benson 2005, Williams y Barry 2012)
Terpenos y sus derivados	D-limoneno L-mentol	<ul style="list-style-type: none"> • Disrupción del dominio lipídico intercelular (Fármacos hidrofílicos) • Aumento de la partición de fármaco en el EC (Fármacos lipofílicos) • Incremento en la conductividad eléctrica del EC dando lugar a vías de entrada para compuestos polares 	(Walker y Smith 1996, Dragicevic , Atkinson y Maibach 2015, Williams y Barry 2012)
Fosfolípidos	Fosfatidilcolina	<ul style="list-style-type: none"> • Las estructuras de auto ensamble mejoran la partición del fármaco encapsulado y perturban la bicapa lipídica 	(Karande y Mitragotri 2009, Dragicevic , Atkinson y Maibach 2015)
	Agua	<ul style="list-style-type: none"> • Perturbación de la bicapa lipídica • Hidratación del EC 	(Roussel, y otros 2015, Dragicevic , Atkinson y Maibach 2015, H. Benson 2005)

2.4.2 Promotores físicos de la absorción

La posibilidad de aumentar el número de fármacos administrados en la piel o aumentar la permeación de aquellas moléculas que presentan baja permeabilidad no puede llevarse a cabo eficazmente en todos los casos mediante el uso de promotores químicos. El uso de técnicas físicas proporciona un método alternativo eficaz para la mejora de la permeación en tales casos (Walker y Smith 1996). La forma física más antigua y por mucho la más popular para superar la barrera de la piel es el uso de agujas hipodérmicas. En muchos casos es el único método viable para administrar compuestos poco permeables y altamente inestables (Paudel, y otros 2010). Sin embargo, este método causa dolor y trauma.

Para hacer frente a estos inconvenientes, se han investigado varios métodos para mejorar la administración a través de la piel, tales como métodos mecánicos: Inyección directa (por ejemplo, microagujas o inyecciones a presión), la cual permite irrumpir el SC para administrar una sustancia activa a una profundidad predeterminada, tratamiento con cintas adhesivas, microdermoabrasión o abrasión térmica, las cuales mejoran la penetración (en parte) mediante la reducción del espesor del estrato corneo, mientras que la flexión o el estiramiento puede causar un debilitamiento general de la barrera. El masaje también puede promover la ruta de entrega folicular, que se muestra en particular para micropartículas, que pueden ser cargadas con un fármaco para crear un reservorio. Por otra parte, el uso de

láseres o tecnologías cavitacionales eliminan la barrera del SC en sitios discretos, formando microporos o microcanales a través de los cuales puede ocurrir la difusión. Por último, existen tecnologías como la sonoforesis, magnetoforesis e iontoforesis, las cuales se basan en la aplicación de corrientes y/o campos eléctricos o magnéticos, diseñados para mejorar la penetración mediante el aumento de la fuerza de accionamiento de un penetrante (H. A. Benson 2012).

Estos métodos permiten desarrollar sistemas de fácil uso y proporcionar esquemas de administración flexibles, siendo capaces de producir perfiles de administración tipo bolo, así como liberación sostenida de fármacos (Paudel, y otros 2010). Básicamente, estas técnicas se aplican con el objetivo de: (a) promover la penetración de fármacos que normalmente no atraviesan la barrera cutánea (fármacos de alto peso molecular como pueden ser hormonas), (b) aumentar la penetración de aquellos fármacos que penetran en concentraciones subterapéuticas y (c) reducir los periodos de latencia de aquellos productos aplicados tópicamente (H. A. Benson 2012).

2.4.2.1 Iontoforesis

La iontoforesis provee una alternativa no invasiva para la administración de fármacos (Kalia, y otros 2004). Permite una administración controlada mediante la aplicación de una corriente constante de bajo voltaje (Kalia, y otros 2004, Ganem-Rondero 2011) la cual implica la aplicación de un pequeño potencial eléctrico para mantener dicha corriente constante, lo cual permite el transporte de moléculas polares y cargadas a través de la piel (Kalia, y otros 2004). La velocidad de liberación se modula variando la densidad de corriente (Ganem-Rondero 2011), ya que la cantidad de fármaco administrado es directamente proporcional a la cantidad de carga que pasa; por lo tanto, ambos factores, cantidad de dosis y velocidad de liberación y absorción dependen de la corriente aplicada, la duración de dicha corriente y el área superficial de la piel en contacto con el compartimento del electrodo (Kalia, y otros 2004).

Otras ventajas incluyen un rápido inicio del efecto farmacológico y la posibilidad de detener el transporte una vez que la corriente se interrumpe, además de que ha permitido aumentar el número de fármacos que pueden ser administrados mediante esta ruta, el perfil se puede personalizar para lograr la cinética de administración de fármaco deseada dependiendo de si se requiere un suministro continuo o pulsátil, reduce la variabilidad intra e inter individual (Kalia, y otros 2004) y proporciona un suministro más eficiente por unidad de área correspondiente a una reducción sustancial en el área superficial (por ejemplo, pueden usarse parches de menor tamaño) (Kalaria, y otros 2012). Hay, sin embargo, sólo unos pocos estudios sobre la combinación de un método eléctrico con fármacos formulados en microemulsiones (Sintov y Brandys-Sitton 2006).

2.4.2.1.1 Electroquímica de la Iontoforesis

Un dispositivo iontoforético comprende una fuente de alimentación y dos compartimientos de electrodos (figura 7). La formulación del fármaco que contiene la molécula ionizada (D^+) se coloca en el compartimiento del electrodo que tiene la misma carga. El electrodo con carga opuesta se coloca en un sitio distal en la piel. Aunque hay muchos tipos de electrodos, el más adecuado para la iontoforesis es el par $Ag/AgCl$, ya que evita los descensos bruscos de pH que se ven con otros electrodos (por ejemplo electrodos Pt -metálicos). Los electrodos de $Ag/AgCl$ tienen la ventaja de que su electroquímica se produce a voltajes más bajos que los necesarios para la electrólisis del agua, la cual es indeseable por dos razones: primero, los protones generados en el ánodo compiten por la carga y debido a su pequeño tamaño y la alta movilidad, pueden reducir significativamente la eficiencia de suministro de fármaco; y segundo, el pH bajo producido en el compartimiento anódico puede conducir a quemaduras en la piel debidas al ácido y puede tener un efecto adverso sobre la estabilidad del fármaco. Una vez que se aplica la corriente, el campo eléctrico impone una direccionalidad del movimiento de los iones presentes: movimiento del compartimiento anódico hacia el catódico en el caso de las cargas positivas, mientras que los aniones se mueven en la dirección opuesta (Kalia, y otros 2004).

La electroquímica que ocurre en el ánodo Ag requiere la presencia de iones Cl^- en el compartimiento anódico: este requisito por lo general conduce a una disminución en la eficiencia de administración de fármacos, ya que el $NaCl$ comúnmente utilizado para proporcionar Cl^- también introduce concentraciones significativas de iones Na^+ de gran movilidad que compiten de manera muy eficaz con el fármaco para transportar corriente. A medida que los iones Cl^- llegan a la interfaz electrodo-solución, reaccionan con la plata metálica para formar cloruro de plata, que a causa de su bajo producto de solubilidad, se deposita en la superficie del electrodo, liberando al mismo tiempo un electrón. A fin de mantener la electroneutralidad en el compartimiento anódico, un catión debe moverse fuera del compartimiento e ir hacia la piel o un anión debe dejar la piel y pasar a la cámara anódica. En el compartimiento catódico, el $AgCl$ se reduce por la llegada de los electrones de la fuente de alimentación y produce plata metálica junto con un ion Cl^- , que pasa a la solución. De nuevo, para mantener la electroneutralidad, esto debe ser compensado por la llegada al cátodo de un catión proveniente de la piel o por la pérdida de un anión. Dado que el circuito eléctrico se completa con los iones inorgánicos endógenos que están presentes en la piel, principalmente Na^+ y Cl^- , estas últimas especies pueden tener un impacto sobre la eficiencia de transporte de fármacos (Kalia, y otros 2004).

El uso de puentes salinos permite reducir la cantidad de cationes en competencia en el compartimiento donador, ya que el puente salino contiene suficientes iones Cl^- , añadidos como $NaCl$, para mantener la electroquímica anódica,

lo cual permite controlar los efectos de los iones inorgánicos en la eficiencia de transporte del fármaco (Ackaert, y otros 2010).

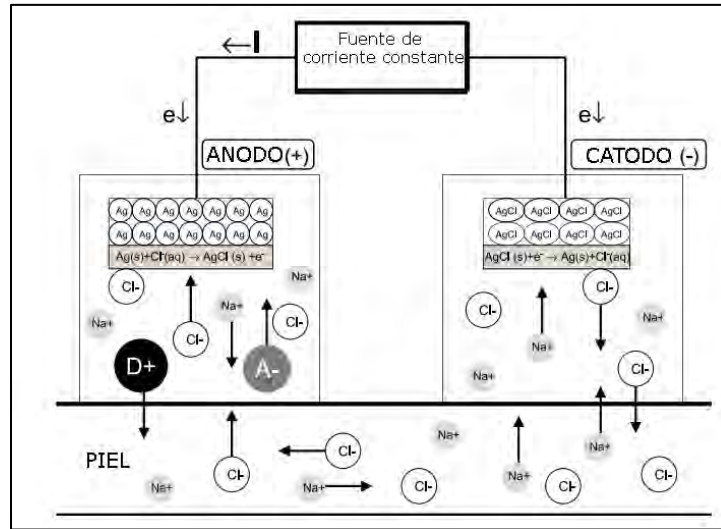


Figura 7. Esquema de un sistema iontoforético.

2.4.2.1.2 Mecanismos de transporte iontoforético

Ha habido una serie de análisis detallados de los mecanismos de la iontoforesis y fenómenos iontoforéticos. La iontoforesis mejora la administración de fármacos a través de la piel mediante tres mecanismos, los cuales están implicados en el transporte de fármacos: (1) permeación pasiva a través de la piel, (2) electrorepulsión o electromigración, en el que el ion es repelido desde un electrodo de la misma carga, y (3) la electroósmosis, que es el movimiento de convección de un disolvente a través de un "poro" cargado en respuesta al paso preferente de iones contrarios cuando se aplica un campo eléctrico (Guy, y otros 2000).

La importancia relativa de la electrorepulsión y electroósmosis depende de las características físico-químicas y eléctricas de la membrana y del permeante.

El flujo iontoforético observado de una especie cargada, X, en el estado estacionario se puede considerar como la suma de estos 2 mecanismos de transporte separados: electromigración J_X^{EM} y electroósmosis J_X^{EO} , asumiendo que la permeabilidad pasiva es insignificante (ecuación 2).

$$J_X^T = J_X^{EM} + J_X^{EO} \dots\dots\dots \text{Ecuación 2}$$

La electromigración se refiere al efecto directo del campo eléctrico aplicado en las especies cargadas presentes en la formulación, por lo que el transporte de fármacos catiónicos se mejora desde el compartimiento anódico en la piel, y el de los fármacos aniónicos se promueve desde el cátodo (Marro, y otros 2001).

La electroósmosis puede ser explicada como el flujo de volumen inducido por el flujo de corriente, en otras palabras, el movimiento de carga, a través de una membrana. A un nivel molecular, la electroósmosis puede ser vista como el resultado del hecho de que la piel tiene un punto isoeléctrico de ~4-4,5, por encima del cual los grupos carboxilato presentes en la membrana se ionizan (Kalia, y otros 2004), por lo que la piel se comporta como una membrana negativa (Marro, y otros 2001). La aplicación de un campo eléctrico a través de una membrana cargada favorece el movimiento de los contra-iones que tratan de neutralizar la carga de la membrana y, en el caso de la piel, da lugar a su permeabilidad selectiva a los cationes (Kalia, y otros 2004). Este flujo de corriente inducida facilita el transporte de cationes, inhibe la de aniones, y permite el transporte transdérmico mejorado de, solutos polares neutros por iontoforesis (Marro, y otros 2001).

La electroósmosis se puede definir ya sea como un proceso de flujo, que es el flujo de volumen por unidad de área por unidad de tiempo (por ejemplo, $\mu\text{L}/\text{cm}^2\text{h}$) o como una velocidad de disolvente, v , en cuyo caso, es equivalente a un coeficiente de permeabilidad con sus unidades correspondientes, por ejemplo cm/h . La existencia de este flujo de disolvente en la dirección del ánodo al cátodo significa que (i) las moléculas neutras pueden ser entregadas por iontoforesis anódica y (ii) los cationes pueden beneficiarse de una segunda fuerza además de la electromigración. Como regla general, la movilidad eléctrica disminuye con el peso molecular y, como consecuencia, la contribución electroosmótica debe ser cada vez más importante para las moléculas más grandes (Guy, y otros 2000).

Varias moléculas marcadoras, como manitol-C14 y acetaminofén (ACM), están disponibles para estimar la contribución electroosmótica durante el transporte iontoforético. En los últimos años el acetaminofén ha ganado mayor interés que el manitol-C14, debido a sus ventajas prácticas (Ackaert, y otros 2010).

ACM es un compuesto hidrofílico neutro, con una baja permeabilidad pasiva, el cual puede ser administrado a través de la piel mediante iontoforesis y dicho transporte se puede atribuir exclusivamente a la electroósmosis (Ackaert, y otros 2010, Schuetz, y otros 2005). Durante la iontoforesis, la velocidad V_w del flujo inducido por la corriente del agua a través de la piel se puede estimar a partir de (Marro, y otros 2001):

$$V_w = \frac{J_{ACM}}{C_{ACM}} \dots\dots\dots \text{Ecuación 3}$$

Donde J_{ACM} es el flujo de acetaminofén y C_{ACM} es la concentración de acetaminofén en el compartimento donador. De ello se desprende que si V_w se cuantifica en presencia de fármaco, entonces el componente convectivo de su transporte iontoforético (J_{EO}) se puede calcular multiplicando V_w por la concentración de fármaco en el compartimento donador ($C_{Fármaco}$) (Marro, y otros 2001):

$$J_{EO} = V_w * C_{Fármaco} \dots \dots \dots \text{Ecuación 4}$$

Además, la carga negativa de la piel puede ser reducida, neutralizada, o incluso revertida por la iontoforesis de determinadas especies lipófilas catiónicas. La electroósmosis a través de la barrera es atenuada significativamente por la asociación de estos compuestos con los sitios fijos de carga negativa en la piel (Guy, y otros 2000). El uso de co-iontoforesis de acetaminofén con fármaco permite calcular el factor de inhibición electroosmótico (FI) que permite evaluar el efecto del transporte del fármaco en la permeoselectividad de la piel (ecuación 5).

$$FI = \frac{Q_{ACM, control}}{Q_{ACM}} \dots \dots \dots \text{Ecuación 5}$$

Donde $Q_{ACM, control}$ es la cantidad acumulada de ACM administrada durante la iontoforesis, y Q_{ACM} es el valor correspondiente obtenido utilizando co-iontoforesis de acetaminofén y el fármaco en estudio (Schuetz, y otros 2005).

2.4.2.2 Microporación láser

La microporación láser proporciona varias ventajas: es una técnica libre de agujas, no produce residuos biológicos peligrosos, permite mitigar los riesgos asociados con las inyecciones (reutilización de agujas y el dolor). El dispositivo láser se puede utilizar repetidamente, en contraste con el uso de parches con microagujas. El área y la profundidad de los poros es reproducible, asegurando que la administración es controlable y predecible; es posible generar poros de menor profundidad para obtener un efecto local (aplicaciones dermatológicas) o de mayor profundidad, cuando se desea un efecto sistémico (Dubey 2012, Garvie-Cook 2016). Esta técnica también mejora la administración de macromoléculas. Actualmente se cuenta con dispositivos comercialmente disponibles para producir microporos en la piel y mejorar la administración de fármacos aplicados tópicamente (Garvie-Cook 2016).

La abrasión fototérmica se consigue mediante el calentamiento rápido de un cromóforo diana (p or ejemplo colágeno, melanina y agua) dentro del tejido. El agua presente en el tejido circundante absorbe la radiación láser y se calienta, la posterior vaporización de ésta conduce a una acumulación de presión dentro del tejido. El incremento de presión ocasiona una micro-explosión y por lo tanto la ablación del material circundante. En el caso de pulsos láser cortos,

su duración puede ser menor que el tiempo de relajación térmica del componente diana en el tejido, lo que resulta en poca transferencia de calor, y por lo tanto menos daño, en el tejido circundante (Garvie-Cook 2016).

Dentro de los parámetros importantes a tomar en cuenta al utilizar un dispositivo láser, tenemos la potencia, la cual se define en términos de Fluencia (Energía aplicada por unidad de superficie -J/cm²) e irradiancia (potencia aplicada por unidad de superficie-W/cm²). Bachhav y colaboradores (Bachhav, y otros 2010) han demostrado que el aumento de la fluencia (y por tanto potencia) conduce a una mayor profundidad de los poros (Bachhav, y otros 2010) lo cual también permite controlar los daños en la piel. Idealmente la duración del pulso debe ser inferior al tiempo de relajación térmica (tiempo requerido para que el blanco disipe la mitad de la energía térmica incidente el cual oscila de nano a milisegundos) y la frecuencia (número de impulsos emitidos por segundo-Hz) debe ser optimizada con respecto a las propiedades de conductancia de calor del tejido (Dubey 2012), para mitigar los daños en el tejido. Una aplicación ideal deberá ser tal que resulte en un daño mínimo con el máximo de permeación en el menor tiempo (Dubey 2012).

Los láseres más comúnmente utilizados para aplicaciones médicas y de medicamentos se resumen en la tabla 3. Actualmente se prefiere utilizar láseres IR en lugar de UV con el objetivo de aumentar la potencia del láser para disminuir el daño tisular (Dubey 2012).

Tabla 3. Tipos de láseres utilizados para aplicaciones médicas y administración transdérmica de fármacos (Dubey 2012).

LASER	TIPO DE MEDIO LASER	LONGITUD DE ONDA TÍPICA
CO ₂	Gas (Dióxido de carbono)	9.4 y 10.6 μm
Rubí	Estado sólido (Cristal de rubí)	694.3 nm
Nd:YAG	Estado sólido (Cristal de Itrio y aluminio-dopado con Neodimio; Nd:Y ₃ Al ₅ O ₁₂)	532 a 1064 nm
Er:YAG	Estado sólido (Cristal de Itrio y aluminio-dopado con Erblio; Er:Y ₃ Al ₅ O ₁₂)	2940 nm

El dispositivo de mano PLEASE® (Precise Laser Epidermal System), desarrollado por Pantec Biosolutions AG (Schellenberg, Liechtenstein), utiliza un láser fraccional Er:YAG (figura 8a) que emite luz a 2.94 micras; la principal longitud de onda de absorción de las moléculas de agua (figura 8b), para crear microporos en la piel, tanto para mejorar la administración de fármacos como para procedimientos cosméticos (Garvie-Cook 2016, Bachhav, y otros 2010, Dubey 2012). Este dispositivo permite adaptar el número de poros y la fluencia, de acuerdo a la aplicación deseada [47]. Los poros creados utilizando este dispositivo son de aproximadamente 150 a 200 micras de diámetro (Garvie-Cook 2016). Debido a la aplicación selectiva de energía y pulsos de duración corta (se sabe que el láser

pulsado es más seguro para aplicaciones dermatológicas (Bachhav, y otros 2010)) menores al tiempo de relajación de agua, se garantiza una mínima transferencia de calor al tejido cercano [6]. El dispositivo utiliza un láser de barrido especialmente diseñado para crear una matriz (arreglo) de microporos definida por el usuario en la superficie de la piel. Por lo tanto, es posible crear varios cientos de microporos con una profundidad dada en unos pocos segundos (Bachhav, y otros 2010).

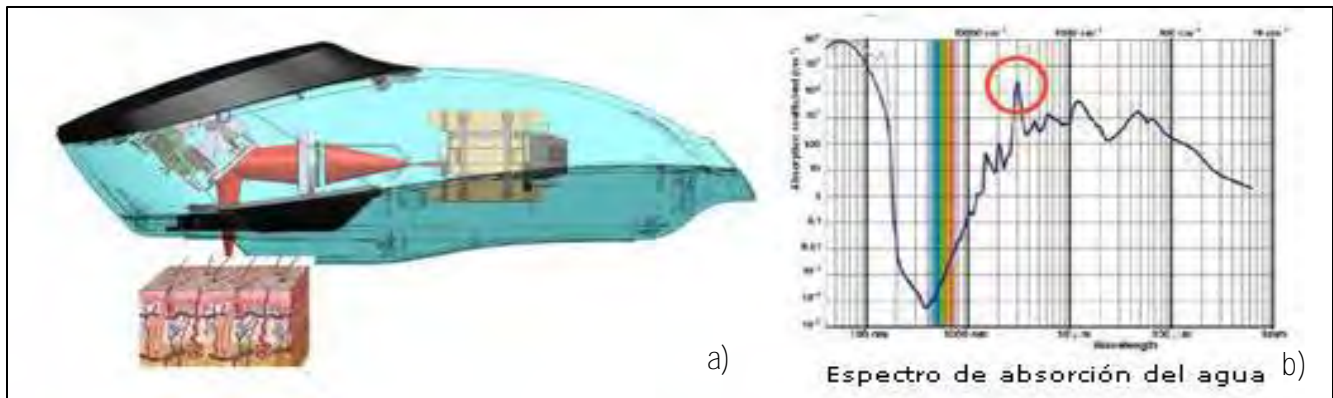


Figura 8. a) Sistema P.L.E.A.S.E, b) Espectro de absorción del agua (Pantec biosolutions 2015)

Dentro de los efectos adversos de la ablación mediante el uso de láser fraccional de ER:YAG y CO₂ se encuentran: la irritación de la piel y la inflamación, cicatrización, una retardada reepitelización y eritema (enrojecimiento de la piel), con largos tiempos de recuperación. Sin embargo, se reportan menos de estos síntomas cuando se utilizan láseres fraccionales. El tiempo de curación es una preocupación, especialmente cuando se consideran múltiples tratamientos a largo plazo. El costo y el complejo diseño de los sistemas de microporación se consideran inconvenientes en cuanto a su uso (Garvie-Cook 2016).

El tratamiento y diagnóstico del cáncer se encuentran entre las primeras aplicaciones del láser, ya que se ha reportado la administración de 5-fluorouracilo (5-FU), metotrexato, ácido 5-aminolevulínico (diagnóstico fotodinámico), analgésicos y anestésicos locales (Dubey 2012). También se ha combinado la microporación en combinación con iontoforesis, observándose un efecto sinérgico, el cual mejora la permeación (Dubey 2012). Aparte de fármacos pequeños, la microporación láser permite administrar macromoléculas a través de la piel y ha mostrado prometedores resultados en la vacunación por vía transdérmica (Dubey 2012).

2.5 Microemulsiones

El concepto de microemulsión (ME) fue introducido en 1943 por Hoar y Schulman quienes obtuvieron una solución transparente por titulación de una emulsión con hexanol (Hoar y Schulman 1943). Schulman y colaboradores

acuñaron el término microemulsión en 1959. La definición establecida por Danielsson y Lindman en 1981 es usada frecuentemente como punto de referencia, de esta manera una ME se define como un sistema disperso compuesto por agua, aceite y por lo menos un compuesto anfílico, que se presenta como una solución líquida ópticamente isotrópica y termodinámicamente estable (Danielsson y Lindman 1981, Lawrence y Rees 2012) (figura 9).

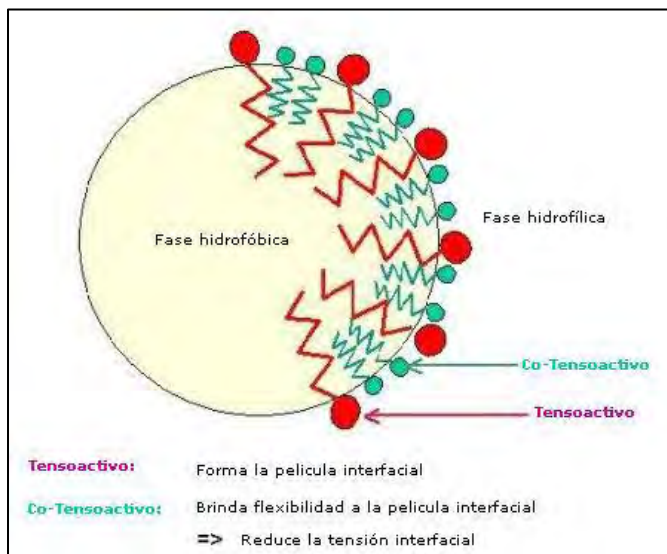


Figura 9. Estructura de una ME

El término microemulsión parece implicar una estrecha relación con las emulsiones ordinarias o convencionales, y esto podría ser engañoso, ya que las microemulsiones difieren significativamente de las emulsiones (macroemulsiones) (Lu y Gao 2010) (tabla 4).

Tabla 4. Diferencias entre emulsión y microemulsión.

PROPIEDADES	EMULSIÓN	MICROEMULSIÓN
Aspecto	Lechosa y opaca	Transparente
Formación	Homogenización	Espontánea
Estabilidad	Cinética	Termodinámica
Tamaño de la fase dispersa	0.15 – 100 μm	10-200 nm
Viscosidad	Alta	Baja
Concentración de surfactante	Baja	Alta

Para poder obtener una microemulsión es necesario que la energía libre (ΔG) involucrada al incrementar el área interfacial sea negativa, por lo que un requisito esencial es que la tensión interfacial entre el componente oleoso y el agua (γ) se reduzca a un valor muy bajo mediante la película interfacial, mientras que la dispersión de las gotas en la fase continua incrementa la entropía del sistema (ecuación 6). La adición de un tensoactivo y co-tensoactivo puede disminuir la tensión interfacial a un valor muy bajo (Moulik y Rakshit 2006), logrando que la energía libre sea

negativa debido a que la entropía de la dispersión de las gotitas en la fase continua supera el producto positivo de la pequeña tensión y la gran área interfacial.

$$\Delta G_f = \gamma \Delta A - T \Delta S \dots \dots \dots \text{Ecuación 6}$$

Donde ΔG es la energía libre de formación, γ es la tensión superficial en la interface aceite-agua, ΔA es el cambio en el área interfacial en la microemulsificación, ΔS es el cambio en la entropía del sistema, la cual corresponde a la entropía de dispersión y T es la temperatura (Eccleston 2007, Lawrence y Rees 2012).

Estructuralmente, las microemulsiones se pueden clasificar en: aceite en agua (o/w), agua en aceite (w/o) y bicontinuas, dependiendo de la composición (Lu y Gao 2010) (figura 10). El tipo de microemulsión que se obtiene depende de las propiedades del tensoactivo, co-tensoactivo y aceite. En cuanto a los tensoactivos se debe tomar en cuenta que los sistemas con un valor de HLB bajo (3-6) generalmente forman ME w/o, mientras que aquellos con un HLB alto (8-18) formaran ME o/w (Moulik y Rakshit 2006).

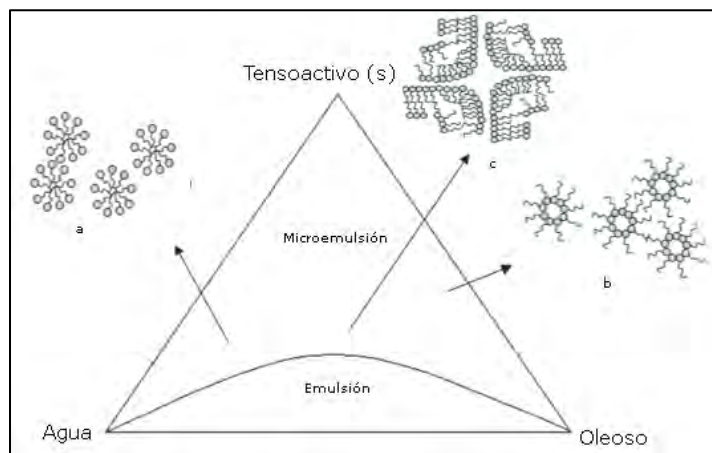


Figura 10. Diagrama de fases ternario a) ME o/w, b)ME w/o c) ME bicontinua (Modificado de Moulik 2006).

2.5.1 Aplicaciones

En el área farmacéutica y cosmética las microemulsiones han sido usadas ampliamente debido a que presentan diversas ventajas en comparación con otros sistemas como son: su fácil preparación (económicas), pequeño tamaño de gota, su notable estabilidad independiente del medio (larga vida de anaquel), claridad óptica (cosméticamente elegantes), baja viscosidad (fácil manipulación), su capacidad para solubilizar materiales tanto hidrofílicos como lipofílicos (Carlucci, Cicconi-Vidal y Bregni 2004), así como la existencia de microdominios de diferente polaridad y

la posibilidad de actuar como reservorios de fármacos sensibles lipófilos o hidrófilos (por ejemplo proteínas) contenidos en la fase dispersa (Bidyut y Moulik 2001).

Ambos tipos de ME, aceite en agua (o/w) y agua en aceite (w/o) han demostrado mejorar la absorción gastrointestinal y por lo tanto la biodisponibilidad oral de fármacos. Este tipo de sistemas permite diseñar una liberación de fármaco sostenida o controlada por vía percutánea, oral, tópica, transdérmica, ocular, y parenteral (Bidyut y Moulik 2001). García-Celma (García-Celma 1997) ha revisado microemulsiones como sistemas de administración de medicamentos para los diferentes tipos de fármacos; agentes antineoplásicos/antitumorales, péptidos, simpatolíticos, anestésicos locales, esteroides, ansiolíticos, antibióticos, vitaminas, anti-inflamatorios y productos dermatológicos (Bidyut y Moulik 2001).

En cuanto a la administración tópica y transdérmica de fármacos (Moulik y Rakshit 2006), se compararon las microemulsiones con vehículos convencionales tales como hidrogeles, emulsiones y liposomas. Las propiedades de liberación de fármacos han sido más favorables a partir de las microemulsiones, esto parece ser atribuible fundamentalmente a sus excelentes propiedades de solubilización. Sin embargo, los ingredientes que la componen también pueden actuar como promotores de penetración (Carlucci, Cicconi-Vidal y Bregni 2004).

Las principales limitaciones de este tipo de sistemas como vehículos de fármacos son el estrecho intervalo de surfactante, co-tensoactivos, disolventes y demás excipientes farmacéuticamente aceptables (toxicidad y biocompatibilidad) (Moulik y Rakshit 2006), así como las altas concentraciones de tensoactivo requeridas (Bidyut y Moulik 2001). Al administrarlos por vía transdérmica es importante considerar la posibilidad de que los componentes puedan ocasionar irritación (Carlucci, Cicconi-Vidal y Bregni 2004).

2.5.2 Métodos de preparación de microemulsiones

Los componentes a utilizar deben seleccionarse cuidadosamente dependiendo de los requerimientos regulatorios y tomando en cuenta la vía de administración a la que está destinada la formulación (Carlucci, Cicconi-Vidal y Bregni 2004), una vez seleccionados, se construyen diagramas ternarios o pseudo-ternarios (figura 10) para definir la extensión y naturaleza de la región de la ME (Eccleston 2007).

Regularmente se preparan mediante el método de titulación; se prepara una mezcla que generalmente se compone de aceite, surfactante y co-surfactante, la cual es titulada mediante la adición de agua gota a gota hasta observar

turbidez (Lawrence y Rees 2012). Alternativamente se puede elegir el componente oleoso o la mezcla tensoactivo/co-tensoactivo para realizar la titulación de la mezcla.

Una vez determinadas las proporciones adecuadas para obtener una ME, esta puede prepararse simplemente mediante la mezcla de aceite, agua, surfactante y co-surfactante con agitación suave, ya que son termodinámicamente estables.

2.5.3 Caracterización de microemulsiones

La caracterización de la estructura de una microemulsión es difícil debido a la amplia variedad de estructuras y procesos cinéticos que conlleva, por lo que muchas veces se requiere de la combinación de más de una tecnología para lograr una caracterización fiable (Muzaffar, Singh y Chauhan 2013).

A nivel macroscópico se pueden caracterizar mediante su viscosidad, conductividad y constante dieléctrica. La naturaleza isotrópica y claridad óptica de las ME permite estudiarlas mediante el uso de técnicas espectroscópicas (Carlucci, Cicconi-Vidal y Bregni 2004).

Los métodos de dispersión de luz también han sido usados en la elucidación de la estructura de la microemulsión, incluyen dispersión de la luz estática y dinámica, dispersión neutrónica de pequeño ángulo (SANS), dispersión de Rayos X de pequeño ángulo (SAXS) (Carlucci, Cicconi-Vidal y Bregni 2004) y resonancia magnética nuclear (NMR).

Las técnicas de microscopía electrónica ofrecen el potencial para la visualización directa de la microestructura de las microemulsiones a una resolución < 5 nm. Las técnicas de transmisión (TEM) y de barrido (SEM) se han utilizado para estudiar la nanoestructura interna y la superficie (Acharya y Hartley 2012).

La microscopía electrónica de crío-fractura también ha sido usada para estudiar la estructura de las microemulsiones, sin embargo se requiere un entrenamiento especial para mantener la estructura y minimizar la posibilidad de artificios (Carlucci, Cicconi-Vidal y Bregni 2004).

3. JUSTIFICACIÓN

Los ISRS son utilizados en el tratamiento de la depresión, trastorno de ansiedad generalizada, trastorno obsesivo compulsivo, trastorno de pánico, fobia social y trastorno de estrés post-traumático. Uno de los fármacos más potentes de este grupo es el clorhidrato de paroxetina, sin embargo al administrarse por vía oral presenta un extenso metabolismo de primer paso y una alta variabilidad inter individual, por lo que se hace necesaria una alternativa para la administración de este fármaco.

La vía transdérmica representa una alternativa atractiva en comparación con las vías de administración convencionales, ya que ofrece ventajas tales como evitar la degradación en tracto gastrointestinal y el efecto del primer paso y facilita el cumplimiento terapéutico por parte del paciente. Sin embargo solo unos cuantos fármacos son capaces de penetrar de manera pasiva la piel.

Las microemulsiones han despertado considerable interés en los últimos años como posibles sistemas de administración de fármacos debido a las ventajas que ofrecen sobre otros sistemas, como es el caso de su estabilidad termodinámica y facilidad de preparación, así como la posibilidad de incorporar tanto fármacos lipofílicos como hidrófilos. De igual manera la presencia de agentes tensoactivos, co-tensoactivos u oleosos con propiedades promotoras facilitan la permeación del fármaco a través de la piel. La combinación de una microemulsión con técnicas como la iontoforesis o la microporación láser pueden facilitar el flujo de fármaco a través de la piel.

4. HIPÓTESIS

De esta forma la hipótesis planteada en este trabajo considera que “la incorporación del clorhidrato de paroxetina en una microemulsión formulada con excipientes que pueden fungir como promotores químicos de la absorción, aplicando de manera conjunta métodos de promoción físicos, permitirá obtener un efecto sinérgico que potencie la liberación sistémica del fármaco a partir de su administración en piel”.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Estudiar el transporte *in vitro* a través de la piel, de clorhidrato de paroxetina formulado en una microemulsión para liberación transdérmica y comparar el efecto de promotores físicos y químicos en la permeabilidad de la molécula.

5.2 Objetivos particulares

- Preparar y caracterizar una serie de microemulsiones que contengan clorhidrato de paroxetina para ser administrada por vía transdérmica.
- Desarrollar y evaluar los métodos analíticos (HPTLC, HPLC, UPLC MS/MS) apropiados para la cuantificación de clorhidrato de paroxetina en los sistemas preparados, así como durante los estudios de permeación *in vitro* a través de la piel.
- Realizar estudios de permeación *in vitro* de clorhidrato de paroxetina formulado en distintas microemulsiones para evaluar el efecto de la incorporación de promotores químicos en la permeación.
- Realizar estudios de permeación *in vitro* de microemulsiones conteniendo clorhidrato de paroxetina, aplicando iontoforesis y microporación láser con el fin de evaluar el efecto de promotores físicos sobre la capacidad de transporte del fármaco en piel.
- Evaluar y comparar la biodistribución del clorhidrato de paroxetina en las capas de la piel cuando se administra de manera pasiva y al utilizar un método físico para promover su permeación.

