



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA

Estudio de permeabilidad *in vitro* de fármacos y productos naturales utilizando una membrana sintética y una membrana vegetal

TESIS

Que para obtener el título de:
Química Farmacéutica Bióloga

Presenta:

Sánchez Ramírez Yolanda Lizbeth

Director: Dr. Andrés Navarrete Castro

Asesor: M. en F. Ma. Martha Ugalde Hernández



Ciudad de México 2019



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Jurado asignado

Presidente: Dr. Adelfo Natalio Reyes Ramírez
Vocal: Dr. Andrés Navarrete Castro
Secretario: M. en F. María Martha Ugalde Hernández
Suplente: Dra. Leticia Cruz Antonio
Suplente: M. en F. Leticia Huerta Flores

Sitio dónde se desarrolló el trabajo:

Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Química,
Departamento de Farmacia, Conjunto E, Laboratorio 126.

Bajo la dirección del Dr. Andrés Navarrete Castro

Asesor: M. en F. María Martha Ugalde Hernández

Sustentante: Yolanda Lizbeth Sánchez Ramírez



Agradecimientos

El presente trabajo fue posible gracias al financiamiento otorgado por la Dirección General de Asuntos del Personal Académico de la Facultad de Química a través del proyecto DGAPA-UNAM IN 213418, Programa de Apoyo a la Investigación y Posgrados a través del Proyecto PAIP500-9143.

A la Universidad Nacional Autónoma de México, a la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza.

A mi tutor el Dr. Andrés Navarrete Castro por darme la oportunidad de formar parte de su equipo de trabajo, por el apoyo académico y profesional brindado durante la realización de este proyecto y paciencia durante mi estancia en el laboratorio.

A la M. en F. María Martha Ugalde Hernández por su apoyo académico y tiempo dedicado al presente trabajo.

Al Dr. José Luis Balderas por el apoyo profesional y técnico recibido.

A la Dra. Elizabeth Arlen Pineda por su tiempo y apoyo académico y personal.

Al M. en C. Mario A. Díaz Ortiz por el asesoramiento en este proyecto.

Al Dr. José Carlos Tavares Carvalho, así como también a la maestra Adriana Maciel Ferreira por el apoyo técnico en la realización de las micrografías.

A los miembros del jurado: Dr. Adelfo Natalio Reyes Ramírez, Dra. Leticia Cruz Antonio y M. en F Leticia Huerta Flores por sus aportaciones y tiempo brindado en la revisión de esta tesis.

Dedicatoria

A Dios por darme la fortaleza y paciencia para crecer personal y profesionalmente. Quiero dedicar esta tesis a dos seres muy especiales en mi vida, quienes me ayudaron a formar y comprender todo lo que soy, mis padres Yolanda Ramírez y Víctor Sánchez, quienes con su esfuerzo, sabiduría y paciencia me han permitido concluir esta etapa de mi vida, en inculcar en mí el ejemplo de responsabilidad, dedicación y perseverancia, por mostrarme la importancia de tener un núcleo familiar y las fortalezas de esta, por ayudarme a interponerme ante cualquier adversidad, los amo infinitamente.

A mis hermanas Vanessa (dra dientitos), Diana (Kika), Audrey (huevi) y mi hermano Víctor (gollo-Gregorio) por motivarme a ser mejor cada día y por ser mis compañeros de vida, por las risas, platicas y peleas; por confiar en mí como ejemplo, es difícil ser la hermana mayor; ustedes, así como mis padres vivirán por siempre en mi pensamiento, sangre y corazón hasta el infinito y mas alla...

A Brandon Arévalo por brindarme siempre su apoyo incondicional, por su paciencia, cariño y amor, por ser mi refugio en esos momentos difíciles y por incentivarme a ser una mejor persona día tras día.

A mis compañeros y amigos del laboratorio 126 por compartir experiencias, aprendizaje, platicas infinitas y por alegrar mi estancia en el laboratorio.

Contenido

Índice de figuras.....	IV
Índice de cuadros.....	V
Resumen.....	VI
1. Introducción.....	1
2. Marco Teórico.....	3
2.1 La piel.....	3
2.2 Vías de penetración cutánea.....	5
2.2.1 Vía transepidérmica.....	5
2.2.2 Vía transapendicular.....	6
2.3 Ventajas de los sistemas terapéuticos transdérmicos.....	7
2.4 Leyes de difusión de Fick.....	7
2.4.1 Primera ley de Fick.....	8
2.5 Membrana sintética Strat-M® Millipore.....	9
2.6 El Agave.....	11
2.6.1 La cutícula.....	12
2.6.2 Morfología.....	13
2.6.3 Cutina.....	13
2.6.4 Ceras cuticulares.....	14
2.7 Celdas de Franz.....	15
2.8 Aplicaciones de interés de los compuestos en estudio.....	17
2.8.1 Pirfenidona.....	17
2.8.2 Cafeína.....	17
2.8.3 7-hidroxi-3,4-dihidrocadalina.....	17
2.8.4 Piperina.....	18
2.8.5 Curcumina.....	18
2.8.6 Glucosa.....	19
3. Planteamiento del problema.....	20
4. Hipótesis.....	21

5.	Objetivos.....	22
5.1	Objetivo general.....	22
5.2	Objetivos particulares.	22
6.	Material y métodos	24
6.1	Materiales	24
6.1.1	Material vegetal	24
6.1.2	Membrana sintética	24
6.1.3	Fármacos, compuestos y reactivos	24
6.1.4	Equipos y aparatos.....	25
6.1.5	Preparación de soluciones	26
6.2	Metodología	27
6.2.1	Estudios de permeabilidad <i>in vitro</i>	27
6.2.2	Determinación mediante Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución. ..	29
6.2.2.1	Pirfenidona.....	29
6.2.2.2	7-hidroxi-3,4-dihidrocadalina.....	29
6.2.2.3	Piperina.....	29
6.2.2.4	Cafeína	29
6.2.3	Determinación Espectrofotométrica	30
6.2.3.1	Glucosa	30
6.2.3.2	Curcumina	30
6.2.4	Determinación de la concentración.....	30
6.2.5	Microscopia electrónica de barrido (MEB)	30
6.2.6	Análisis de datos.....	31
6.2.7	Análisis estadístico	32
7.	Resultados.....	33
7.1	Estudios de permeabilidad <i>in vitro</i>	33
7.2	Curvas de calibración para la determinación de la concentración	37
7.3	Correlación de la membrana Strat-M® Millipore con la cutícula de maguey.....	38
7.4	Análisis por microscopia electrónica de barrido (MEB).....	39
7.4.1	Membrana Strat-M® Millipore	39

7.4.2	Cutícula de maguey	40
7.4.3	Microscopia óptica de la cutícula de maguey	41
7.5	Compuestos de estudio	45
8.	Discusión de resultados.....	46
9.	Conclusiones	54
10.	Perspectivas	55
11.	Referencias	56
12.	Anexos.....	62
12.1.	Curvas Patrón para la determinación de la concentración.....	62
12.2.	Gráficas de las curvas calibración construidas	63
12.2.1	Pirfenidona.....	63
12.2.2	7-hidroxi-3,4-dihidrocajalina.....	64
12.2.3	Glucosa.....	65
12.2.4	Piperina.....	66
12.2.5	Curcumina	67

Índice de figuras

Figura 1. Esquema tridimensional de la piel.....	4
Figura 2. Principales vías de penetración a través de la piel.	6
Figura 3. Celda de Franz.....	16
Figura 4. Cantidad acumulada/área contra tiempo para pirfenidona.....	34
Figura 5. Cantidad acumulada/área contra tiempo para cafeína.....	34
Figura 6. Cantidad acumulada/área contra tiempo para 7-hidroxi-3,4-dihidrocafeína.....	35
Figura 7. Cantidad acumulada/área contra tiempo para piperina.....	35
Figura 8. Cantidad acumulada/área contra tiempo para glucosa.....	36
Figura 9. Gráfica de correlación del Kp entre Strat-M® Millipore y la cutícula de maguey.	38
Figura 10. Microscopia electrónica de barrido de Strat-M® Millipore.	42
Figura 11. Microscopia electrónica de barrido de la cutícula de maguey.....	43
Figura 12. Microscopia óptica 40x de la cutícula de maguey.....	44
Figura 13. Compuestos de estudio.....	45
Figura A 1. Curva patrón de pirfenidona, área bajo la curva contra la concentración en (mg/mL).....	63
Figura A 2. Curva patrón de 7-hidroxi-3,4-dihidrocafeína, área bajo la curva la concentración en (mg/mL).....	64
Figura A 3. Curva patrón de glucosa, absorbancia contra la concentración en (mg/mL).....	65
Figura A 4. Curva patrón de piperina, área bajo la curva la concentración en (mg/mL).....	66
Figura A 5. Curva patrón de curcumina, absorbancia contra la concentración en (mg/mL).....	67

Índice de cuadros

Cuadro 1. Valores del coeficiente de permeabilidad (K_p) obtenidos de los compuestos probados.	36
Cuadro 2. Resumen de los resultados de las curvas patrón para la determinación de la concentración.	37
Cuadro A 1. Curvas patrón de concentraciones conocidas.....	62
Cuadro A 2. Curva patrón de Pirfenidona.	63
Cuadro A 3. Curva patrón de 7-hidroxi-3,4-dihidrocajalina.	64
Cuadro A 4. Curva patrón de Glucosa.	65
Cuadro A 5. Curva patrón de Piperina.	66
Cuadro A 6. Curva patrón de Curcumina.	67

Resumen

En el presente trabajo se realizaron estudios de permeabilidad *in vitro* de seis sustancias utilizando celdas de tipo Franz verticales y dos membranas: una sintética de uso comercial, denominada Strat-M® Millipore y una vegetal, denominada cutícula de maguey (Mixiote). Se efectuó un análisis por HPLC o por espectrofotometría visible de acuerdo con el compuesto en estudio. Los coeficientes de permeabilidad (K_p) \pm EEM (cm/h) obtenidos para la membrana Strat-M® Millipore y cutícula de maguey fueron: para la pirfenidona: 0.04404 ± 0.016047 cm/h y 0.02687 ± 0.00632 cm/h; para la cafeína: 0.045246 ± 0.01168 cm/h y 0.009708 ± 0.005707 cm/h; para la 7-hidroxi-3,4-dihidrocajalina: 0.0458 ± 0.005 cm/h y 0.07597 ± 0.0095 cm/h; para la piperina: 0.3343 ± 0.008126 cm/h y 0.08283 ± 0.001645 cm/h y para la glucosa: 1.2811 ± 0.09283 cm/h y 0.634190 ± 0.24129 cm/h respectivamente. Para la curcumina se determinó un K_p de 0 en ambas membranas. Se encontró correlación de ($r = 0.9686$) entre los valores de K_p obtenidos con las dos membranas. Los valores K_p obtenidos con la Strat-M® Millipore fueron estadísticamente ($p < 0.05$) mayores a los obtenidos con la membrana de la cutícula de maguey.

Se realizó el análisis por microscopía electrónica de barrido (MEB) de las membranas en estudio para describir el espesor, morfología de ambas caras y capas constitutivas.

La cutícula de maguey podría utilizarse como una membrana alternativa para estudios de permeabilidad de compuestos, aunque es necesario aumentar el número de compuestos ensayados.

1. Introducción

En el desarrollo de estudios de permeabilidad se emplea tejido como la piel humana o de animal, así como membranas sintéticas. El uso de tejido humano plantea desafíos experimentales, como estabilidad deficiente, sensibilidad a las condiciones de almacenamiento y riesgos biológicos costosos.¹

Existen numerosos modelos animales de mamíferos como cerdos,² cobayos y reptiles³ que se han desarrollado como sustituto de piel humana, utilizados en la industria cosmética para evaluar la seguridad y eficacia de ingredientes cosméticos. Sin embargo, en la actualidad ha sido prohibido su uso por la Cosmetic Directiva 76/768/CEE de la Comunidad Económica Europea, que a la letra dice:

“La Directiva pone punto final a la experimentación en animales, instaurando dos prohibiciones en lo relativo a:

- la experimentación en animales de productos cosméticos acabados y en ingredientes (prohibición de experimentar).
- la comercialización de productos cosméticos acabados experimentados en animales o que contienen ingredientes experimentados en animales (prohibición de comercializar).