6. METODOLOGÍA

6.1 Reactivos

Clorhidrato de paroxetina (Donado por Moléculas Finas de México, S.A de C.V.)
Clorhidrato de paroxetina (Hangzhou Taincheng Chemical Co., LTD)
Cloruro de plata (Sigma-Aldrich, EE.UU)
Dietilenglicol monoetil éter de alta pureza/Transcutol® P (Gattefossé, Francia)
Aceite de Castor PEG-35/ Kolliphor EL® (BASF, Alemania)
Aceite de Castor PEG-35/ Kolliphor EL® (Sigma-Aldrich, EE.UU)
Aceite de ricino hidrogenado PEG-40/ Kolliphor RH 40® (BASF, Alemania)
3-dioleato-poligliceril/ Plurol® oleique cc 497 (Gattefossé, Francia)
Monolaurato de Propilenglicol/ Lauroglycol™ 90 (Gattefossé, Francia)
1, 2-propilenglicol/ Kollisolv® PG (BASF, Alemania)
Polisorbato 60/ Kolliphor® PS60 (BASF, Alemania)
Monooleato de Glicerilo tipo 40 NF/ Peceol™ (Gattefossé, Francia)
Monocaprilato de propilenglicol tipo II NF/ Capryol™ 90 (Gattefossé, Francia)
Monolinoleato de Glicerilo/ Maisine™ 35-1 (Gattefossé, Francia)
Alcohol oleico/ NovoI™ (CRODA, UK)
Polietilenglicol hexadecil éter/ Brij® 58 (Sigma-Aldrich, EE.UU)
Triglicéridos de cadena media/ Labrafac™ lipophile WL 349 (Gattefossé, Francia)
Propilenglicol Dicaprilocaprolato/ Labrafac™ PG (Gattefossé, Francia)
Poligliceril-3 dioleato / Plurol® oleique CC 497(Gattefossé, Francia)
Caprilocaproil polioxil-8 gliceridos/Labrasol® (Gattefossé, Francia)
Ácido oleico (Sigma-Aldrich, EE.UU)
Ácido oleico (Merck, EE.UU.)
Fosfato de sodio monobásico (Sigma-Aldrich, EE.UU)
Fosfato monobásico de potasio (J.T. Baker, México)
Fosfato monobásico de potasio (Sigma-Aldrich, EE.UU)
Hidróxido de sodio (J.T. Baker, México)
Cloruro de sodio (Sigma-Aldrich, EE.UU)
Polisorbato 80/Tween® 80 (Merck, EE.UU.)
Polisorbato 20/Tween® 20 (Spectrum, EE.UU.)
Miristato de isopropilo (Hanseler AG, Suiza)
Butanol (Meyer, México)
Metanol (J.T. Baker, EE.UU.)
Ácido acético glacial (Meyer, México)
Agua provista por el sistema de purificación Mili-Q (Millipore® Corp., MA; EE.UU)
Acetonitrilo (Fisher scientific, EE.UU)
Metanol (Fisher scientific, EE.UU)

6.2 Material

Celda vertical tipo Franz de vidrio con un área de exposición de 0.78 cm² y un volumen receptor de 2 mL (Celdas A)

Celda vertical tipo Franz de vidrio con un área de exposición de 3 cm² y un volumen receptor de 10 mL (Celdas B)

Celda vertical tipo Franz de vidrio con un área de exposición de 2 cm² y un volumen receptor de 11 mL (Celdas C)

Celda vertical con 2 brazos tipo Franz de vidrio con un área de exposición de 2 cm² y un volumen receptor de 11 mL (Celdas D)

Cámara cromatográfica de fondo plano

Placas de sílica gel, fase normal con indicador de fluorescencia ALUGRAM® (Macherey-Nagel, Alemania)

Columna Lichrosphere 100 RP18 (125 x 4 mm, 5 µm) (Merck-Millipore, EE.UU)

Columna XBridge BEH C18 (50 x 2.1 mm, 2.5 µm) (Waters, EE.UU)

Prefiltros (Millipore® Corp., MA; EE.UU)

Filtros de 0.22 µm (Millipore® Corp., MA; EE.UU)

Filtros de 0.22 µm (BGB Analytik, Suiza)

Membrana de 0.45 µm (Whatman, Suiza)

Jeringas hipodérmicas de plástico con aguja

6.3 Equipos e Instrumentos

Agitador magnético multiplaza R015 (IKA, Alemania)

Aplicador automático para cromatografía de capa fina de alta resolución, Automatic TLC Sampler III versión 2.12 (CAMAG, Suiza)

Balanza analítica ATX224 (Shimadzu, Japón)

Balanza analítica XS204 (Mettler Toledo, Suiza)

Centrífuga EBA 12 (Hettich, Alemania)

Centrífuga 5804 (Eppendorf, Alemania)

Dermatomo eléctrico (Zimmer Varsovia, Polonia)

pH metro 700 (Oakton, EE.UU.)

pH metro LE409 (Mettler Toledo, Suiza)

pH metro Inlab Science (Mettler Toledo, Suiza)

Espectrofotómetro U-5100 (Hitachi, Japón)

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

Escáner 3 y software CATS versión 4.06 para cromatografía de capa fina de alta resolución (CAMAG, Suiza)

Sonicador 8891 (Cole-Parmer, EE.UU.)

Sonicador Branson 5510 (Branson Ultrasonics Corp. EE.UU.)

Vórtex Genie2 (Scientific Industries, EE.UU.)

Vórtex (IKA, Alemania)

Viscosímetro Brookfield CAP 2000 (Ametek Inc, EE.UU.)

Zetasizer (Zetasizer 3000, Malvern, UK, software Malvern instruments Dispersion Technology and Light Scattering Systems)

ACQUITY UPLC® (Waters, EE.UU.)

Dionex Ultimate 3000 (Thermo Scientific, EE.UU.)

Micrómetro MZD698 (Mitutoyo, Japón)

Multímetro (Fluke, EE.UU.)

Criotomo CryoStar NX50 (Thermo Scientific, EE.UU.)

Sistema láser P.L.E.A.S.E. (Painless Laser Epidermal System) (Pantec biosolutions, Liechtenstein)
Fuente de alimentación KEPCO (ELSTAR Elektronik AG, Suiza)
Microscopio estereoscópico S6D (Leica microsystems, Alemania)
Microscopio de tomografía de coherencia óptica (LL Tech., Canadá)

6.4 Cuantificación de PAX mediante espectrofotometría UV

Se preparó una curva patrón de paroxetina en metanol por triplicado para determinar la concentración de principio activo en las pruebas de solubilidad. Para lo cual se pesaron 10.1 mg de paroxetina y se aforaron a un volumen de 5 mL con metanol, para obtener una solución stock de 1mg/mL, de la cual se tomaron alícuotas de 200, 400, 600 y 1000 μ L y se llevaron a un volumen final de 5 mL. Las soluciones preparadas se leyeron a una longitud máxima de absorción de 294 nm utilizando un espectrofotómetro (Hitachi).

6.5 Cuantificación de PAX mediante HPTLC (Cromatografía en capa fina de alta resolución)

Las muestras de estabilidad de la solución de PAX, permeación pasiva y PAX retenida en piel de los estudios realizados en la FES-Cuautitlán (Formulaciones MEM, MEO y ME) se analizaron mediante HPTLC. Se utilizaron placas de aluminio de sílica gel G60 (ALUGRAM®, Macherey-Nagel), la fase móvil utilizada fue butanol: ácido acético: agua (3.8:0.95:0.1). Las muestras se colocaron en viales y se aplicaron 10 μ L de muestra en banda de 6 mm (Automatic TLC Sampler III, CAMAG Suiza) sobre la placa, la cual se colocó en una cámara de elución que contenía 10 mL de fase móvil y se dejó correr a una altura de 4.5 cm. La placa se secó a 60 °C durante 5 minutos y posteriormente se leyó a 294 nm en el escáner 3 (CAMAG, Suiza). Se utilizó el software CATS 4 (CAMAG, Suiza) para obtener el área bajo la curva del pico correspondiente a PAX. Se validó el método evaluando los siguientes parámetros: linealidad, precisión del método, exactitud, límite de detección, cuantificación, tolerancia. (Anexo 1).

6.6 Cuantificación de PAX mediante HPLC (Cromatografía líquida de alta resolución)

Las muestras de solubilidad, estabilidad de la solución de PAX, permeación pasiva, permeación utilizando promotores físicos, biodistribución y PAX retenida en piel de los estudios realizados en la Universidad de Ginebra, Suiza (Formulaciones S, ME 1-1 y ME 1-2) se analizaron mediante HPLC. La separación cromatográfica del analito se obtuvo en el equipo Dionex Ultimate 3000 utilizando una columna Lichrosphere 100 RP18 (125 x 4 mm, 5 μ m) a 35 °C (se utilizó una precolumna para proteger la columna analítica). Se utilizó como fase móvil (i) una solución de Na₂HPO₄ (10 mM; pH=3) y (ii) Metanol utilizando un gradiente (figura 11) a un flujo de 1 mL/min. La fase móvil se

filtró a través de una membrana de 0.45 μm (Wathman, Suiza) y se desgasificó por 20 min mediante sonicación. El volumen de inyección fue de 25 μL . La absorbancia fue medida a 294 nm.

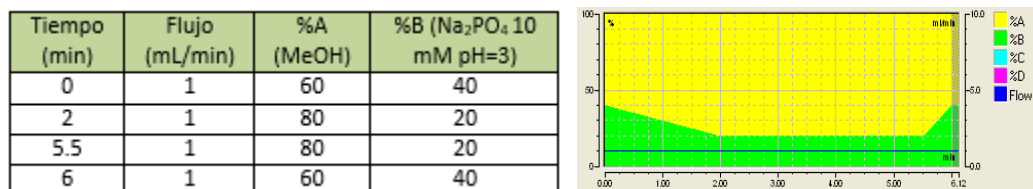


Figura 11. Gradiente de elución

Se utilizó el software Chromeleon 6.6 para obtener el área bajo la curva del pico correspondiente a PAX. Se validó el método evaluando los siguientes parámetros: linealidad, precisión del método, exactitud, límite de detección, límite de cuantificación. (Anexo 2).

6.7 Cuantificación de PAX mediante UPLC MS/MS (cromatografía de líquidos de ultra-alta resolución acoplada a un detector de masas)

Aquellas muestras que al ser analizadas mediante HPLC se encontraban por debajo del límite de cuantificación fueron analizadas utilizando UPLC MS/MS. La separación cromatográfica del analito se obtuvo en el equipo ACQUITY UPLC® (Waters, EE.UU.) acoplado al detector XEVO TQ-MS (Waters, EE.UU.), se utilizó una columna XBridge BEH C18 (50 x 2.1 mm, 2.5 μm) a 35 °C. La fase móvil fue (i) una solución de ácido fórmico (FA) 0.1% y (ii) acetonitrilo 0.1 % FA en proporción 70:30 a un flujo de 0.4 ml/min, con un tiempo total de análisis de 3 minutos. El volumen de inyección fue de 5 μL .

Para la detección de masas en tándem se utilizó una fuente de ionización por electrospray (ESI) operada en modo de iones positivos con monitoreo de reacciones múltiples (MRM) y analizador de doble cuádrupolo. El volumen de inyección fue de 5 μL . La transición de iones monitoreada fue de m/z 330.16 a 191.99 (molécula padre) y de 330.16 a 69.98 (molécula hija), la identidad del pico también se corroboró mediante la medición de la absorbancia UV a 294 nm con un detector PDA. Para cada análisis realizado se inyectó una curva patrón por triplicado. Se analizó la linealidad de la curva patrón (Anexo 3).

6.8 Determinación de la solubilidad de PAX en excipientes

Para seleccionar los componentes más apropiados para la microemulsión, se realizaron pruebas de solubilidad del clorhidrato de paroxetina en una serie de surfactantes y excipientes. Se colocaron 0.5 mL del excipiente a probar en

un vial Eppendorf® al cual se adicionó PAX hasta saturarlo, se dejó en agitación magnética (IKA) durante 24 horas a temperatura ambiente y posteriormente se centrifugó a 10,000 rpm x 10 min. El sobrenadante se diluyó con metanol para su análisis mediante la lectura a la máxima longitud de absorción ($\lambda_{\max}=294$ nm) utilizando un espectrofotómetro (Hitachi) o por HPLC (Dionex Ultimate). La concentración se determinó interpolando en la curva de calibración correspondiente.

6.9 Determinación del medio receptor

Con el fin de determinar el medio más adecuado para realizar los estudios de permeación se determinó la solubilidad del clorhidrato de paroxetina en solución buffer de fosfatos pH 7.4, solución buffer de fosfatos adicionada con Brij® 58 al 1%, 2% y 3%, solución buffer de fosfatos adicionada con Tween® 80 al 1% y solución buffer de fosfatos adicionada con Tween® 20 al 1%. Se colocaron 0.5 mL del medio a probar en un vial, al cual se adiciono PAX hasta saturarlo. Se dejó en agitación durante 24 horas a temperatura ambiente y posteriormente se centrifugó a 10,000 rpm x 10 min. El sobrenadante se diluyó con metanol para su análisis mediante la lectura a la máxima longitud de absorción utilizando un espectrofotómetro (Hitachi) o por HPLC (Dionex Ultimate). Cada ensayo se realizó por triplicado.

6.10 Formulación de microemulsiones

6.10.1 Construcción de diagramas pseudo-ternarios

Se realizó la construcción de los diagramas pseudo-ternarios para definir las proporciones de los componentes en donde se forma la microemulsión. Se prepararon mezclas de surfactante/co-surfactante, utilizando las proporciones 1:1, 1:2 y 2:1 p/p, las cuales se añadieron a la fase oleosa seleccionada en proporciones de 10:90 hasta 90:10 p/p. Cada una de estas mezclas se tituló con agua (figura 12). El punto final se determinó en el momento en que se obtuvo una formulación translúcida o transparente y se continuó hasta volver a obtener un sistema opaco o separación de fases. Los datos obtenidos se registraron con el fin de construir los diagramas utilizando el software Prosim Ternary diagram. Con el fin de validar los diagramas obtenidos se seleccionaron proporciones de los distintos componentes correspondientes a los bordes del área de predominio de la ME, se prepararon las microemulsiones (triplicado) y en caso de no obtener la ME, se repitió la construcción del diagrama por el método de titulación.

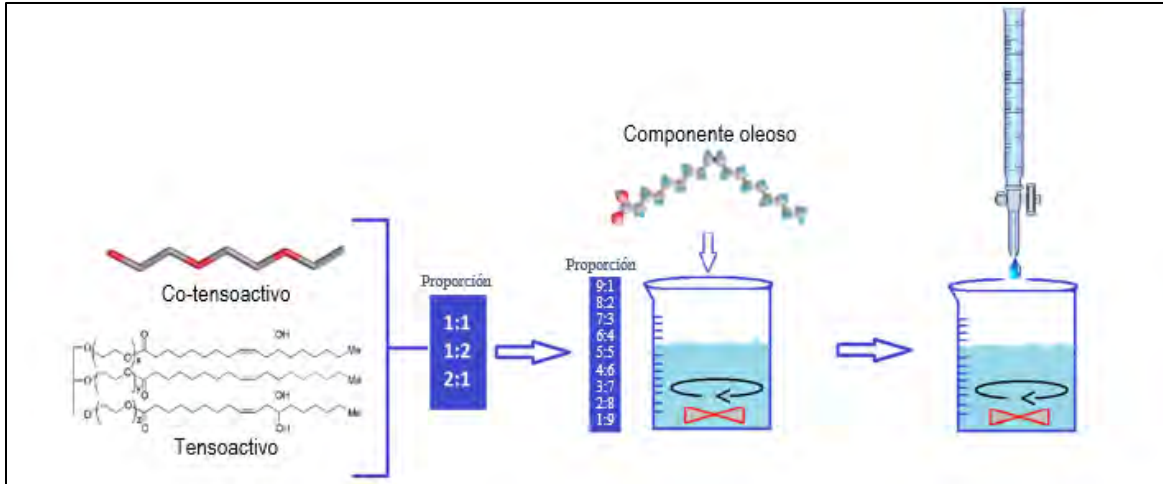


Figura 12. Titulación de mezcla tensioactivo: co-tensioactivo/componente oleoso para la construcción de diagramas pseudo-ternarios.

6.10.2 Preparación de microemulsiones

De acuerdo a las áreas correspondientes a la microemulsión se seleccionaron las proporciones de los componentes a utilizar. Las microemulsiones se obtuvieron mezclando la cantidad determinada de tensioactivo y co-tensioactivo, posteriormente se añadió el componente oleoso y finalmente se añadió la cantidad determinada de agua gota a gota con agitación magnética a temperatura ambiente. El sistema se dejó equilibrar manteniendo una agitación leve (aproximadamente 200 rpm) durante 30 minutos.

6.11 Evaluación de la solubilidad de PAX en la microemulsión seleccionada

Como estimación de la solubilidad de PAX en las microemulsiones se utilizó el modelo de Yalkowsky (ecuación 7) el cual se basa en la suma de la solubilidad de PAX en los componentes.

$$\text{Log } S_m = f_1 \log S_1 + f_2 \log S_2 + f_3 \log S_3 \dots \dots \dots \text{Ecuación 7 (Jouyban 2008)}$$

De manera experimental se determinó la solubilidad mediante 2 métodos:

- i) En la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán se prepararon microemulsiones con distintas cantidades de PAX (40, 50, 60 y 70 mg/mL) y se determinó la solubilidad aparente como aquella en que no se presenta fármaco precipitado.
- ii) En la Universidad de Ginebra se colocaron 0.5 mL de la microemulsión en un vial eppendorf, la ME se saturó con PAX y se dejó en agitación durante 24 horas, transcurrido este tiempo se centrifugó a 10,000 rpm por 10 min, el sobrenadante se diluyó con metanol y se analizó mediante HPLC.

6.12 Preparación de microemulsiones cargadas con PAX

Se disolvió la cantidad seleccionada de PAX en el co-surfactante, consecutivamente se añadieron el tensoactivo y el componente oleoso con agitación y finalmente se adicionó a la mezcla la cantidad determinada de agua gota a gota con agitación magnética a temperatura ambiente. El sistema se dejó equilibrar manteniéndose con agitación leve (aproximadamente 200 rpm) durante 30 minutos.

6.13 Caracterización de microemulsiones

El pH se evaluó a 25 °C usando un pH metro InLab® Science (Mettler Toledo, Suiza). La viscosidad se evaluó a 25 °C usando un viscosímetro Brookfield CAP 2000 (Ametek Inc, EE.UU.) con la aguja # 1 a 350 rpm. El índice de refracción se determinó utilizando un refractómetro analógico ABBE (ABBE, Filipinas) a 22 °C.

La determinación y distribución (índice de polidispersidad, IP) del tamaño promedio de las microemulsiones y la desviación estándar se determinaron por espectroscopia de correlación de fotones usando un Zetasizer (Malvern systems Nano- ZS90, EE. UU.). Las microemulsiones se leyeron directamente, realizándose las lecturas a 25 °C, con un rayo de incidencia del rayo láser de 90°. Las mediciones se realizaron por triplicado.

6.14 Determinación del medio de extracción de PAX a partir de piel

Se evaluó la extracción de PAX en la FESC utilizando como medios de extracción metanol y buffer de fosfatos adicionado con Brij® 58 al 3%. Para ello se utilizaron trozos de piel de 2.8 cm² en los cuales se colocaron 100 µL de una solución de PAX en acetona (3 mg/mL). Se dejó evaporar el solvente y posteriormente se cortó la piel en trozos pequeños con ayuda de unas tijeras, la muestra se colocó en viales con 5 mL de la solución de prueba (n=7) y se mantuvo bajo agitación magnética durante 24 horas. Una vez transcurrido este periodo se decantó la solución en viales y se centrifugó a 10,000 rpm durante 10 min. El sobrenadante se analizó mediante HPTLC.

En la Universidad de Ginebra se optimizó la extracción de PAX mediante el uso de mezclas de solventes. Se colocaron trozos de piel de 8 cm² en los cuales se pusieron 100 µL de una solución de PAX en metanol (concentración alta; 80 µg/mL y concentración baja; 20 µg/mL), se dejó evaporar el solvente y se cortó la piel en trozos pequeños, se colocó en agitación con 5 mL de solución de extracción (n=3). Como soluciones de extracción se utilizaron en distintas proporciones las siguientes soluciones: (i) acetonitrilo: agua, (ii) acetonitrilo: PBS y (iii) metanol: agua. Pasadas 12 horas se centrifugó la solución y se analizó el sobrenadante mediante HPLC.

6.15 Estudio de estabilidad de PAX en la solución receptora y en contacto con piel

Antes de iniciar con los estudios de permeación se realizó el estudio de estabilidad de PAX en solución en contacto con piel, para ello se colocó un trozo de piel en una solución de PAX en PBS adicionada con Brij® 58 3% (medio receptor en los estudios de permeación), la solución se dejó en agitación durante 24 horas, posteriormente la solución se centrifugó y se analizó mediante HPLC.

El estudio de estabilidad en solución se realizó almacenando las soluciones (n=3) a temperatura ambiente en presencia de luz y en oscuridad a temperatura ambiente ($25 \pm 2^\circ\text{C}$). Las muestras fueron analizadas a tiempos predeterminados (1, 2 o 7 días), mediante HPTLC y HPLC.

Adicionalmente se realizó un estudio para evaluar la viabilidad de las muestras al ser almacenadas en condiciones de refrigeración y congelación en caso de que no pudieran ser analizadas en un tiempo corto. Para esto se prepararon 2 grupos de muestras en viales de vidrio, las cuales correspondían a concentración (n=3) baja ($15 \mu\text{g/mL}$) y alta ($50 \mu\text{g/mL}$). Las muestras se analizaron al tiempo cero y posteriormente a la semana y a las 2 semanas.

6.16 Estudio de permeación pasiva

6.16.1 Preparación de la piel

Las orejas de cerdo se recuperaron directamente del rastro después del sacrificio de los animales y antes de ser tratados con agua caliente o vapor. Se lavaron con agua corriente para eliminar los residuos (figura 13a). Con ayuda de un bisturí se retiró la piel de la parte posterior de la oreja, teniendo especial cuidado en mantener la integridad de la piel (figura 13b). Se retiró el exceso de grasa y de pelo con ayuda de unas tijeras. La piel se cortó a un grosor determinado utilizando i) dermatomo ($600\text{-}700 \mu\text{m}$) (figura 13c), ii) Micrótopo (figura 13d) o se utilizó piel integra (full skin), con ayuda de tijeras o con una prensa neumática (figura 13e) se cortaron círculos de piel del tamaño de las celdas a utilizar. Para su conservación se colocó la piel en aluminio o en parafilm y se guardó en el congelador (-20°C) hasta su uso en los estudios de permeación.

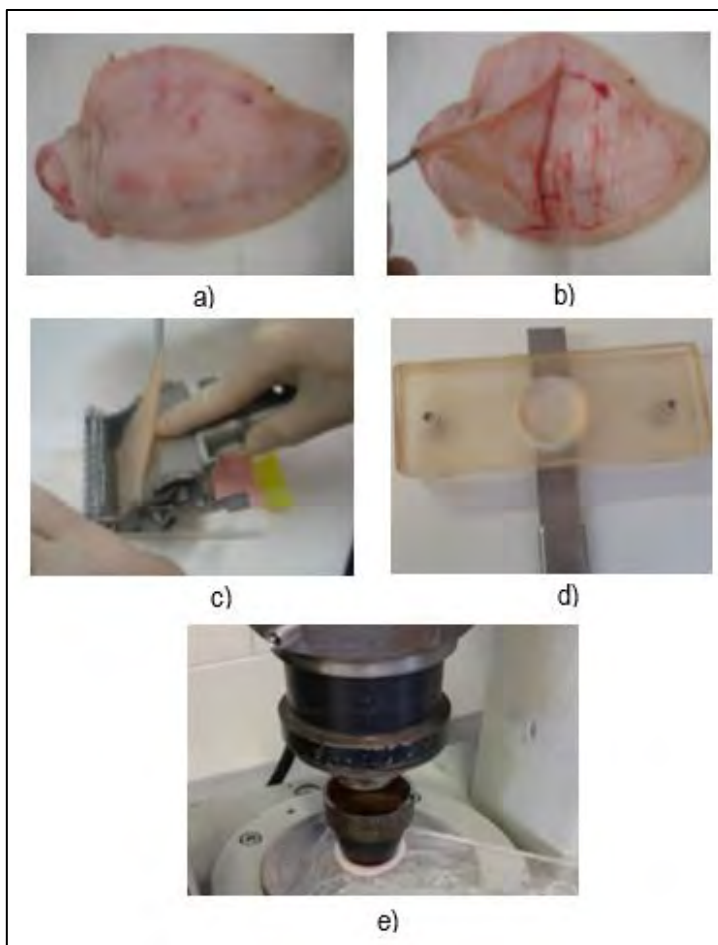


Figura 13. a) Orejas de cerdo lavadas, b) Separación de la piel, c) Corte de la piel utilizando un dermatomo, d) Corte de la piel con un micrótopo, e) Uso de una prensa neumática para cortar círculos de piel.

6.16.2 Experimentos de difusión pasiva

Las muestras de piel se equilibraron e hidrataron en el medio receptor (PBS pH 7.4 con Brij® 58 3%) por 30 min. Transcurrido este tiempo se midió el grosor de la misma (figura 14a) y se montó en la celda de Franz (celdas A y B-figura 15b) situando el estrato córneo hacia la solución donadora. Se adicionó el medio receptor en ambos compartimientos y las celdas se colocaron en un baño de agua a 37 °C bajo agitación magnética constante (Figura 16a). Se dejaron equilibrar por 30 min y posteriormente se midió la resistencia eléctrica de la piel (figura 14b). Seguidamente, se eliminó la solución del compartimiento donador y se secó la piel con cuidado. Finalmente se adicionaron 300 μL de la formulación correspondiente. Se tomaron muestras de 1 mL del medio receptor a intervalos de tiempo definidos (2,4, 6, 8, 22, 23, 24 horas), reemplazando el medio sustraído con solución fresca cada vez (figura 15a). Las muestras se analizaron mediante HPTLC, HPLC o UPLC MS/MS.



Figura 14. a) Medición del grosor de la piel, b) Medición de la resistencia eléctrica de la piel

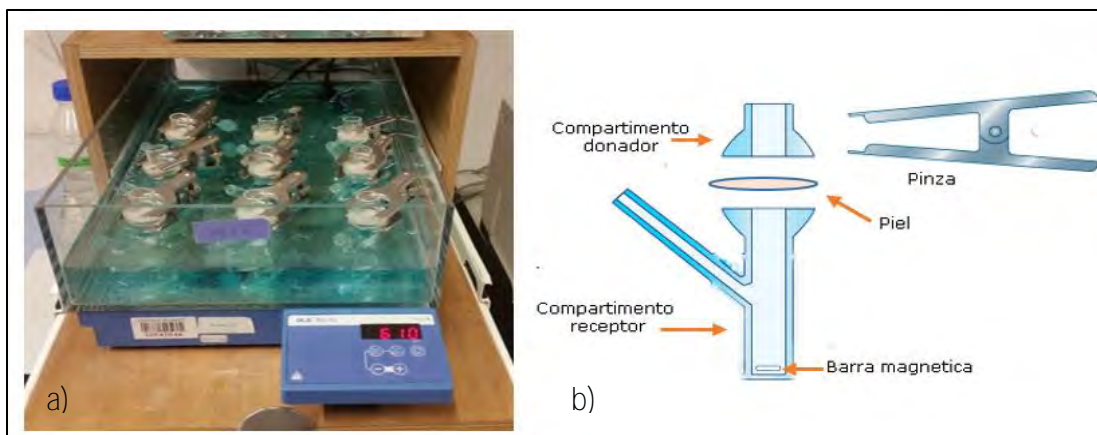


Figura 15. a) Estudio de permeación, b) Celda de Franz

6.16.3 Extracción de PAX a partir de la piel

Una vez concluido el estudio de permeación, se desmontaron las celdas de Franz, se retiró el exceso de formulación con papel y se limpió con agua corriente durante 10 segundos. Para determinar la cantidad de fármaco depositada en la piel, el área de permeación de cada celda se separó de la piel comprimida entre los bordes de la celda (figura 17), se cortó en trozos pequeños y se dejó en agitación constante con 5 mL de solución de extracción durante al menos 12 hrs. Transcurrido ese tiempo se centrifugó y se analizó el sobrenadante mediante HPTLC o HPLC.



Figura 16. Separación del área de permeación

6.16.4 Análisis de los datos de permeación de las microemulsiones preparadas

Con el fin de analizar más a detalle los resultados obtenidos en los estudios de permeación pasiva y el efecto producido por los promotores químicos, los perfiles de absorción se ajustaron a la ecuación propuesta por Scheuplein (ecuación 8), la cual deriva de la segunda ley de Fick, y es aplicable cuando no se ha alcanzado el estado estacionario.

$$Q = (KH)C_{ME} \left[\frac{D}{H^2}t - \frac{1}{6} - \frac{2}{\pi^2} \sum_{n=1}^{\infty} \frac{(-1)^n}{n^2} \exp\left(\frac{-Dn^2\pi^2 t}{H^2}\right) \right] \dots\dots\dots\text{Ecuación 8}$$

Donde Q es la cantidad acumulada de fármaco en el compartimiento receptor por unidad de área durante un determinado tiempo, *t*. La concentración de fármaco en la microemulsión (Compartimiento donador) se representa como *C_{ME}*, *K* es el coeficiente de reparto estrato córneo/vehículo, *D* (*cm²/h*) es el coeficiente de difusión en la piel, *H* (cm) es la longitud de camino de difusión que ha de atravesar, es decir el espesor de la membrana (piel) y *n* es un número entero comprendido entre uno e infinito.

De esta manera se obtuvieron los siguientes parámetros farmacocinéticos: flujo en el estado estacionario *J_{ss}*, coeficiente de permeabilidad (*K_p*), parámetro de partición (*KH*), parámetro de difusión (*D/H²*) y tiempo de latencia (*T_o*). El ajuste se realizó utilizando el software WinNonlin 5.0.1 (Parsight Corp., Mountain view, CA, EE.UU).

6.17 Estudio de biodistribución de PAX en las capas de la piel

Para el estudio de biodistribución (cantidad de fármaco depositado en la piel en función de la profundidad), una vez concluida la prueba de permeación, se lavó la muestra y posteriormente se fijó con medio de montaje en una base de corcho, la cual se colocó entre 2 vidrios para ser sumergida en isopentano enfriado con nitrógeno líquido durante 20 segundos (figura 17b). **Este proceso permite realizar “snap-freezing” con ayuda de un criotomo (CryoStar NX50)**, se realizaron 2 cortes de 50 μm y 5 cortes de 100 μm, siendo los cortes paralelos a la superficie de la piel y comenzando desde el estrato córneo (figura 17a). La piel restante se cortó en trozos pequeños con ayuda de unas tijeras. Tanto los cortes como los trozos de piel se colocaron en diferentes viales Eppendorf con 1.5 mL de solución de extracción en agitación constante durante al menos 12 hrs (figura 17c). Finalmente, se centrifugaron las muestras a 10,000 rpm durante 10 minutos y se analizó el sobrenadante mediante HPLC.



Figura 17. a) Corte de secciones de piel utilizando el criotomo, b) Preparación de muestra de piel, c) Extracción de PAX a partir de las secciones de piel.

6.18 Evaluación del efecto de la microporación láser en la permeación de PAX a partir de una microemulsión

Antes de montar las muestras de piel completa en las celdas de Franz se realizó un pretratamiento utilizando el sistema P.L.E.A.S.E. (Precise Laser Epidermal System) (figura 18b) para generar poros en la piel (figura 18a), los parámetros utilizados fueron: 5 pulsos/poro, 15 % de fracción de piel tratada, fluencia (energía aplicada por unidad de área) de 88.9 J/cm^2 la cual se ha reportado (Bachhav, y otros 2010) que produce poros de un tamaño aproximado de $150\text{-}200 \mu\text{m}$. Los poros generados en la piel fueron observados utilizando un microscopio estereoscópico Leica S6D y se caracterizaron utilizando un microscopio de tomografía de coherencia óptica. Las muestras de piel se montaron y se realizaron los estudios de permeación de la manera descrita para los estudios de permeación en el apartado 6.16.2.

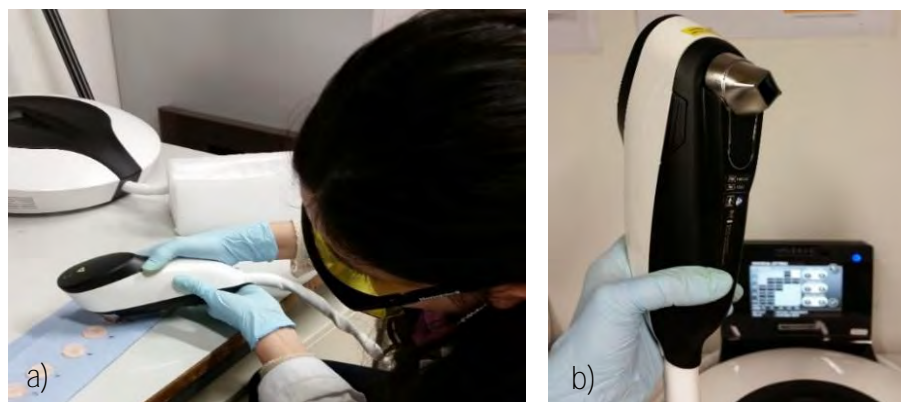


Figura 18. a) Pretratamiento de la piel para generar poros, b) Dispositivo P.L.E.A.S.E.

6.19 Evaluación del efecto de la iontoforesis en la permeación de PAX a partir de una microemulsión

Para la aplicación de la técnica de iontoforesis se utilizaron un par de electrodos reversibles Ag/AgCl, ya que estos no producen hidrólisis en solución acuosa, lo cual permite evitar variaciones de pH en el medio. Los electrodos se prepararon en el laboratorio mediante el recubrimiento de un alambre de plata con AgCl fundido (figuras 19a y b), el resto del alambre se cubrió con un aislante termo contráctil para protegerlo de la corrosión (figura 19c).

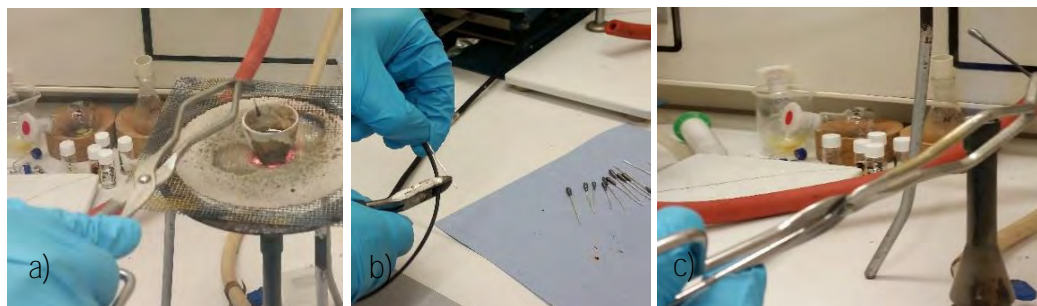


Figura 19. a) Recubrimiento del alambre de Ag con AgCl, b) Electrodos preparados, c) Recubrimiento de los electrodos con aislante termo contráctil.

Para la preparación de los electrodos de plata se preparó un circuito cerrado de electrodos de AgCl, hilo de platino de 0.5 mm de diámetro y una solución de NaCl (figura 20a). El circuito se conecta a un generador de corriente eléctrica y se aplica una corriente eléctrica de intensidad constante a 2 mA con lo que se consigue la reducción electroquímica de la plata del cloruro de plata (Ag^+) a plata metálica (Ag^0).

Con el fin de evitar la competencia entre los iones del fármaco y el NaCl u otros electrolitos presentes en la solución, se utilizaron puentes salinos (figura 20b), los cuales se prepararon llenando un tubo de silicona flexible con una dispersión acuosa al 3 % de agarosa y NaCl 0.1 M, la cual solidifica al enfriarse generando los puentes salinos.