En relación con las pruebas de toxicidad de dosis repetidas, los peligros para la reproducción y la toxicinética, la prohibición de comercialización se aplicará

desde el 11 de marzo de 2013. La prohibición también se aplica con independencia de que existan alternativas de experimentación”.⁴

Algunas alternativas consisten en el empleo de membranas sintéticas comerciales, para estudios *in vitro* las cuales han demostrado que su uso es capaz de predecir la permeabilidad cutánea en modelos de difusión dérmica.⁵

En el presente trabajo se realizó la comparación del coeficiente de permeabilidad para varios compuestos empleando un modelo *in vitro* de difusión transdérmica en celdas de Franz verticales, entre una membrana sintética comercial denominada Strat-M® Millipore, reportada por Joshi y colaboradores en el 2012⁶ y una membrana natural obtenida del Agave, cutícula de maguey, para experimentos de difusión, con el propósito de correlacionar el uso de estas dos membranas y finalmente identificar a la cutícula de maguey como una nueva alternativa para el desarrollo de estudios de permeabilidad y modelos de difusión.

2. Marco Teórico

2.1 La piel

El órgano más extenso del cuerpo humano es la piel, recubre su superficie y representa aproximadamente el 16 % del peso corporal. La piel tiene varias funciones importantes; conforma una barrera contra la invasión de microorganismos y confiere protección contra acciones mecánicas, químicas y las radiaciones ultravioletas.⁷ También tiene importancia en la regulación de la temperatura y para mantener el equilibrio hídrico; tiene capacidades de absorción y secreción, representa un importante eslabón en la defensa inmunitaria y actúa como un sistema excretor. La urea, las sales y el agua se pierden con el sudor, también fabrica varias proteínas importantes para la inmunidad y sintetiza vitamina D.⁸ Por último, la piel tiene función endocrina y es un órgano sensorial extenso.⁹

La piel está compuesta por tres capas: la capa superficial o externa llamada epidermis, la capa intermedia llamada dermis y por último la capa más profunda denominada la hipodermis^{7,8} (Figura 1).

La epidermis es un epitelio plano estratificado queratinizado en el que se diferencian cinco capas denominadas estratos: el basal, el espinoso, el granuloso, el lúcido y el córneo. La epidermis junto con su capa más exterior, el estrato córneo, son la barrera principal de permeabilidad.¹⁰

El estrato córneo contiene ceramidas, colesterol y ácidos grasos principalmente proporciona a la piel protección mecánica, constituye una

barrera para la pérdida de agua¹⁰ y actúa de manera selectiva a la penetración de sustancias externas.⁷

La dermis es una capa de tejido conectivo que incluye fibras de colágeno y fibras elásticas, está altamente vascularizada, lo que le permite proporcionar energía y la nutrición a la epidermis y desempeña un papel primordial en la termorregulación y en la cicatrización de heridas.⁷ La epidermis y la dermis están firmemente conectadas.⁸

Por debajo de la dermis se encuentra la hipodermis o el tejido subcutáneo, esta capa está constituida por tejido conectivo laxo y por tejido adiposo, principalmente.⁷ Actúa como un amortiguador de golpes y aísla los tejidos más profundos de los cambios de temperatura extremos que se producen fuera del organismo.⁸

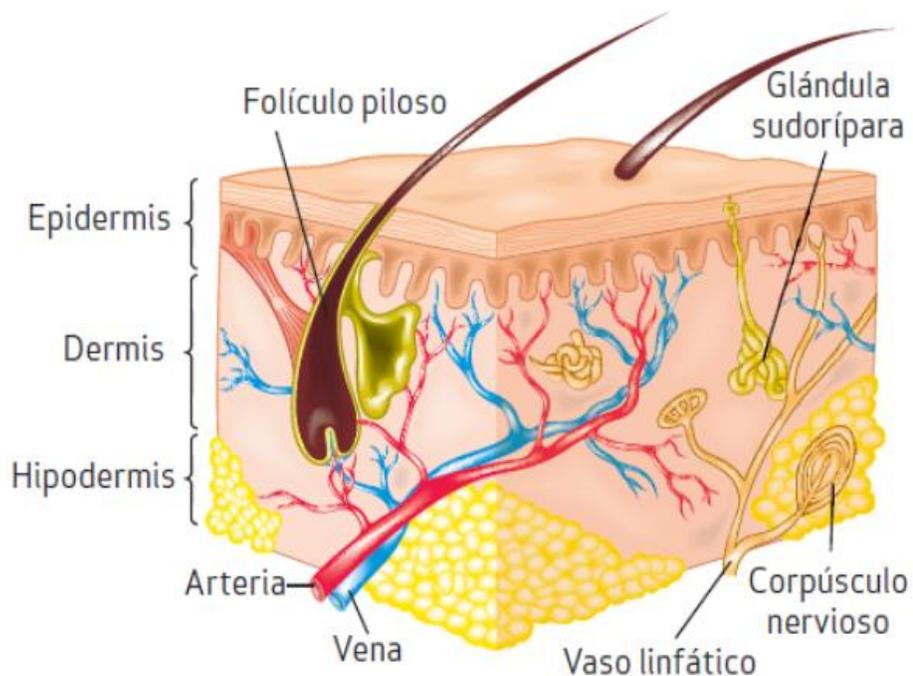


Figura 1. Esquema tridimensional de la piel. Tomado de Arenas et al.¹¹

La piel es una membrana con permeabilidad selectiva, es el primer obstáculo que cualquier sustancia o fármaco aplicado tópicamente debe superar para llegar al sitio de acción, por ello, la elaboración de formulaciones dermatológicas con efectos sistémicos deseables debe de tomar en cuenta esta permeabilidad selectiva para el desarrollo de nuevas formas farmacéuticas.¹²

2.2 Vías de penetración cutánea

La absorción percutánea implica el paso de un fármaco a través de la piel hasta los capilares que irrigan la dermis tras su liberación del sistema que lo incluye. Ya en la circulación sistémica, se distribuye por todo el organismo hasta alcanzar su lugar de acción.¹³

Las dos vías principales de transporte de fármacos hacia y a través de la piel son: la ruta transepidérmica a través del estrato córneo y la ruta transapendicular a través de las unidades pilosebáceas y derivaciones.¹⁴

2.2.1 Vía transepidérmica

La mayoría de las moléculas que permean a través de la piel, la atraviesan por esta vía y a su vez pueden seguir dos vías:¹⁵

- Intercelular: Se considera la principal para la mayoría de las sustancias.¹⁶ Consiste en la difusión a través de los espacios intercelulares del estrato córneo. Es una ruta tortuosa y la difusión del principio activo se realiza por los canales lipídicos que hay entre las células del estrato córneo.¹⁷

- Transcelular: Las sustancias atraviesa los queratinocitos de las distintas capas del estrato córneo, alternando estructuras hidrófilas y lipófilas.¹⁷

2.2.2 Vía transapendicular

El paso de sustancias a través de esta vía se realiza por las glándulas sudoríparas y los folículos pilosebáceos. Debido a la pequeña superficie que ocupan los folículos y la relativa escasez de las glándulas sudoríparas, la contribución de esta ruta es prácticamente despreciable.¹⁸

Sin embargo, para algunos autores, esta vía puede ser utilizada prioritariamente por moléculas de gran volumen y carácter lipófilico.¹⁹

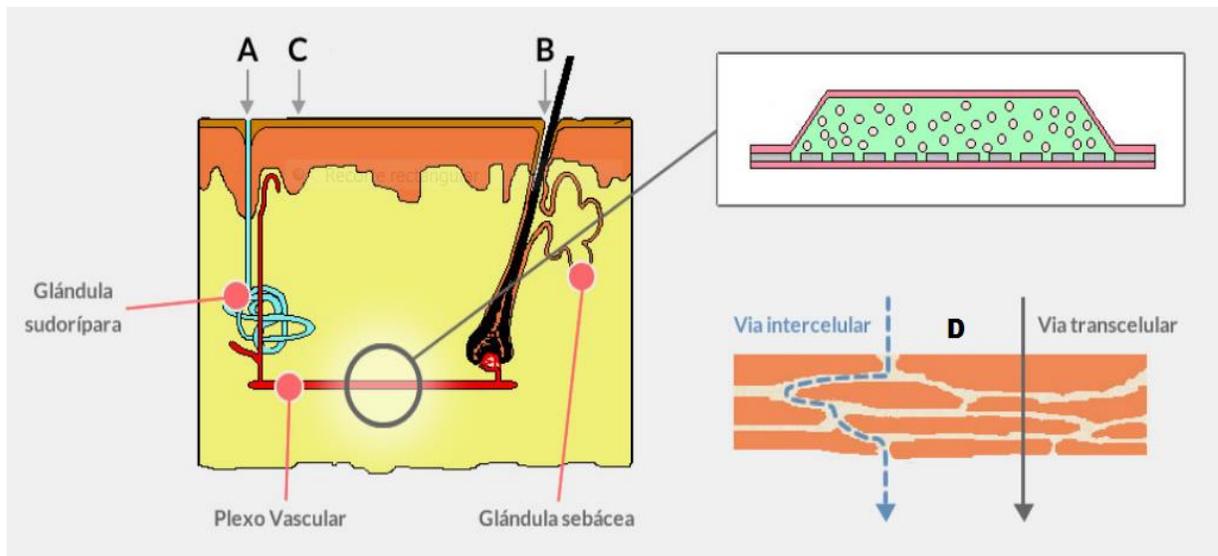


Figura 2. Principales vías de penetración a través de la piel.

Transapendicular: A. a través de glándulas sudoríparas. B. a través de folículos pilosebáceos. C. transepidérmica, que sigue dos vías: D. Vías de penetración intercelular y transcelular.^A

^A Medicina del dolor. Iontoforesis [Internet]. 2019 [consultado 30 de julio del 2019]. Disponible en: <https://medicinadeldolor.es/tratamientos/iontoforesis/iontoforesis/>

2.3 Ventajas de los sistemas terapéuticos transdérmicos

Recientemente, la ruta transdérmica ha competido con el tratamiento oral como el área de investigación innovadora más exitosa en la administración de fármacos.¹⁶ Existen múltiples ventajas de los sistemas terapéuticos transdérmicos, como la de ser considerada una ruta de fácil acceso, liberación gradual, flujo controlado con máxima absorción e ingreso de una cantidad constante de principio activo con niveles sanguíneos uniformes, constantes y sostenidos. Además, la administración de activos a través de la piel elimina el efecto de primer paso hepático.¹²

Otros beneficios que han surgido en los últimos años a medida que las tecnologías han evolucionado, incluyen el potencial de liberación sostenida (útil para medicamentos con vidas medias biológicas cortas) y una cinética de entrada controlada, que es particularmente indispensable para medicamentos con índices terapéuticos estrechos.²⁰ Además su uso es sencillo e indoloro, tiene buena aceptación y optimiza la adherencia al tratamiento.^{21,22}

2.4 Leyes de difusión de Fick

Las leyes de difusión de Fick predicen que la difusión se producirá en la dirección de mayor a menor concentración con una magnitud directamente proporcional al gradiente de concentración. Los mismos supuestos se aplican a los modelos matemáticos actuales utilizados para describir la absorción dérmica a través del estrato córneo por difusión pasiva.^{23,14}

La matriz lipídica del estrato córneo es un medio homogéneo que rodea a los queratinocitos donde una sustancia se difunde de concentración alta a baja de acuerdo a la Primera Ley de Fick, la fracción que se absorbe en un periodo específico de tiempo es constante y se mantendrá constante en diferentes concentraciones.²⁴

2.4.1 Primera ley de Fick

Cuando se coloca un fármaco sobre la superficie de la piel, este migra hacia las capas más internas a través del estrato córneo y la epidermis viable.²¹

El estrato está compuesto por queratinocitos que se convierten en una barrera sustancial para la administración de fármacos. Principalmente el proceso de difusión es pasivo, el cual se caracteriza porque las sustancias se mueven a través del estrato córneo.²⁴

Partiendo de la ecuación de la primera Ley de Fick basada en el estado estable de flujo (J) y la concentración (C_0) del compartimento donador se establece la relación descrita por la Ecuación 1:²⁵

$$J = KpC_0 \dots\dots\dots (Ec. 1)$$

Con la finalidad de poder analizar la eficacia con la que un fármaco penetra hasta su sitio de acción, se debe obtener el coeficiente de permeabilidad (Kp)

a partir del despeje de la ecuación anterior (Ec.1) llegando entonces a la Ecuación 2:²⁶

$$Kp = \frac{J}{c_o} \dots \dots \dots (Ec. 2)$$

Dónde:

J = Pendiente de la curva correspondiente al flujo de la membrana (mg • min/cm²)

Kp = Coeficiente de permeabilidad (cm/min o cm/h)

C_o = Es la concentración inicial en el compartimento donador (mg/cm³)

El coeficiente de permeabilidad (Kp), representa la velocidad de penetración dérmica (cm/min o cm/h) de los productos químicos a través de la piel. Se aplica en la mayoría de los modelos matemáticos como parámetro para predecir la penetración percutánea en función de las propiedades fisicoquímicas de las sustancias químicas.^{27,28}

2.5 Membrana sintética Strat-M® Millipore

Las membranas sintéticas disponibles comercialmente están compuestas por láminas delgadas de macromoléculas poliméricas que controlan el pasaje de los componentes; pueden estar compuestas de polímeros sintéticos (por ejemplo: polisulfona, policarbonato, poli-acrilonitrilo y polipropileno) o polímeros de celulosa semisintéticos (acetato de celulosa, nitrato de celulosa y celulosa regenerada).²⁹

En la actualidad las membranas sintéticas han ganado un lugar importante en el desarrollo tecnológico y en la industria, debido a que se utilizan para estudios de difusión *in vitro*, pues son empleadas para cumplir la función de simulación de la piel y control de calidad. Originalmente se desarrollaron para usarse como alternativa al uso de modelos de piel humana y para la determinación de la difusión del fármaco de formulaciones usando métodos *in vitro*.³⁰

Debido a que utilizar piel humana o animal tiene varios inconvenientes por las consideraciones éticas y económicas asociadas a pruebas *in vivo*,³¹ además que dificultan los datos de reproducibilidad de los candidatos al fármaco, incluyendo: variaciones del grosor de la piel de donantes de piel, estados patológicos, condiciones de almacenamiento, densidad de folículos pilosos, edad del donante, región del cuerpo de la que se obtuvo y altos costos de laboratorio.

Mientras que las ventajas de usar una membrana sintética son: espesor controlado de la membrana, no requiere tiempo de preparación, periodo de almacenamiento y bajo costo.³²

Existen dos tipos de membranas sintéticas utilizadas para estudios de difusión de fármacos, las cuales son isotrópicas y anisotrópicas. Las membranas isotrópicas tienen una composición y estructura uniforme y puede ser porosa o densa (las más utilizadas), debido a que un supuesto de la Ley de Fick establece que el estrato córneo es considerado como una capa homogénea.

Las membranas anisotrópicas tienen estructuras heterogéneas y pueden contener poros o estructuras estratificadas.²⁹

De acuerdo con Karadzovska en 2013,³¹ la membrana sintética recientemente comercializada denominada Strat-M® Millipore, reportada por Joshi y colaboradores en el 2012,⁶ quienes demuestran el uso de esta membrana como sustituto para experimentos de difusión en piel humana que no tiene una variabilidad significativa lote a lote, tiene una alta seguridad de que los datos que se obtengan son confiables y no hay una limitación de almacenaje.³²

Esta membrana está compuesta de múltiples capas de poliétersulfona creando una morfología similar a la de la piel humana, que incluye una capa superficial muy compacta, el cuál simula el estrato córneo de la piel humana.^{31,32}

2.6 El Agave

El maguey es un *Agave*, perteneciente a la familia *Agavaceae*. Es una planta nativa de México, monocárpica (florece una vez en su vida, posterior a eso muere). La forma que adquieren sus hojas (pencas) son como una roseta; sus pencas son verdes y gruesas y termina con una punta afilada.³³ En México se encuentra el 75 % de las especies continentales de *Agave*. Existen variantes con importancia regional, nacional e internacional.³⁴

El maguey es capaz de adaptarse a condiciones muy adversas, los climas que más le favorecen son el árido y el semiárido. En los agaves, la membrana cuticular es el mecanismo de protección más importante por funcionar como una interface con el exterior, poseen mecanismos que les permiten adaptarse

al frío o a la sequía y en cuanto al suelo, se encuentran en suelos con condiciones de pH neutro a ligeramente alcalino.³³

El maguey ha brindado innumerables beneficios y productos al hombre. Se cultivan diversas especies, siendo las más comunes y que presentan importancia económica y cultural para el país son: *Agave americana* L., *Agave mapisaga* Trel., *Agave salmiana* Otto ex Sal-Dyckssp *crassispina* y *Agave salmiana* Otto ex Salm-Dyckvarsalmiana.³⁵

Sin embargo *Agave salmiana* Otto ex Salm-Dyck y del *Agave mapisaga* Trel son las dos especies más cultivadas en el centro de México para la obtención de la cutícula de maguey (mixiote).^{35,36} De acuerdo a la RAE, (del nahua *metl*, maguey y *xiotl*, película que forra la penca). Mx. Saquito hecho con la membrana que recubre la penca de maguey.^B

Agave salmiana Otto ex Salm-Dyck. Es una especie con rosetas de 1.5 a 2.0 m de altura con raíz fibrosa y hojas de color verde oscuro a verde glauco. Incluye poblaciones silvestres y cultivadas con alrededor de 10 formas.³⁵

Agave mapisaga Trel. Planta con rosetas de 2 a 2.5 m de altura, con raíz fibrosa y hojas lineales de 2.5 m de color verde pálido, tiene espinas oscuras. Presenta formas como: penca larga y carricillo.³⁵

2.6.1 La cutícula

La cutícula constituye una auténtica barrera química protectora que actúa como interface entre la célula vegetal y el medio externo.³⁷ Es una capa

^B Real academia española: *Diccionario de la lengua española*, 23ª ed., [versión 23.2 en línea]. [consultado 30 de julio de 2019]. Disponible en: <https://dle.rae.es>

protectora que se encuentra en la superficie más externa de las plantas y esta interacciona con el ambiente, se encuentra en todas las partes aéreas de las plantas superiores, está constituida principalmente por dos tipos de polímeros lipofílicos, la cutina y ceras cuticulares.³⁸

Tanto su composición como su estructura dependen de factores genéticos, fisiológicos y ambientales (tipo de suelo, época del año, etc.).³⁸

Esta capa actúa como una membrana de difusión en la que la permeabilidad de un compuesto en la cutícula dependerá de su solubilidad y movilidad en la membrana.³⁷ Desempeña un papel importante como una barrera que reduce la pérdida de agua y difusión de gases, controla cambios de temperatura y provee soporte mecánico.³⁸

2.6.2 Morfología

Está compuesta por una cubierta superior de ceras epicuticulares, una gruesa capa intermedia que contiene cutinas embebidas en ceras (cutícula propiamente dicha) y la capa inferior formada por cutina y cera mezcladas con sustancias de la pared celular, pectinas, celulosa y otros carbohidratos constituyendo de esta forma la capa cuticular.³⁹

2.6.3 Cutina

La *cutina*, es el principal componente de la cutícula de *Agave* (en una proporción que varía del 40-80 % del peso); es un polímero constituido por ácidos grasos de cadena media, los cuales se encuentran formando enlaces tipo éster entre sí, gracias a los enlaces covalentes entre sus monómeros

resiste daños mecánicos y forma la estructura básica de la cutícula. La cutina está formada casi exclusivamente por ácidos grasos de 16 carbonos, entre los cuales se encuentran el ácido 10,16-dihidroxihexadecanoico y su isómero posicional 9,16-dihidroxihexadecanoico, como los componentes principales.³⁸

2.6.4 Ceras cuticulares

Las ceras de la cutícula son una mezcla compleja de compuestos alifáticos donde cada uno de ellos puede contener varias series homólogas de compuestos³⁷ estos son de cadenas lineales varían entre 20 y 40 átomos de carbono, las ceras intracuticulares se encuentran intercaladas dentro del polímero de la cutina y tienen una composición química distinta de ceras epicuticulares que se encuentran en la superficie en forma de cristales discontinuos.

Los principales componentes químicos de las ceras son *n*-alcanos, ésteres, alcoholes, aldehídos, cetonas y ácidos grasos de cadena corta, la composición química y la estructura cuticular son generadas por una red metabólica compleja. Por lo general tienen una estructura microcristalina y se visualizan como una capa subyacente amorfa, la importancia de la composición química de las ceras epicuticulares radica en la estrecha relación que existe con la morfología y ultraestructura de estas.³⁸

La cutícula es una membrana permeable tanto a compuestos polares como no polares, donde las ceras cumplen un papel clave en la reducción de la permeabilidad al agua, especialmente las ceras epicuticulares que regulan la capacidad de la superficie para la evapotranspiración.³⁸

La cinética de la absorción y desabsorción, planteada por Schreiber y Schönherr, 1992 sugieren que los compuestos son primero absorbidos en la superficie de los agregados cerosos epicuticulares, donde están en contacto con la solución donante, los solutos luego difunden a través de los agregados cerosos superficiales al interior de la cutícula.³⁹

El equilibrio entre soluciones donantes, ceras superficiales y cutícula se establece aproximadamente en 30 minutos. La absorción después de este tiempo representa la penetración en el interior de las células de las hojas.³⁹

2.7 Celdas de Franz

El uso de la celda de difusión de Franz para evaluar la permeabilidad de la piel se ha convertido en una metodología importante en investigación que proporciona información clave sobre las relaciones entre la piel, el fármaco y la formulación.⁴⁰

Los ensayos basados en la celda de difusión de Franz se utilizan actualmente para estudiar la permeación transdérmica de fármacos y formulaciones, el monitoreo en tiempo real de estos procesos dinámicos puede ser de gran relevancia ya que permite el establecimiento de perfiles de permeación más completos, proporcionando información cinética confiable que es necesaria para predecir los resultados farmacológicos.⁴¹

Las celdas de Franz constituyen un sistema compuesto por dos compartimentos, uno donador y otro receptor, separadas por una membrana de origen animal, humana o sintética que permite evaluar la difusión de

moléculas biológicamente activas de un compartimento a otro. En el compartimento superior se adiciona una solución o dispersión que contiene el compuesto activo y en el inferior se toman las muestras correspondientes, que posteriormente son cuantificadas mediante técnicas analíticas como UV/visible y cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC).⁴²

Entre los parámetros que influyen en la difusión de dicho compuesto, están la temperatura, la velocidad de agitación, el tipo y naturaleza de la membrana y el medio del compartimento receptor.⁴³

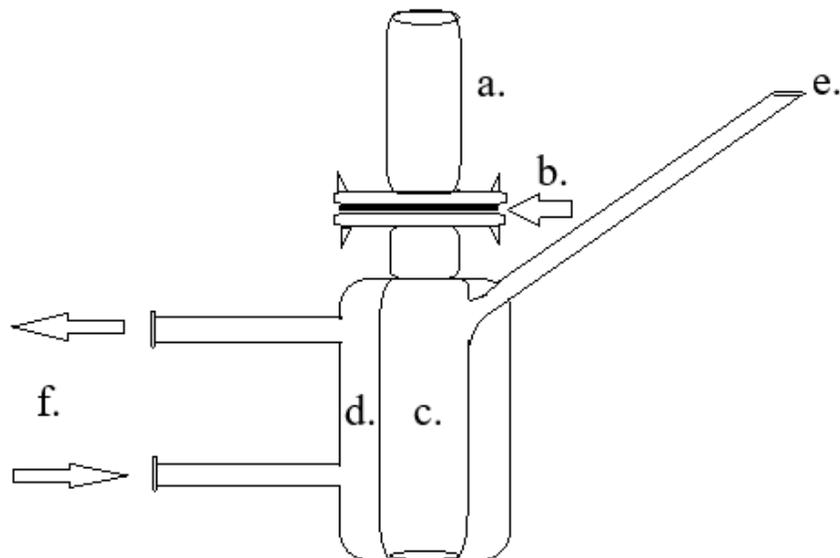


Figura 3. Celda de Franz.

a) compartimento donador, b) membrana, c) compartimento receptor, d) chaqueta de calentamiento, e) salida para toma de muestra, f) recirculación de agua.