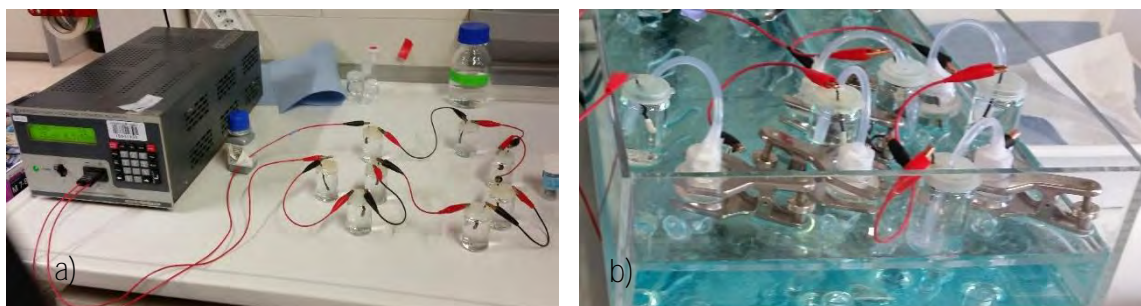


Figura 20. a) Proceso de plateado de los electrodos AgCl, b) Puentes salinos utilizados en el estudio con iontoforesis

Las celdas de Franz se montaron de la misma manera en que se describió en el apartado 5.16.2. para los estudios de permeación y se adicionaron 0.5 mL de la formulación a probar en el compartimiento donador. Posteriormente, el electrodo de AgCl (cátodo) se colocó en el compartimiento receptor y uno de los lados del puente salino se colocó en el compartimiento donador. El otro lado del puente salino se colocó en un frasco que contenía una solución de NaCl 0.9 % en la cual también se encontraba inmerso el electrodo de Ag (ánodo). Lo anterior se realizó con todas las celdas de tal manera que se obtuvo un circuito eléctrico cerrado. Durante las 24 horas del experimento, se aplicó una corriente eléctrica de intensidad constante a 0.5 mA/cm^2 con una fuente de alimentación (KEPCO, ELSTAR Elektronik AG) (figura 21). Las muestras del compartimiento receptor se recolectaron en intervalos de tiempo definidos (2, 4, 6, 8, 22, 23, 24 h) y se repusieron con medio fresco. La cantidad de PAX se determinó mediante HPLC.

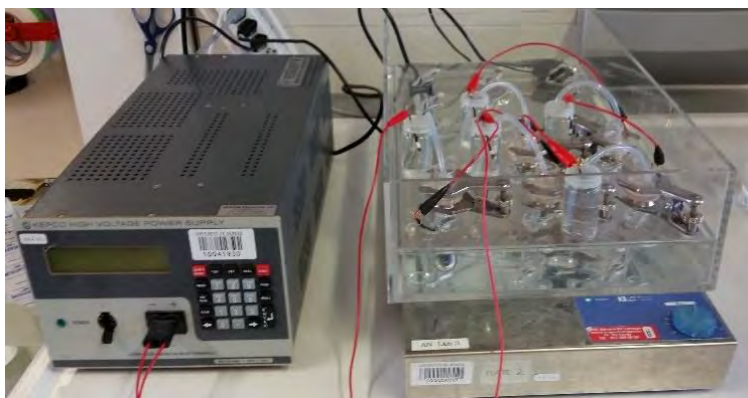


Figura 21. Estudio de permeación de PAX con iontoforesis

6.19.1 Determinación de la contribución de los mecanismos de electroósmosis y electromigración

Para determinar la contribución de los mecanismos de electroósmosis y electromigración se realizó el estudio de iontoforesis de acetaminofén (ACM) 15 mM a partir de la microemulsión y el de co-iontoforesis incorporando en la microemulsión tanto el PAX como ACM 15 mM. Se determinó el flujo de ACM y PAX, así como el factor de inhibición (ecuación 2).

6.19.1.1 Cuantificación de Acetaminofén mediante HPLC

Para cuantificar el acetaminofén se utilizó un método desarrollado por el grupo FAPER de la Universidad de Ginebra, Suiza. La separación cromatográfica del analito se obtuvo en el equipo Dionex Ultimate 3000 utilizando una columna Lichrosphere 100 RP18 (125 x 4 mm, $5 \mu\text{m}$) a $35 \text{ }^\circ\text{C}$ (se utilizó una precolumna para proteger la columna analítica). Se utilizó como fase móvil (i) una solución de ácido trifluoroacético 0.1 % y (ii) acetonitrilo (90:10) a un flujo de 1

mL/min. La fase móvil se filtró a través de una membrana de 0.45 μm (Whatman, Suiza) y se degasificó por 20 min mediante sonicación. El volumen de inyección fue de 25 μL . La absorbancia fue medida a 289 nm (Anexo 4).

6.19.1.2 Cálculo de los parámetros

El flujo de acetaminofén se determinó experimentalmente en el estado estacionario a partir de la pendiente del gráfico de cantidad acumulada ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) frente al tiempo (h). La velocidad de flujo del solvente (V_w) se determinó utilizando el flujo de ACM en el experimento de co-iontoforesis (J_{ACM}) y la concentración inicial de ACM en el compartimento dador (C_{ACM}) (ecuación 3). A partir de V_w se pudo calcular la contribución del mecanismo de electroósmosis mediante la multiplicación de V_w y la concentración de PAX en el experimento (C_{PAX}) (ecuación 4). La electromigración, se calculó restando al flujo total del PAX (J^T), el flujo debido a la electroósmosis (J^{EO}) (Ecuación 1). Mientras que el factor de inhibición se obtuvo con la cantidad total acumulada de ACM a las 24 horas y la cantidad acumulada de ACM en presencia de PAX a las 24 horas, de acuerdo a la ecuación 5.

6.20 Análisis estadístico de los resultados

Se utilizó el análisis de varianza de una vía (ANOVA) para detectar la posible existencia de diferencias significativas entre los valores obtenidos en los estudios de difusión transdérmica de PAX. El nivel de confianza fue del 95 %, de modo que existen diferencias significativas cuando el valor de probabilidad obtenido es inferior al 5%. El análisis de varianza se realizó mediante el programa Statgraphics® y se complementó mediante el test de comparaciones múltiples Student-Newman-Keuls (homocedástico) y análisis de la varianza de Kruskal-Wallis para grupos con varianzas diferentes (heterocedasticidad).

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 Validación de métodos analíticos

7.1.1 Resultados de cuantificación de PAX mediante HPTLC (anexo 1)

Se establecieron las condiciones cromatográficas para cuantificar PAX en solución de buffer de fosfatos pH 7.4 con Brij® 58 al 3% mediante HPTLC obteniéndose una buena separación, con un R_f de 0.42-0.47. El método demostró ser lineal en un intervalo de 100 a 800 ng con una buena correlación ($r^2=0.9993$), los límites de detección y cuantificación obtenidos fueron de 35 ng y 107 ng respectivamente. Se evaluó la reproducibilidad del método en un mismo día y en diferentes días, obteniéndose precisión (coeficiente de variación) y exactitud (error relativo) menores al 15 %. El método resultó ser robusto al modificar el volumen de inyección (5-15 μL), las proporciones de la fase móvil (butanol: ácido acético), tiempo de secado (2 y 5 minutos) y la velocidad de aplicación (40 y 50 nl/seg).

7.1.2 Resultados de cuantificación de PAX mediante HPLC (anexo 2)

Se establecieron las condiciones cromatográficas para cuantificar PAX en solución de buffer de fosfatos pH 7.4 con Brij® 58 al 3% y en solución ACN/ H₂O 75:25 mediante HPLC obteniéndose una buena separación en un análisis de 6 min con un tiempo de retención de 3.8 min. No se encontró diferencia significativa para la respuesta ni para los parámetros obtenidos al comparar las curvas obtenidas en los 2 medios. El método demostró ser lineal en un intervalo de 3 a 100 $\mu\text{g/mL}$ con una buena correlación ($r^2=0.9989$), los límites de detección y cuantificación obtenidos fueron de 1 $\mu\text{g/mL}$ y 3 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. Se evaluó la reproducibilidad del método en un mismo día y en diferentes días, obteniéndose precisión (coeficiente de variación) y exactitud (error relativo) menores al 15 %. Se realizaron pruebas de retención de PAX en filtros de nylon y PTFE, encontrándose que ninguno de ellos afecta la cuantificación de PAX, ya que el recobro en ambos casos fue mayor al 90%.

7.1.3 Resultados de cuantificación de PAX mediante UPLC/MS-MS (anexo 3)

Se establecieron las condiciones cromatográficas para cuantificar PAX en solución de buffer de fosfatos pH 7.4 con Brij® 58 al 3% mediante UPLC obteniéndose una buena separación en un análisis de 5 min con un tiempo de retención de 2.61 min. Las transiciones MRM seleccionadas para la determinación fueron; m/z de 330.16 a 191.99 (molécula padre) y de 330.16 a 69.98 (molécula hija). Se seleccionó la curva de calibración correspondiente a la

molécula padre para la cuantificación de PAX, la cual fue lineal en el rango de 10-800 ng/mL, la precisión (coeficiente de variación) y exactitud (error relativo) intra-día fueron menores al 15 %. El método no se validó, debido a la poca disponibilidad en el uso del equipo.

7.1.4 Resultados de cuantificación de ACM mediante HPLC (anexo 4)

Se establecieron las condiciones cromatográficas para cuantificar ACM en solución de buffer de fosfatos pH 7.4 con Brij® 58 al 3% mediante HPLC obteniéndose una buena separación en un análisis de 5 min con un tiempo de retención de 3 min. El método demostró ser lineal en un intervalo de 1 a 103 µg/mL con una buena correlación ($r^2=0.999$), los límites de detección y cuantificación obtenidos fueron de 0.3 µg/mL y 0.9 µg/mL, respectivamente. Se evaluó la reproducibilidad del método en un mismo día y en diferentes días, obteniéndose precisión (coeficiente de variación) y exactitud (error relativo) menores al 15 %.

7.2 Resultados de extracción y estabilidad de las muestras

En el laboratorio de tecnología farmacéutica de la FES-Cuautitlán se evaluó la extracción de PAX depositada en piel, utilizando metanol y buffer de fosfatos pH 7.4 adicionado con Brij® 58 3%. Se obtuvo un mayor recobro utilizando metanol (81.7%) en comparación con el obtenido con buffer (72.3%), sin embargo, la extracción con este solvente genera interferencias cercanas al pico de PAX (HPTLC), por lo que se decidió realizar las extracciones utilizando Buffer de fosfatos pH 7.4 adicionado con Brij® 58 3% (figura 22). En cuanto a la optimización del método de extracción en la Universidad de Ginebra, se seleccionó la mezcla ACN/H₂O 75:25 para realizar la extracción de PAX a partir de piel obtenida de los estudios de permeación, ya que como se observa en la figura 22 presenta el mayor porcentaje de recobro.

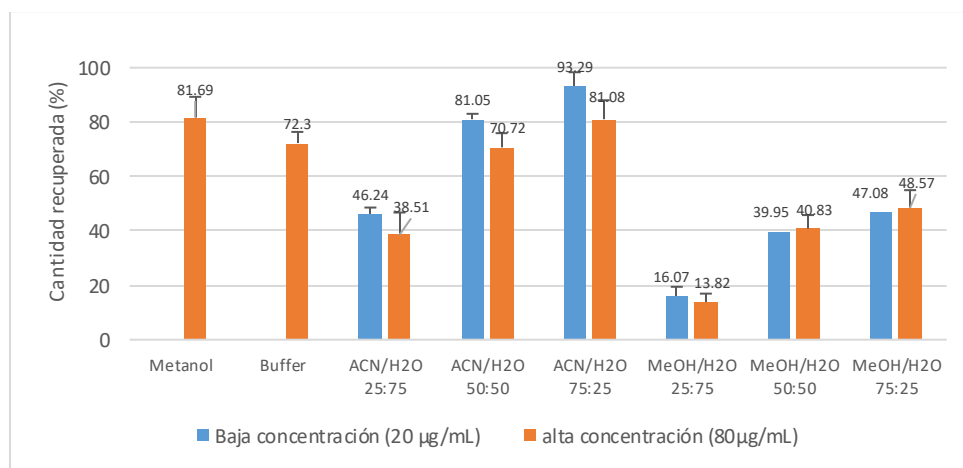


Figura 22. Resultados de los estudios de extracción de PAX a partir de piel (n=3).

Antes de iniciar con los estudios de permeación se realizó el estudio de estabilidad de la solución de PAX en contacto con piel, con el que se pudo comprobar que no se produce degradación significativa del fármaco durante el estudio (24 h) debido al contacto con la piel, ya que se cuantificó el PAX con una exactitud dentro de los parámetros establecidos (<15 %) para la concentración de 80 µg/mL y para la concentración de 20 µg/mL (figura 23).

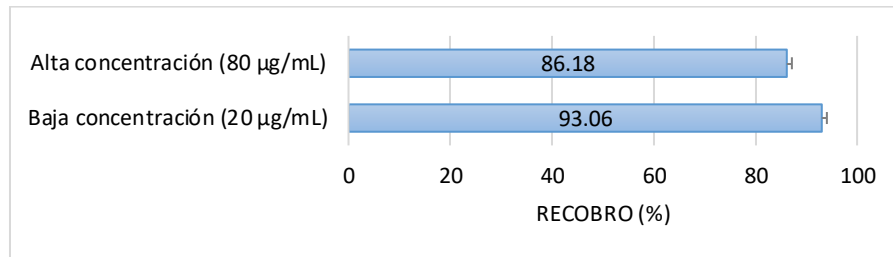


Figura 23. Resultados de estabilidad de PAX en PBS con Brij® 58 3% en presencia de piel durante 24 h (n=3).

Se evaluó la estabilidad de las muestras con luz directa del sol y al resguardo de la luz con refrigeración, mediante HPTLC y HPLC (figura 24). Encontrándose cambios significativos en las muestras sometidas a la luz durante 7 días analizadas tanto en HPTLC como en HPLC.

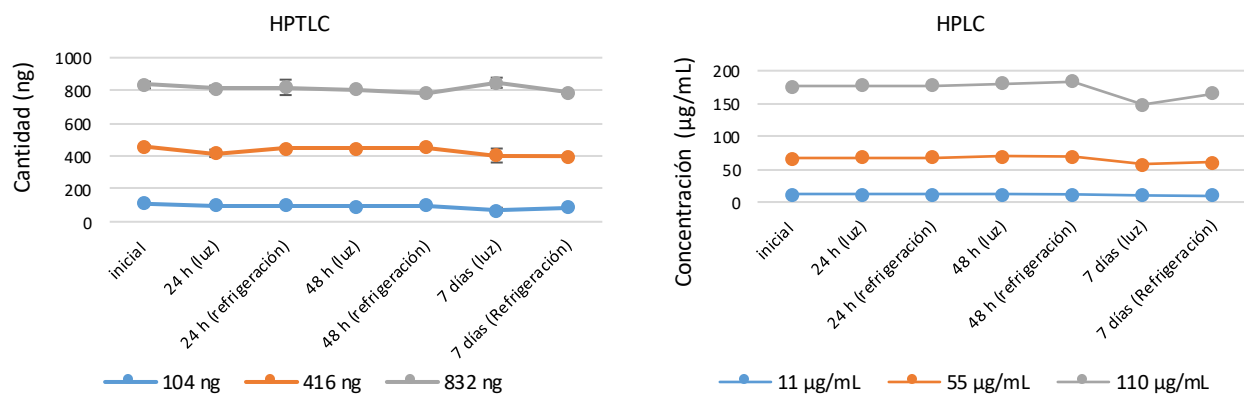


Figura 24. Estabilidad de muestras almacenadas en diferentes condiciones de luz y oscuridad c/refrigeración durante 24 horas, 48 horas y 7 días, analizadas utilizando: HPTLC (n=5) y HPLC (n=3).

En la tabla 5 podemos observar que la estabilidad de la muestra se mantiene hasta por 48 hrs, sin embargo para la cantidad más baja, se observa una disminución importante de la respuesta a los 7 días por efecto de la luz. La estabilidad también se analizó mediante HPLC (tabla 6) observándose que las muestras son estables incluso en presencia de luz durante 48 horas mientras que a los 7 días se observó una disminución importante en presencia de luz en comparación con las muestras que se mantuvieron en oscuridad.

Tabla 5. Resultados del estudio de estabilidad de PAX en solución (Buffer salino pH 7.4 con Brij® 58 3%) analizados mediante HPTLC.

CONDICIONES	104 ng		416 ng		832 ng	
	Cantidad (ng)	E _{rel} (%)	Cantidad (ng)	E _{rel} (%)	Cantidad (ng)	E _{rel} (%)
Inicial	109.8 ± 4.6	5.54	458.3 ± 7.1	10.17	834.1 ± 20.4	0.25
24 h (luz, sin R)	102.2 ± 6.3	5.0	417.2 ± 22.7	4.4	813.2 ± 17.2	2.3
24 h (Oscuridad c/R)	101.5 ± 4.0	3.5	445.6 ± 11.6	7.1	819.2 ± 46.9	4.1
48 h (luz, sin R)	95.9 ± 3.5	7.7	448.3 ± 10.1	7.8	805.9 ± 7.0	3.1
48 h (Oscuridad c/R)	98.8 ± 2.5	5.0	454.3 ± 8.4	9.2	783.1 ± 6.4	5.9
7 días (luz, sin R)	70.9 ± 15.0	31.87	403.9 ± 42.60	8.89	847.5 ± 30.78	2.76
7 días (Oscuridad c/R)	84.7 ± 2.6	18.6	400.2 ± 5.60	3.81	788.8 ± 7.85	5.20

Tabla 6. Resultados del estudio de estabilidad de PAX en solución (Buffer salino pH 7.4 con Brij® 58 3%) analizados mediante HPLC. Concentración promedio ± D.E. y Error relativo (Erel)

CONDICIONES	11 µg/mL		55 µg/mL		110 µg/mL	
	Concentración (µg/mL)	E _{rel} (%)	Concentración (µg/mL)	E _{rel} (%)	Concentración (µg/mL)	E _{rel} (%)
Inicial	11.31 ± 0.032	2.80	55.67 ± 0.73	1.22	109.31 ± 0.45	0.63
24 h (luz, sin R)	11.49 ± 0.305	4.41	55.70 ± 0.227	1.28	109.54 ± 0.153	0.42
24 h (Oscuridad c/R)	11.29 ± 0.042	2.61	55.88 ± 0.047	1.60	109.84 ± 0.323	0.27
48 h (luz, sin R)	11.69 ± 0.13	6.24	57.16 ± 0.24	3.93	111.65 ± 0.012	1.50
48 h (Oscuridad c/R)	11.71 ± 0.10	6.41	57.59 ± 0.29	4.71	113.80 ± 0.23	3.45
7 días (luz, sin R)	10.08 ± 0.37	8.35	47.73 ± 1.05	13.22	90.64 ± 1.40	17.60
7 días (Oscuridad c/R)	10.44 ± 0.28	5.13	50.5 ± 0.23	8.25	103.96 ± 1	5.49

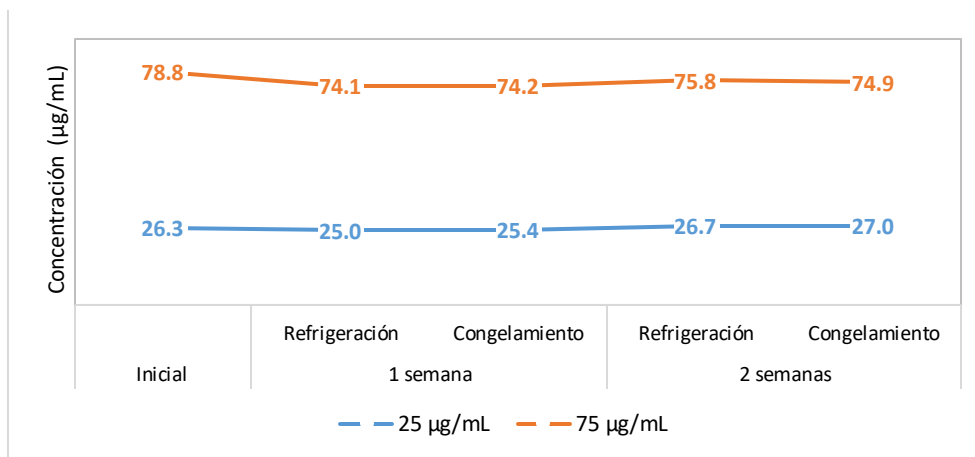


Figura 25. Resultados del estudio de estabilidad en refrigeración y congelamiento (n=3)

En la figura 25 se muestran los resultados de estabilidad de las muestras mantenidas en condiciones de oscuridad y almacenadas en refrigeración y congelamiento durante 1 y 2 semanas. Este estudio se realizó para cubrir el peor de los casos; en que se tuvieran dificultades para procesar y analizar las muestras por cuestiones de disponibilidad de los equipos (HPLC o UPLC), por ello se alargó el estudio de estabilidad a 2 semanas. En base a los resultados obtenidos se decidió procesar y analizar las muestras en un máximo de 48 horas protegiéndolas de la luz y

conservándolas en refrigeración, sin embargo en el caso de que no se tuviera acceso a los equipos o no fuera posible analizarlas dentro de ese periodo, las muestras se congelaron y solo se descongelaron en el momento en que se fueran a analizar, sin exceder un periodo de 2 semanas.

7.3 Pruebas de solubilidad y formulación de las microemulsiones.

La solubilidad en los excipientes a probar se cuantificó mediante espectroscopía UV o HPLC. En la tabla 7 se muestran los valores de absorbancia obtenidos para las soluciones de paroxetina preparadas, con los cuales se construyó la curva patrón (figura 26), los datos se analizaron mediante regresión lineal para obtener la ecuación de la recta ($y=13.73x+0.0571$). Se obtuvo una buena correlación, con una r^2 de 0.9919. Se observó linealidad en el intervalo de concentraciones de 0.0404-0.202 mg/mL. Las lecturas se realizaron a una $\lambda=294$ nm.

Tabla 7. Lecturas obtenidas para las soluciones preparadas

Concentración de paroxetina (mg/mL)	Absorbancia 1 [294 nm]	Absorbancia 2 [294 nm]	Absorbancia 3 [294 nm]	Absorbancia promedio
0.0404	0.55	0.5528	0.5537	0.552
0.0808	1.1652	1.1642	1.1653	1.165
0.1212	1.8424	1.8433	1.8442	1.843
0.202	2.73	2.74	2.84	2.770

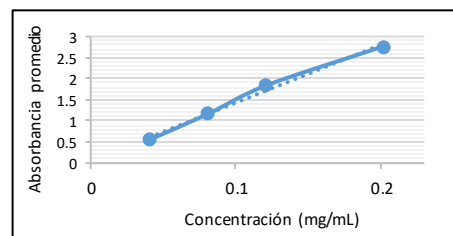


Figura 26. Curva patrón de paroxetina en metanol

La solubilidad de PAX en los distintos tensoactivos y excipientes evaluados se muestra en las figuras 27, 28 y 29.

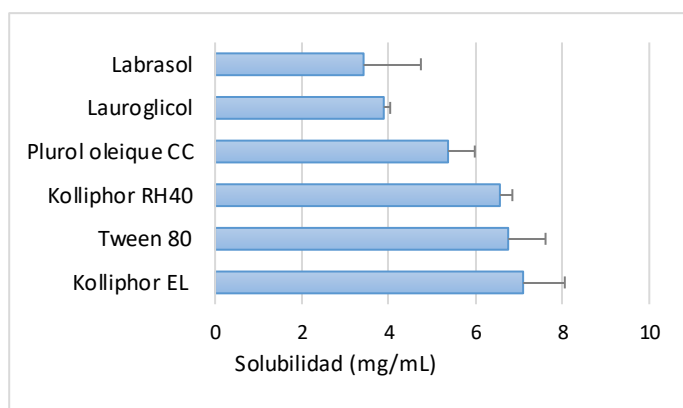


Figura 27. Solubilidad de PAX en tensoactivos.

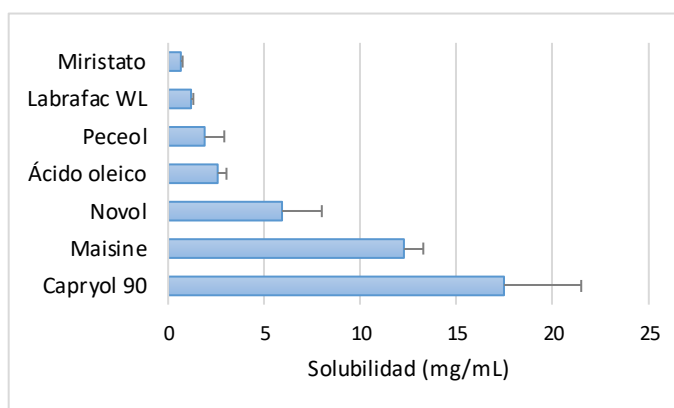


Figura 28. Solubilidad de PAX en excipientes oleosos.

En trabajos anteriores realizados en la FES-C se han formulado ME destinadas a la vía transdérmica utilizando Tween® 80, Transcutol® P, miristato de isopropilo y agua. Li y colaboradores (Li, y otros 2014) reportaron que el uso de la mezcla Tween® 80: Kolliphor® EL conduce a una mayor área de predominio de la ME. Aunado a la

adecuada solubilidad de PAX en estos excipientes, se decidió iniciar por construir los diagramas pseudo-ternario utilizando dichos excipientes. Los diagramas obtenidos se observan en la figura 30.

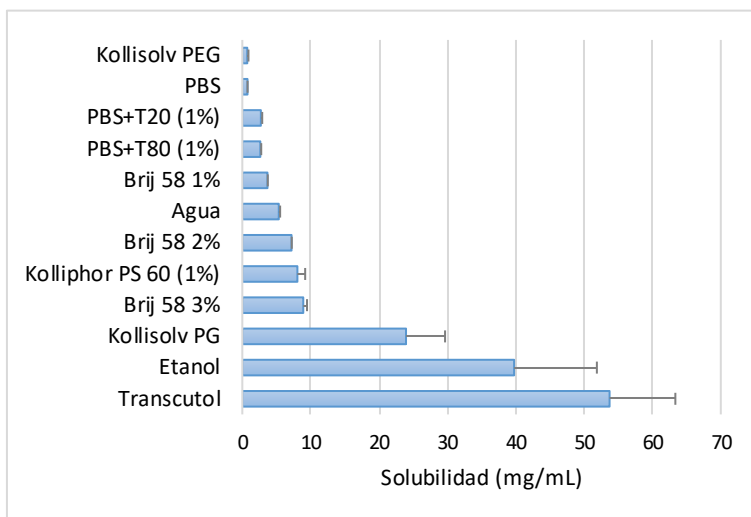


Figura 29. Solubilidad de PAX en Co-tensioactivos y soluciones acuosas.

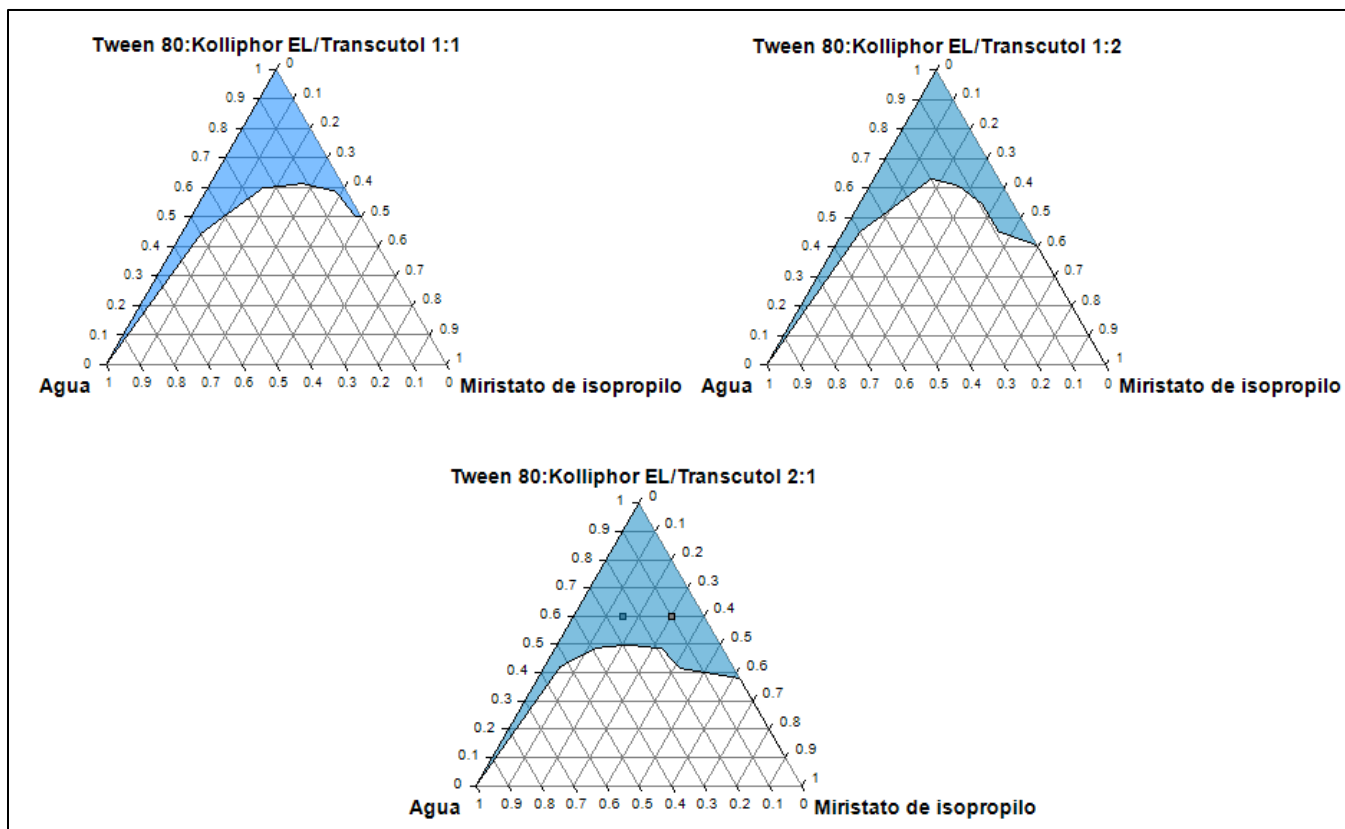


Figura 30. Diagramas pseudoternarios obtenidos utilizando Tween® 80: Kolliphor® EL (1:1)/ Transcutol® P (1:1, 1:2, 2:1), Miristato de isopropilo y agua.

Se obtuvieron ME en las distintas proporciones Tensoactivo/co-tensoactivo probadas (1:1, 1:2, 2:1), siendo la proporción 2:1 la que presenta una mayor área de predominio. En todos los sistemas prevalecen las ME de tipo o/w. Lo cual es congruente con el HLB de los tensoactivos utilizados, ya que de acuerdo a la teoría de HLB, las microemulsiones o/w se obtienen utilizando tensoactivos que son más solubles en agua que en la fase oleosa (HLB= 8-18), mientras que se obtienen microemulsiones w/o al utilizar tensoactivos con mayor solubilidad en componentes oleosos (HLB= 3.5-6). Por lo que ya que el Tween® 80 (HLB= 15 (Sigma-aldrich 2016)) y Kolliphor® EL (HLB=12-14 (BASF 2016)) son tensoactivos con mayor afinidad por el agua, tenderán a formar ME o/w predominantemente (Holmberg , y otros 2003).

También se ha reportado (Li, y otros 2014) el aumento en las áreas de predominio de las microemulsiones al utilizar mezclas de fases oleosas, por lo que se decidió construir los diagramas pseudo-ternarios utilizando una mezcla de Miristato de isopropilo y Labrafac™ lipophile WL, para las proporciones de surfactante/co-surfactante 1:2 y 2:1, que son las que mostraron mayor área de existencia de la ME (figura 31).

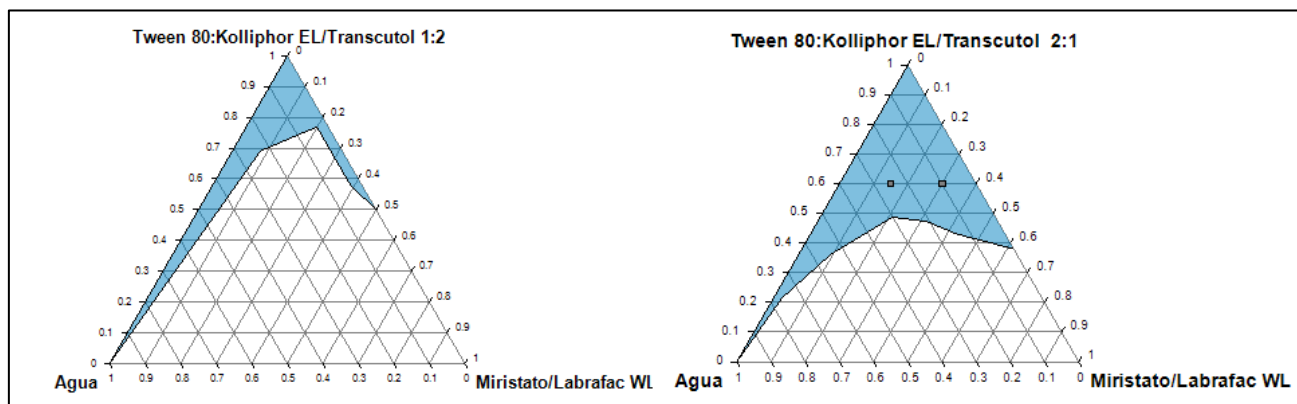


Figura 31. Diagramas pseudoternarios obtenidos utilizando Tween® 80: Kolliphor® EL (1:1)/ Transcutol® P (1:1, 1:2, 2:1), Miristato de isopropilo: Labrafac™ lipophile WL (1:1) y agua.

Tabla 8. Composición de las microemulsiones preparadas utilizando los diagramas de las figuras 27 y 28.

Denominación	Composición				PAX Adicionada (mg/mL)
	Tensoactivo (%)	Co-tensoactivo (%)	Componente oleoso (%)	Agua (%)	
MEM 2-1 o/w	T80/EL (1:1) (40)	TC (20)	MI (15)	25	60
MEM 2-1 w/o	T80/EL (1:1) (40)	TC (20)	MI (30)	10	Desestabilización al adicionar PAX
MEO 2-1 o/w	T80/EL (1:1) (40)	TC (20)	MI/LA (15)	25	Desestabilización al adicionar PAX
MEO 2-1 w/o	T80/EL (1:1) (40)	TC (20)	MI/LA (30)	10	Desestabilización al adicionar PAX

Se observó un incremento en el área de predominio de la microemulsión en la proporción 2:1 utilizando mezcla de excipientes oleosos. En base a los diagramas de las figuras 27 y 28, se eligieron las proporciones a probar, las cuales se observan en la tabla 8. Al intentar incorporar PAX se observó desestabilización de la ME.

La formulación MEM 2-1 o/w permitió incorporar 60 mg de PAX, sin embargo presentó un aumento importante en cuanto a la viscosidad al incorporar agua, con lo cual al intentar diluir el sistema para su caracterización o al colocarse la formulación en el compartimento donador en condiciones oclusivas, mostraba un comportamiento similar a un gel, lo cual concuerda con lo anteriormente reportado para sistemas que contienen Tween® 80, en donde un cambio importante en la viscosidad al incrementar la proporción de agua, se relaciona al cambio en la microestructura de la microemulsión derivado del cambio en el empaquetamiento interfacial (Mehta, Kaur y Bhasin 2009, Nazar, Khan y Shah 2009).

Se decidió utilizar únicamente Kolliphor® EL en combinación con un componente oleoso en el que PAX tuviera una mayor solubilidad, seleccionándose el ácido oleico ya que también presenta propiedades como agente promotor de la permeación y se ha reportado su uso en microemulsiones para administración de fármacos por vía transdérmica (Zhu, y otros 2008), por lo que se construyeron los diagramas de fases utilizando Kolliphor® EL, Transcutol® P, ácido oleico y agua (figura 32).