2.8 Aplicaciones de interés de los compuestos en estudio

2.8.1 Pirfenidona

La pirfenidona es utilizado de manera tópica, es para tratar y prevenir la formación de cicatrices cutáneas, su uso común es para tratar la fibrosis pulmonar; también puede ser útil en el tratamiento de heridas agudas porque reduce la respuesta inflamatoria, además de que estos efectos pueden actuar sinérgicamente regulando la cicatrización de heridas y la producción de colágeno. También incrementa la epitelización de la piel.⁴⁴

2.8.2 Cafeína

La cafeína se usa en preparaciones farmacéuticas y cosméticas debido a sus efectos favorables sobre la piel y su capacidad para penetrar la piel. Se utiliza como una sustancia hidrofílica modelo en estudios de permeabilidad de piel de seres humanos y de animales, así como de membranas sintéticas. Como cosmético, la cafeína se utiliza en formulaciones con efectos anticelulíticos y antioxidantes. Este compuesto estimula la degradación de grasas por la inhibición de fosfodiesterasas. La cafeína es un potente antioxidante, protector de los rayos ultravioletas (UV). Estimula microcirculación de los vasos cutáneos y estimula el crecimiento de pelo por la inhibición de la 5 α -reductasa.^{45,46}

2.8.3 7-hidroxi-3,4-dihidrocadalina

La 7-hidroxi-3,4-dihidrocadalina es uno de los principios activos de *Heterotheca inuloides* Cass, mejor conocida como “árnica mexicana”, es una planta utilizada como analgésica y antiinflamatoria para el tratamiento de

reumatismo, contusiones, procesos inflamatorios y heridas cutáneas, de forma tópica.⁴⁷

2.8.4 Piperina

La piperina es la alcaloide mayoritaria en el fruto de las especies de *Piper nigrum* y *Piper longum* tiene diversas actividades terapéuticas como antioxidante, antimicrobiano, analgésico, antiinflamatorio, insecticida entre otros efectos. Y usado ampliamente en la medicina ayurvédica.⁴⁸

También es útil en el tratamiento de los trastornos de la piel, aplicaciones terapéuticas como cosméticos o formulaciones de medicamentos para la prevención de daños cutáneos inducidos por los rayos UV.⁴⁹

2.8.5 Curcumina

La *cúrcuma* se emplea ampliamente en la medicina tradicional para tratar diversas enfermedades como el acné y las lesiones. Según las evidencias científicas actuales, la curcumina, principio activo de *Curcuma longa*, es un potente agente antiinflamatorio, cicatrizante y muestra efectos antimicrobianos.⁵⁰

Así como también se ha considerado en aplicaciones cosméticas debido a sus efectos antioxidantes y antiinflamatorios en la piel ya que posee actividades antienvjecimiento, antiarrugas, protector solar y regeneradora de la piel y puede conducir a una mejor apariencia de la piel.⁵⁰

2.8.6 Glucosa

La glucosa es un compuesto hidrofílico y el estudio de esta es relevante para el desarrollo de sistemas de administración transdérmica de fármacos y el diseño de formulaciones de productos para el cuidado de la piel.⁵¹ Además de que son empleadas para pruebas de permeabilidad en membranas.⁵²

Con lo anterior se comprende que actualmente y con mayor frecuencia se utilizan modelos *in vitro* que evalúan la permeabilidad de fármacos y sustancias evitando el uso de tejido humano y animal.

3. Planteamiento del problema

Los estudios de difusión son ampliamente utilizados en la industria farmacéutica y cosmética para analizar la permeabilidad de diferentes fármacos y sustancias, como base en el desarrollo de formulaciones útiles que sean permeables a través de la piel. Los modelos *in vitro* tienen como objetivo principal simular las condiciones de difusión en seres humanos, obviando de esta manera los requisitos para la investigación *in vivo* que utiliza tejido de seres humanos o animales.⁵

Actualmente las técnicas empleadas son desarrolladas con membranas sintéticas comerciales con las cuales se puede predecir la permeabilidad cutánea en modelos de difusión transdérmica. Sin embargo, la utilización de estas membranas es costosa, lo cual limita su uso en estudios de investigación.⁵³

El presente trabajo tiene como objetivo evaluar y comparar los perfiles de permeabilidad de algunos fármacos y productos naturales, en un sistema *in vitro* utilizando las celdas de Franz verticales,⁴² con una membrana sintética (Strat-M® Millipore) y una membrana natural (cutícula del maguey), la cual debido a su contenido de cutina y ceras cuticulares funciona como una barrera semipermeable tanto a compuestos polares como no polares.³⁷

Con el propósito de proponer el uso de la cutícula de maguey como una alternativa de menor costo y funcionalidad similar de permeación en estudios *in vitro* comparándola con la membrana sintética, Strat-M® Millipore.

4. Hipótesis

Al desarrollar estudios de difusión de diversos fármacos y productos naturales, utilizando la cutícula de maguey y la membrana sintética Strat-M® Millipore, siguiendo un mecanismo de difusión pasiva mediante la determinación del coeficiente de permeabilidad (K_p), será posible establecer una correlación de la permeabilidad de las sustancias empleadas en ambas membranas.

5. Objetivos

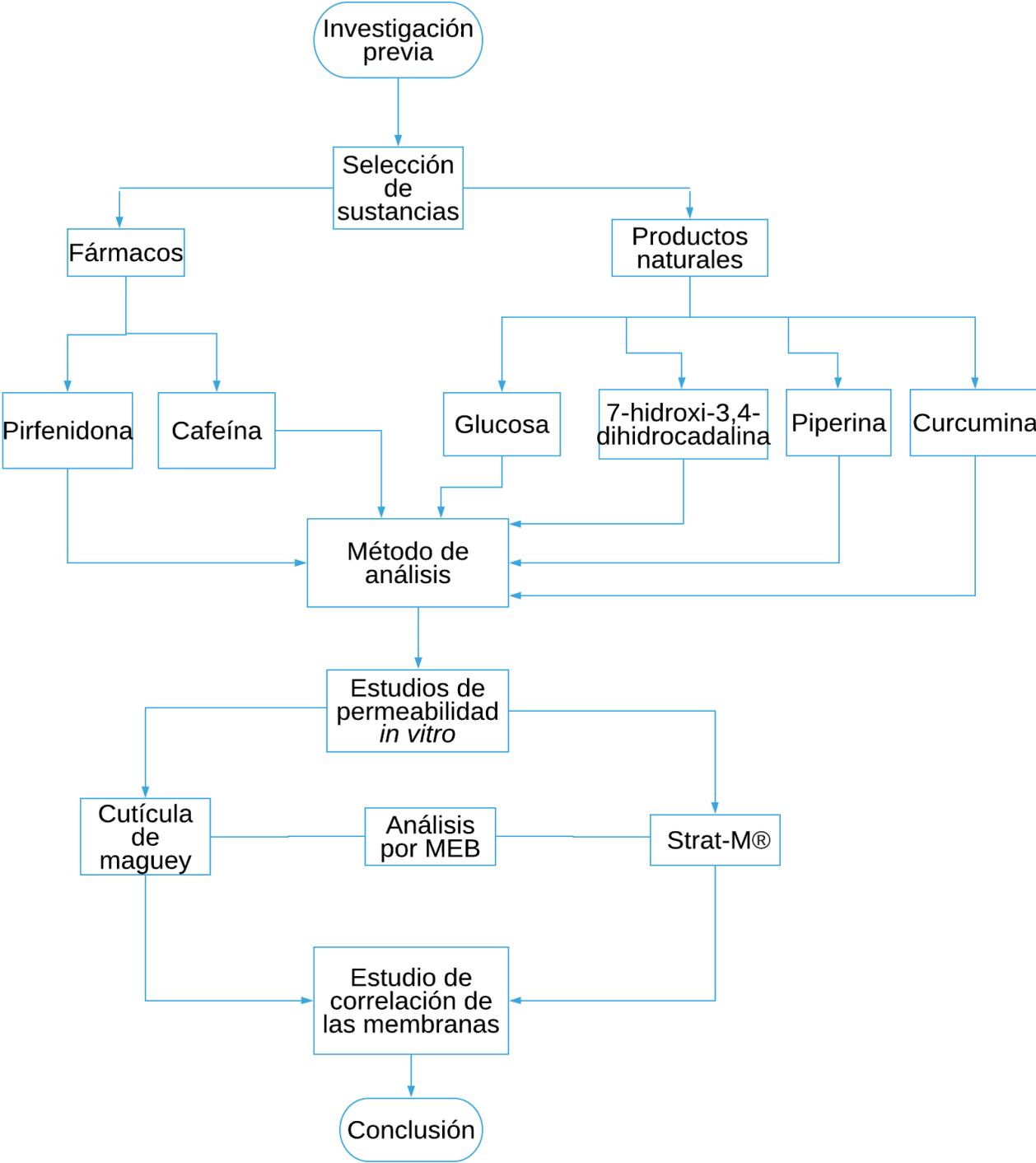
5.1 Objetivo general.

- Evaluar la permeabilidad *in vitro* de los fármacos pirfenidona y cafeína; de los productos naturales 7-hidroxi-3,4-dihidrocajalina, piperina, curcumina y glucosa, utilizando la membrana sintética Strat-M® Millipore y una membrana biológica vegetal obtenida del *Agave* (cutícula de maguey) en celdas de Franz verticales.

5.2 Objetivos particulares.

- Ajustar el método analítico de cada compuesto empleado en el laboratorio de trabajo.
- Determinar el coeficiente de permeabilidad de cada uno de los compuestos, utilizando una membrana sintética y la membrana vegetal.
- Establecer la correlación de la permeabilidad entre cada una de las membranas en estudio.
- Efectuar el análisis morfológico de las membranas por microscopía electrónica de barrido (MEB).

Diagrama 1. En el siguiente diagrama se presenta la metodología desarrollada de manera general.



6. Material y métodos

6.1 Materiales

6.1.1 Material vegetal

Se utilizó la cutícula de maguey (mixiote), se obtuvo de *Agave salmiana* Otto ex Salm-Dyck y *A. mapisaga* Trel., procedente de San Miguel Tlaixpan, Texcoco Edo. de México, en junio 2017 y fue almacenada a - 20°C, hasta su procesamiento. Posteriormente se descongeló a temperatura ambiente, se hirvió en agua durante 5 minutos y se cortó en láminas delgadas de 1 cm² para ser utilizada en los experimentos de difusión.

6.1.2 Membrana sintética

La membrana sintética Strat-M® Millipore fue adquirida de Millipore Merck, México.

6.1.3 Fármacos, compuestos y reactivos

La pirfenidona fue donada por el laboratorio farmacéutico Cell Pharma S. de RL de CV. La cafeína anhidra CAS 58-08-2. EC No. 200-362-1, adquirida en Sigma Aldrich (St. Louis, MO EUA).

Los compuestos de origen natural fueron obtenidos previamente, para otros estudios en el laboratorio 126 de la Facultad de Química. El metabolito 7-hidroxi-3,4-dihidrocajalina fue aislada de *Heterotheca inuloides* Cass (árnica mexicana), la curcumina fue aislada de la raíz molida de *Cúrcuma longa* y la piperina fue extraída de *Piper nigrum*.

La glucosa hidratada al 99.5% GC. CAS 50-99-7 y el Tris Base Ultrapure (US Biological) fueron adquiridos de Sigma Aldrich (St. Louis, MO EUA).

Los disolventes grado HPLC: acetonitrilo CAS 75-05-8, metanol CAS 67-56-1, etanol CAS 64-17-5 fueron adquiridos de JT Baker (EUA).

Las disoluciones se prepararon en agua purificada calidad cromatográfica obtenida del purificador de agua Milli-Q system (Millipore S.A de C.V., México).

6.1.4 Equipos y aparatos

6.1.4.1 Celda de Franz vertical construida de vidrio Pirex (Figura 3) con un área donante de 0.7854 cm^2 y un volumen de receptor de 5.0 mL, con chaqueta de calentamiento, un baño de agua para mantener la temperatura a $37 \text{ }^\circ\text{C}$ y un sistema de agitación constante.

6.1.4.2 Cromatógrafo de Líquidos de Alta Resolución (HPLC): Inyector Waters 717 Plus, controlador automático de gradientes Waters 600, detector UV con arreglo de diodos Waters 2996, Software Waters Empower Pro.

6.1.4.3 Espectrofotómetro microplate reader, BioRad®, Modelo 680.

6.1.4.4 Microscopio electrónico de barrido (MEB). HITACHI, modelo: TM3030Plus.

6.1.5 Preparación de soluciones

Para la preparación de las soluciones de los diferentes compuestos se utilizó agua purificada calidad cromatográfica.

Pirfenidona, se preparó una solución acuosa de concentración 1.8 mg/mL.

Cafeína, se preparó una solución acuosa de concentración 1.0 mg/mL.

7-hidroxi-3,4-dihidrocadalina, se preparó una suspensión de concentración 1.8 mg/mL en solución amortiguadora de TRIS pH 7.5.

Piperina, se preparó una solución de concentración 1.8 mg/mL de etanol-agua (50:50). Curcumina, se preparó una solución de concentración 1.0 mg/mL de etanol-agua (50:50). Glucosa, se preparó una solución acuosa de una concentración de 3.603 mg/mL.

Preparación del reactivo de *o*-toluidina al 5 %, se disolvió 0.15 g de tiourea en 50 mL de ácido acético glacial contenido en un matraz aforado de 100 mL. Se agregó 5 mL de *o*-toluidina y se completó el volumen con ácido acético glacial. Se mezcló la solución y se mantuvo en un frasco de vidrio ámbar a temperatura ambiente.⁵⁴

6.2 Metodología

6.2.1 Estudios de permeabilidad *in vitro*

Se empleó una celda de permeación tipo Franz vertical construida de vidrio. En el compartimento receptor se colocó 5 mL de una solución amortiguadora de TRIS pH 7.5 preparada de acuerdo a la FEUM 11 edición⁵⁵ para las sustancias: pirfenidona, 7-hidroxi-3,4-dihidrocadalina, piperina, curcumina y para el ensayo con glucosa se empleó 5 mL de agua destilada.

La celda de difusión de Franz tiene una capacidad del compartimento donante y receptor de 2.5 mL y 5 mL respectivamente. En la interface entre dichos compartimentos se colocó la membrana Strat-M® o la cutícula con un diámetro de contacto de 1 cm, asegurando la misma entre los compartimientos y verificando que no existiera fuga.

Durante el experimento se mantuvo la temperatura a 37 °C mediante un baño de agua y con agitación constante, utilizando un agitador magnético. Treinta minutos antes de la adición de cada una de las soluciones a evaluar se colocó en la celda de Franz la membrana sintética Strat-M® o la membrana vegetal de cutícula de maguey para observar que no existieran fugas y al mismo tiempo se equilibraran con el medio ambiente.³⁹

En el compartimento donador para el ensayo de pirfenidona se colocó 1 mL de la solución amortiguadora de TRIS pH 7.5 y 1 mL de la solución de concentración 1.8 mg/mL respectivamente.

En el ensayo con 7-hidroxi-3,4-dihidrocahalinase colocó 2 mL de la suspensión de concentración 1.8 mg/mL en solución amortiguadora de TRIS pH 7.5.

Para los ensayos de glucosa de concentración 3.603 mg/mL., de piperina de concentración 1.8 mg/mL y de curcumina de concentración 1.0 mg/mL se adicionaron, 2 mL de la solución respectivamente.

Se tomaron muestras de 500 μ L de la solución presente en el compartimento receptor, de la parte media de dicho compartimento con ayuda de una sonda de plástico y se recuperó el volumen con la solución amortiguadora de TRIS pH 7.5, agua destilada u solución de etanol-agua (50:50), de acuerdo con la solución de prueba.

Para el ensayo de la pifrenidona, la 7-hidroxi-3,4-dihidrocahalinay la piperina la toma de muestra se efectuó a los 0, 20, 40, 60, 80, 100, 120,150, 180, 210 y 240 minutos.

Para el ensayo de glucosa la toma de muestra se efectuó a los 0, 20, 40, 60, 80, 100 y 120 minutos.

Para el ensayo de curcumina la difusión se realizó durante 300 minutos, pero la toma demuestra comenzó en el minuto 100 por intervalos de 30 minutos hasta el minuto 300.

6.2.2 Determinación mediante Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución.

6.2.2.1 Pirfenidona

Se emplearon las siguientes condiciones: Soporte: Columna de acero inoxidable Luna 5 μ C18. 5 μ m (150x4.6mm). Fase móvil. Acetonitrilo-agua (35:65) grado HPLC. Flujo: 0.7 mL/min. Detector: UV-VIS ajustado a 317 nm. Volumen muestra 10 μ L. Temperatura de columna: 25 °C, tiempo de corrida 7 minutos.⁵⁶

6.2.2.2 7-hidroxi-3,4-dihidrocadalina

Soporte: Columna de acero inoxidable Luna 5 μ C18. 5 μ m (150x4.6mm). Fase móvil. Acetonitrilo grado HPLC. Flujo: 1.0 mL/min. Detector: UV-VIS ajustado a 220 nm. Volumen muestra 10 μ L. Temperatura de columna: 30°C, tiempo de corrida 6 minutos.⁵⁷

6.2.2.3 Piperina

Soporte: Columna de acero inoxidable Luna 5 μ C18. 5 μ m (250x4.6mm). Fase móvil. Acetonitrilo-agua (90:10) grado HPLC. Flujo: 1.5 mL/min. Detector: UV-VIS ajustado a 343 nm. Volumen muestra 10 μ L. Temperatura de columna: 30 °C, tiempo de corrida 6 minutos.⁵⁸

6.2.2.4 Cafeína

Soporte: Columna de acero inoxidable Luna 5 μ C18. 5 μ m (250x4.6mm). Fase móvil. Agua-metanol (50:50) grado HPLC. Flujo: 1.0mL/min. Detector: UV-VIS ajustado a 272 nm. Volumen muestra 10 μ L. Temperatura de columna: 26 °C, tiempo de corrida 5 minutos.⁵⁹

6.2.3 Determinación Espectrofotométrica

6.2.3.1 Glucosa

A cada muestra se le adicionó 1mL del reactivo de *o*-toluidina y se preparó un blanco con agua destilada. Los tubos se colocaron en un baño de agua hirviendo durante 10 minutos, al final las muestras desarrollaron un color verde. Posteriormente los tubos se enfriaron durante 3 minutos en un baño de agua a temperatura ambiente. Se colocaron 200 μ L de cada muestra en una microplaca de lectura, leyendo a una longitud de onda de 620 nm.⁵⁴

6.2.3.2 Curcumina

Se colocaron 200 μ L de cada muestra en una microplaca para su posterior lectura. Se preparó una solución etanol-agua (50:50) como blanco. Se realizó la lectura a una longitud de onda de 415 nm.⁶⁰

6.2.4 Determinación de la concentración

Para determinar la concentración de las muestras a los diferentes tiempos se construyeron curvas patrón de concentraciones conocidas para cada compuesto empleado.

6.2.5 Microscopia electrónica de barrido (MEB)

La microscopía electrónica de barrido de las membranas Strat-M® Millipore y de la cutícula de maguey, se realizaron en un Microscopio de Mesa TM3030plus de la marca HITACHI. Las muestras de las membranas se colocaron directamente en el soporte (porta muestra) adheridas a la cinta de carbono, posteriormente en el microscopio electrónico de barrido al vacío para

el inicio de la captura de las imágenes transversales y de las caras externa e interna. Este estudio se efectuó en el Laboratório de Pesquisa em Fármacos de la Universidad Federal de Amapá en Macapá Brasil.

6.2.6 Análisis de datos

Para evaluar la cantidad obtenida de las muestras obtenidas de los ensayos de permeabilidad de cada compuesto se prepararon curvas patrón con las especificaciones correspondientes presentadas en el Cuadro A 1, en el apartado de Anexo.

El análisis de los compuestos: pirfenidona, 7-hidroxi-3,4-dihidrocadalina, piperina y cafeína se realizaron por el método de HPLC y para los compuestos: glucosa y curcumina se empleó un método espectrofotométrico.

Los parámetros de permeación, como el flujo y el coeficiente de permeabilidad se calcularon de forma individual para cada ensayo.

El flujo ($\text{mg}/\text{cm}^2 \cdot \text{min}$) se determinó a partir de la pendiente de la gráfica de cantidad acumulada de compuesto permeado por área de superficie (cm^2) en función del tiempo (min) de ambas membranas: Strat-M® Millipore y cutícula de maguey mediante análisis de regresión lineal.

El coeficiente de permeabilidad (Kp) de los compuestos en estudio se calculó utilizando la ecuación $Kp = \frac{J}{c_0}$ descrita en la sección 2.4.1.

6.2.7 Análisis estadístico

Los resultados se reportan como el coeficiente de permeabilidad (Kp) \pm EEM ($n = 6$). El análisis estadístico de los datos se realizó mediante regresión lineal y la prueba t de Student, y un valor establecido en ($p < 0.05$), fueron considerados como evidencia de una diferencia significativa.

Gráfica de correlación a partir de los resultados de (Kp) \pm EEM de cada una de las membranas Strat-M® y cutícula de maguey, se determinó el coeficiente de correlación y se realizó la prueba de la pendiente, verificando que éste sea diferente de cero.

7. Resultados

7.1 Estudios de permeabilidad *in vitro*

En las figuras 4 a 8 se presentan las gráficas de cantidad acumulada/área (mg/cm^2) de compuesto contra el tiempo (min) para los compuestos de prueba: pirfenidona (Figura 4), cafeína (Figura 5), 7-hidroxi-3,4-dihidrocajalina (Figura 6), piperina (Figura 7) y glucosa (Figura 8). Con dichas gráficas se calculó el flujo: J ($\text{mg}/\text{cm}^2 \cdot \text{min}$) determinado a partir de la pendiente de dichas gráficas. Conociendo el flujo J se calculó el coeficiente de permeabilidad (K_p). El resumen de los resultados del coeficiente de permeabilidad (K_p) de cada compuesto se presenta en el Cuadro 1.