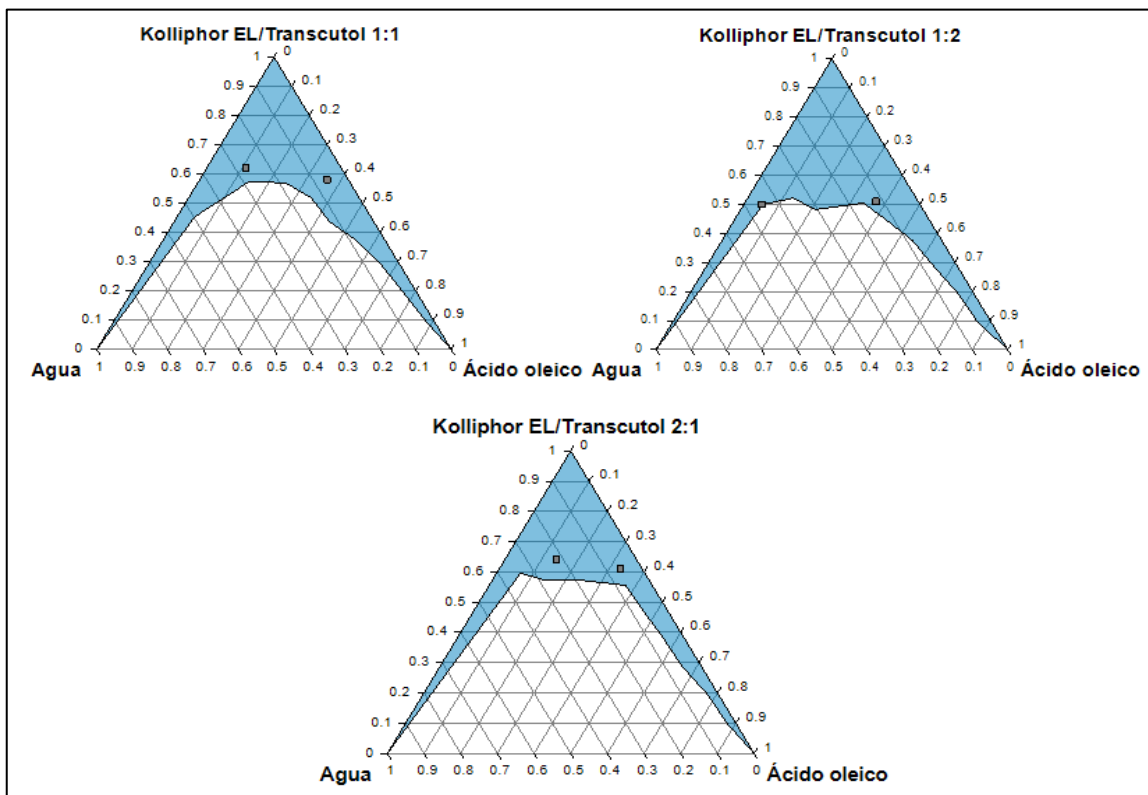


Figura 32. Diagramas pseudo-ternarios utilizando Kolliphor® EL, Transcutol® P, ácido oleico y agua.

Utilizando esta combinación se observó una mayor área de predominio de la microemulsión e incluso se obtuvieron tanto ME o/w como w/o, las cuales permitieron incorporar hasta 60 mg/mL de formulación en el caso de la ME 1-1 o/w.

Tabla 9. Composición y caracterización de las microemulsiones preparadas utilizando los diagramas de la figura 7. Tween® 80 (T80), Kolliphor® EL (EL), Transcutol® P (TC), ácido oleico (AO).

Denominación	Composición			Agua (%)	Solubilidad de PAX en la microemulsión		Viscosidad Poise (22 °C, 350 rpm)	Índice de refracción	Tamaño ME blanco (IP) nm	Tamaño ME c/PAX nm	pH
	Tensoactivo (%)	Co-tensoactivo (%)	Componente oleoso (%)		Experimental (mg/mL)	Teórica (mg/mL)					
ME 1-1 o/w	EL (31)	TC (31)	AO (11)	27	60	14.4	1.741	1.43	75.05* (0.776)	194.4 (0.66)	3.3
ME 1-2 o/w	EL (20)	TC (30)	AO (5)	45	50	19.5	0.730	1.42	71.79* (0.473)	173.4 (0.41)	3.7
ME 2-1 o/w	EL (43)	TC (21)	AO (14)	22	50	10.2	3.332	1.44	75.80* (0.67)	172.4 (0.37)	ND
ME 1-1 w/o	EL (29)	TC (29)	AO (36)	6	40	9.0	1.077	1.45	129.6 (0.837)	194.83 (0.59)	ND
ME 1-2 w/o	EL (17)	TC (34)	AO (37)	12	40	10.1	0.702	1.44	60.20 (0.32)	63.71 (0.1)	ND
ME 2-1 w/o	EL (41)	TC (20)	AO (33)	6	35	7.7	1.832	1.45	101.6 (0.53)	109 (0.40)	ND

*Las mediciones de tamaño reportadas se realizaron en muestras diluidas.

Ya que todos los sistemas preparados permitieron incorporar el fármaco, se decidió realizar la selección de la formulación más adecuada mediante estudios de permeación, con el fin de observar el efecto del tipo de formulación preparado. La caracterización de las ME o/w se realizó diluyendo la muestra con agua, debido a que se ha reportado que en algunas ocasiones es necesario para evitar el agregado de los glóbulos, lo cual surge como resultado del aumento de las interacciones en el umbral de percolación (Podlogar, y otros 2004). Sin embargo, en el caso de las ME w/o no es posible diluir las muestras sin desestabilizar la microemulsión, por lo que en ese caso las mediciones se realizaron directamente en la muestra.

Los estudios de solubilidad complementarios realizados durante la estancia corta en la Universidad de Ginebra nos permitieron identificar excipientes en los que PAX presenta una mayor solubilidad, utilizando estos excipientes se decidió formular microemulsiones utilizando Capryol™90, Maisine™ 35-1, Novol™ y etanol. Los diagramas pseudo-ternarios obtenidos se encuentran en las figuras 33, 34 y 35. Dichos sistemas presentaron una mayor área de predominio en comparación con los formulados anteriormente y se obtuvieron tanto microemulsiones o/w como w/o.

En la figura 33 se colocaron puntos negros indicando las proporciones seleccionadas dentro del área de predominio de la microemulsión, para las cuales se evaluó la solubilidad de PAX (tabla localizada en la parte inferior de la figura), encontrándose que la mayor solubilidad se obtiene en el punto localizado en la parte media de los diagramas y al

utilizar la proporción S1111-2. Por esta razón se decidió utilizar la proporción: 25 % tensoactivo, 25 % co-tensoactivo, 30 % componente oleoso y 20 % agua (en el caso de la proporción 1-1) y 16.7 % tensoactivo, 33.3 % co-tensoactivo, 30 % componente oleoso y 20 % agua (para la proporción 1-2). Dichas proporciones se localizaron en los diagramas posteriores, se revisó su estabilidad y se determinó la solubilidad de PAX (tabla 10).

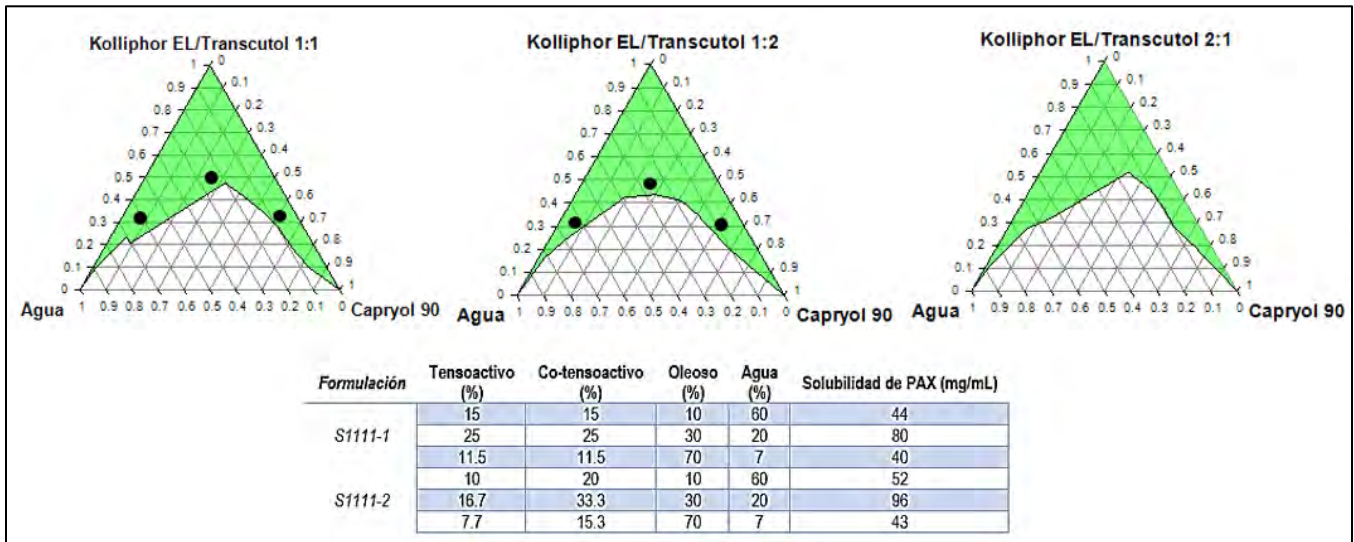


Figura 33. Diagramas de fase pseudo-ternarios obtenidos utilizando Kolliphor® EL, Transcutol® P, Capryol™ 90 y agua. Resultados de las pruebas de solubilidad en función de las proporciones probadas.

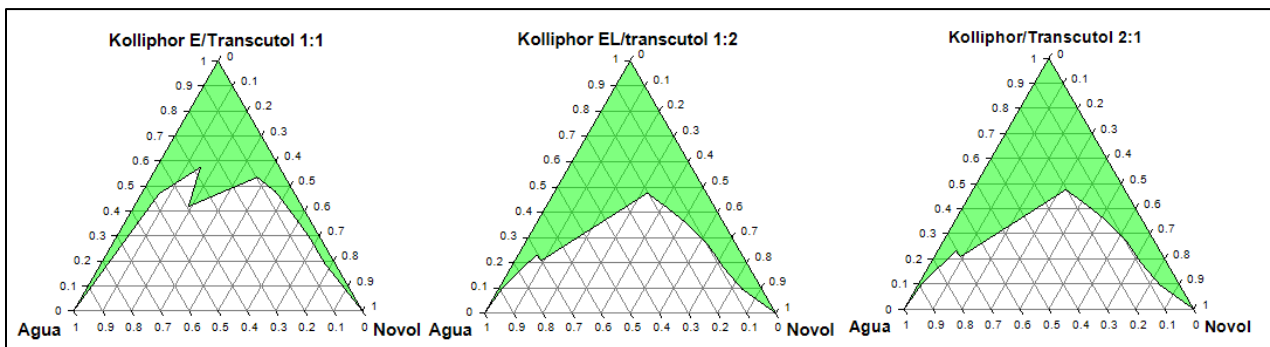


Figura 34. Diagramas de fases pseudo-ternarios obtenidos utilizando Kolliphor® EL, Transcutol® P, Novol™ y agua.

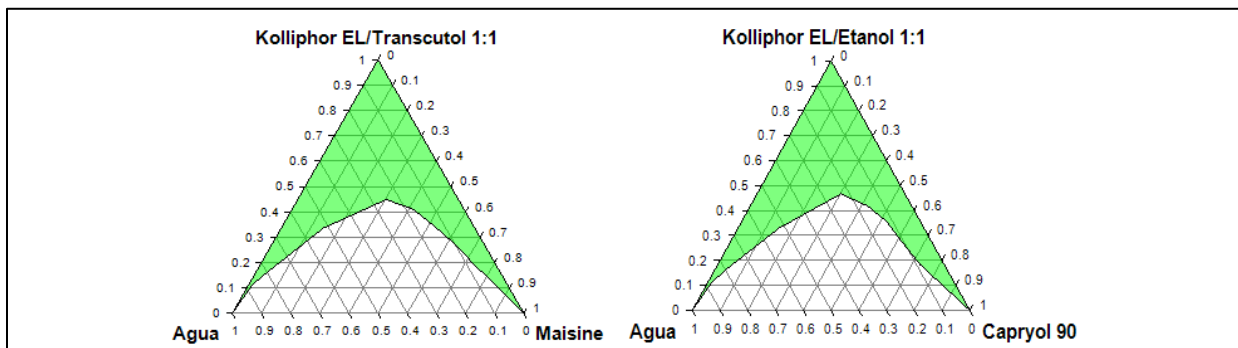


Figura 35. Diagramas de fases pseudo-ternarios obtenidos utilizando Kolliphor® EL/Transcutol® P, Maisine™ 35-1 y agua, así como Kolliphor® EL/etanol, Capryol™ 90 y agua.

Los sistemas preparados utilizando las proporciones 1-1 y 1-2 tensoactivo/co-tensoactivo se inspeccionaron de manera visual observándose soluciones de baja viscosidad, transparentes y sin separación de fases. Sin embargo al utilizar la proporción 2-1 algunos de los sistemas presentaban un aumento de viscosidad al adicionar agua. De acuerdo a los sistemas preparados y caracterizados, el uso de Capryol™ 90 condujo a un menor tamaño de gota. Las microemulsiones de tipo o/w presentaron un pH ácido entre 3.3-4.5, por lo que el PAX (pKa= 9.9) se encontraría en su forma ionizada.

Tabla 10. Composición de las microemulsiones obtenidas: Kolliphor® EL (EL), Transcutol® P (TC), Etanol (ET), ácido oleico (AO), Capryol™ 90 (C90), Maisine™ 35-1 (MA) y Novol™ (NO).

Denominación	Composición			Agua (%)	Solubilidad de PAX en la microemulsión		Tamaño** c/PAX (nm)	IP	pH
	Tensoactivo (%)	Co-tensoactivo (%)	Componente oleoso (%)		Experimental (mg/mL)	Teórica (mg/mL)			
S1111-1 w/o	EL (25)	TC (25)	C90 (30)	20	80	18.7	9.04	0.92	
S1111-2 w/o	EL (16.7)	TC (33.3)	C90 (30)	20	96	23.1	15.42	0.78	
S1111-2 o/w	EL (10)	TC (20)	C90 (10)	60	52	24.5	8.43	0.41	4.55
S1141-1 w/o	EL (25)	TC (25)	MA (30)	20	25	20.2	202.8	0.29	
S11151-1 w/o	EL (25)	TC (25)	NO (30)	20	24	15.4	166.8	0.28	
S1211-1 w/o	EL (25)	ET (25)	C90 (30)	20	48	20.4	5.78	0.94	

** El tamaño reportado se midió sin diluir la muestra.

En las tablas 9 y 10 podemos observar que la solubilidad teórica calculada en función de la solubilidad de cada uno de los excipientes es menor a la solubilidad obtenida de manera experimental, esto es debido a que al formarse las ME la presencia de microdominios aumentan la solubilidad de PAX. Los mayores tamaños de glóbulo (>100 nm) corresponden a agregados mientras que los diámetros más pequeños corresponden a glóbulos independientes (Baroli, y otros 2000).

7.4 Resultados de las pruebas de permeación pasiva y deposición de PAX en la piel

Para evaluar la absorción transdérmica de PAX se utilizó como modelo la piel de oreja de cerdo por su facilidad de obtención en comparación con la piel humana y por qué presenta características similares a la humana, estos incluyen el espesor de la epidermis, la relación de espesor dérmis-epidérmis, la semejanza en la densidad de folículos pilosos y vasos sanguíneos en la piel, así como el contenido de glicoesfingolípidos, ceramidas, colágeno y elastina (Flaten, y otros 2015). La piel de cerdo tiene un punto isoeléctrico de 4 (Merino, y otros 1999), cercano al descrito para piel humana (Marro, y otros 2001). Por lo que el modelo utilizado es válido para evaluar las formulaciones preparadas y para realizar estudios de permeación transdérmica con iontoforesis.

La microemulsión MEM 2-1 o/w se evaluó de manera preliminar en condiciones oclusivas colocando diferentes volúmenes de formulación (300 μL y 500 μL) para determinar el más adecuado a utilizar en los estudios subsecuentes, sin embargo, al término del estudio se observó que la formulación aplicada presentaba una consistencia similar a un gel. Se logró cuantificar PAX únicamente a las 24 horas en las celdas correspondientes a la ME y con respecto a la deposición en piel, se detectó PAX tanto en las muestras de piel correspondientes a la ME como en la solución, sin embargo debido a la alta viscosidad que presenta la formulación al entrar en contacto con la humedad de la piel, se decidió probar otras formulaciones.

Las microemulsiones preparadas con la mezcla Kolliphor® EL, Transcutol® P, ácido oleico y agua se cargaron con el fármaco y se probó su permeación a través de la piel. En la figura 36 se muestra la comparación entre las formulaciones preparadas con distintas proporciones de tensoactivo/co-tensoactivo (1:1, 1:2 y 2:1) y la solución saturada de PAX (60 mg/mL), la permeación es significativamente mayor para las proporciones 1:1 y 1:2 en comparación con las otras ME preparadas, sin embargo solo la ME 1-1 o/w provee una mayor cantidad permeada en comparación con la solución saturada de PAX.

Mientras que la ME 1-2 o/w fue la que mostró una mayor cantidad depositada en piel con respecto a la solución. También puede observarse que tanto la permeación como la deposición son significativamente mayores al usar ME del tipo o/w en comparación con las w/o. En la figura 37 se muestra la comparación entre las formulaciones ME 1-1 o/w y ME 1-1 w/o.

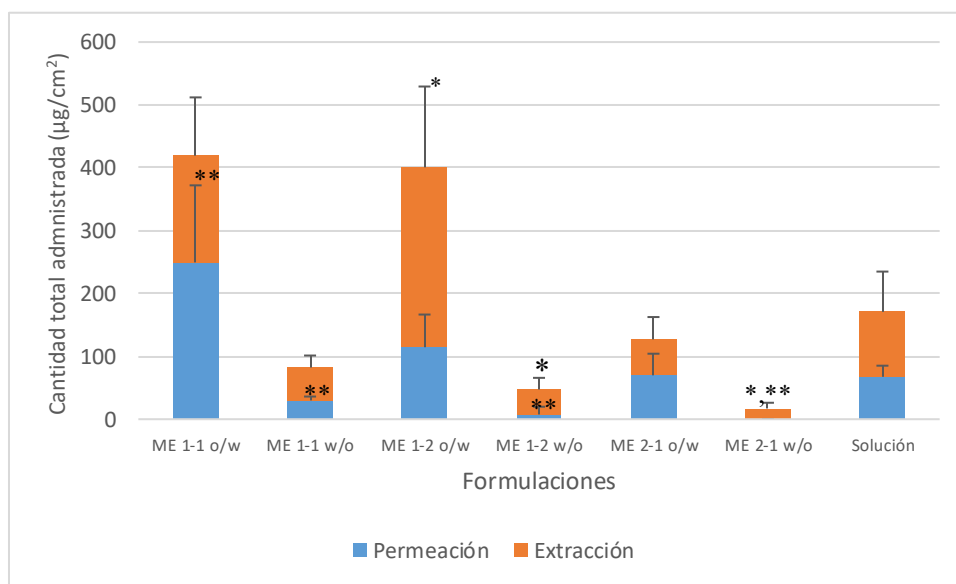


Figura 36. Cantidad total de PAX administrada: permeación y deposición en piel (Media \pm D.E.) al utilizar las formulaciones ME 1-1, 1-2 y 2-1. **Diferencia estadísticamente significativa con respecto a la permeación obtenida con la solución. * Diferencia estadísticamente significativa con respecto a la deposición en piel obtenida con la solución.

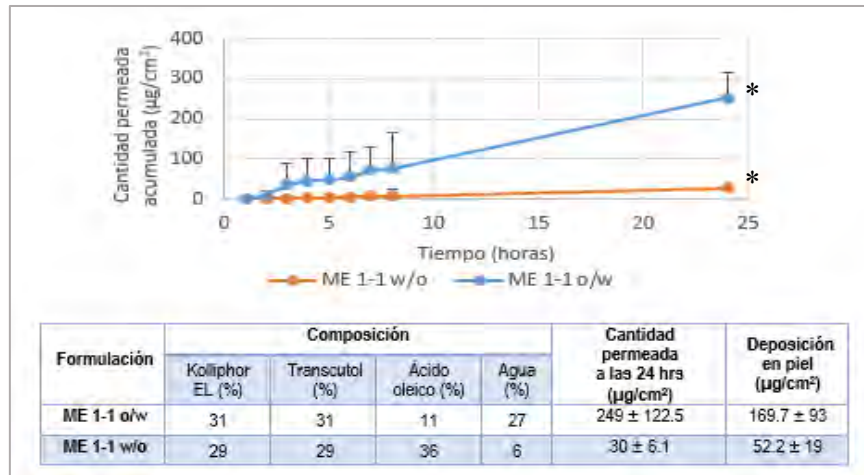


Figura 37. Cantidad permeada acumulada de PAX vs tiempo (Media ± D.E.) al utilizar las formulaciones ME 1-1 w/o y ME 1-1 o/w; composición de las formulaciones y resultados de permeación y deposición en piel (Media ± D.E). *Diferencia estadísticamente significativa.

Debido a la mayor cantidad administrada que proveen las formulaciones ME 1-1 o/w y ME 1-2 o/w, se seleccionaron para evaluar la forma en que se distribuye PAX en las diferentes capas de la piel (estudios de biodistribución). Las microemulsiones desarrolladas en la FES-Cuautitlán se evaluaron en la Universidad de Ginebra utilizando piel completa con la finalidad de realizar los cortes necesarios para los estudios de biodistribución, sin embargo, se obtuvo una menor cantidad permeada con respecto a la obtenida en los estudios de permeación anteriores, por lo que se complementaron los estudios utilizando también piel dermatomada y piel cortada con micrótopo (figuras 38 y 39). Para ambas formulaciones (ME 1-1 y ME 1-2) se encontraron diferencias significativas entre la cantidad permeada a las 24 hrs utilizando piel cortada (micrótopo) y piel completa. Se ha reportado que el uso de piel completa frente a piel cortada resulta en una disminución en la penetración de los compuestos lipofílicos ($\log P_{PAX} = 3.95$) debido a la naturaleza acuosa de la dermis (H. A. Benson 2012). Wilkinson y colaboradores (Wilkinson, y otros 2006) encontraron que al estudiar la permeación de testosterona ($\log P = 3.32$) y cafeína ($\log P = -0.01$) a través de piel completa y piel dermatomada se observó una reducción significativa en el flujo máximo de testosterona y un aumento del tiempo de latencia (t_0), sin embargo no hubo diferencia significativa en la deposición en piel, mientras que en el caso de la cafeína, un compuesto altamente soluble en agua, se encontró muy poca influencia del grosor de la piel en la penetración percutánea y la deposición en piel, sin embargo se observó un pequeño incremento t_0 al usar piel completa. Inesperadamente la cantidad permeada utilizando piel cortada y piel dermatomada presentó diferencia significativa, lo cual puede ser debido a que el grosor de la piel obtenida con el dermatomo está sujeto al ángulo de corte, la presión aplicada y la velocidad del corte, por lo que se requiere habilidad y práctica para obtener muestras de piel reproducibles y con un grosor constante (Kao 1991). Sin embargo, a pesar de las diferencias en la

cantidad permeada y depositada en piel, no hubo diferencia significativa en la cantidad total administrada al utilizar piel con distintos tratamientos.

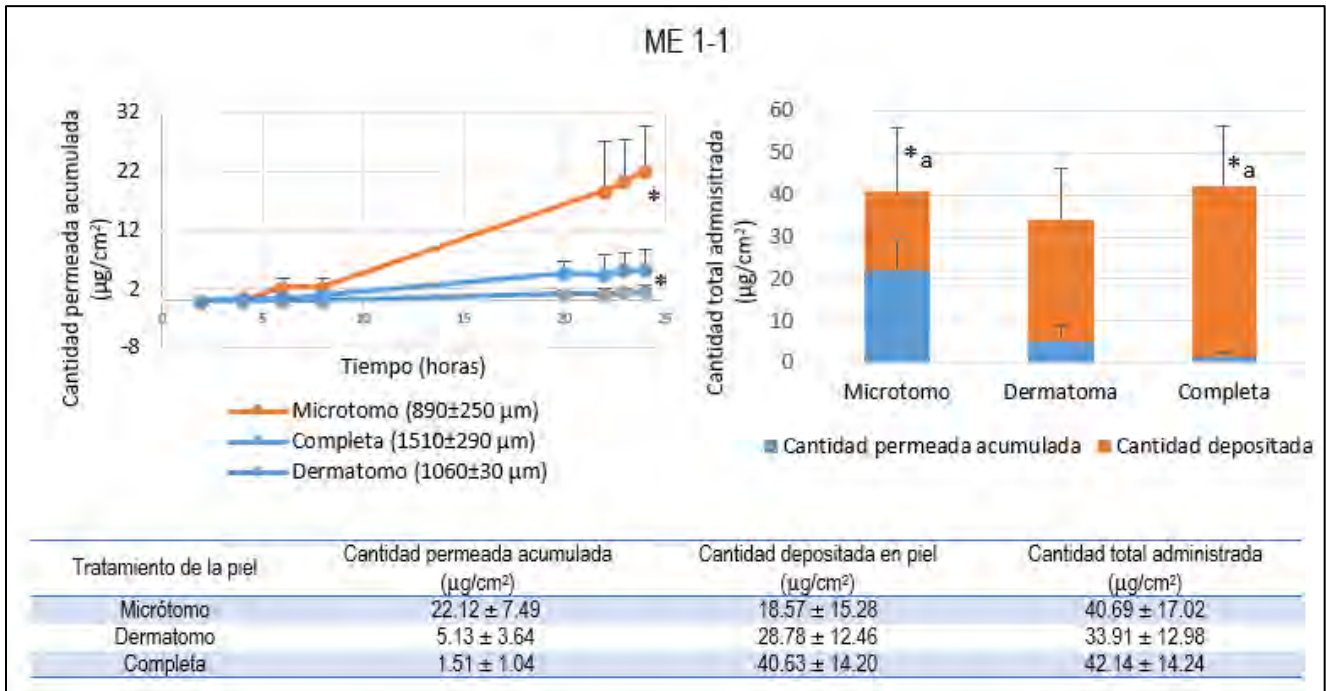


Figura 38. a) Cantidades de PAX acumuladas ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) frente al tiempo (h) obtenidas tras evaluar la formulación ME 1-1 en piel tratada con distintos grosores: piel completa, piel dermatomada y piel cortada con micrótopo. b) Comparación de la cantidad total de PAX administrada en los ensayos transdérmicos al aplicar la formulación ME 1-1 o/w. * Diferencia estadísticamente significativa en la cantidad permeada. a* Diferencia significativa en la deposición en piel. *b Diferencia significativa con respecto al uso de piel cortada con micrótopo.

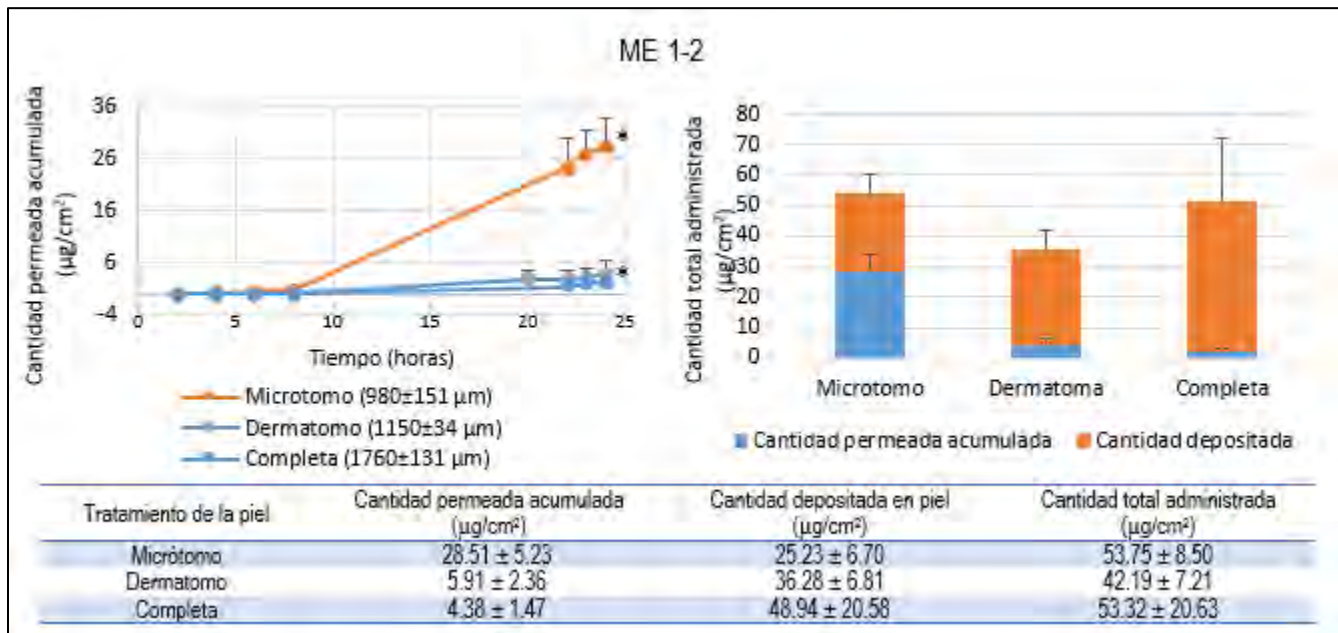


Figura 39. a) Cantidades de PAX acumuladas ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) frente al tiempo (h) obtenidas tras evaluar la formulación ME 1-2 en piel tratada con distintos grosores: piel completa, piel dermatomada y piel cortada con micrótopo. b) Comparación de la cantidad total de PAX administrada en los ensayos transdérmicos al aplicar la formulación ME 1-2 o/w. * Diferencia estadísticamente significativa. *a Diferencia significativa con respecto a la cantidad permeada obtenida utilizando piel cortada con micrótopo.

Al comparar la cantidad permeada de PAX al utilizar las formulaciones ME 1-1 y ME 1-2 (difieren en la proporción tensoactivo/Co-tensoactivo) en piel completa se encontró diferencia significativa en la cantidad de PAX permeada en 24 horas, la cual fue mayor utilizando la ME 1-2. No se encontró diferencia significativa en la cantidad depositada en la piel. En cuanto a los parámetros de permeación obtenidos mediante el ajuste de los valores experimentales, la formulación ME 1-2 presentó un valor significativamente mayor para J_{ss} , K_p , KH en comparación con ME 1-1 (figura 41). En los estudios de biodistribución realizados para las formulaciones ME 1-1 y ME 1-2 se observó que para ambas formulaciones el PAX se deposita principalmente en las primeras capas de la piel (estrato córneo y epidermis) y la concentración disminuye en las capas inferiores (dermis) (figura 40).

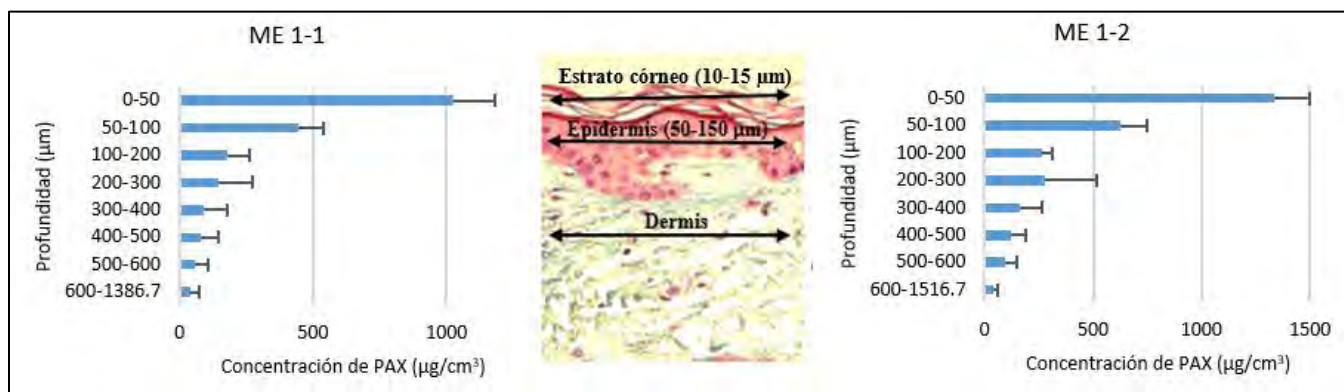


Figura 40. Perfil de biodistribución (cantidad de PAX extraída frente a la profundidad de los cortes realizados) en piel utilizando las formulaciones ME 1-1 y ME 1-2 durante 24 horas.

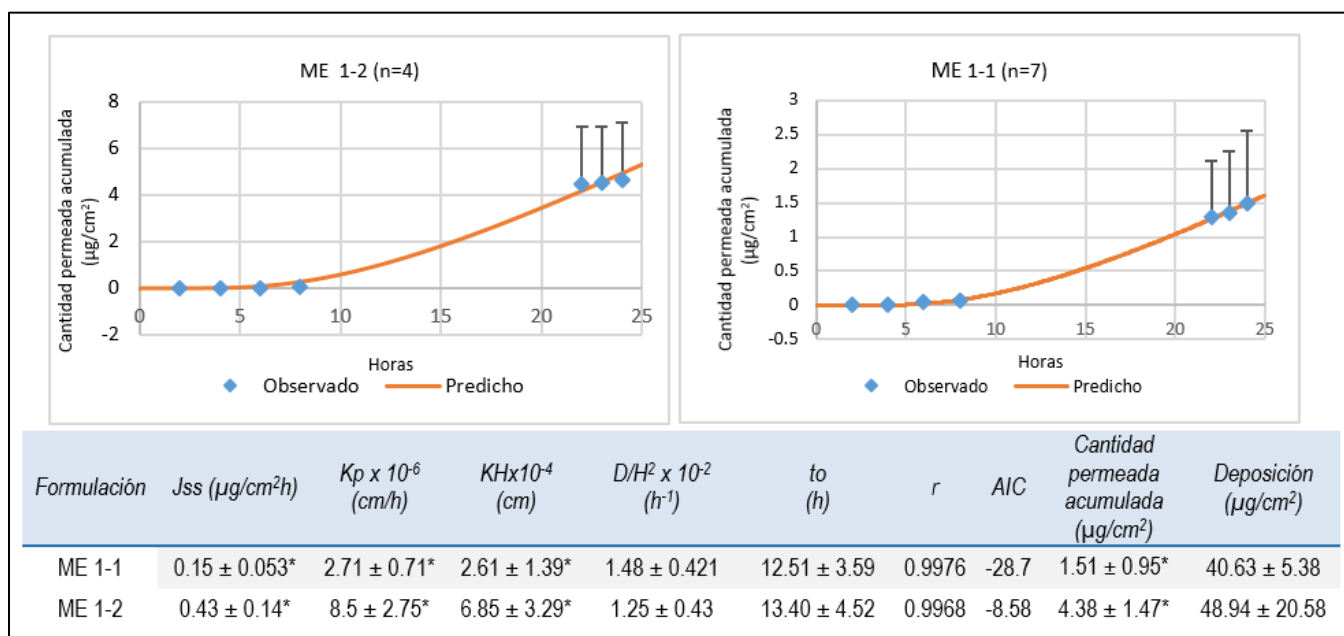


Figura 41. Comparación de la cantidad acumulada de PAX ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) frente al tiempo observada (Media \pm D.E) y predicha para las formulaciones ME 1-1 y ME 1-2; parámetros de permeación obtenidos mediante el ajuste: Flujo en el estado estacionario (J_{ss}), coeficiente de permeabilidad (K_p), reparto (KH), difusión (D/H^2) y tiempo de latencia (t_0) (Media \pm E.E), deposición de PAX en piel y parámetros estadísticos que definen la bondad de los datos ajustados: coeficiente de correlación (r) y criterio de Akaike (AIC). *Diferencia significativa.

7.4.1 Efecto del componente oleoso

Se realizaron los estudios de permeación utilizando las formulaciones ME 1-1 (ácido oleico), S1141-1 (Maisine™ 35-1), S1151-1 (Novol™), S1111-1 (Capryol™ 90). Se comparó la cantidad permeada acumulada a las 24 horas y la deposición en piel (figura 42).