En cuanto al análisis estadístico obtenido de cada ensayo en la membrana Strat-M® Millipore y la cutícula de maguey no se observó diferencia significativa ($p > 0.05$) en el ensayo con pirfenidona. Mientras que para los compuestos: 7-hidroxi-3,4-dihidrocajalina, glucosa, piperina y cafeína si se observó diferencia significativa ($p < 0.05$). El compuesto curcumina no permeo en ninguna de las dos membranas por lo que se determinó un coeficiente de permeabilidad (K_p) de 0.

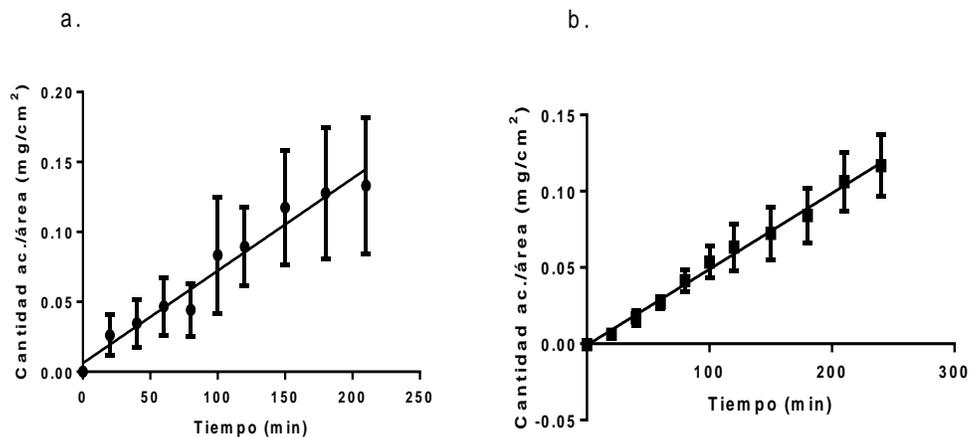


Figura 4. Cantidad acumulada/área contra tiempo para pirfenidona.

En (a) Membrana sintética Strat-M[®] y en (b) Cutícula de maguey. Los datos son reportados como media \pm EEM (n=6).

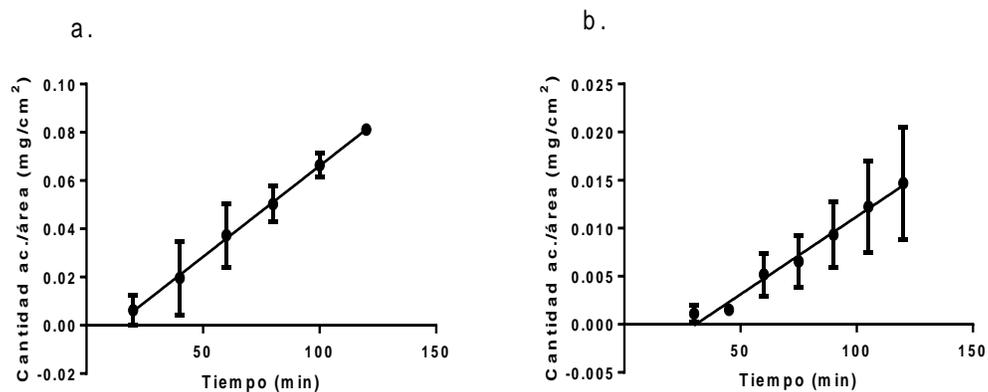


Figura 5. Cantidad acumulada/área contra tiempo para cafeína.

En (a) Membrana sintética Strat-M[®] y en (b) Cutícula de maguey. Los datos son reportados como media \pm EEM (n=3).

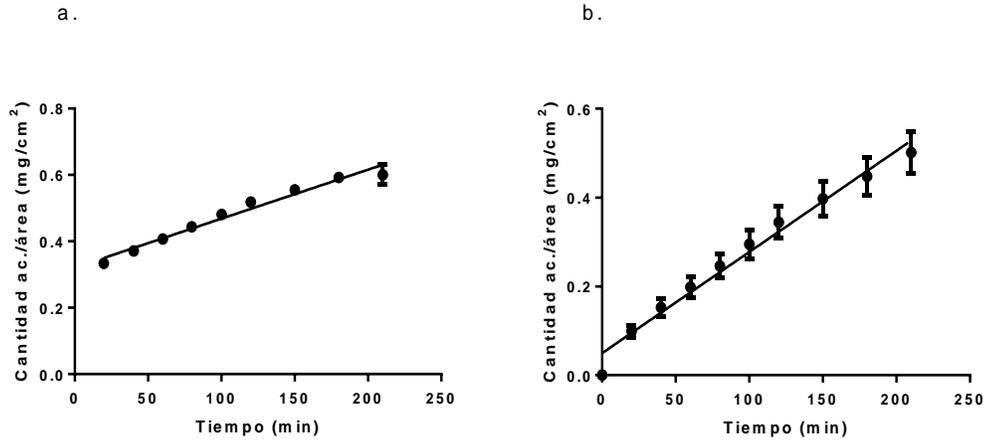


Figura 6. Cantidad acumulada/área contra tiempo para 7-hidroxi-3,4-dihidrocadalina.

En (a) Membrana sintética Strat-M® y en (b) Cutícula de maguay. Los datos son reportados como media \pm EEM (n=6).

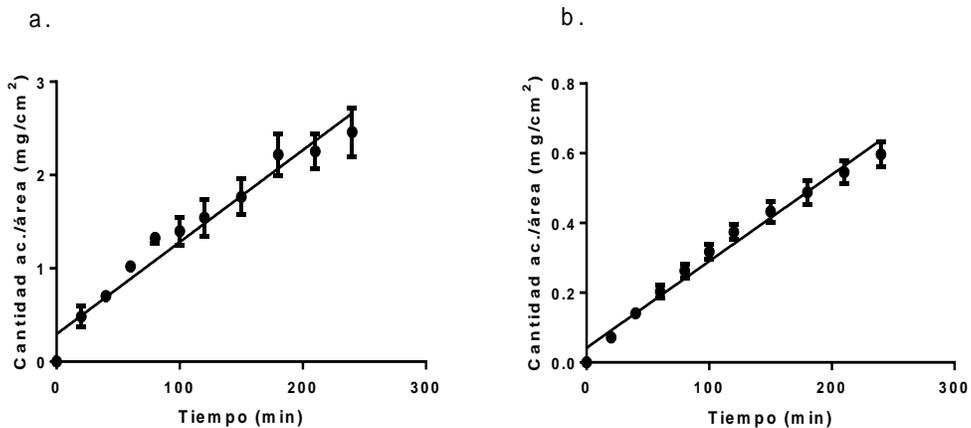


Figura 7. Cantidad acumulada/área contra tiempo para piperina.

En (a) Membrana sintética Strat-M® y en (b) Cutícula de maguay. Los datos son reportados como media \pm EEM (n=6).

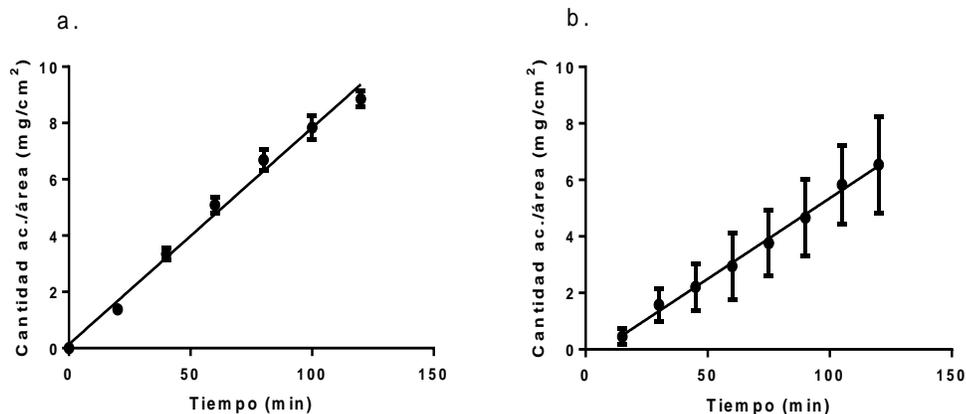


Figura 8. Cantidad acumulada/área contra tiempo para glucosa.

En (a) Membrana sintética Strat-M® y en (b) Cutícula de maguey. Los datos son reportados como media \pm EEM (n=6).

Cuadro 1. Valores del coeficiente de permeabilidad (K_p) obtenidos de los compuestos probados.

Sustancia	$K_p \pm$ EEM		Prueba t de Student ($p < 0.05$)
	Strat-M®Millipore	Cutícula de maguey	
Pirfenidona	0.04404 \pm 0.016047	0.02687 \pm 0.00632	No
Cafeína	0.045246 \pm 0.01168	0.009708 \pm 0.005707	Si
7-hidroxi-3,4-dihid roscadalina	0.0458 \pm 0.005	0.07597 \pm 0.0095	Si
Piperina	0.3343 \pm 0.008126	0.08283 \pm 0.001645	Si
Curcumina	0	0	ND
Glucosa	1.2811 \pm 0.09283	0.634190 \pm 0.24129	Si

7.2 Curvas de calibración para la determinación de la concentración

En el Cuadro 2 se presentan los datos obtenidos de las curvas de calibración para la determinación de la concentración de cada ensayo. Las gráficas obtenidas de dichas curvas se encuentran en el apartado de Anexo, (Figura A 1, A 2, A 3, A 4 y A 5).

Cuadro 2. Ecuación de regresión y coeficiente de correlación para cada compuesto analizado y longitud de onda a la que se determinó la concentración.

Compuesto	Ecuación de regresión lineal	R ²	λ de lectura (nm)
Pirfenidona	$Y = 2.176e+007 * X - 1017$	0.9916	317
7-hidroxi-3,4-dihidrocadalina	$Y = 5.883e+007 * X + 69905$	0.9906	220
Piperina	$Y = 5.646e+007 * X - 87898$	0.9729	343
Curcumina	$Y = 4.162 * X + 0.09089$	0.9547	415
Glucosa	$Y = 0.2914 * X + 0.1357$	0.9777	620

7.3 Correlación de la membrana Strat-M® Millipore con la cutícula de maguey

Los valores del coeficiente de permeabilidad (K_p) obtenidos para cada compuesto en la membrana Strat-M® Millipore y la cutícula de maguey presentó un coeficiente de correlación (r) de 0.9686 (Figura 9).

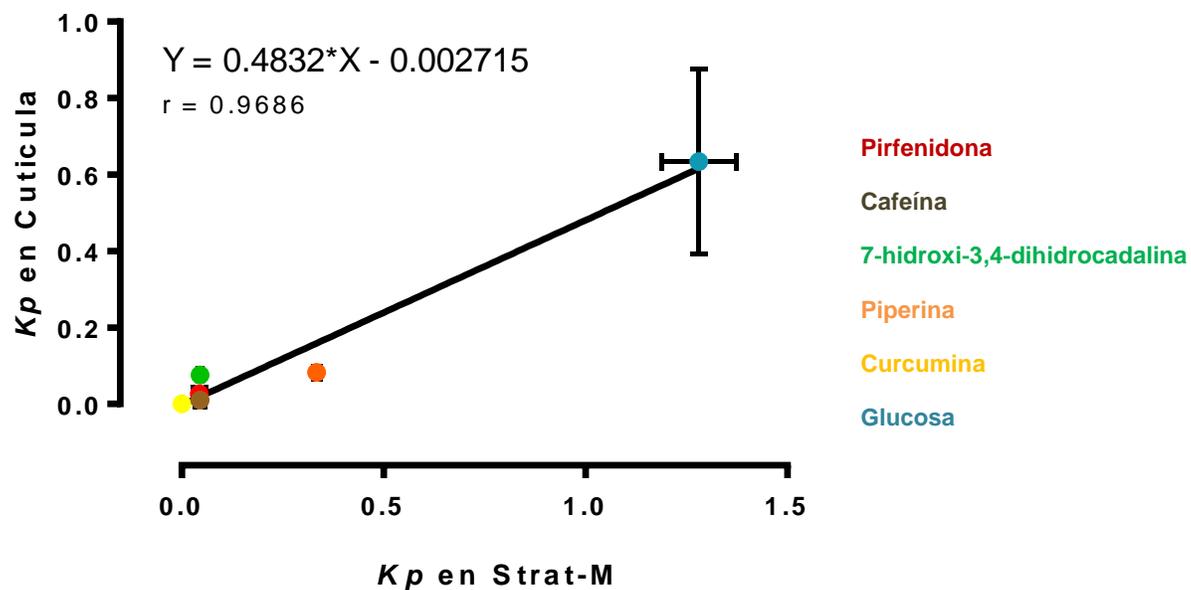


Figura 9. Gráfica de correlación del K_p entre Strat-M® Millipore y la cutícula de maguey de los compuestos probados ($r = 0.9686$).