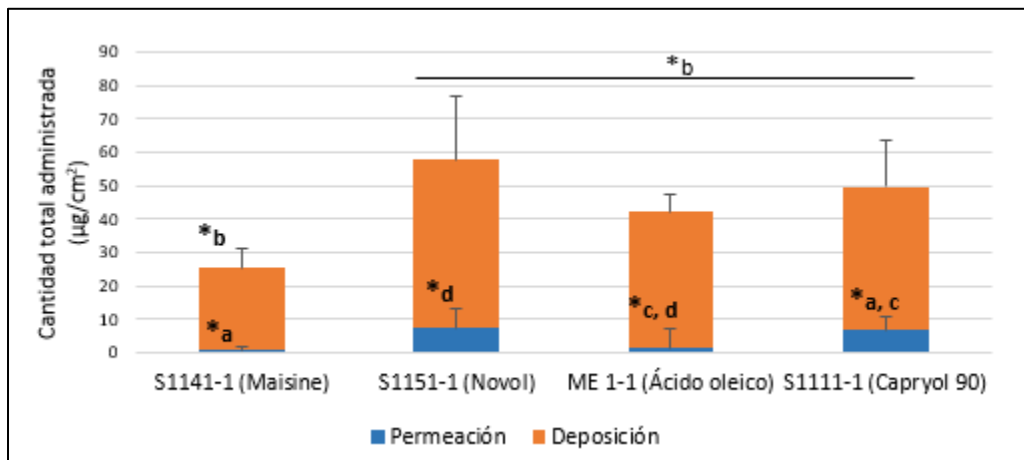


Figura 42. Comparación de la cantidad total administrada ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) a través de la piel al aplicar las formulaciones S1141-1, S1151-1, ME 1-1, S1111-1 durante 24 horas. *Diferencia significativa ($P < 0.05$).

Se obtuvo una mayor permeación con las ME S1151-1 y S1111-1, en comparación con S1141-1 y ME 1-1. Con respecto a la cantidad depositada en piel se encontró diferencia significativa entre la formulación que contiene Maisine™ 35-1 en comparación con las formulaciones en que se usa Novol™, ácido oleico y Capryol™ 90.

Se realizó el ajuste de los resultados experimentales mediante la ecuación de Scheuplein, los resultados obtenidos se observan en la figura 43. El mayor flujo se obtiene al utilizar las formulaciones S1111-1 (Capryol™) y S1151-1 (Novol™). A pesar de que la solubilidad de PAX en la formulación S1151-1 es baja (24 mg/mL) en comparación con el resto de las ME, esta ME presenta el mayor coeficiente de permeabilidad y reparto, seguida por la ME S1111-1 la cual muestra un coeficiente de permeación mayor a las formulaciones S1141-1 y ME 1-1 y el menor tiempo de latencia de todas las ME probadas. La variación del tipo de componente oleoso no impactó en el parámetro de difusión de PAX.

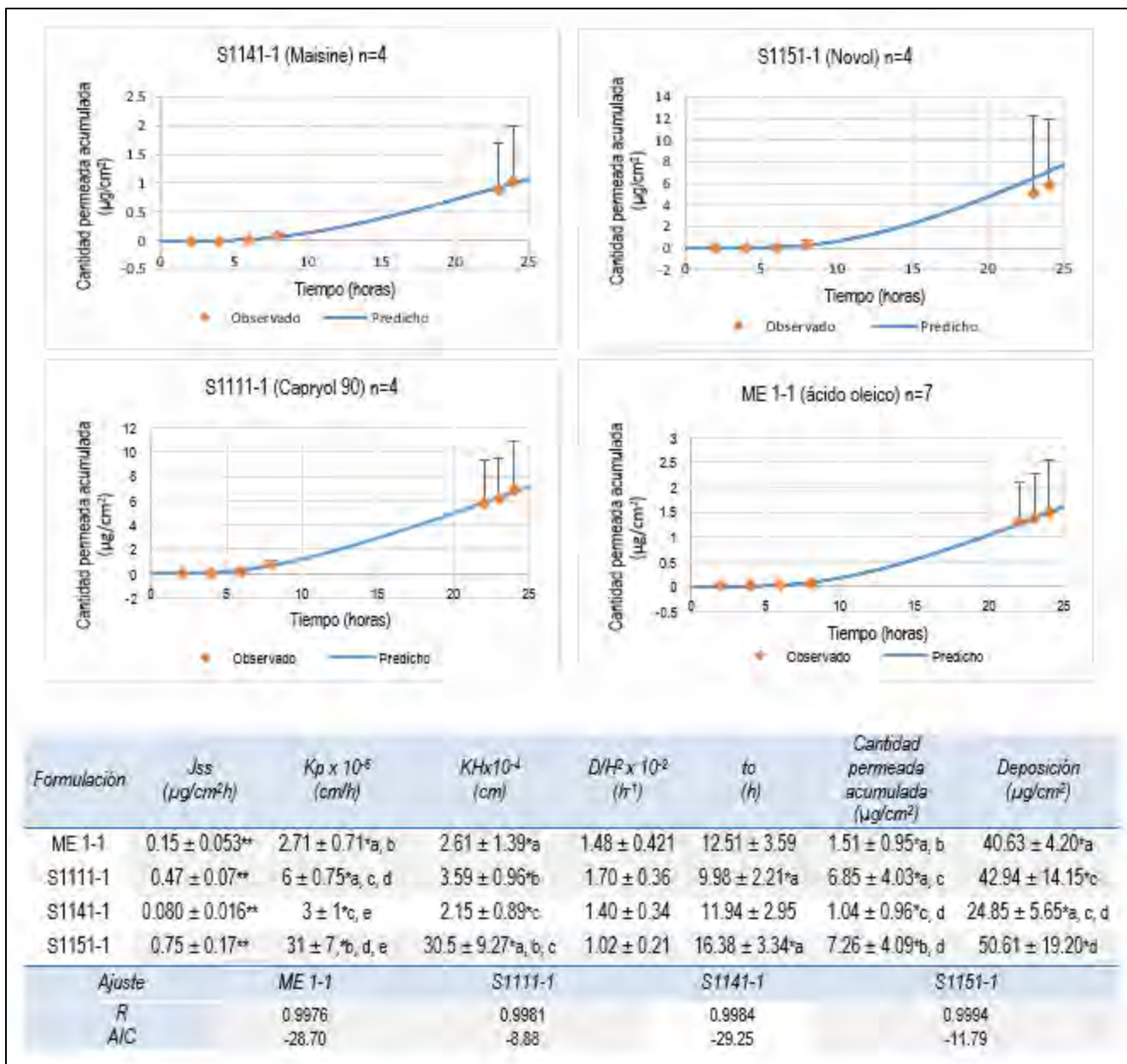


Figura 43. Comparación de la cantidad acumulada de PAX ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) frente al tiempo observada (Media \pm D.E) y predicha para las formulaciones ME 1-1, S1111-1, S1141-1 y S1151-1; parámetros de permeación obtenidos mediante el ajuste: Flujo en el estado estacionario (J_{ss}), coeficiente de permeabilidad (K_p), reparto (KH), difusión (D/H^2) y tiempo de latencia (t_0) (Media \pm E.E). Parámetros estadísticos que definen la bondad de los datos ajustados: coeficiente de correlación (r) y criterio de Arkaike (AIC). *Diferencia estadísticamente significativa, ** Diferencia estadísticamente significativa entre todas las formulaciones.

CapryolTM 90 (propilenglicol monocaprilato) y NovolTM (alcohol oleico), moléculas que presentan un grupo hidroxilo en su estructura han sido los que permiten una mayor permeación de PAX a través de la piel. Se ha reportado que los alcoholes pueden potenciar la penetración de fármacos lipófilos debido a que permiten aumentar la solubilidad del fármaco no solo en la formulación sino también en las áreas lipofílicas de la capa córnea (Trommer y Neubert 2006). Estas moléculas difieren en la longitud de la cadena alquílica, la cual es importante para su acción como

promotores de la penetración. Se ha visto que el incremento en la longitud de la cadena alquílica aumenta la permeación hasta valores máximos encontrados con longitudes de seis a ocho átomos de carbono, sin embargo, alcoholes con un número superior de átomos de carbono mostró una disminución en la tasa de penetración durante los experimentos con indometacina como fármaco lipofílico modelo (Chien, y otros 1988). En el caso de la promoción de PAX, Novol™ el alcohol con la mayor cadena alquílica (18 átomos de carbono) mostro parámetros de permeación más adecuados en comparación con Capryol™ 90 (8 átomos de carbono). Al comparar el efecto de Novol™ y ácido oleico, moléculas muy similares estructuralmente, se observó que el alcohol produjo una mayor permeación lo cual puede ser debido a la mayor solubilidad que presenta PAX en este y a la muy documentada capacidad de este tipo de compuestos para extraer lípidos y proteínas de la bicapa lipídica incrementando la porosidad del estrato corneo, efecto que podría aumentar el flujo (Williams y Barry 2012).

En el caso de Capryol™ 90 se ha reportado que se puede incorporar en el estrato córneo aumentando la fluidez y permeabilidad de la piel y, portanto facilitando el paso de sistemas dispersos líquidos, como microemulsiones (Ogiso, Niinaka y Iwaki 1996). También fue el excipiente oleoso en el que PAX presento una mayor solubilidad. El aumento de la solubilidad del fármaco en la ME es un método eficaz para mejorar la penetración a través de la piel (Zhao, y otros 2006), ya que esto permite tener una mayor dosis de fármaco, lo que podría mejorar la actividad termodinámica.

Debido a que se obtuvo una buena permeación y deposición, el menor t_0 y la mayor solubilidad de PAX, se eligió la formulación S1111-1 para evaluar el efecto del co-tensoactivo.

7.4.2 Efecto del co-tensoactivo

Debido a que la solubilidad de PAX en etanol fue una de las más elevadas, se decidió evaluar el efecto del co-tensoactivo en la permeación de PAX. Se compararon las formulaciones S1211-1 y S1111-1, encontrándose diferencia significativa para la cantidad permeada a las 24 h, pero con una deposición de PAX en piel similar (figura 44).

En la figura 45 se puede observar que el cambio del co-tensoactivo modifico el J_{ss} , K_p y KH, siendo mayores al usar Transcutol® P. Por lo que en los estudios subsecuentes se continuó utilizando este excipiente. Cázares-Delgadillo y colaboradores (Cázares-Delgadillo, y otros 2005), concluyeron que la presencia de Transcutol® P como co-disolvente, promueve la absorción del tensioactivo en la piel, favoreciendo su interacción con los lípidos de l estrato córneo. Además, de que puede dar lugar a un cambio en la solubilidad de un soluto, como en este caso ocurre con PAX, alterando su actividad termodinámica y por consiguiente el coeficiente de reparto piel/vehículo.

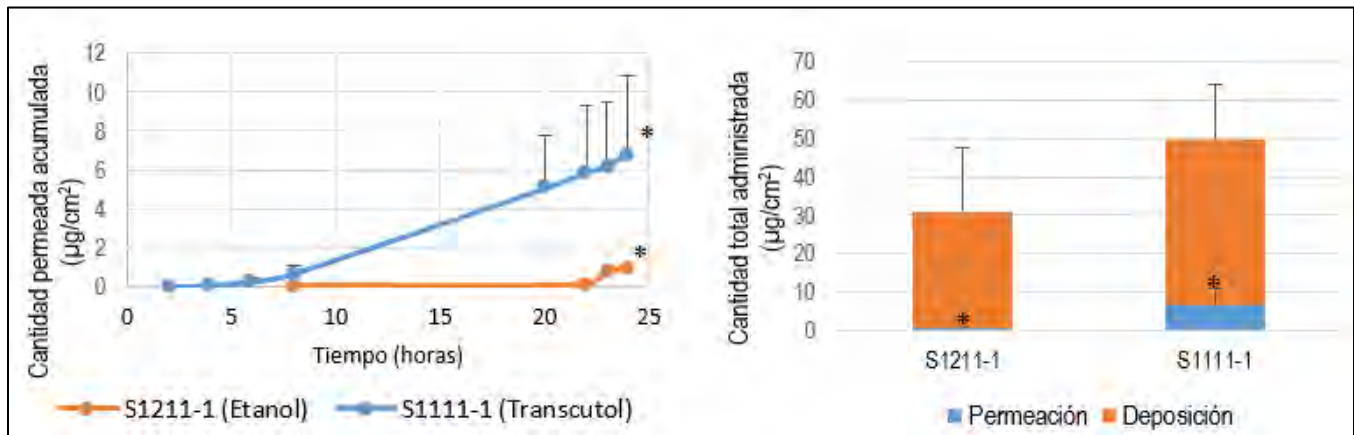


Figura 44. Comparación de los Perfiles de permeación de PAX a partir de las formulaciones S1211-1 y S1111-1 y Cantidad total de PAX administrada a partir de las formulaciones probadas.*Diferencia estadísticamente significativa entre formulaciones.

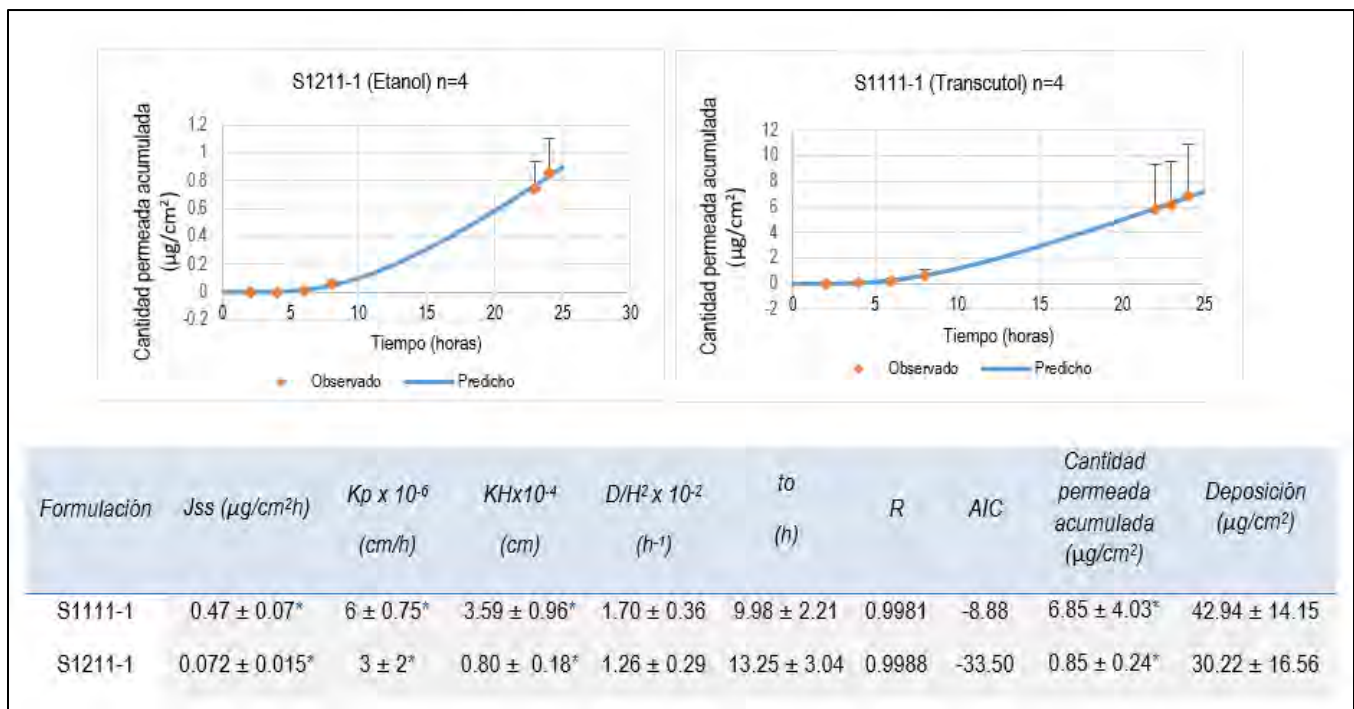


Figura 45. Comparación de la cantidad acumulada de PAX ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) frente al tiempo observada (Media \pm D.E) y predicha para las formulaciones S1111-1 y S1211-1; parámetros de permeación obtenidos mediante el ajuste: Flujo en el estado estacionario (J_{ss}), coeficiente de permeabilidad (K_p), reparto (KH), difusión (D/H^2) y tiempo de latencia (t_0) (Media \pm E.E), deposición de PAX en piel y parámetros estadísticos que definen la bondad de los datos ajustados: coeficiente de correlación (r) y criterio de Akaike (AIC).*Diferencia estadísticamente significativa entre formulaciones.

7.4.3 Efecto de la proporción tensoactivo/co-tensoactivo

Se evaluó la permeación de las formulaciones S1111-1 y S1111-2 en donde la diferencia en la composición es la proporción Kolliphor® EL/ Transcutol® P 1:1 y 1:2, al analizar los datos se encontró diferencia significativa en la

deposición de PAX en piel (figura 46), siendo mayor en el caso de la formulación S1111-2, lo cual concuerda con lo encontrado para las formulaciones ME 1-1 y ME 1-2.

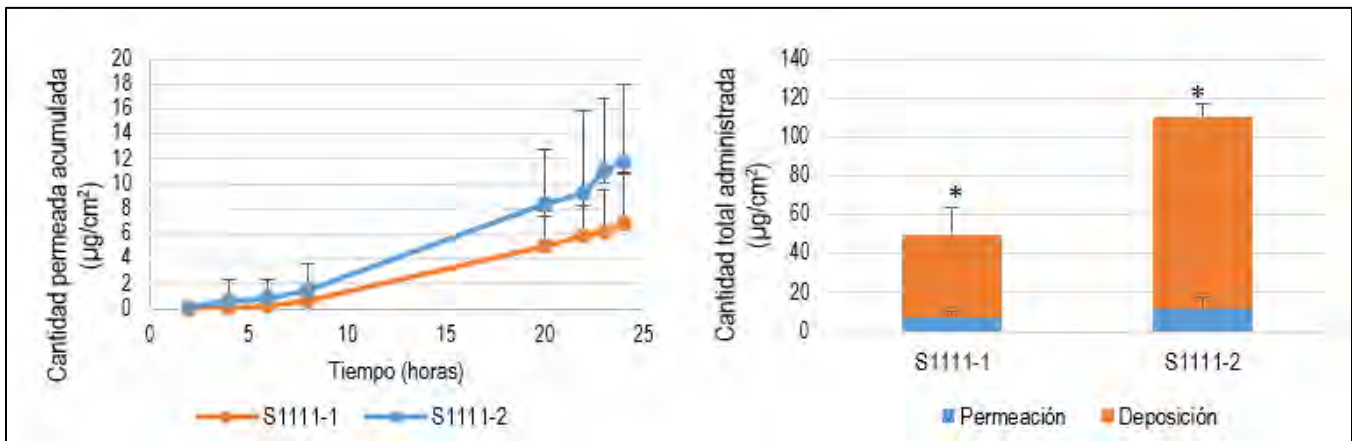


Figura 46. Comparación de los perfiles de permeación y cantidad total de PAX administrada a partir de las formulaciones S1111-1 y S1111-2. *Diferencia estadísticamente significativa entre formulaciones.

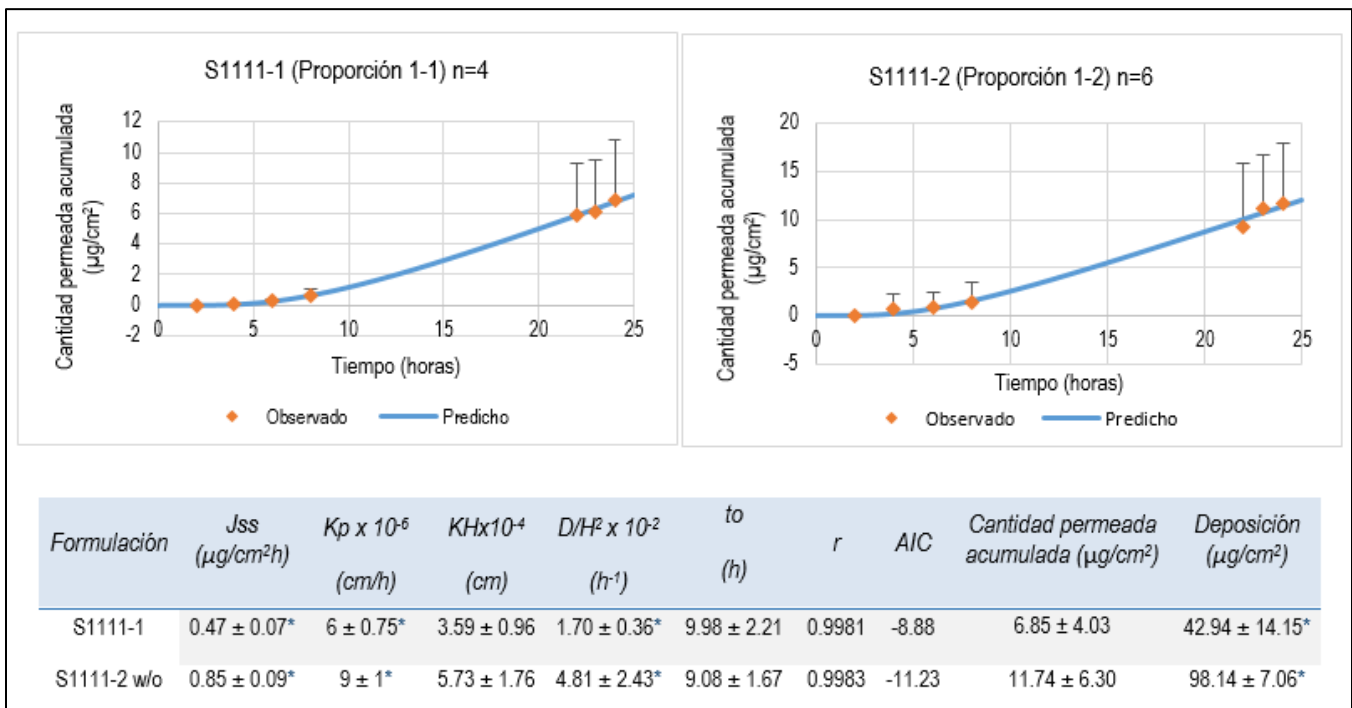


Figura 47. Comparación de la cantidad acumulada de PAX ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) frente al tiempo, datos observados (Media \pm D.E) vs predichos para las formulaciones S1111-1 y S1111-2 w/o; parámetros de permeación obtenidos mediante el ajuste: Flujo en el estado estacionario (J_{ss}), coeficiente de permeabilidad (K_p), reparto (KH), difusión (D/H^2) y tiempo de latencia (t_0) (Media \pm E.E), cantidad permeada acumulada y deposición de PAX en piel y parámetros estadísticos que definen la bondad de los datos ajustados: coeficiente de correlación (r) y criterio de Akaike (AIC). *Diferencia estadísticamente significativa entre formulaciones ($P < 0.05$).

Se determinó experimentalmente que una proporción más elevada de Transcutol® P favorece la deposición de PAX en la piel. En la figura 47 se presentan los parámetros de permeación correspondientes al ajuste a la ecuación de Scheuplein, en donde podemos apreciar que la forma en que se favorece la permeación de PAX al aumentar la cantidad de Transcutol® P es mediante el incremento en el coeficiente de permeación (Kp) y en el parámetro de difusión (D/H^2). Mura y colaboradores (Mura, y otros 2000) reportan un aumento en la permeación de fármacos en función de la concentración de Transcutol® P (10-50% w/w). Debido al alto porcentaje de tensoactivo y co-tensoactivo, las microemulsiones pueden disminuir significativamente la función de barrera de la piel y por consiguiente su resistencia eléctrica, por lo tanto, dar lugar a mayores flujos permeabilidad (Hathout y Nasr 2013).

7.4.4 Efecto del tipo de microemulsión

Para evaluar el efecto del tipo de microemulsión se probaron las formulaciones S1111-2 w/o y S1111-2 o/w, el perfil de permeación obtenido y la cantidad total administrada se comparan en la figura 48.

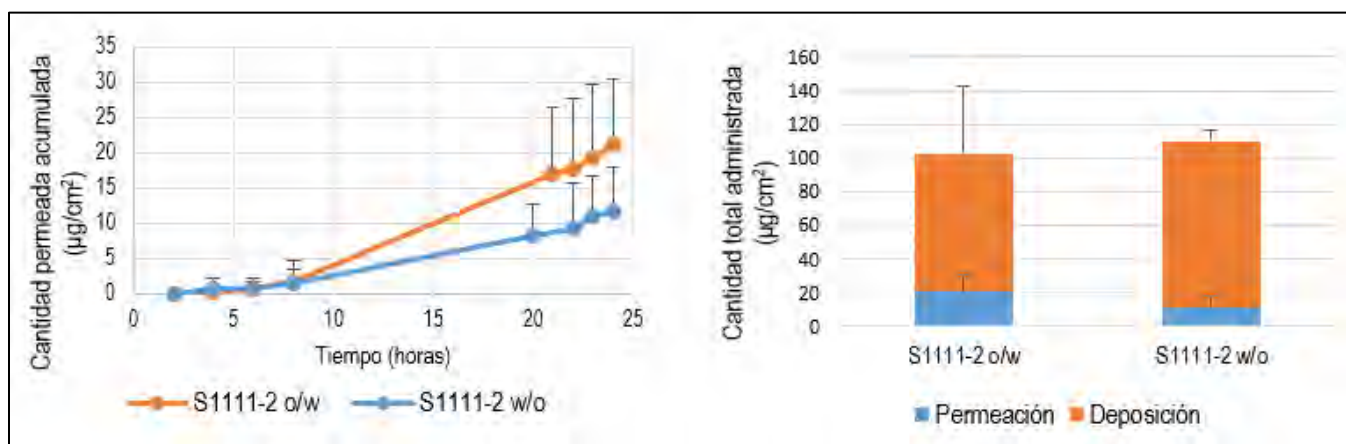


Figura 48. Comparación de la cantidad permeada acumulada ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) frente al tiempo y cantidad total administrada ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) obtenida al aplicar las formulaciones S1111-2 w/o y S1111-2 o/w.

No se encontró diferencia significativa en la cantidad permeada acumulada ni en la deposición obtenida con las ME S1111-2 w/o y S1111-2 o/w, sin embargo debemos recordar que la formulación S1111-2 w/o solubiliza casi el doble de fármaco en relación a la ME o/w. Al realizar el ajuste de los datos (figura 49) se evidenció el efecto del tipo de ME en la permeación de PAX, ya que la formulación S1111-2 o/w presenta un mayor flujo (J_{ss}), coeficiente de permeabilidad (kp) y KH , sin embargo una menor difusión (D/H^2). Esta ME es una muy buena opción para estudios posteriores ya que presenta una gran proporción de agua y una baja proporción tensoactivo/co-tensoactivo, por lo que podría tener un bajo potencial irritante en la piel.

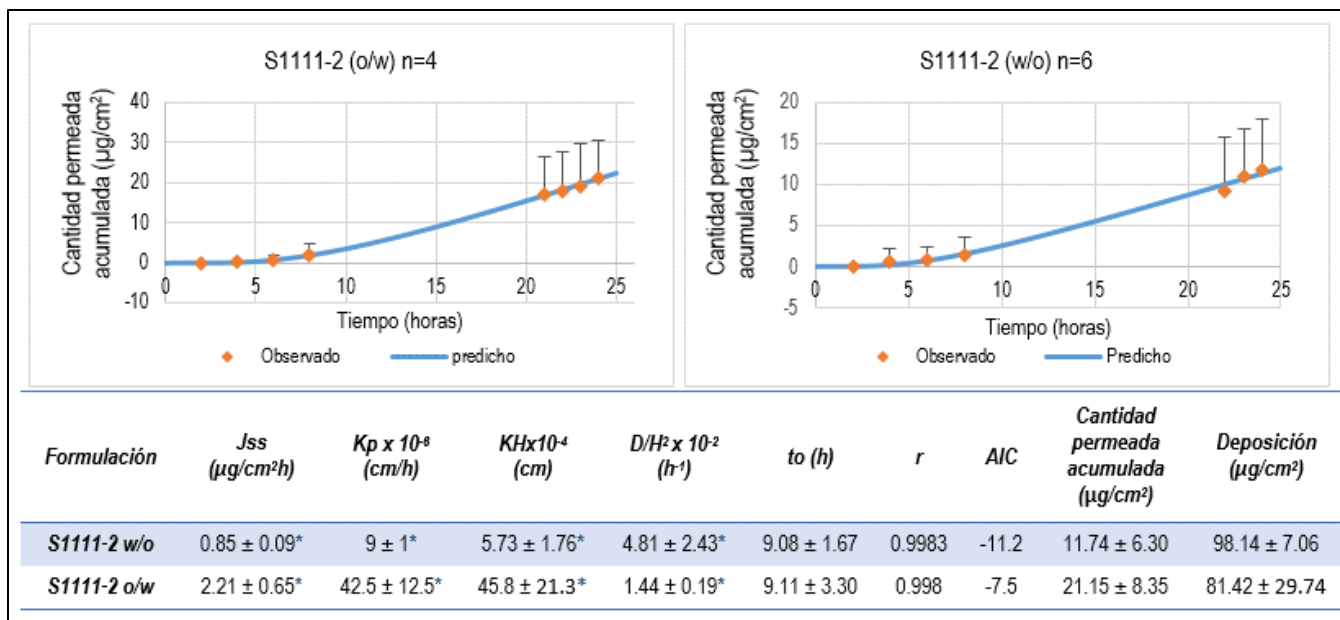


Figura 49. Comparación de la cantidad acumulada de PAX ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) frente al tiempo, datos observados (Media \pm D.E) vs predichos para las formulaciones S1111-2 w/o y S1111-2 o/w; parámetros de permeación obtenidos mediante el ajuste: Flujo en el estado estacionario (J_{ss}), coeficiente de permeabilidad (K_p), reparto (KH), difusión (D/H^2) y tiempo de latencia (t_0) (Media \pm E.E), cantidad permeada acumulada y deposición de PAX en piel y parámetros estadísticos que definen la bondad de los datos ajustados: coeficiente de correlación (r) y criterio de Arkaike (AIC). *Diferencia estadísticamente significativa entre formulaciones ($P < 0.05$).

En la figura 50 se muestra la cantidad total administrada mediante las distintas formulaciones utilizando piel completa, se obtuvo una buena permeación y deposición, así como una gran solubilidad con la formulación S1111-2, por lo que se decidió utilizar esta formulación en conjunto con métodos físicos, con el fin de aumentar la cantidad administrada por esta vía. En la tabla 11 se resumen los parámetros de permeación obtenidos y la cantidad permeada acumulada y depositada para las formulaciones ensayadas.

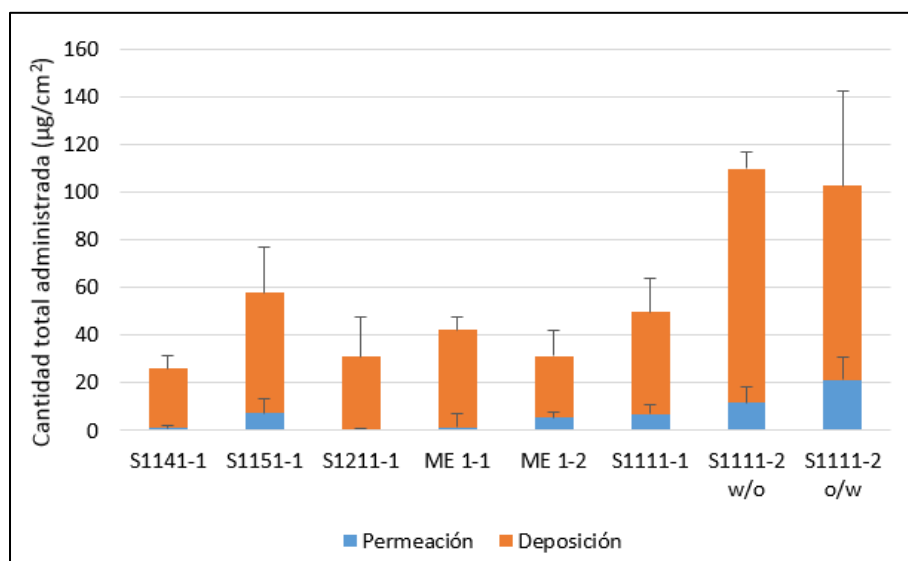


Figura 50. Comparación de la cantidad total de PAX administrada a partir de las diferentes microemulsiones preparadas.

Tabla 11. Condensado de parámetros de permeación obtenidos mediante el ajuste de los datos experimentales a la ecuación de Scheuplein (Scheuplein 1967): Flujo en el estado estacionario (J_{ss}), coeficiente de permeabilidad (K_p), reparto (KH), difusión (D/H^2) y tiempo de latencia (t_0) (Media \pm E.E), deposición de PAX en piel y parámetros estadísticos que definen la bondad de los datos ajustados: coeficiente de correlación (r) y criterio de Arkaike (AIC).

Formulación	J_{ss} ($\mu\text{g}/\text{cm}^2\text{h}$)	$K_p \times 10^{-6}$ (cm/h)	$KH \times 10^{-4}$ (cm)	$D/H^2 \times 10^{-2}$ (h^{-1})	t_0 (h)	r	AIC	Cantidad permeada acumulada ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	Deposición ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)
ME 1-1	0.15 ± 0.053	2.71 ± 0.71	2.61 ± 1.39	1.48 ± 0.421	12.51 ± 3.59	0.9976	-28.70	1.51 ± 0.95	40.63 ± 4.20
ME 1-2	0.43 ± 0.14	8.5 ± 2.75	6.85 ± 3.29	1.25 ± 0.43	13.40 ± 4.52	0.9968	-8.58	4.38 ± 1.47	48.9 ± 20.58
S1111-1	0.47 ± 0.07	6 ± 0.75	3.59 ± 0.96	1.70 ± 0.36	9.98 ± 2.21	0.9981	-8.88	6.85 ± 4.03	42.94 ± 14.15
S1111-2 w/o	0.85 ± 0.09	9 ± 1	5.73 ± 1.76	4.81 ± 2.43	9.08 ± 1.67	0.9983	-11.23	11.74 ± 6.30	98.14 ± 7.06
S1211-1	0.072 ± 0.015	3 ± 2	0.80 ± 0.18	1.26 ± 0.29	13.25 ± 3.04	0.9988	-33.50	0.85 ± 0.24	30.22 ± 16.56
S1141-1	0.080 ± 0.016	3 ± 1	2.15 ± 0.89	1.40 ± 0.34	11.94 ± 2.95	0.9984	-29.25	1.04 ± 0.96	24.85 ± 5.65
S1151-1	0.75 ± 0.17	31 ± 7	30.5 ± 9.27	1.02 ± 0.21	16.38 ± 3.34	0.9994	-11.79	7.26 ± 4.09	50.61 ± 19.20
S1111-2 o/w	2.21 ± 0.65	42.5 ± 12.5	45.8 ± 21.3	1.44 ± 0.19	9.11 ± 3.30	0.998	-7.51	21.15 ± 8.35	81.42 ± 29.74

7.5 Efecto de la microporación láser en la permeación de PAX a partir de una microemulsión.

En la figura 51a se muestra la piel al término del estudio de permeación, en donde a simple vista pueden observarse pequeños puntos en la superficie de la piel en un arreglo cuadrado centrado en el área de permeación, mientras que en la figura 51b puede observarse la diferencia entre la piel sin tratar y la piel tratada. En la figura 52 al utilizar un aumento de 200 y 400x se puede apreciar que los poros obtenidos presentan una forma bien definida con una disposición en red, sin embargo esto no nos permite visualizar la profundidad ni la definición de los poros creados con este sistema. Sin embargo al utilizar la tomografía de coherencia óptica (OCT), una técnica no invasiva, pudimos realizar cortes transversales micrométricos, los cuales se observan en la figura 53, técnica con la cual incluso corroboramos que al aplicar una fluencia de $88.9 \text{ J}/\text{cm}^2$ se obtienen poros de $200 \mu\text{m}$ (figura 54).

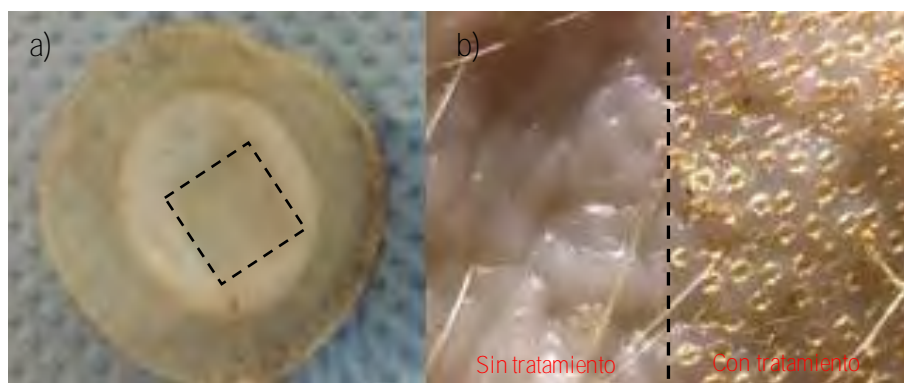


Figura 51. a) Piel al término del estudio de permeación, b) Comparación entre piel sin tratamiento y piel después del tratamiento con microporación láser (aumento 63X).

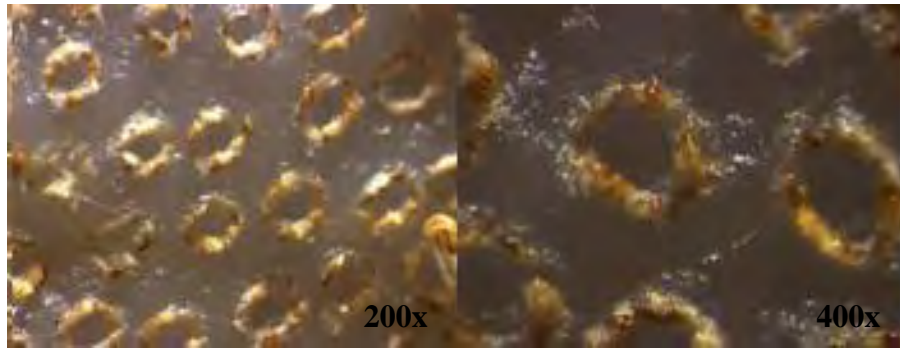


Figura 52. Forma y disposición de los microporos generados con el sistema P.L.E.A.S.E. observados con el microscopio estereoscópico Leica S6D utilizando aumento de 200x y 400x.

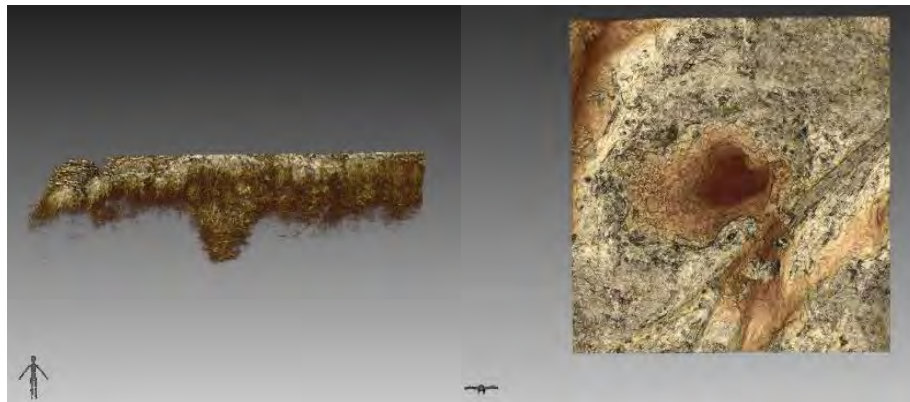


Figura 53. Vista lateral y superior de un poro generado con el sistema P.L.E.A.S.E mediante OCT.

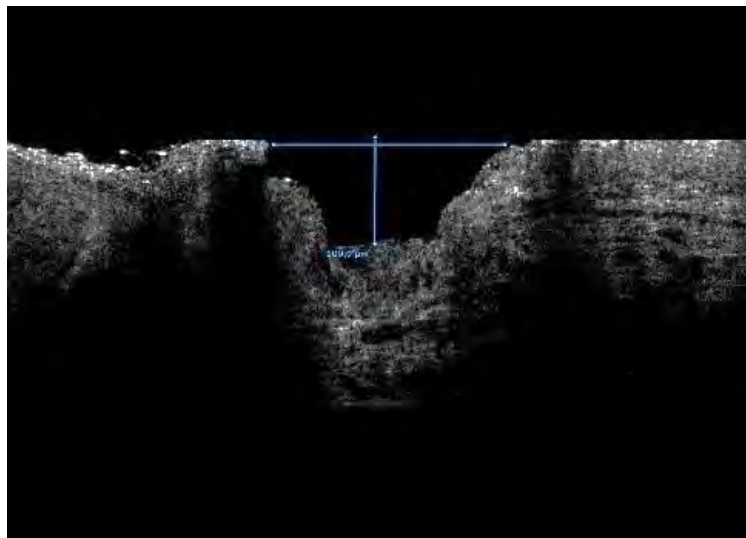


Figura 54. Corte lateral y medición de un poro generado con el sistema P.L.E.A.S.E. mediante OCT.

Al comparar el perfil de permeación pasiva de PAX a partir de la formulación S1111-2 con el obtenido utilizando la técnica de microporación láser, se observó una diferencia significativa tanto en la cantidad permeada a las 24 horas

como en la deposición en piel (Figura 55), de manera similar, se encontraron diferencias en la distribución de PAX al realizar el estudio de biodistribución (figura 56), en donde nos encontramos con que la mayor concentración de PAX se localiza en las capas superiores de la piel, sin embargo es interesante notar que a pesar de que se deposita casi 4 veces más PAX en piel al generar microporos, podemos observar que casi el 90 % del fármaco retenido se localiza en los primeros 200 μm de piel, los cuales corresponden a la profundidad de los poros generados, mientras que al permear de manera pasiva encontramos mayores concentraciones de PAX en capas más profundas de la piel.

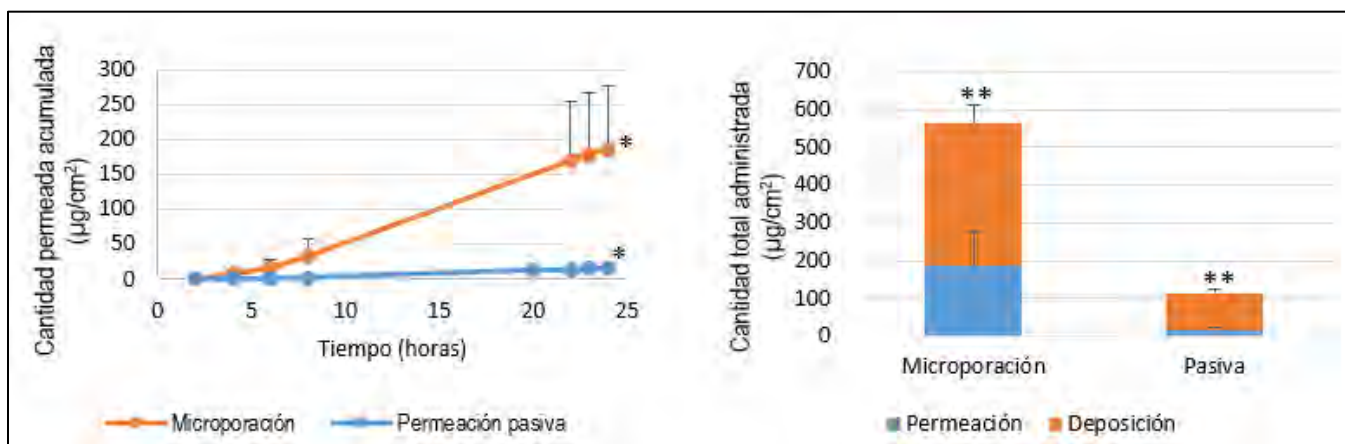


Figura 55. Comparación de la cantidad permeada acumulada ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) frente al tiempo y cantidad total de PAX administrada obtenidas al aplicar de manera pasiva la formulación S1111-2 w/o y al utilizar la técnica de microporación láser.

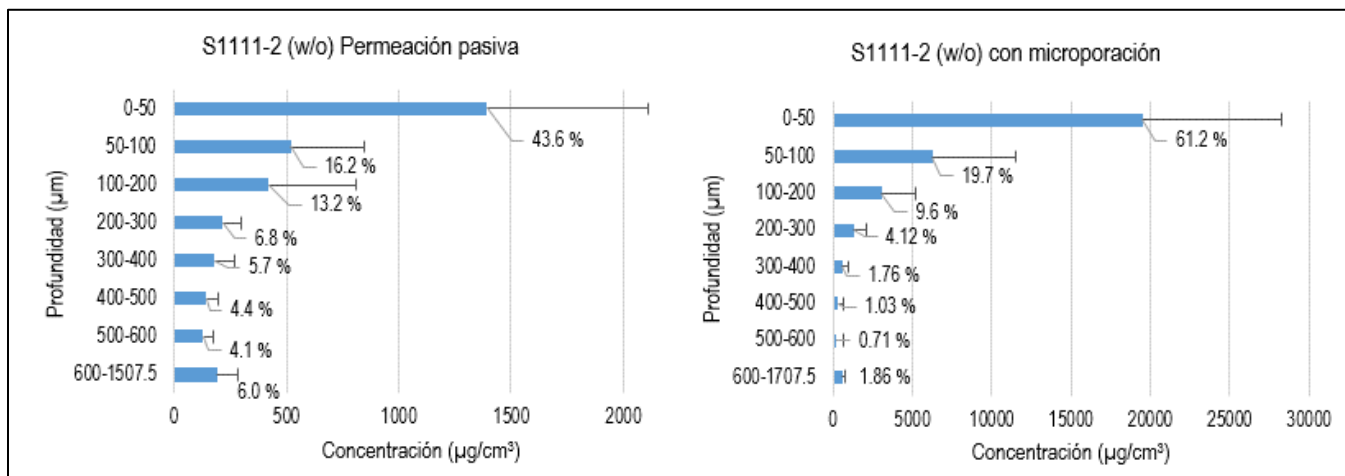


Figura 56. Comparación de los perfiles de biodistribución de PAX en la piel después del estudio de permeación pasiva y con pretratamiento con el sistema P.L.E.A.S.E a partir de la formulación S1111-2 (w/o).

Esta técnica permite aumentar la cantidad total de PAX administrada con la microemulsión S1111-2 (w/o) hasta 5 veces en comparación con la permeación pasiva.

7.6 Efecto de la iontoforesis en la permeación de PAX a partir de una microemulsión

Los estudios de iontoforesis se realizaron inicialmente utilizando 300 μL de la formulación, sin embargo al transcurrir el estudio se observó una ligera evaporación de la formulación, lo cual en ciertas ocasiones no fue suficiente para propiciar un buen contacto con el puente salino colocado en el compartimiento donador, pres entándose problemas de interrupción del circuito cerrado, por lo que el estudio se realizó nuevamente colocando 500 μL de la formulación y fijando los puentes salinos con parafilm para evitar interrupciones en la corriente eléctrica aplicada. Durante el primer estudio realizado también se detectó un ligero aumento de voltaje después de las primeras 12 horas del estudio, por lo que para el segundo ensayo se fijó un voltaje más alto para evitar variaciones en la intensidad aplicada, con estos ajustes se logró mantener una corriente de 0.5 mA/cm^2 .

Al comparar la permeación pasiva de la formulación S1111-2 con los datos obtenidos utilizando iontoforesis, se pudo observar que la combinación del uso de una microemulsión y esta técnica produce un aumento en la cantidad permeada acumulada de PAX de hasta 50 veces y se obtiene una deposición en piel 7 veces mayor (figura 57).

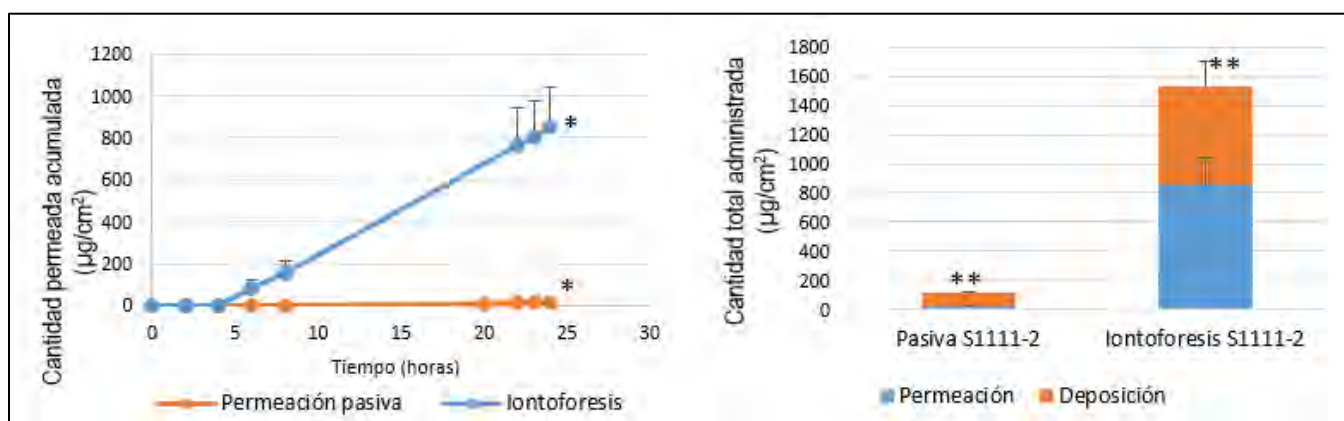


Figura 57. Comparación de la cantidad permeada acumulada ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) frente al tiempo y cantidad total de PAX administrada obtenidas al aplicar de manera pasiva la formulación S1111-2 w/o y al utilizar la técnica iontoforesis.

Al realizar el estudio de biodistribución (figura 58) se observó que la cantidad de PAX en las capas superiores es mayor con respecto a las capas inferiores. Sin embargo, las cantidades de PAX encontradas en capas inferiores se distribuyen de una manera más homogénea, es decir sin mostrar un patrón decreciente definido y son mayores a las encontradas de manera pasiva.

Se ha descrito el uso de la técnica de iontoforesis utilizando microemulsiones como vehículo para fármacos, sin embargo, es utilizando microemulsiones de tipo o/w, por lo cual fue sorprendente que al utilizar una microemulsión w/o pudiera aumentar la permeación de PAX en proporciones importantes.

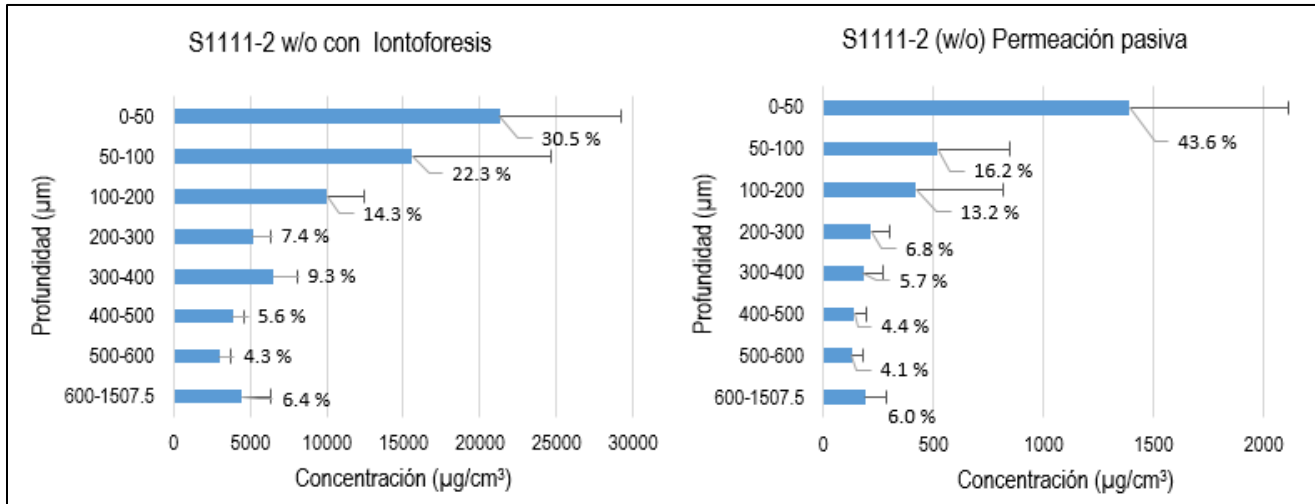


Figura 58. Comparación de los perfiles de biodistribución de PAX en la piel después del estudio de permeación pasiva y con iontoforesis a partir de la formulación S1111-2 (w/o).

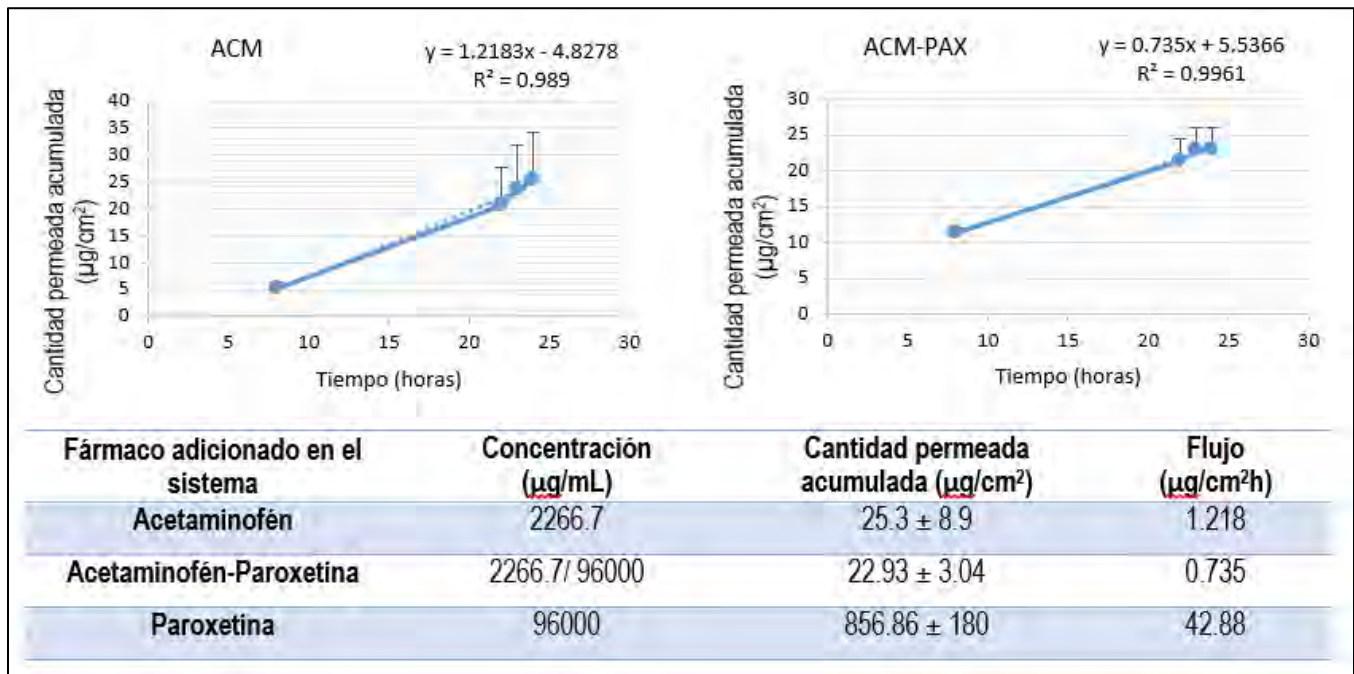


Figura 59. Cálculo del flujo de ACM al aplicarse iontoforesis y co-iontoforesis con PAX a partir de la formulación S1111-2 w/o.

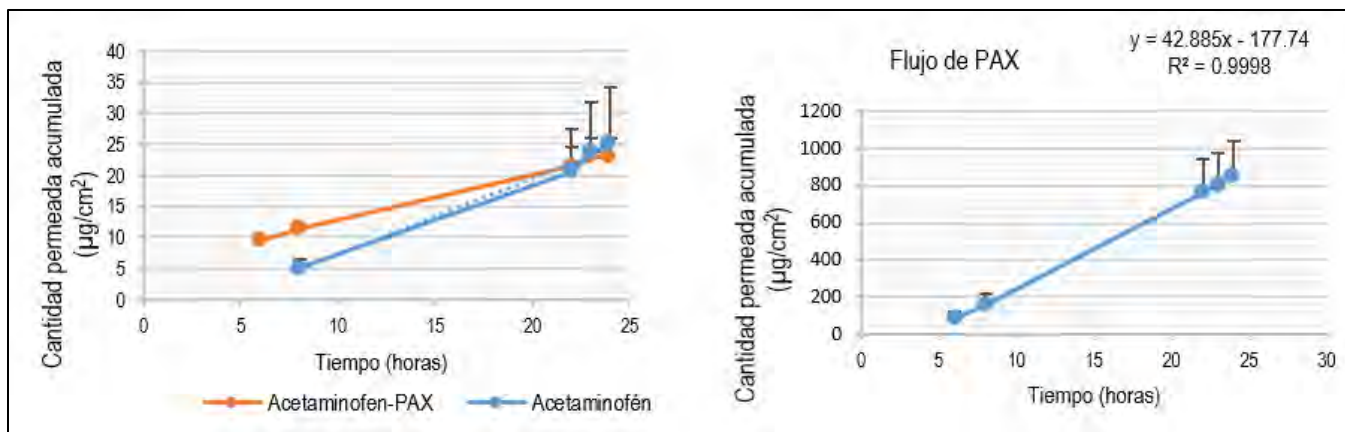


Figura 60. a) Comparación del flujo de acetaminofén al aplicar Iontoforesis y mediante co-iontoforesis con PAX. b) Flujo de PAX

$$V_w = \frac{J_{ACM}}{C_{ACM}} \dots \dots \dots V_w = \frac{0.735 \mu g/cm^2 h}{2266.7 \mu g/mL} = 3.24 \times 10^{-4} mL/cm^2 h$$

$$J_{EO} = V_w * C_{Fármaco} \dots \dots \dots J_{EO} = 3.24 \times 10^{-4} \frac{mL}{cm^2 h} * 96000 \frac{\mu g}{mL} = 31.12 \mu g/cm^2 h (72.6 \%)$$

$$J_{PAX}^T = J_{PAX}^{EM} + J_{PAX}^{EO} \dots \dots \dots J_{PAX}^{EM} = 42.88 \frac{\mu g}{cm^2 h} - 31.12 \frac{\mu g}{cm^2 h} = 11.76 \mu g/cm^2 h (27.4 \%)$$

$$FI = \frac{Q_{ACM,control}}{Q_{ACM}} \dots \dots \dots FI = \frac{25.3 \mu g/cm^2}{22.93 \mu g/cm^2} = 1.1$$

Figura 61. Calculo del mecanismo de flujo iontoforético y del factor de inhibición

Al investigar el mecanismo iontoforético mediante el cual ocurre el flujo de PAX a partir de la ME S1111-2 w/o se encontró que la cantidad permeada acumulada de acetaminofén (ACM) no se ve modificada al aplicar co-iontoforesis PAX-acetaminofén (figura 60), a diferencia del flujo que disminuye (figura 59).

Al realizar los cálculos (figura 61) se encontró que el 72.6 % del flujo de PAX a partir de la microemulsión S1111-2 se debe al mecanismo de electroósmosis y el 27.4 % a la electromigración. El factor de inhibición electroosmótico de PAX fue de 1.1 (figura 61), podemos apreciar que la cantidad permeada de ACM fue similar a la obtenida al adicionar PAX, lo cual nos indica que al atravesar la piel no modifica su permeabilidad selectiva.

El resultado obtenido en cuanto al mecanismo de transporte electroforético podría ser debido a que la formulación utilizada (S1111-2) es una microemulsión w/o. Por lo tanto, las gotas de agua se encuentran inmersas en la fase externa compuesta por el componente oleoso, el PAX se encontraría en ambas fases, sin embargo, sólo en la fase acuosa se encontraría con la carga expuesta y este será el que podría migrar debido al efecto de la corriente eléctrica.

Mientras el fármaco situado en la fase oleosa sería acarreado por el solvente que se mueve a través de la piel. Por esta razón se decidió realizar el estudio de permeación utilizando una formulación con los mismos componentes que la utilizada en los estudios anteriores, pero en proporciones adecuadas para tener una microemulsión o/w (S1111-2 o/w) y también se evaluó la permeación de una solución de PAX saturada.

Al analizar los resultados del uso de la iontoforesis y las microemulsiones S1111-2 o/w, S1111-2 w/o y la solución de PAX (5mg/mL), se hallaron diferencias significativas en la cantidad permeada a las 24 horas entre la solución y la ME S1111-2 w/o (figura 62); así como entre la ME S1111-2 o/w y la S1111-2 w/o. Sin embargo no se hallaron diferencias estadísticamente significativas entre la solución y la formulación S1111-2 o/w.

No obstante, en los resultados de PAX acumulada en la piel se encontró diferencia significativa entre las 3 formulaciones, encontrándose que la deposición a partir de la ME S1111-2 o/w es mayor que la observada para la ME S1111-2 w/o y ambas son mayores a la obtenida con la solución, por lo que se concluye que el usar iontoforesis de manera conjunta con una microemulsión presenta ventajas sobre el uso de una solución.

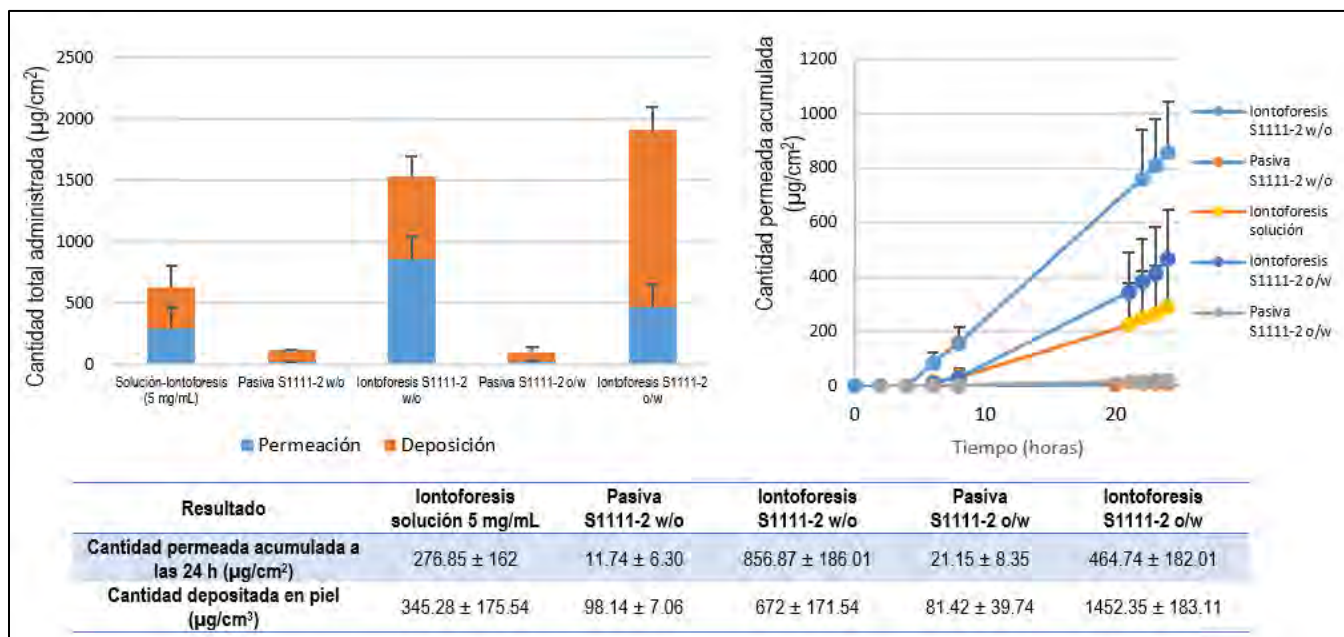


Figura 62. Comparación de la cantidad total de PAX administrada de manera pasiva y usando iontoforesis a partir de microemulsiones S1111-2 w/o, S1111-2 o/w y la solución de PAX (5 mg/mL). *Diferencia significativa con respecto al uso de iontoforesis con solución.

7.7 Comparación del uso de técnicas físicas

En la figura 63 se puede observar el efecto que tiene el uso conjunto de una microemulsión y métodos físicos, como la iontoforesis y la microporación láser, en este caso la mayor cantidad permeada se obtuvo al utilizar iontoforesis, sin embargo ambas técnicas físicas permitieron aumentar la permeación en comparación con la permeación pasiva de la ME S1111-2.

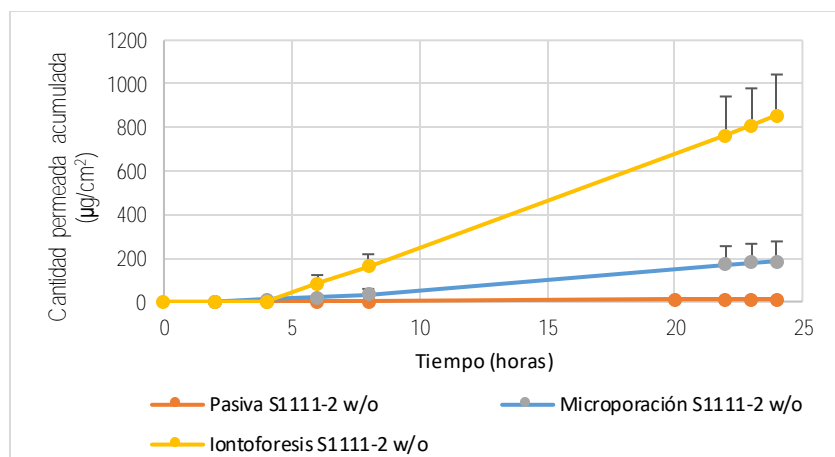


Figura 63. Comparación entre la permeación de PAX utilizando las técnicas promotoras estudiadas

8. CONCLUSIONES

Las ME evaluadas compuestas por Kolliphor® EL/Transcutol® P, ácido oleico y agua (ME 1-2 y ME 1-1), presentaron buena permeación pasiva y deposición siendo incluso mayores a las obtenidas utilizando una solución saturada del fármaco.

La mayor área de predominio de formación de la microemulsión en los diagramas pseudoternarios se obtuvo al utilizar Kolliphor® EL/Transcutol® P (1:1, 1:2), Capryol™ 90 y agua, obteniéndose tanto microemulsiones o/w como w/o. La ME S1111-2 w/o y la S1111-1 w/o solubilizaron la mayor cantidad de PAX (96 y 80 mg, respectivamente), mientras que las ME S1141-1 y S1151-1 condujeron a un mayor tamaño de glóbulo y una baja solubilidad del fármaco.

Los métodos cromatográficos (HPTLC, HPLC, UPLC) utilizados para la cuantificación del clorhidrato de paroxetina solubilizado en la ME, permeado a través de la piel y retenido en piel, mostraron ser lineales dentro del intervalo de concentraciones señalado, exactos y precisos.

La permeación de PAX fue mayor al utilizar NovoI™ y Capryol™ 90, la deposición de PAX en piel utilizando NovoI™, ácido oleico y Capryol™ 90 fue similar pero mayor a la obtenida usando Maisine™ 35-1. Las principales diferencias encontradas al variar el tipo de componente oleoso se presentaron en el flujo (J_{ss}) y el coeficiente de permeación (K_p). Capryol™ 90 y NovoI™ se definieron como los excipientes oleosos más adecuados para la administración de PAX.

El uso de Transcutol® P como co-tensoactivo conduce a una mayor cantidad permeada y depositada en piel, debido a que presenta mayor J_{ss} , K_p y KH , así como una mayor deposición en piel cuando se utiliza una proporción 1:2 tensoactivo/co-tensoactivo (Kolliphor® EL/Transcutol® P).

Al utilizar ME del tipo o/w se obtuvo una mayor permeación, ya que el flujo (J_{ss}), K_p y KH obtenidos son mayores en comparación con ME w/o.

El sistema P.L.E.A.S.E permite obtener microporos definidos, cuya profundidad puede ser ajustada dependiendo de la fluencia utilizada. El uso de esta técnica permitió aumentar la permeación 13 veces y 4 veces la deposición en piel de PAX, en comparación con la administración de la ME de manera pasiva.

EL uso de iontoforesis conduce a un aumento en la permeación de PAX de 50 veces y una deposición en piel 7 veces mayor, en comparación con la administración pasiva de la ME S1111-2 w/o, lo cual ocurre en un 72.6 % mediante electroósmosis y 27.4 % por el mecanismo de electromigración. Los efectos obtenidos en la promoción de la permeación de PAX mediante esta formulación no superaron a los obtenidos mediante el uso conjunto con una solución o con la ME S1111-2 o/w, sin embargo esta última si conduce a un incremento importante en la deposición en piel.

La hipótesis planteada se acepta, ya que se logró administrar PAX a través de la piel formulado en una microemulsión, la cual se optimizó adicionando promotores químicos como: Capryol™ 90, ácido oleico, Novol™, y Transcutol® P (proporción 1:2) para obtener una mayor permeación y deposición del fármaco de manera pasiva. Dichos excipientes pueden utilizarse en formulaciones futuras para aplicación transdérmica de PAX. La formulación optimizada se utilizó de manera conjunta con 2 métodos físicos, obteniéndose un efecto sinérgico el cual condujo a un importante aumento de la permeación de PAX.

9. PERSPECTIVAS

- ✓ Evaluar el posible efecto irritante de las formulaciones sobre la piel (sensibilidad e irritación)
- ✓ Evaluar las modificaciones en la estructura de la piel mediante estudios histológicos.
- ✓ Estudiar el mecanismo iontoforético de la ME S1111-2 o/w
- ✓ Debido a los prometedores parámetros de permeación obtenidos al utilizar Novol™ como componente oleoso, se propone preparar ME utilizando otras proporciones de excipientes y evaluar su uso combinado con métodos físicos.

10. BIBLIOGRAFÍA

- 1) Acharya, Durga P., y Patrick G. Hartley. «Progress in microemulsion characterization.» *Current Opinion in Colloid & Interface Science* 17 (2012): 274-280.
- 2) Ackaert, Oliver W., J. Van Smeden, J. De Graan, D. Dijkstra, M. Danhof, y Joke A. Bouwstra. «Mechanistic Studies of the Transdermal Iontophoretic Delivery of 5-OH-DPAT In Vitro.» *Journal of Pharmaceutical Sciences* 99 (2010): 275-285.
- 3) Alexander, Amit, y otros. «Approaches for breaking the barriers of drug permeation through transdermal drug delivery.» *Journal of Controlled Release* 164 (2012): 26-40.
- 4) Bachhav, Y. G., S. Summer, A. Heinrich, T. Bragagna, C. Böhrer, y Y. N. Kalia. «Effect of controlled laser microporation on drug transport kinetics into and across the skin.» *Journal of Controlled Release* 146 (2010): 31-36.
- 5) Baroli, Bianca, M. Arturo López-Quintela, M. Begoña Delgado-Charro, Anna M. Fadda, y José Blanco-Méndez. «Microemulsions for topical delivery of 8-methoxsalen.» *Journal of Controlled Release* 69 (2000): 209-218.
- 6) BASF. *Excipients for drug formulation*. 2016. <https://industries.basf.com/en/Drug-Formulation/Kolliphor-EL.html> (último acceso: 1 de Julio de 2016).
- 7) Benson, Heather A. E. «Transdermal Drug Delivery: Penetration Enhancement Techniques.» *Current Drug Delivery* 2 (2005): 23-33.
- 8) Benson, Heather A.E. «Skin Structure, Function, and Permeation.» En *Transdermal and Topical Drug Delivery: Principles and Practice*, de Heather A.E. Benson y Adam C. Watkinson, 3-20. New Jersey: Wiley, 2012.
- 9) Bidyut, K. Paul, y Satya P. Moulik. «Uses and applications of microemulsions.» *Current Science* 80 (2001): 990-1001.
- 10) Blier, Pierre, y Claude Montigny. «Possible Serotonergic Mechanisms Underlying the Antidepressant and Anti-Obsessive-Compulsive Disorder Responses.» *Society of Biological Psychiatry* 44 (1998): 313-323.
- 11) Bourin, M., P. Chue, y Y. Guillon. «Paroxetine: A Review.» *CNS Drug Reviews* 7 (2001): 25-47.
- 12) Brown, Marc B., Gary P. Martin, Stuart A. Jones, y Franklin K. Akomeah. «Dermal and Transdermal Drug Delivery Systems: Current and Future Prospects.» *Drug Delivery* 13 (2006): 175-187.
- 13) Carlucci, Adriana M., Marta Cicconi-Vidal, y Carlos Bregni. «Las Microemulsiones como Vehículos.» *Acta Farmacéutica Bonaerense* 4 (2004): 550-557.
- 14) Cázares-Delgadillo, J., A. Naik, Y. N. Kalia, D. Quintanar-Guerrero, y A. Ganem-Quintanar. «Skin permeation enhancement by sucrose esters: a pH-dependent phenomenon.» *International Journal of Pharmaceutics* 297 (2005): 204-212.
- 15) Center for Disease Control and Prevention. *Mental Health: Depression* 2016. <http://www.cdc.gov/mentalhealth/basics/mental-illness/depression.htm> (último acceso: 9 de Septiembre de 2016).
- 16) Chávez-Leon, Enrique, Martha Patricia Ontiveros-Urbe, y Carlos Serrano-Gómez. «Los antidepresivos inhibidores selectivos de recaptura de serotonina (ISRS, ISR-5HT).» *Salud Mental* 31 (2008): 307-319.
- 17) Chen, Yang, Peng Quan, Xiaochang Liu, Manli Wang, y Liang Fang. «Novel chemical permeation enhancers for transdermal drug delivery.» *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences* 9 (2014): 51-64.
- 18) Chien, Yie W., Heliang Xu, Chin-Chih Chiang, y Yih-Chain Huang. «Transdermal controlled administration of Indomethacin. I. Enhancement of skin permeability.» *Pharmaceutical Research* 5 (1988): 103-106.
- 19) Chu, Shaogang, y Chris D. Metcalfe. «Analysis of paroxetine, fluoxetine and norfluoxetine in fish tissues using pressurized liquid extraction, mixed mode solid phase extraction cleanup and liquid chromatography-tandem mass spectrometry.» *Journal of Chromatography A* 1163 (2007): 112-118.