7.4 Análisis por microscopía electrónica de barrido (MEB)

Las muestras de las membranas Strat-M® Millipore y cutícula de maguey fueron examinadas mediante microscopía electrónica de barrido con el propósito de apreciar la morfología estructural de ambas membranas.

Se logró observar la cara interna, externa, así como también el plano transversal de estas. Las micrografías obtenidas se presentan en la Figura 10 y Figura 11.

7.4.1 Membrana Strat-M® Millipore

La Figura 10 muestra las imágenes resultantes del análisis de MEB de la sección transversal y ambas caras de la membrana sintética Strat-M® Millipore. En una escala de 300 μm , se observaron tres capas en el corte transversal. La densidad de cada capa difería y disminuía gradualmente desde la parte superior de la membrana. El análisis transversal mostró que Strat-M® Millipore consiste en tres capas.

Los espesores de las capas que conforman a la membrana fueron de $37.55 \pm 2.605 \mu\text{m}$, $33.90 \pm 2.427 \mu\text{m}$ y $167.95 \pm 20.45 \mu\text{m}$ desde la capa superior a la inferior respectivamente (Figura 10 a). El espesor total de la membrana fue de $278.3 \pm 8.391 \mu\text{m}$ (media \pm EEM).

En la micrografía de la Figura 10 b, a una escala de 2 mm, se puede apreciar la capa superior. Esta superficie es la que está en contacto con el compartimento donador. Se observó una superficie lisa, uniforme, compacta y no porosa.

En el lado interno de la membrana, a una escala de 2 mm (Figura 10 c), se logra observar la capa única de soporte. Compuesta de tela no tejida de poliolefina.

7.4.2 Cutícula de maguey

En la Figura 11 se observa las imágenes obtenidas del análisis de MEB de la membrana cuticular del Agave.

El espesor de la membrana de agave fue de $127.3 \pm 5.5 \mu\text{m}$ (media \pm EEM) observada a $500 \mu\text{m}$ (Figura 11a). En la cara adaxial (lado externo) de la cutícula, a una escala de $300 \mu\text{m}$ (Figura 11 b), se logró observar los estomas de un largo de $87.0 \mu\text{m}$ y ancho de $38.9 \mu\text{m}$. Se observó que estos están compuestos por ostiolas, son de tipo tetracítico regularmente distribuidos. Se encuentran alineados en filas aparentes. Estas estructuras están formadas por un par de células oclusivas y la abertura situada entre estas. En el *Agave* se presenta en ambas superficies de la hoja, condición conocida como anfistomática.⁶¹

No presentó los detalles suficientes para la identificación de las ceras, de la misma manera fue casi imperceptible determinar las mismas en la micrografía de la sección transversal.

Por último, en la micrografía de la Figura 11 c se observa la cara abaxial (lado interno). En esta se aprecian estomas en menor longitud que la cara adaxial de la membrana, los ostiolas presentan $34.25 \mu\text{m}$ de longitud.

7.4.3 Microscopia óptica de la cutícula de maguey

En la Figura 12 se observan las imágenes vistas por microscopia óptica de la membrana cuticular hidratada. Se observaron las dos caras, adaxial presentado en la Figura 12 a y la cara abaxial en la Figura 12 b. En ambas caras de la membrana se logró observar la presencia de estomas de tipo tetracítico.

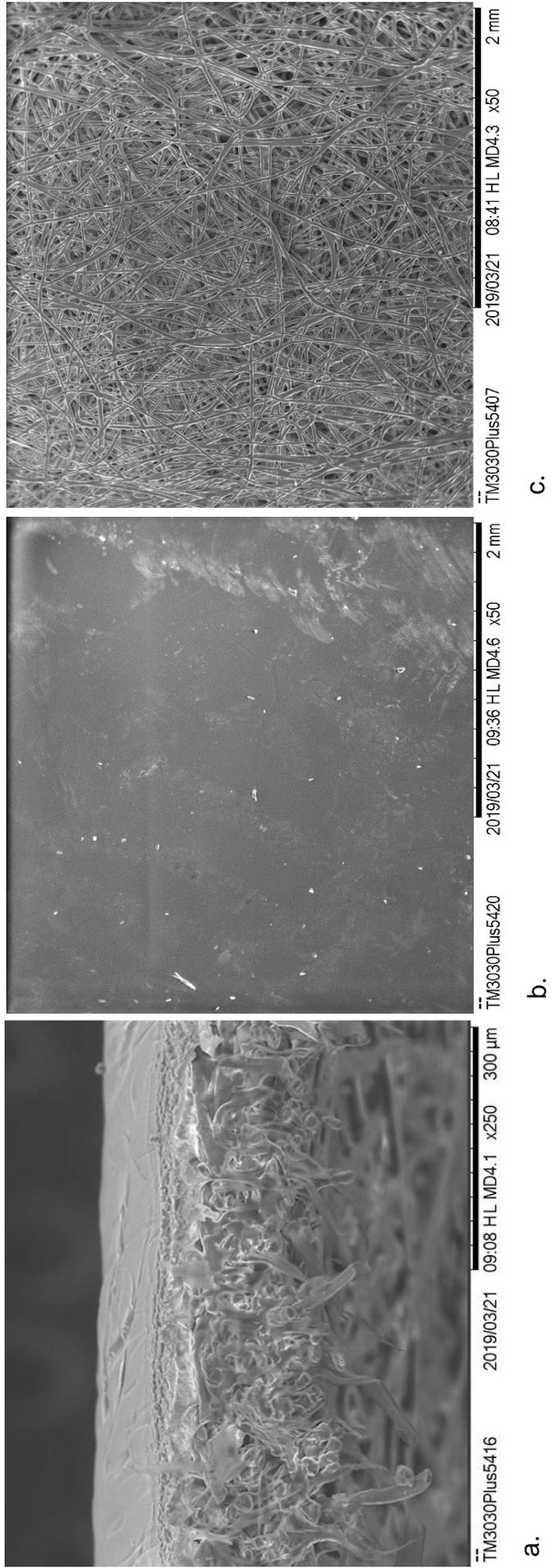


Figura 10. Microscopia electrónica de barrido de Strat-M® Millipore de **a.** sección transversal (barrido 300 μ m). De **b.** lado externo (cara que está en contacto con el compartimento donador; barra 2 mm). Y de **c.** lado interno (cara que está en contacto con el compartimento receptor; barra 2 mm).

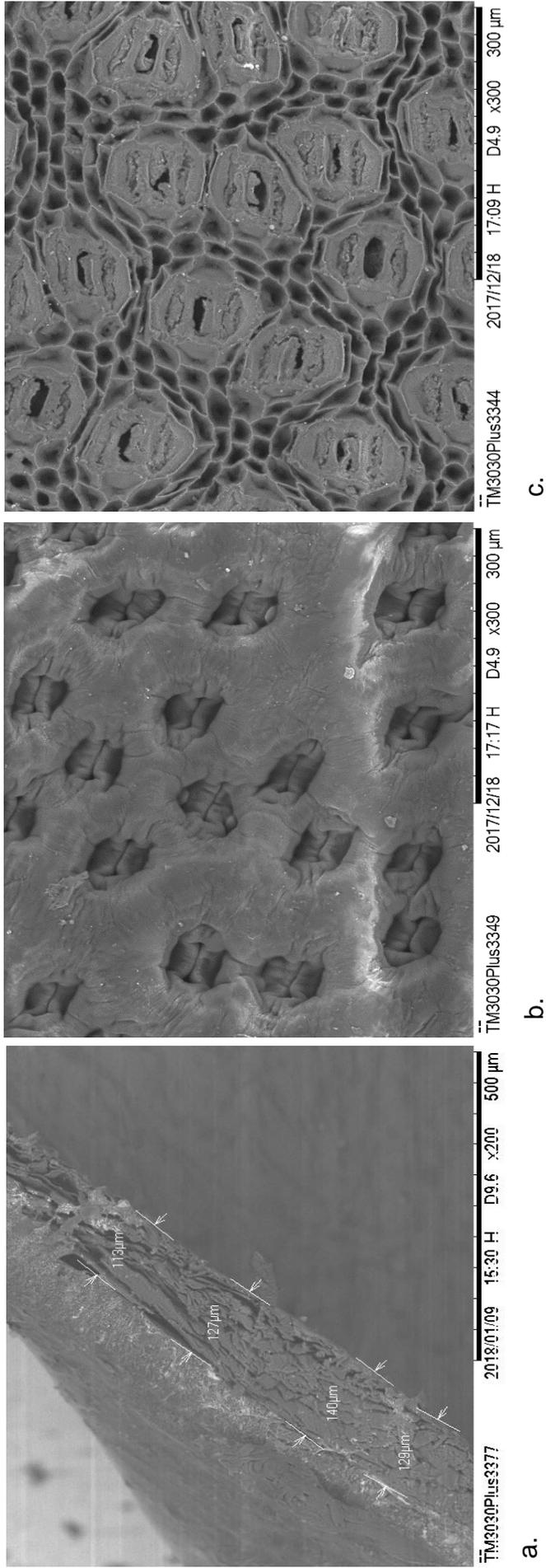
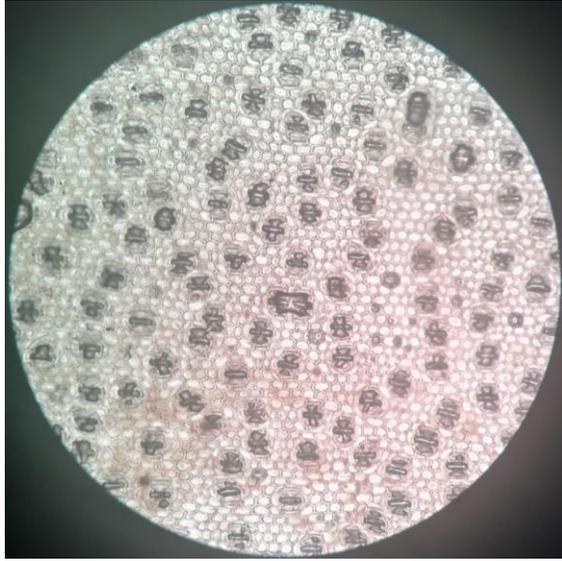
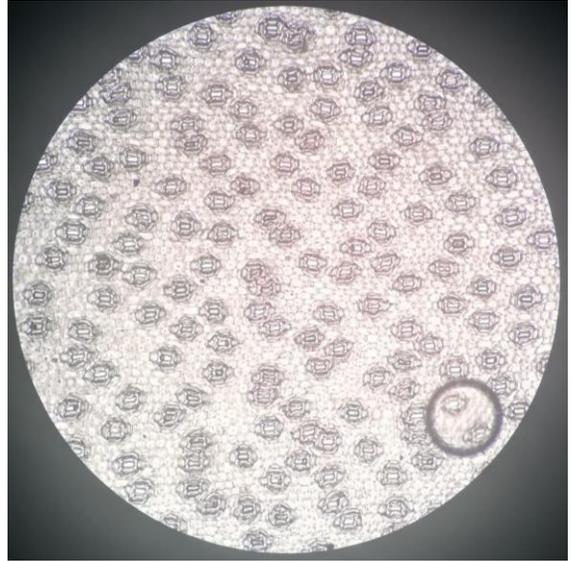


Figura 11. Microscopia electrónica de barrido de la cutícula de maguey. **a.** sección transversal. De **b.** cara adaxial (lado externo). Y de **c.** cara abaxial (lado interno) de la cutícula desprendida de una hoja de *Agave sp.*



a.



b.