- 20) Danielsson, Ingvar, y Björn Lindman. «The definition of microemulsion.» *Colloids and Surfaces* 3 (1981): 391-392.
- 21) Dragicevic , Nina, Jelena Predic Atkinson, y Howard I. Maibach. «Chemical penetration enhancers: classification and mode of action.» En *Percutaneous Penetration Enhancers Chemical Methods in Penetration Enhancement: Modification of the Stratum Corneum*, de Nina Dragicevic y Howard I Maibach, 11-27. San Francisco: Springer, 2015.
- 22) Dubey, Sachin . «Laser microporation for the delivery of drugs.» *Bulletin of Pharmaceutical Research* 2 (2012): 118-123.
- 23) Eccleston, Gillian M. «Emulsions and Microemulsions.» En *Encyclopedia of Pharmaceutical Technology*, 1561-1565. Glasgow, Scotland: Informa Healthcare, 2007.
- 24) El-Nabarawi, Mohamed A., Ehab R. Bendas, Randa Tag A. El Rehem, y Mohammed Y. S. Abary. «Transdermal drug delivery of paroxetine through lipid-vesicular formulation to augment its bioavailability.» *International Journal of Pharmaceutics* 443 (2013): 307-317.
- 25) Eucerin. *Acerca de la piel*. 2016. <http://www.eucerin.com.ec/about-skin/conocimientos-basicos-sobre-la-piel/estructura-y-funcion-de-la-piel> (último acceso: 15 de Enero de 2016).
- 26) FDA. «Guidance for Industry Bioanalytical Method Validation-Biopharmaceutics.» 2013. <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/Guidance/ucm070107.pdf> (último acceso: 21 de febrero de 2015).
- 27) Flaten, Göril Eide, Zora Palac, André Engesland, Jelena Filipovic-**Grcic, Zeljka Vanic, y Nataša Škalko**-Basnet. «In vitro skin models as a tool in optimization of drug formulation.» *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 75 (2015): 10-24.
- 28) Ganem-Rondero, **Adriana**. «¿Qué sabe Ud. acerca de...la vía de administración transdérmica?» *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas* 42 (2011): 65-68.
- 29) García del Busto, Natalia. «Farmacovigilancia.» *Actualidad científica* 23 (2004): 138-139.
- 30) García-Celma, María José . «Solubilization of drugs in microemulsions.» En *Industrial Applications of Microemulsions*, de C. Solans y H. Kunieda, 123-145. New York: Marcel Dekker Inc., 1997.
- 31) Garvie-Cook, Hazel. *Novel (Trans)dermal Drug Delivery Strategies (Micro-and Nano-scale assessments)*. UK: Springer, (2016): 5-9, 16-19.
- 32) Germann, David, George Ma, Feixue Han, y Anna Tikhomirova. «Paroxetine Hydrochloride.» En *Profiles of Drug Substances, Excipients, and Related Methodology*, de Harry G. Brittain. 369-402. Toronto, Canada: Elsevier, 2013.
- 33) Guy, Richard H., Yogeshvar N. Kalia, M. Begoña Delgado-Charro, Virginia Merino, Alicia López, y Diego Marro. «Iontophoresis: electrorepulsion and electroosmosis.» *Journal of Controlled Release* 64 (2000): 129-132.
- 34) Hadgraft, Jonathan , y Majella E. Lane. «Skin permeation: The years of enlightenment.» *International Journal of Pharmaceutics* 305 (2005): 2-12.
- 35) Hathout, R. M., y M. Nasr. «Transdermal delivery of betahistine hydrochloride using microemulsions: Physical characterization, biophysical assessment, confocal imaging and permeation studies.» *Colloids and Surfaces* 110 (2013): 254-260.
- 36) Hernández , A. F., A. Pla, y E. Villanueva . «Síndrome serotoninico.» *La Medicina Hoy* 49 (1995): 98-103.
- 37) Hoar, T. P., y J. H. Schulman. «Transparent water-in-oil dispersions: the oleophatic hydro-micelle.» *Nature* 152 (1943): 102-103.
- 38) Holmberg , Kristen, Bo Jönsson , Bengt Kronberg, y Björn Lindman . *Surfactants and Polymers in Aqueous Solution*. England: John Wiley & Sons, (2003): 459-471.
- 39) ICH Guidelines. «Validation of analytical procedures: Text and methodology Q2(R1).» 2005. http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q2_R1/Step4/Q2_R1__Guideline.pdf (último acceso: 2 de Febrero de 2015).

- 40) Instituto Nacional de Salud Mental. «Depresión.» 2009.
http://www.nimh.nih.gov/health/publications/espanol/depresion/depresion_38791.pdf (último acceso: 8 de Junio de 2016).
- 41) Jouyban, Abolghasem. «Review of the cosolvency models for predicting solubility of drugs in water-cosolvent mixtures.» *Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences* 11 (2008): 32-58.
- 42) Juan, He, Zhou Zhiling, y Li Huande. «Simultaneous determination of fluoxetine, citalopram, paroxetine, venlafaxine in plasma by high performance liquid chromatography–electrospray ionization mass spectrometry (HPLC–MS/ESI).» *Journal of Chromatography B* 820 (2005): 33-39.
- 43) Kalaria, Dhaval R., Pratik Patel, Vandana Patravale, y Yogeshvar N. Kalia. «Comparison of the cutaneous iontophoretic delivery of rasagiline and selegiline across porcine and human skin in vitro.» *International Journal of Pharmaceutics* 438 (2012): 202-208.
- 44) Kalia, Yogeshvar N., Aarti Naik, James Garrison, y Richard H. Guy. «Iontophoretic drug delivery.» *Advanced Drug Delivery Reviews* 56 (2004): 619-658.
- 45) Kao, Jhon. «In vitro assessment of dermal absorption.» En *Dermal and Ocular Toxicology: Fundamentals and Methods*, de David W. Hobson, 272-274. Boston: CRC Press, 1991.
- 46) Karande, Pankaj, y Samir Mitragotri. «Enhancement of transdermal drug delivery via synergistic action of chemicals.» *Biochimica et Biophysica Acta* 1788 (2009): 2362-2373.
- 47) Katon, W., y P. Ciechanowsky. «Impact of major depression on chronic medical illness.» *Journal of Psychosomatic Research* 53 (2002): 859-863.
- 48) Lambropoulos, John, George A. Spanos, y Nick V. Lazaridis. «Method development and validation for the HPLC assay (potency and related substances) for 20 mg paroxetine tablets.» *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 19 (1999): 793-802.
- 49) Lawrence, M. Jayne, y Gareth D. Rees. «Microemulsion-based media as novel drug delivery systems.» *Advanced Drug Delivery Reviews* 64 (2012): 175-193.
- 50) Li, Y., y otros. «Improving oral bioavailability of metformin hydrochloride using water in-oil microemulsions and analysis of phase behaviour after dilution.» *International Journal of Pharmaceutics* 473 (2014): 316-325.
- 51) Lu, Guang Wei, y Ping Gao. «Emulsions and microemulsions for topical and transdermal drug delivery.» En *Handbook of Non-Invasive Drug Delivery Systems*, 59-94. EE.UU.: Elsevier Inc., 2010.
- 52) Lydiard, Bruce R., y Julio Bobes. «Therapeutic advances: Paroxetine for the treatment of social anxiety disorder.» *Depression and Anxiety* 11 (2000): 99-104.
- 53) Marieb, Elaine N. *Anatomía y fisiología humana*. España: Pearson Addison Wesley, (2008): 114-122.
- 54) Marro, Diego, Yogeshvar N. Kalia, M. Begoña Delgado-Charro, y Richard H. Guy. «Contributions of electromigration and electroosmosis to iontophoretic drug delivery.» *Pharmaceutical Research* 18 (2001): 1701-1708.
- 55) Martensson, U., y L. Nassberger. «Influence of antidepressants on mitogen stimulation of human lymphocytes.» *Toxicology in Vitro* 7 (1993): 241-245.
- 56) Mehta, S. K., Gurpreet Kaur, y K. K. Bhasin. «Tween-embedded microemulsions—physicochemical and spectroscopic analysis for antitubercular drugs.» *American Association of Pharmaceutical Scientists* 11 (2009): 143-153.
- 57) Menon, Gopinathan K. «Skin Basics; Structure and Function.» En *Lipids and Skin Health*, de Apostolos Pappas, 9-23. E.U.A: Springer, 2015.
- 58) Merino, Virginia, Alicia López, Yogeshvar N. Kalia, y Richard H. Guy. «Electrorepulsion versus electroosmosis: Effect of pH on the iontophoretic flux of 5-fluorouracil.» *Pharmaceutical research* 16 (1999): 758-761.
- 59) Moulik, Satya Priya, y Animesh Kumar Rakshit. «Physicochemistry and applications of microemulsions.» *Journal of Surface Science and Technology* 22 (2006): 159-186.

- 60) Mura, P., M. T. Faucci, G. Bramanti, y P. Corti. «Evaluation of transcutol as a clonazepam transdermal permeation enhancer from hydrophilic gel formulations.» *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 9 (2000): 365-372.
- 61) Muzaffar, Faizi, U. K. Singh, y Lalit Chauhan. «Review on microemulsions as futuristic drug delivery.» *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* 5 (2013): 39-53.
- 62) Naidong, Weng, y Angela Eerkes. «Development and validation of a hydrophilic interaction liquid chromatography–tandem mass spectrometric method for the analysis of paroxetine in human plasma.» *Biomedical Chromatography* 18 (2004): 28-36.
- 63) National Institute of Mental Health. *Depression*. 2016. <https://www.nimh.nih.gov/health/topics/depression/index.shtml> (último acceso: 09 de Septiembre de 2016).
- 64) Nazar, Muhammad Faizan, Asad Muhammad Khan, y Syed Sakhawat Shah. «Microemulsion system with improved loading of piroxicam: A study of microstructure.» *American Association of Pharmaceutical Scientists* 10 (2009): 1286-1294.
- 65) Norris, David A. «Structure and function of the skin.» En *Goldman-Cecil medicine*, de Lee Goldman y Andrew I Schafer, 2498-2502. New York: Elsevier, 2012.
- 66) O'Donnell, James M., y Richard C. Shelton. «Tratamiento farmacológico de la depresión y de los trastornos por ansiedad.» En *Goodman&Gilman: Las bases farmacológicas de la terapéutica*, de Laurence Brunton, 404-407. México: McGraw Hill Interamericana, 2012.
- 67) Ogiso, T., N. Niinaka, y M. Iwaki. «Mechanism for enhancement effect of lipid disperse system on percutaneous absorption.» *Journal of Pharmaceutical Sciences* 85 (1996): 57-64.
- 68) Olgiasi, Paolo, Emanuele Bajo, y Alessandro Serretti. «Benefit of slow titration of paroxetine to treat depression in the elderly.» *Human Psychopharmacology* 29 (2014): 544-551.
- 69) Otero, M. J., L. Santos, D. Santos-Buelga, y A. Domínguez-Gil. «Farmacocinética clínica de los inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina.» *Farmacia Hospitalaria* 20 (1996): 73-85.
- 70) Pantec biosolutions. *Laser microporation*. 2015. <http://www.pantec-biosolutions.com/en/technology/laser-microporation> (último acceso: 10 de Junio de 2016).
- 71) Pastore, Michael N., Yogeshvar N. Kalia, Michael Horstmann, y Michael S. Roberts. «Transdermal patches: history, development and pharmacology.» *British Journal of Pharmacology* 172 (2015): 2179-2209.
- 72) Patel, Hemul V., Nikesh V. Patel, y Naynika K. Patel. «In-vitro characterization of matrix type transdermal drug delivery systems of paroxetine hydrochloride using different plasticizers.» *International Journal of Research in Pharmacy and Chemistry* 3 (2013): 345-353.
- 73) Pathan, Inayat B., Hiranman Nandure, Shoaeb Mohammad Syed, y Shripad Bairagi. «Transdermal delivery of ethosomes as a novel vesicular carrier for paroxetine hydrochloride: In vitro evaluation and In vivo study.» *Marmara Pharmaceutical Journal* 20 (2016): 1-6.
- 74) Paudel, Kalpana S., Mikolaj Milewski, Courtney L. Swadley, Nicole K. Brogden, Priyanka Ghosh, y Audra L. Stinchcomb. «Challenges and opportunities in dermal/transdermal delivery.» *Therapeutic Delivery* 1 (2010): 109-131.
- 75) Podlogar, F., M. Gašperlin, M. Tomšić, A. Jamnik, y M. Bešter Rogac. «Structural characterisation of water–Tween 40®/Imwitor 308®–isopropyl myristate microemulsions using different experimental methods.» *International Journal of Pharmaceutics* 276 (2004): 115-128.
- 76) Roussel, Laurène, Rawad Abdayem, Elodie Gilbert, Fabrice Pirot, y Marek Haftek. «Influence of excipients on two elements of the stratum corneum barrier: Intercellular lipids and epidermal tight Junctions.» En *Chemical Methods in Penetration Enhancement: Drug Manipulation Strategies and Vehicle Effects*, de Nina Dragicevic y Howard I. Maibach, 80-84. Londres: Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2015.
- 77) Schaefer, Hans, Thomas E Redelmeier, y Jürgen Lademann. «Skin penetration.» En *Contact Dermatitis*, de Jeanne Duus Johansen, Peter J Frosch y Jean-Pierre Lepoittevin, 215-227. Berlin: Springer, 2011.

- 78) Scheuplein, Robert J. «Mechanism of percutaneous absorption.» *The Journal of Investigative Dermatology* 48 (1967): 79-88.
- 79) Schuetz, Yannik B., Aarti Naik, Richard H. Guy, y Yogeshvar N. Kalia. «Effect of amino acid sequence on transdermal iontophoretic peptide delivery.» *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 26 (2005): 429-437.
- 80) Shahzad, Yasser , Ruaan Louw, Minja Gerber, y Jeanetta du Plessis. «Breaching the skin barrier through temperature modulations.» *Journal of Controlled Release* 202 (2015): 1-13.
- 81) Sigma-aldrich. «Product Information: Tween 80.» 2016. https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/docs/Sigma-Aldrich/Product_Information_Sheet/p8074pis.pdf (último acceso: 12 de Junio de 2016).
- 82) Sintov, Amnom C., y Roy Brandys-Sitton. «Facilitated skin penetration of lidocaine: Combination of a short-term iontophoresis and microemulsion formulation.» *International Journal of Pharmaceutics* 316 (2006): 58-67.
- 83) Thomson-PLM. *Diccionario de Especialidades Farmacéuticas PLM.* 2016. http://www.facmed.unam.mx/bmnd/dirijo.php?bib_vv=6 (último acceso: 20 de Enero de 2016).
- 84) Trommer, H., y R. H. Neubert. «Overcoming the stratum corneum: The modulation of skin penetration.» *Skin Pharmacology and Physiology* 19 (2006): 106-121.
- 85) Tulloch, I. F., y A. M. Johnson. «The pharmacologic profile of paroxetine, a new selective serotonin reuptake inhibitor.» *Journal of Clinical Psychiatry* 53 (1992): 7-12.
- 86) USP. *The United States Pharmacopoeia.* Vol. 31. EE.UU., 2008.
- 87) Venkatachalam , A, y Vidya S Chatterjee. «Stability-indicating high performance thin layer chromatography determination of Paroxetine hydrochloride in bulk drug and pharmaceutical formulations.» *Analytica Chimica Acta* 598 (2007): 312-317.
- 88) Verdu, Bénédicte, Isabelle Decosterd, Thierry Buclin, Friedrich Stiefel, y Alexandre Berney . «Antidepressants for the Treatment of Chronic Pain.» *Drugs* 68 (2008): 2611-2632.
- 89) Walker, Frederick Rohan. «A critical review of the mechanism of action for the selective serotonin reuptake.» *Neuropharmacology* 67 (2013): 304-317.
- 90) Walker, Roderick B., y Eric W. Smith. «The role of percutaneous penetration enhancers.» *Advanced Drug Delivery Reviews* 18 (1996): 295-301.
- 91) Watts, J. **Clarke's analysis of drugs and poisons.** 4o. Edición. London: Pharmaceutical Press, 2011.
- 92) Wilkinson, Simon C., Wilfred J. M. Maas, Jesper Bo Nielsen , Laura C. Greaves, Johannes J. M. Van de sandt, y Faith M. Williams. «Interactions of skin thickness and physicochemical properties of test compounds in percutaneous penetration studies.» *International Archives of Occupational and Environmental Health* 79 (2006): 405-413.
- 93) Williams, Adrian C., y Bian W. Barry. «Penetration enhancers.» *Advanced Drug Delivery Reviews* 64 (2012): 128-137.
- 94) World Health Organization. *Health topics: Depression.* 2016. <http://www.who.int/topics/depression/en/> (último acceso: 9 de Septiembre de 2016).
- 95) Yogeshwar, G. Bachhav, Arne Heinrich, y N. Kalia Yogeshvar. «Using laser microporation to improve transdermal delivery of diclofenac: Increasing bioavailability and the range of therapeutic applications.» *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 78 (2011): 408-414.
- 96) Zhao, X., J. P. Liu, X. Zhang, y Y. Li. «Enhancement of transdermal delivery of theophylline.» *International Journal of Pharmaceutics* 327 (2006): 58-64.
- 97) Zhu, W., A. Yu, W. Wang, R. Dong, J. Wu, y G. Zhai. «Formulation design of microemulsion for dermal delivery of penciclovir.» *Pharmaceutical Nanotechnology* 360 (2008): 184-190.

11. ANEXOS

Anexo 1

Desarrollo y validación del método analítico de cuantificación de clorhidrato de paroxetina mediante HPTLC (Cromatografía en capa fina de alta resolución)

A1.1 Selección de las condiciones cromatográficas

Para desarrollar el método analítico se buscaron las condiciones cromatográficas del analito de interés. La primera etapa del desarrollo del método fue encontrar las condiciones necesarias para cuantificar el clorhidrato de paroxetina en buffer de fosfatos pH 7.4 con Brij® 58 al 3% (Permeación y extracción en piel). Para esto se partió de un par de métodos previamente publicados (Venkatachalam y Chatterjee 2007). Ambos métodos utilizan HPTLC y una detección UV. De estos trabajos se obtuvieron las condiciones iniciales, a partir de las cuales se realizaron pruebas y se optimizaron las condiciones cromatográficas para poder tener una adecuada cuantificación del activo. El método se validó de acuerdo a los parámetros descritos en la guía para validación de métodos bioanalíticos de la FDA y las guías ICH (FDA 2013, ICH Guidelines 2005). Las condiciones cromatográficas adecuadas se muestran en la tabla 12.

Tabla 12. Parámetros establecidos para la cuantificación de PAX mediante análisis HPTLC.

PARÁMETRO	CONDICIÓN
Composición de la fase móvil	Butanol: Ácido acético: Agua (7.8:2:0.2)
Saturación de la cámara	15 min a temperatura ambiente
Fase estacionaria	Placas de aluminio recubiertas con gel de sílice 60 F254
Ancho de banda (aplicación)	6 mm
Velocidad de aplicación	40 nl/s
Longitud del cromatograma	4.5 cm
λ_{max}	294 nm
Dimensiones del slit	5 mm X 0.45 mm
Velocidad de escaneo	10 mm/s
Volumen de muestra	5 μ L a 15 μ L
Condiciones de secado	60 °C durante 5 min

A1.2 Selectividad del método

Para evaluar la selectividad del método se preparó una solución blanco colocando el buffer de fosfatos pH 7.4 con Brij® 58 al 3% en contacto con oreja de cerdo. Para replicar las condiciones de una permeación, se dejó en agitación durante 24 horas (Figura 64). Posteriormente se filtró la solución a través de un prefiltro (Millipore®, EE.UU) y por una membrana de 0.45 μ m (Millipore®, EE.UU.), obteniéndose una solución transparente y ligeramente amarilla. Se prepararon muestras de PAX en la solución obtenida (Figura 65), se analizaron las soluciones preparadas así

como un blanco de solución en contacto con oreja de cerdo. Las muestras se inyectaron y se comparó la respuesta analítica obtenida en cada caso.

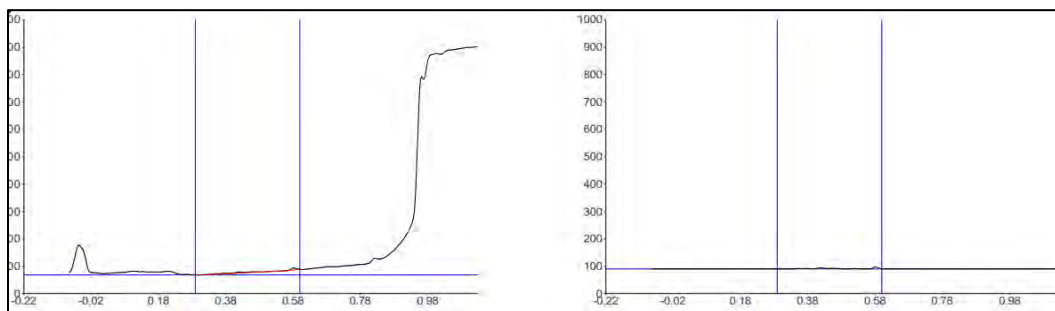


Figura 64. Cromatograma correspondiente a la solución blanco (Buffer de fosfatos pH 7.4 con Brij® 58 al 3% en contacto con piel de oreja de cerdo).

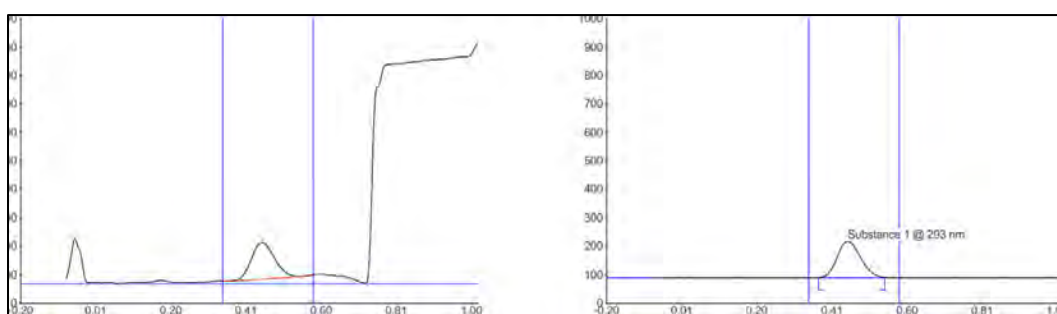


Figura 65. Cromatograma correspondiente a la solución de PAX en Buffer de fosfatos pH 7.4 con Brij® 58 al 3% en contacto con piel de oreja de cerdo.

A1.3 Linealidad

Para evaluar la linealidad de la curva de calibración, las muestras se prepararon por triplicado con el fin de validar el método analítico y se determinó la respuesta analítica; área bajo la curva (ABC) para cada cantidad de clorhidrato de paroxetina analizada en la matriz buffer de fosfatos pH 7.4 adicionada con Brij® 58 al 3% dejada en contacto con piel de oreja de cerdo, los datos obtenidos se muestran en la tabla 13. El conjunto de puntos obtenidos para la curva de calibración (n=7) se muestran en la figura 66. Utilizando el programa Statgraphics® Centurión XVI se realizaron los análisis estadísticos.

Tabla 13. Datos obtenidos del análisis de las soluciones patrón preparadas.

Cantidad (ng)	Área promedio (UA)	Factor de respuesta	Desviación estándar
102	564.4	5.5	68.9
204	1158.7	5.7	56.7
306	1737.3	5.7	141.2
408	2258.3	5.5	208.0
510	2806.4	5.5	167.5
612	3301.0	5.4	208.1
714	3878.8	5.4	229.4
816	4372.5	5.4	137.6

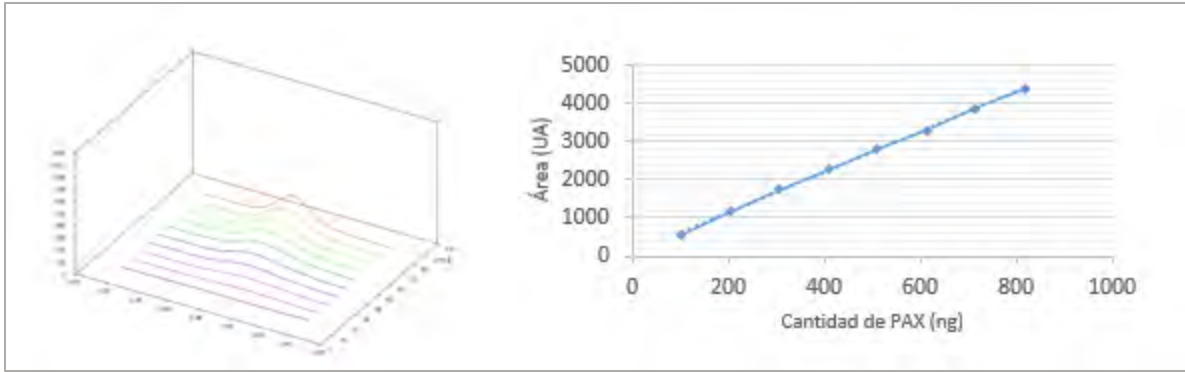


Figura 66. Curva de calibración de clorhidrato de paroxetina en matriz buffer de fosfatos pH 7.4 con Brij® 58 al 3% (n=8).

Los parámetros obtenidos para la curva de calibración ($r^2=0.9993$) se ajustaron a un modelo lineal (tablas 14 y 15). Los intervalos de confianza establecidos para los parámetros obtenidos se muestran en la tabla 16, en el caso de la ordenada al origen se concluyó que el cero se encuentra dentro de los valores establecidos con una confianza del 95%. Se realizó un análisis de varianza con los resultados obtenidos, confirmando que existe una relación estadísticamente significativa entre la cantidad de clorhidrato de paroxetina y el área obtenida con un nivel de confianza del 95 % (Tabla 17, $P<0.05$).

Tabla 14. Parámetros obtenidos para la curva de calibración realizada

Sistema	M	b	r^2
Buffer de fosfatos pH 7.4 con Brij® 58 al 3%	5.31	71.70	0.994

Tabla 15. Coeficientes obtenidos mediante regresión lineal

Coeficientes				
	Mínimos Cuadrados	Estándar	Estadístico	
Parámetro	Estimado	Error	T	Valor-P
Intercepto	71.7022	56.9751	1.25848	0.2186
Pendiente	5.31113	0.111345	47.6996	0.0000

Tabla 16. Intervalos de confianza del 95.0% para las estimaciones de los coeficientes

Parámetro	Estimación	Error Estándar	Límite Inferior	Límite Superior
Intercepto	71.7022	56.9751	-45.0063	188.411
Pendiente	5.31113	0.111345	5.08304	5.53921

Tabla 17. Resultados del análisis de varianza realizado

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Modelo	4.85313E7	1	4.85313E7	2275.25	0.0000
Residuo	597243.	28	21330.1		
Total (Corr.)	4.91285E7	29			
Coeficiente de Correlación = 0.993903 R-cuadrada = 98.7843 por ciento R-cuadrado (ajustado para g.l.) = 98.7409 por ciento Error estándar del est. = 146.048 Error absoluto medio = 115.156					

Se realizó la prueba de bondad de ajuste del modelo mediante la comparación de la variabilidad de los residuos del modelo actual con la variabilidad entre observaciones realizadas para valores de repetición de la variable cantidad. Puesto que el valor-P para la carencia de ajuste en la tabla ANOVA es menor que 0.05, el modelo es adecuado para los datos observados con un nivel de confianza del 95.0% (Tabla 18, $P < 0.05$).

Tabla 18. Análisis de Varianza con Carencia de Ajuste

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Modelo	4.85313E7	1	4.85313E7	2275.25	0.0000
Residuo	597243.	28	21330.1		
Carencia de Ajuste	26405.0	6	4400.83	0.17	0.9823
Error Puro	570838.	22	25947.2		
Total (Corr.)	4.91285E7	29			

Podemos observar una buena correlación entre los valores de área obtenidos y los valores predichos por el modelo (Figura 67), así como una distribución sin tendencia de los residuos (figura 68).

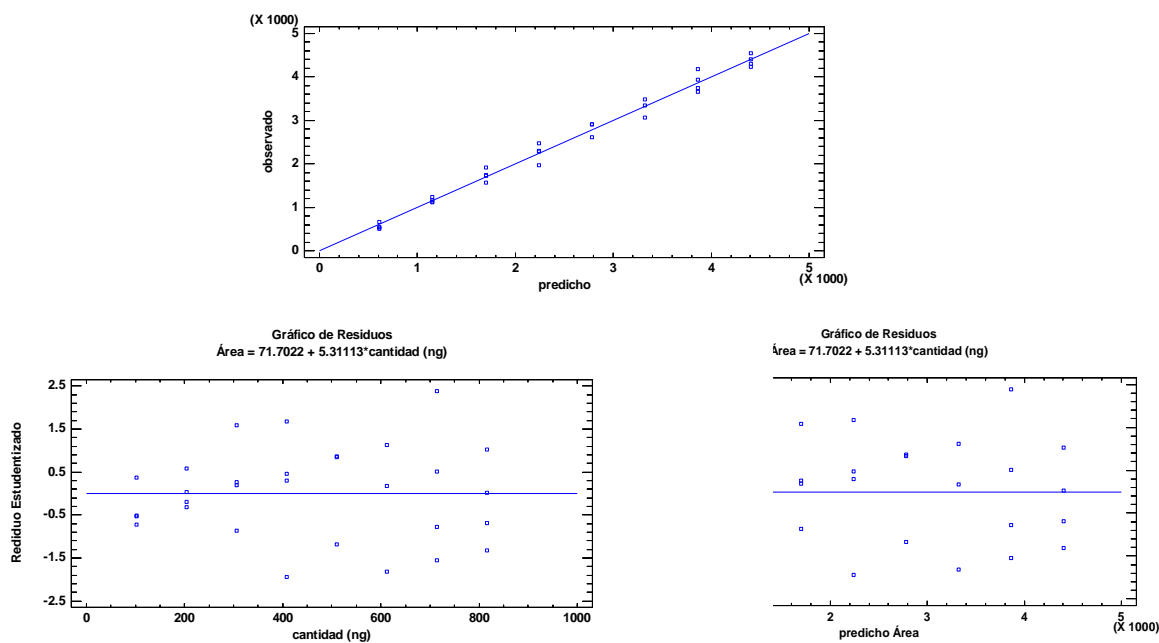


Figura 68. Residuos estandarizados vs cantidad y área predichas por el modelo.

A1.4 Límite de detección y cuantificación

La determinación de los límites de detección y cuantificación se realizó de manera teórica utilizando las siguientes formulas:

$$\text{Límite de detección} = 3.3x \frac{\sigma}{S} \dots\dots\dots \text{ Límite de detección} = 3.3 x \frac{56.975}{5.31} = 35.4 \text{ ng}$$

$$\text{Límite de cuantificación} = 10x \frac{\sigma}{S} \dots\dots\dots \text{ Límite de cuantificación} = 10 x \frac{56.975}{5.31} = 107 \text{ ng}$$

Donde σ es la desviación estándar del intercepto en las regresiones y S es la pendiente de la curva de calibración. Se comprobaron de forma experimental los resultados obtenidos teóricamente para ambos límites, concluyéndose que el límite de cuantificación corresponde a 104 ng y el de detección a 36 ng.

A1.5 Precisión y exactitud

Cada concentración fue analizada 5 veces en el mismo día para determinar la reproducibilidad intra-día. Para determinar la variación inter-día, se repitió en 2 diferentes días. La precisión (coeficiente de variación) y exactitud (error relativo) fueron menores al 15 % (Tabla 19).

Tabla 19. Resultados de precisión y exactitud intermedia de la cuantificación de PAX mediante HPTLC.

Cantidad teórica (ng)	Área promedio (UA)	Desviación estándar	Precisión (CV %)		Exactitud (Error relativo %)	
			Intra-día	Inter-día	Intra-día	Inter-día
104	653.7	28.12	3.73	4.30	5.7	6.50
416	2467.49	60.76	1.50	2.46	10.2	8.96
832	4555.33	117.05	1.49	2.57	1.4	2.15

A1. 6 Robustez

❖ Volumen de inyección

Para evaluar el efecto del volumen de inyección se preparó una solución stock de 40.8 ng/ μ L, de la cual se inyectaron volúmenes de 5, 10, 15 y 20 μ L (Tabla 20).

Tabla 20. Efecto del volumen de inyección en la cuantificación de PAX mediante HPTLC.

Volumen (μ L)	Cantidad (ng)	Área (UA)	Cantidad recuperada	Error relativo (%)	Desviación estándar	% CV
5	204	1200.4	212.57	4.20	35.8	3.0
10	408	2273.4	414.63	1.62	39.2	1.7
15	612	2902.9	533.19	12.88	35.2	1.2
20	816	3559.2	656.77	19.51	169.3	4.8

En este caso se observó que al inyectar volúmenes de 5, 10 y 15 μ L se obtiene una precisión y exactitud con valores de CV y error relativo < 15%, mientras que al inyectar 20 μ L se comienza a tener problemas en la exactitud de la cuantificación (>15 %).

❖ Modificaciones en la fase móvil

Para comprobar la robustez del método analítico se realizaron pequeñas modificaciones en las proporciones de la fase móvil, especialmente en los componentes que son propensos a evaporarse y con ello modificar las proporciones (Tablas 21 y 22). Como se observa en las tablas 9 y 10 en ambos casos se cuantifica con un CV y error estándar <15%.

Tabla 21. Resultados obtenidos al utilizar butanol: ácido acético: agua (7.7:2.1:0.2).

Cantidad (ng)	Área promedio (UA)	% CV	Cantidad recuperada (ng)	Error relativo (%)
101	542.63	4.92	88.67	12.21
404	2254.94	3.21	411.08	1.75
808	4277.70	1.33	791.94	1.99

Tabla 22. Resultados obtenidos al utilizar butanol: ácido acético: agua (7.9:1.8:0.2).

Cantidad (ng)	Área promedio (UA)	% CV	Cantidad recuperada (ng)	Error relativo (%)
101	595.72	4.43	98.67	2.31
404	2228.2	4.32	406.04	0.51
808	4044.86	1.44	748.10	7.41

❖ Modificación en el tiempo de secado

Con el fin de evaluar los efectos de un secado incompleto, se dejó secar la placa durante 2 minutos (Tabla 23), sin embargo, los CV y el error relativo obtenidos fueron menores al 15%, lo que implica que la disminución en el tiempo de secado no afecta la cuantificación de PAX.

Tabla 23. Resultados obtenidos al secar la placa a 60 °C durante 2 minutos.

Cantidad (ng)	Área promedio (UA)	% CV	Cantidad Recuperada (ng)	Error relativo (%)
101	558.74	2.44	91.70	9.20
404	2119.76	1.78	385.63	4.55
808	3864.32	0.89	714.11	11.62

❖ Modificación en la velocidad de aplicación

Dentro de las pruebas de robustez también se evaluó el efecto de la velocidad de aplicación de la muestra (Tabla 24), encontrándose que aun cuando se aumenta la velocidad a 50 nl/s, la cuantificación se realiza con un CV y error relativo <15%.

Tabla 24. Resultados obtenidos al incrementar la velocidad de aplicación a 50 nl/s.

Volumen (µL)	Cantidad (ng)	Área promedio (UA)	Cantidad recuperada (ng)	Error relativo (%)	Desviación estándar	% CV
1	101	556.86	91.35	9.93	50.18	9.01
4	404	2155.8	392.41	2.87	60.91	2.83
8	808	3929.24	726.33	10.11	89.41	2.28

Anexo 2

Desarrollo y validación del método analítico de cuantificación de clorhidrato de paroxetina mediante HPLC (Cromatografía líquida de alta resolución)

A2.1 Selección de las condiciones cromatográficas

Se partió de métodos previamente publicados (Lambropoulos, Spanos y Lazaridis 1999, Bourin, Chue y Guillon 2001), en los cuales se utiliza HPLC y detección UV. A partir de las condiciones iniciales se realizaron pruebas y se optimizaron las condiciones cromatográficas para poder tener una adecuada cuantificación del clorhidrato de paroxetina en buffer de fosfatos pH 7.4 con Brij® 58 al 3% (Permeación) y en mezcla acetonitrilo/agua (Extracción en piel). La separación cromatográfica del analito se obtuvo en el equipo Dionex Ultimate 3000, utilizando las condiciones cromatográficas de la tabla 25.

Tabla 25. Condiciones cromatográficas adecuadas para cuantificar PAX mediante HPLC.

PARÁMETRO	CONDICIÓN
fase móvil	Gradiente: Solución de Na ₂ HPO ₄ (10 mM; pH=3): Metanol (Figura 69)
Columna	Lichrosphere 100 RP18 (125 x 4 mm, 5 µm)
Flujo	1 ml/min
Temperatura de la columna	35 °C
Volumen de inyección	25 µL
Tiempo de la corrida	6 min
Tiempo de retención	3.8 min

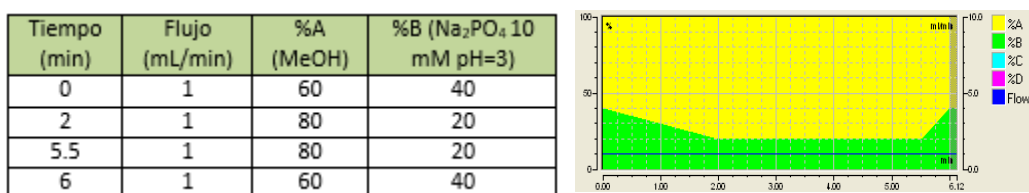


Figura 69. Gradiente de elución utilizado para cuantificar PAX

A2.2 Linealidad

Para evaluar la linealidad de la curva de calibración se prepararon nueve diferentes concentraciones de PAX (0.5, 1, 2, 5, 10, 25, 50, 75, 100 µg/mL; Figura 70) en buffer de fosfatos pH 7.4 con Brij® 58 3% y en MeOH. Las curvas de calibración se construyeron graficando el área promedio del pico en función de la concentración del fármaco. No se obtuvo diferencias significativas en las áreas ni en los parámetros obtenidos al comparar las curvas obtenidas

con los 2 medios, por lo que las curvas posteriores se prepararon en buffer. A partir de la regresión de la recta mediante mínimos cuadrados, se construyó una curva promedio usando todos los datos de las curvas de calibrado obtenidas (Tabla 26).

Tabla 26. Datos obtenidos para la curva promedio construida durante la validación.

Cantidad (µg/mL)	Área Promedio (UA)	Desviación Estándar	% CV
0.5	0.0944	0.005	44.93
1	0.2488	0.011	16.68
2.5	0.4616	0.039	12.56
5	0.9513	0.057	8.28
10	2.0777	0.081	4.54
25	5.8566	0.246	4.20
50	12.4142	0.420	3.38
75	18.2827	0.500	3.00
100	24.8705	0.863	4.72

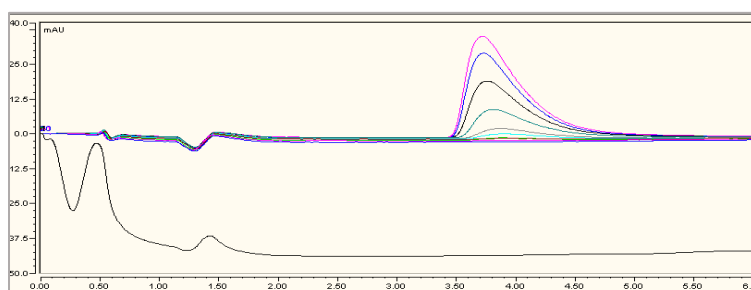


Figura 70. Curva patrón de PAX y blanco de la solución buffer con Brij® 58 3%.

El conjunto de puntos obtenidos para la curva de calibración (n=23) se muestra en la figura 71. Utilizando el programa Statgraphics® Centurión XVI se realizaron los análisis estadísticos. Se encontró linealidad en el intervalo de 3 a 100 µg/mL con un coeficiente de correlación de 0.9989 (Tabla 27).

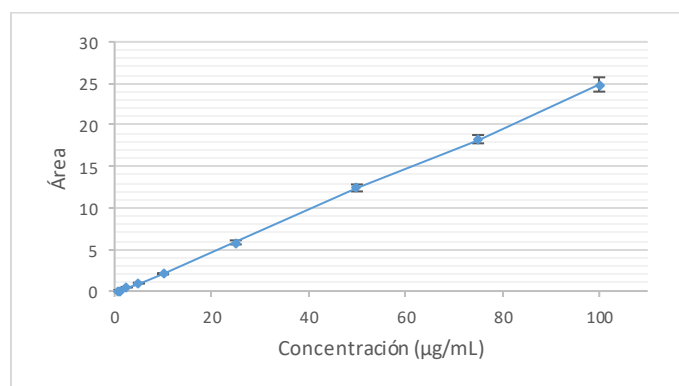


Figura 71. Curva de calibración de PAX de 3 a 100 µg/mL mediante HPLC

Tabla 27. Parámetros obtenidos para la curva de calibración realizada

Medio	Intervalo	M	B	r ²
Buffer de fosfatos pH 7.5 con Brij® 3%	3 a 100	0.243	-0.128	0.9989
Mezcla ACN/H ₂ O (75:25)				

Los parámetros obtenidos para la curva de calibración se ajustaron a un modelo lineal (Tabla 28). Los intervalos de confianza establecidos para los parámetros obtenidos se muestran en la tabla 29, en el caso de la ordenada al origen se concluyó que el cero se encuentra dentro de los valores establecidos con una confianza del 95%. Se realizó un análisis de varianza con los resultados obtenidos, confirmando que existe una relación estadísticamente significativa entre la cantidad de clorhidrato de paroxetina y el área obtenida con un nivel de confianza del 95 % (Tabla 30, P<0.05).

Tabla 28. Coeficientes obtenidos mediante regresión lineal

Parámetro	Estimación	Error Estándar	Estadístico T	Valor-P
Intercepto	-0.128445	0.0773628	-1.66029	0.1354
Pendiente	0.243432	0.00174562	139.453	0.0000

Tabla 29. Intervalos de confianza del 95.0% para las estimaciones de los coeficientes

Parámetro	Estimación	Error Estándar	Límite Inferior	Límite Superior
Intercepto	-0.128445	0.0773628	-0.306844	0.0499548
Pendiente	0.243432	0.00174562	0.239407	0.247457

Tabla 30. Resultados del análisis de varianza realizado para la cuantificación de PAX mediante HPLC

Análisis de Varianza					
Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Modelo	14767.9	1	14767.9	89592.29	0.0000
Residuo	30.9889	188	0.164834		
Total (Corr.)	14798.9	189			

Coeficiente de Correlación = 0.998952
 R-cuadrada = 99.7906 por ciento
 R-cuadrado (ajustado para g.l.) = 99.7895 por ciento
 Error estándar del est. = 0.405998
 Error absoluto medio = 0.258876
 Estadístico Durbin-Watson = 1.73321 (P=0.0329)
 Autocorrelación de residuos en retraso 1 = 0.132967

Se realizó la prueba de bondad de ajuste del modelo mediante la comparación de la variabilidad de los residuos del modelo actual con la variabilidad entre observaciones realizadas para valores de repetición de la variable cantidad. Puesto que el valor-P para la carencia de ajuste en la tabla ANOVA es menor que 0.05, el modelo es adecuado para los datos observados con un nivel de confianza del 95.0% (Tabla 31, P<0.05).

Tabla 31. Análisis de Varianza con Carencia de Ajuste para la cuantificación de PAX mediante HPLC

Análisis de Varianza con Carencia de Ajuste					
Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Modelo	15496.1	1	15496.1	61860.77	0.0000
Residuo	47.0939	188	0.2505		
Carencia de Ajuste	3.2375	7	0.4625	1.91	0.0705
Error Puro	43.8564	181	0.242301		
Total (Corr.)	15543.2	189			

Podemos observar una buena correlación entre los valores de área obtenidos y los valores predichos por el modelo (Figura 72), así como una distribución sin tendencia de los residuos (figura 73).

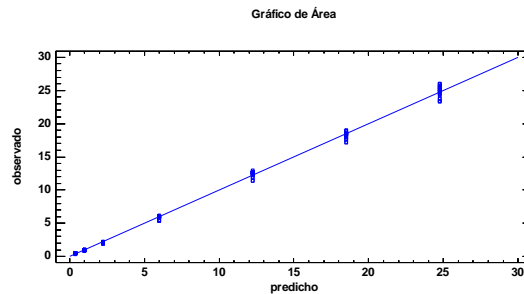
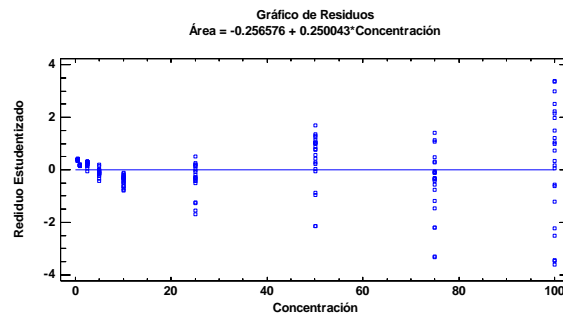
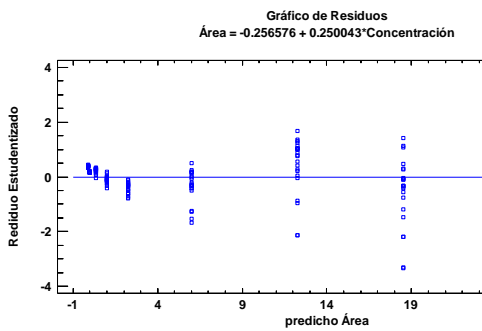


Figura 72. Relación entre los valores de área obtenidos y los predichos por el modelo



... sin tendencia por el modelo.

A2.3 Límite de detección y cuantificación

La determinación de los límites de detección y cuantificación se realizó de manera teórica utilizando las siguientes formulas:

$$\text{Límite de detección} = 3.3x \frac{\sigma}{S} \dots\dots \quad \text{Límite de detección} = 3.3x \frac{0.0774}{0.243} = 1 \mu\text{g/mL}$$

$$\text{Límite de cuantificación} = 10x \frac{\sigma}{S} \dots\dots \quad \text{Límite de cuantificación} = 10x \frac{0.0774}{0.243} = 3.2 \mu\text{g/mL}$$

Donde σ es la desviación estándar del intercepto en las regresiones y S es la pendiente de la curva de calibración. Se comprobaron de forma experimental los resultados obtenidos teóricamente para ambos límites, concluyéndose que el límite de cuantificación corresponde a 1 $\mu\text{g/mL}$ y el de detección es 3 $\mu\text{g/mL}$.

A2.4 Precisión y exactitud

Cada concentración fue analizada 5 veces en el mismo día para determinar la reproducibilidad intra-día. Para determinar la variación inter-día, se repitió en 5 diferentes días. La precisión (coeficiente de variación) y exactitud (error relativo) fueron menores al 15 % (de acuerdo con las guías ICH y FDA) (tabla 32).

Tabla 32. Resultados de precisión y exactitud intermedia para el método de cuantificación de PAX por HPLC.

Cantidad teórica ($\mu\text{g/mL}$)	Área promedio (UA)	Desviación estándar	Precisión (CV %)		Exactitud (Error relativo %)	
			Intra-día	Inter-día	Intra-día	Inter-día
2.5	0.4616	0.039	5.66	8.41	12.66	14.1
25	5.8566	0.246	2.42	5.97	3.30	2.21
100	24.8705	0.863	2.22	3.88	2.56	0.50

A2.5 Pruebas de retención en filtros

Se evaluó la retención de PAX en filtros de nylon y PTFE, ya que las muestras se filtran y posteriormente se analizan mediante HPLC, sin embargo no se obtuvo una diferencia importante en la concentración de las muestras al ser filtradas (tabla 33).

Tabla 33. Resultados de las pruebas de retención en filtros de nylon y PTFE.

Muestra	Área	Concentración calculada	% Recobro	Promedio	Desviación estándar
75 PTFE 1	18.87	75.50	98.70	98.31	0.46
75 PTFE 2	18.70	74.81	97.79		
75 PTFE 3	18.82	75.31	98.44		
75 NYLON 1	18.29	73.19	95.68	97.24	1.51
75 NYLON 2	18.87	75.51	98.70		
75 NYLON 3	18.61	74.47	97.34		
10 PTFE 1	2.24	9.66	94.73	93.49	1.15
10 PTFE 2	2.20	9.52	93.28		
10 PTFE 3	2.18	9.43	92.46		
10 NYLON 1	2.19	9.48	92.94	91.07	2.29
10 NYLON 2	2.16	9.36	91.75		
10 NYLON 3	2.08	9.03	88.52		

Anexo 3

Desarrollo del método analítico de cuantificación de clorhidrato de paroxetina mediante UPLC-MS/MS (cromatografía de líquidos de ultra-alta resolución acoplado a un detector de masas)

A3.1 Selección de las condiciones cromatográficas

Se partió de métodos previamente publicados (Naidong y Eerkes 2004, Chu y Metcalfe 2007, Juan, Zhiling y Huande 2005), en los cuales se realiza la separación cromatográfica mediante cromatografía de líquidos de ultra-alta resolución (AQUITY UPLC) acoplado a un detector de masas en tándem con una fuente de iones por electrospray (ESI) y operada en modo de iones positivos con monitoreo de reacción múltiple (MRM) para la cuantificación de iones $[M+H]^+$ utilizando el software MassLynx 4.0 (Waters, EE.UU.) El sistema UPLC consistió en una bomba binaria, un **calentador de columna y un muestreador automático con enfriamiento a 4 °C**.

Las condiciones se optimizaron mediante el programa Intellistart, con lo cual se pudo tener una adecuada cuantificación del clorhidrato de paroxetina en buffer de fosfatos pH 7.4 con Brij® 58 al 3% (Permeación). La separación cromatográfica del analito se obtuvo utilizando las condiciones cromatográficas de la tabla 34.

Tabla 34. Condiciones cromatográficas adecuadas para cuantificar PAX mediante UPLC.

PARÁMETRO	CONDICIÓN
fase móvil	Mezcla 70:30 de las soluciones: (i) Solución de ácido fórmico (FA) 0.1% y (ii) acetonitrilo 0.1% FA
Columna	Columna XBridge BEH C18 (50 x 2.1 mm, 2.5 µm)
Flujo	0.4 ml/min
Temperatura de la columna	35 °C
Temperatura de la fuente	150 °C
Flujo de nitrógeno (cono)	2 L/h
Temperatura del gas de desolvatación	350 °C
Flujo del gas de desolvatación	650 L/h
Energía de colisión (Ar)	20 eV
Flujo del gas de colisión (Ar)	0.15 mL/min
Voltaje del capilar	2.60 kV (ESI 1) 2.66 kV(ESI 2)
Voltaje del cono	34 V (ESI 1)-59.68 V (ESI 2)
Voltaje del extractor	3 V (ESI 1)-25.49 V (ESI 2)
Volumen de inyección	5 µL
Tiempo de la corrida	5 min
Tiempo de retención	2.61 min

Las transiciones MRM seleccionadas para la determinación fueron; m/z de 330.16 a 191.99 (molécula padre) y de 330.16 a 69.98 (molécula hija) (Figuras 74 y 75), también se midió la absorbancia UV a 294 nm con un detector de

matriz de fotodiodos (PDA) (Figura 74). Para cada análisis realizado se inyectó una curva patrón por triplicado. Se analizó la linealidad de la curva patrón.

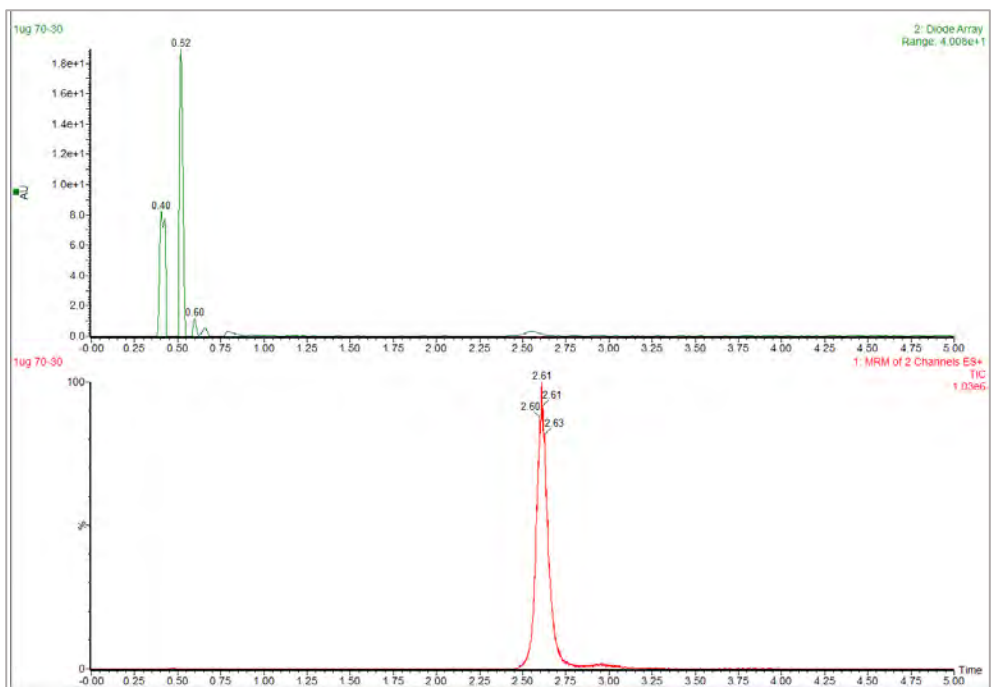


Figura 74. Cromatogramas correspondientes a la detección de PAX mediante PDA (verde) y masas MRM (rojo)

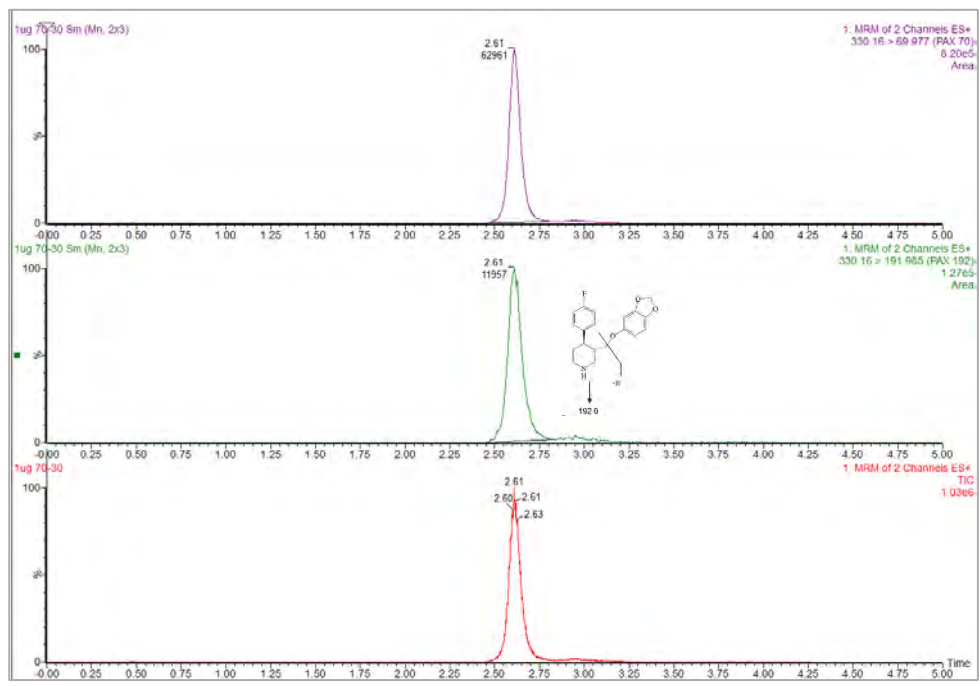


Figura 75. Pico obtenido para la molécula padre (verde) e hija (morado) obtenido mediante el método analítico UPLC-MS/MS desarrollado.

A2.2 Linealidad

Para evaluar la linealidad de la curva de calibración se prepararon trece diferentes concentraciones de PAX (0.5, 1, 5, 10, 25, 50, 75, 100, 200, 400, 600, 800 ng/mL). Cada concentración fue analizada 3 veces en el mismo día para determinar la reproducibilidad intra-día. Las curvas de calibración se construyeron graficando el área promedio del pico obtenido para la molécula padre (tabla 35 y figura 76) y el área obtenida para la molécula hija (tabla 36 y figura 77) en función de la concentración del fármaco. A partir de la regresión de la recta mediante mínimos cuadrados, se determinó la cantidad de PAX en las muestras. La curva de calibración fue lineal en el intervalo de 10-800 ng/mL (Figura 76), la precisión (coeficiente de variación) y exactitud (error relativo) intra-día fueron menores al 15 % para la detección de la molécula padre. Debido a la poca disponibilidad del equipo no fue posible validar el método.

Tabla 35. Datos obtenidos para la curva promedio obtenida mediante la detección de la molécula padre m/z 192.

Molécula padre (330 → 192)							
Concentración teórica (ng/mL)	Área Curva 1	Área Curva 2	Área Curva 3	Área promedio	Desviación estándar	Coefficiente de variación (%)	Error relativo (%)
10.2	1395	1504	1408	1435.7	59.5	4.15	9.27
25.5	3141	3346	3472	3319.7	167.1	5.03	7.04
51	6591	6964	7318	6957.7	363.5	5.23	5.97
102	13632	13787	15121	14180.0	818.6	5.77	5.79
204	29414	31216	31076	30568.7	1002.4	3.28	0.66
408	59577	62021	64548	62048.7	2485.6	4.01	1.76
612	89304	93054	95202	91179.0	2985.0	3.27	0.43
816	118907	125166	123837	122036.5	3297.6	2.70	0.12

Tabla 36. Datos obtenidos para la curva promedio obtenida mediante la detección de la molécula hija m/z 70.

Molécula hija (330 → 70)							
Concentración teórica (ng/mL)	Area Curva 1	Area Curva 2	Area Curva 3	Area promedio	Desviación estándar	Coefficiente de variación (%)	Error relativo (%)
10.2	1233	1263	1144	1213.33	61.89	5.10	16.33
25.5	2958	3123	3202	3094.33	124.50	4.02	1.61
51	6135	6532	6780	6482.33	325.36	5.02	4.10
102	12398	13557	13533	13162.67	662.33	5.03	6.01
204	27133	28372	28883	28129.33	899.88	3.20	1.43
408	55287	56913	60316	57505.33	2566.29	4.46	0.10
612	82303	86760	68848	84531.50	9325.07	11.03	2.35
816	110137	118276	68896	114206.5	26474.67	23.18	1.20

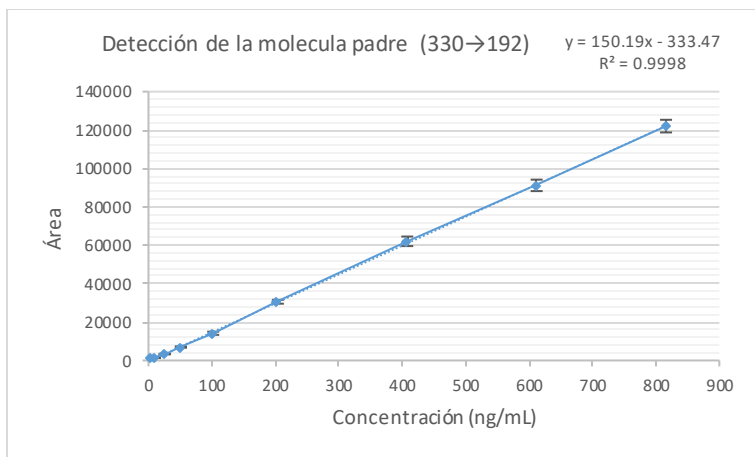


Figura 76. Curva de calibración obtenida mediante la detección de la molécula padre m/z 192.

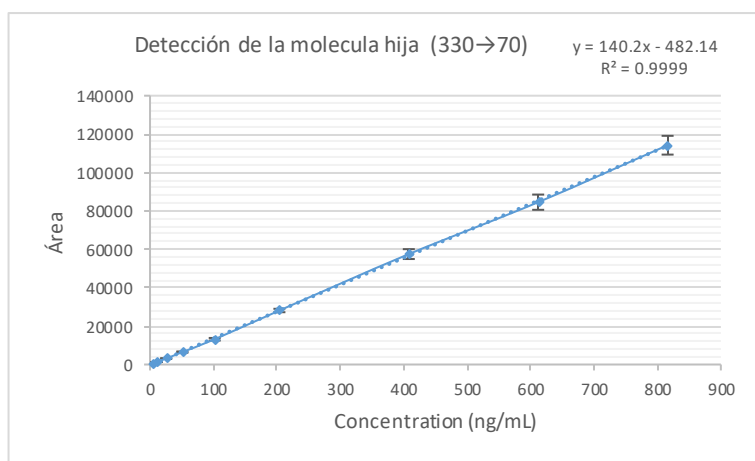


Figura 77. Curva de calibración obtenida mediante la detección de la molécula hija m/z 70.

Debido a que la señal obtenida para la molécula padre es mayor y presenta una mayor exactitud para la menor concentración, se decidió cuantificar en base a esta área.

Anexo 4

Validación del método analítico de cuantificación de acetaminofén mediante HPLC (Cromatografía líquida de alta resolución)

A4.1 Cuantificación de acetaminofén mediante HPLC

Para la cuantificación de acetaminofén en las muestras obtenidas de los estudios de permeación con iontoforesis se utilizó un método analítico desarrollado y anteriormente utilizado en el laboratorio del Dr. Kalla en la Universidad de Ginebra. La separación cromatográfica del analito se obtuvo en el equipo Dionex Ultimate 3000, utilizando las siguientes condiciones cromatográficas (Tabla 37):

Tabla 37. Condiciones cromatográficas adecuadas para cuantificar PAX mediante HPLC.

PARÁMETRO	CONDICIÓN
fase móvil	Mezcla 90:10 (i) una solución de ácido trifluoroacético 0.1 % (ii) Acetonitrilo
Columna	Lichrosphere 100 RP18 (125 x 4 mm, 5 μ m)
Flujo	1 ml/min
Volumen de inyección	25 μ L
Temperatura de la columna	35 °C
λ_{\max}	289 nm
Tiempo de la corrida	5 min
Tiempo de retención	3 min

A4.2 Linealidad

La linealidad se evaluó en el medio de permeación (Solución buffer pH 7.4 con Brij® 58 al 3%), preparándose nueve diferentes concentraciones de ACM (0.25, 0.5, 1, 5, 10, 25, 50, 75, 100 μ g/mL). Las curvas de calibración se construyeron graficando el área promedio del pico en función de la concentración del fármaco. A partir de la regresión de la recta mediante mínimos cuadrados, se construyó una curva promedio usando todos los datos de las curvas de calibrado obtenidas en 2 días (Tabla 38).

Tabla 38. Datos obtenidos para la curva promedio obtenida durante la validación.

Concentración (μ g/mL)	Área promedio (UA)	Desviación estándar
1.03	0.1748	0.0087
5.15	0.9059	0.0102
10.3	1.8592	0.0242
25.75	4.5327	0.0797
51.5	9.0694	0.0609
77.25	13.7382	0.0817
103	18.5680	0.1035

El conjunto de puntos obtenidos para la curva de calibración (n=7) se muestran en la figura 78. Utilizando el programa Statgraphics Centurión XVI se realizaron los análisis estadísticos. Se encontró linealidad en el intervalo de 1 a 100 µg/mL con un coeficiente de correlación de 0.999 (tabla 39).

Tabla 39. Parámetros obtenidos para la curva de calibración realizada.

Intervalo (µg/mL)	m	b	r ²
1 – 100	0.1802	-0.0309	0.999

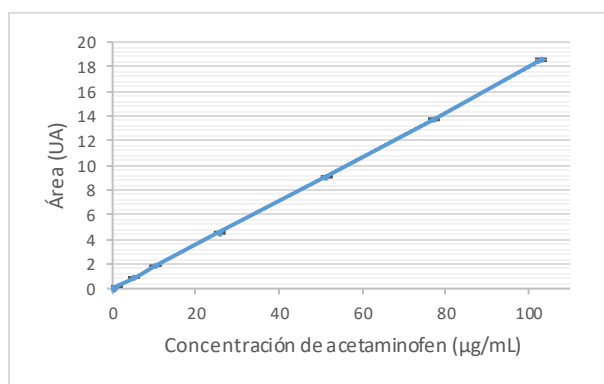


Figura 78. Curva de calibración obtenida mediante la detección UV de acetaminofén.

Los parámetros obtenidos para la curva de calibración ($r^2=0.999$) se ajustaron a un modelo lineal (Tabla 40). Se realizó un análisis de varianza con los resultados obtenidos, confirmando que existe una relación estadísticamente significativa entre la cantidad de clorhidrato de paroxetina y el área obtenida con un nivel de confianza del 95 % (Tabla 42, $P<0.05$). Los intervalos de confianza establecidos para los parámetros obtenidos se muestran en la tabla 41, en el caso de la ordenada al origen se concluyó que el cero se encuentra dentro de los valores establecidos con una confianza del 95%.

Tabla 40. Coeficientes obtenidos mediante regresión lineal

Coeficientes				
Parámetro	Minimos Cuadrados	Estándar	Estadístico	Valor-P
	Estimado	Error	T	
Intercepto	-0.0309202	0.0165773	-1.86522	0.0671
Pendiente	0.18002	0.000347248	518.419	0.0000

Tabla 41. Intervalos de confianza del 95.0% para las estimaciones de los coeficientes

Parámetro	Estimación	Error Estándar	Límite Inferior	Límite Superior
Intercepto	-0.0309202	0.0165773	-0.0640913	0.00225088
Pendiente	0.18002	0.000347248	0.179325	0.180715

Tabla 42. Resultados del análisis de varianza realizado para la cuantificación de ACM mediante HPLC

Análisis de Varianza					
Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Modelo	2558.0	1	2558.0	268758.55	0.0000
Residuo	0.561552	59	0.00951784		
Total (Corr.)	2558.56	60			

Coeficiente de Correlación = 0.99989
 R-cuadrada = 99.9781 por ciento
 R-cuadrado (ajustado para g.l.) = 99.9777 por ciento
 Error estándar del est. = 0.0975594
 Error absoluto medio = 0.0672209
 Estadístico Durbin-Watson = 1.29833 (P=0.0018)
 Autocorrelación de residuos en retraso 1 = 0.332183

En la figura 79, se observa la relación entre los valores observados y los predichos obtenidos mediante la ecuación del modelo.

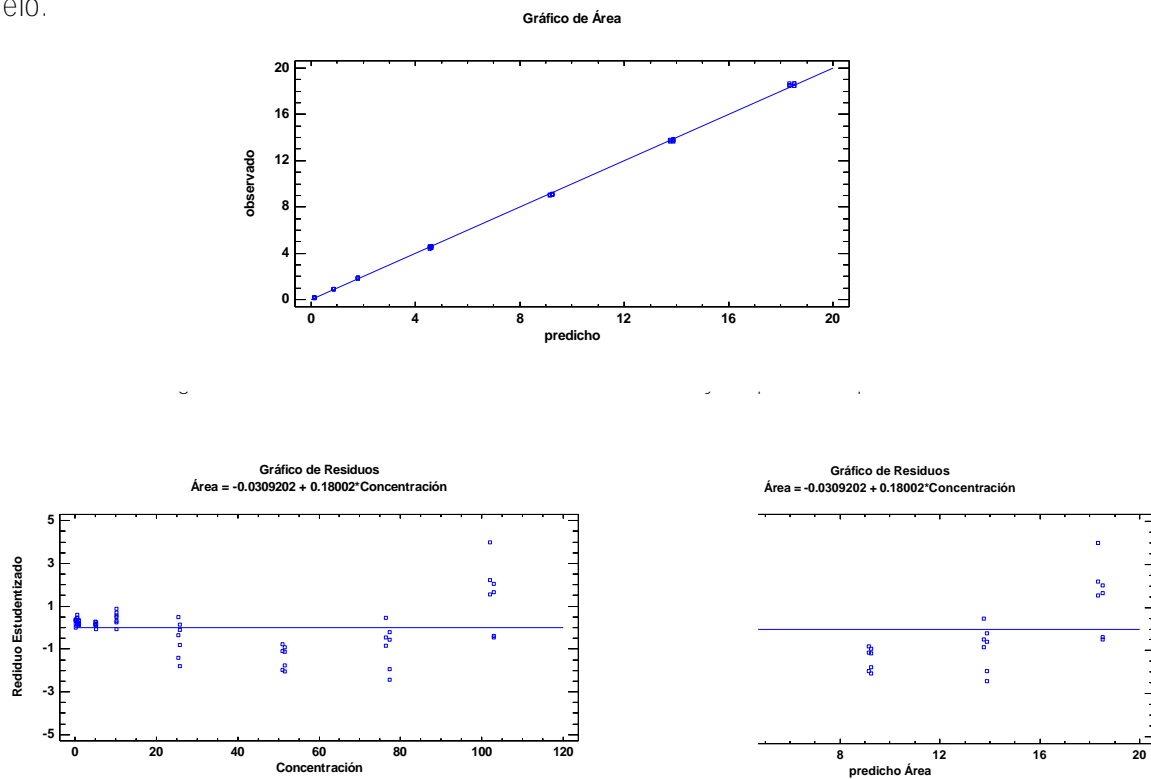


Figura 80. RESIDUOS ESTUDENTIZADOS vs Concentración y Área predichas por el modelo.

En la figura 80, se muestran los residuos estudentizados con respecto a la concentración y el área, en donde no se observa una tendencia definida, por lo que el modelo es adecuado para describir los datos.

A4.3 Límite de detección y cuantificación

La determinación de los límites de detección y cuantificación se realizó de manera teórico utilizando las siguientes formulas:

$$\text{Límite de detección} = 3.3x \frac{\sigma}{S} \dots\dots\dots \text{ Límite de detección} = 3.3x \frac{0.0166}{0.1802} = 0.30 \mu\text{g/mL}$$

$$\text{Límite de cuantificación} = 10x \frac{\sigma}{S} \dots\dots\dots \text{ Límite de cuantificación} = 10x \frac{0.0166}{0.1802} = 0.92 \mu\text{g/mL}$$

Donde σ es la desviación estándar del intercepto en las regresiones y S es la pendiente de la curva de calibración. Se comprobaron de forma experimental los resultados obtenidos teóricamente para ambos límites. El límite de detección fue de 0.30 $\mu\text{g/mL}$ y el de cuantificación fue de 0.95 $\mu\text{g/mL}$.

A4.4 Precisión y exactitud

Cada concentración fue analizada 5 veces en el mismo día para determinar la reproducibilidad intra-día. Para determinar la variación inter-día, se repitió en 2 diferentes días. La precisión (coeficiente de variación) y exactitud (error relativo) fueron menores al 15 % (tabla 43).

Tabla 43. Resultados de precisión y exactitud intermedia para el método de cuantificación de ACM por HPLC.

Cantidad teórica ($\mu\text{g/mL}$)	Área promedio (UA)	Desviación estándar	Precisión (CV %)		Exactitud (Error relativo %)	
			Intra-día	Inter-día	Intra-día	Inter-día
1.03	0.175	0.009	4.50	4.96	10.62	10.6
51.5	0.906	0.010	1.34	1.13	1.24	1.4
103	1.859	0.024	0.91	1.30	0.63	0.7