Figura 12. Microscopia óptica 40x de la cutícula de maguey de *Agave* sp. **a.** cara adaxial. **b.** cara abaxial.

7.5 Compuestos de estudio

En la Figura 13 se presentan las estructuras de los compuestos empleados para los ensayos de permeabilidad y sus propiedades fisicoquímicas.

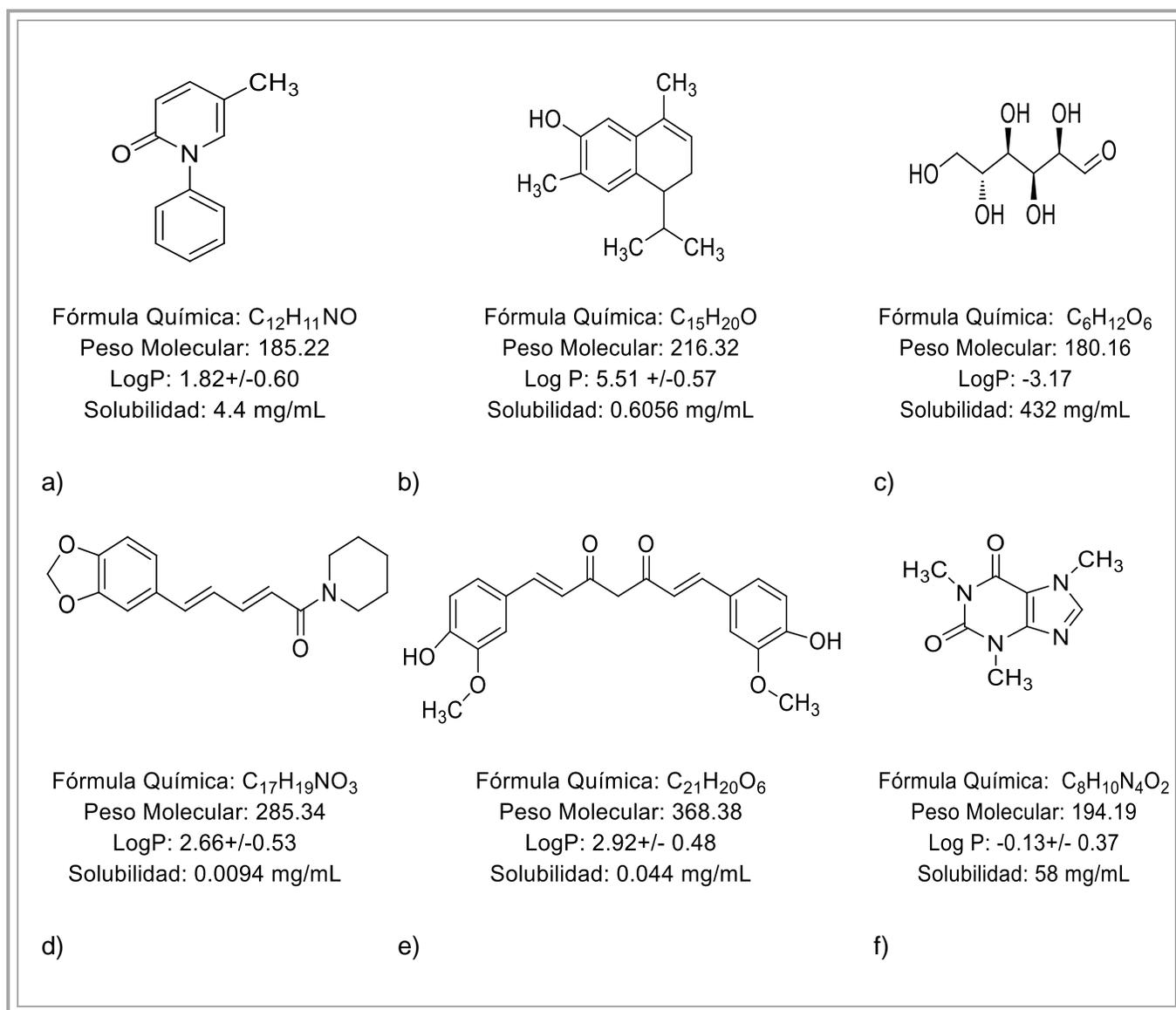


Figura 13. Compuestos de estudio

a. piperfenidona. b. 7-hidroxi-3,4-dihi-drocadalina. c. glucosa. d. piperina. e. curcumina. f. cafeína. Las estructuras fueron realizadas en el programa ChemBioDraw. Log P (Calculado usando: Advanced chemistry Development (ACD/Labs) Software V 14.0 (© 1995-2018 ACD Inc.)

8. Discusión de resultados

En el presente trabajo se determinó el coeficiente de permeabilidad (Kp) de los fármacos pirfenidona y cafeína, de los productos naturales 7-hidroxi-3,4-dihidrocadalina, piperina, curcumina y de glucosa. Se realizó la comparación empleando dos membranas: una sintética comercial denominada Strat-M® Millipore y una membrana biológica vegetal obtenida del *Agave*: cutícula de maguey. Este coeficiente de permeabilidad se emplea para predecir o caracterizar la penetración percutánea de sustancias químicas el cual expresa la velocidad de penetración dérmica (cm/h) parámetro utilizado para el proceso de formulaciones dérmicas.²⁷

La evaluación de la absorción percutánea de las moléculas es importante para conocer la efectividad de cualquier sistema de administración de fármacos vía transdérmica.⁶²

Existen factores que pueden afectar la velocidad y el grado en que se absorbe una molécula a través de la piel y se relaciona con las propiedades fisicoquímicas del penetrante. Los parámetros fisicoquímicos más importantes son: el peso molecular, el coeficiente de reparto y solubilidad.

Como regla general las moléculas con un peso molecular mayor que 500 Da no penetran la piel.⁶³ Este requisito lo cumplen todas las moléculas evaluadas para penetrar la piel. En general un $\log P$ entre 1 y 3 es considerado óptimo para la absorción de la piel.^{20,22,63} Respecto a esto, sólo pirfenidona, piperina y curcumina, cumplen con este parámetro para penetrar la piel. Finalmente, la solubilidad acuosa debe ser mayor a 1mg/mL.²⁰ Solo pirfenidona, glucosa y

cafeína tienen esta característica. Como se puede deducir sólo pirfenidona cumple con los tres requisitos para poder penetrar la piel y como es sabido se utiliza en productos comerciales como cicatrizante.

La **pirfenidona** (5-metil-1-fenil-2(1*H*)-piridona) es una molécula pequeña, 185.22 Da en cuya estructura tiene presente un grupo piridona, un fenilo y un metilo. Sus características definen a la pirfenidona como una base débil con un pK_a de -0.16 ± 0.63 , además de otros factores que favorecen la permeabilidad como el logaritmo del coeficiente de reparto ($\log P$) de 1.82 ± 0.60 calculado y su solubilidad. En los ensayos de difusión fue el único compuesto que en las pruebas estadísticas no presentó diferencia significativa respecto a las membranas Strat-M® y cutícula de maguey, es atribuible a estas características, es importante mencionar que, en el medio receptor, la molécula se encuentra en su forma no disociada lo cual es ideal para favorecer su permeabilidad.⁵⁷

Para este compuesto se obtuvo un K_p de 0.04404 ± 0.016047 cm/h para el ensayo con membrana sintética Strat-M® y en el ensayo con cutícula de maguey fue de 0.02687 ± 0.00632 cm/h. Se demostró que la permeabilidad en la membrana sintética es aproximadamente dos veces mayor que en la membrana de maguey, sin embargo, en estos resultados no se observó diferencia significativa.

La **cafeína** es un alcaloide natural del grupo de las metilxantinas caracterizadas por tener poco carácter básico y poco soluble en agua.⁶⁴ Es una molécula pequeña con un peso de 194.19 Da y debido a sus características definen a la

molécula como una base débil con un pka de 0.52 ± 0.70 y un coeficiente de partición de -0.13 ± 0.37 calculado, además de que no se encontraba disociado en el medio receptor.

Los resultados obtenidos para este compuesto demostraron que la permeabilidad en la membrana sintética es cuatro veces mayor que en la membrana de maguey, el K_p obtenido fue de 0.009708 ± 0.005707 cm/h en los ensayos con la cutícula de maguey establecido en estudios previos realizados en este laboratorio por Esparza-Martínez y Pérez-Romo, en 2015⁵², se puede observar que la permeabilidad de este compuesto es muy reducida en esta a pesar de las características favorables, igual hubo modificaciones en el vehículo, lo cual posiblemente afectó la determinación del K_p en esta membrana.

Estos resultados se compararon respecto a la determinación realizada por Galicia Alcántara en 2015⁵⁷ en el cual se empleó a la cafeína para el ensayo de permeabilidad utilizando membrana sintética Strat-M® y obtuvo un K_p de 0.045246 ± 0.01168 cm/h, en las pruebas estadísticas de estos resultados se observa diferencia significativa.

Con respecto a **7-hidroxi-3,4-dihidrocajalina** es un sesquiterpeno, en cuya estructura se encuentra presente un grupo hidroxilo fenólico, dos metilos y un radical isopropilo. Es una molécula pequeña de 216.32 Da y debido a sus características definen a la molécula como un ácido débil con un pka de 10.53 ± 0.40 y un $\log P$ de 5.51 ± 0.57 calculado, que no favorecen la permeabilidad de la molécula, así como su solubilidad menor a uno y que no se encuentra disociado en el medio receptor.

El K_p obtenido fue de 0.07597 ± 0.0095 cm/h en los ensayos con la cutícula de maguey. En este ensayo el K_p mayor fue el obtenido con cutícula de maguey, siendo casi el doble, el cuál se atribuye a que es una molécula lipofílica y moléculas con coeficiente de reparto alto pueden quedar retenidas en la membrana.⁶⁵ Con respecto a estudios previos realizados por Galicia Alcantara en 2015 en este laboratorio,⁵⁷ en el cual analizó a la 7-hidroxi-3,4-dihidrocadalina aislado de *Heterotheca inuloides* Cassutilizando membrana sintética Strat-M® y en el cuál se determinó un K_p de 0.04588 ± 0.005 cm/h. En las pruebas estadísticas de estos resultados se observó diferencia significativa.

La **piperina** es un componente bioactivo y alcaloide nitrogenado que existe abundantemente en *Piper nigrum* L,⁵⁸ dotado de propiedades terapéuticas importantes.

Su estructura está compuesta por tres subunidades: una amida constituida por un anillo de piperidina con un resto carbonilo α,β -insaturado, un grupo 1,3-benzodioxol que también es llamado núcleo piperonal y una cadena de butadieno.⁴⁸ Es una molécula pequeña de 285.34 Da y sus características la definen como una base débil con un pka de -0.93 ± 0.20 su $\log P$ es de 2.66 ± 0.53 calculado, el compuesto no se encontraba disociado en el medio receptor, tales características son buenas para favorecer la difusión de la molécula. Los resultados obtenidos para piperina demostraron que la permeabilidad en la membrana sintética es cuatro veces mayor que en la membrana de maguey, esto es atribuible al vehículo empleado ya que este

compuesto tiene una solubilidad acuosa muy baja por lo que para realizar el ensayo se preparó una solución de etanol-agua (50:50) y de acuerdo con Hilton et al., la naturaleza del vehículo puede causar modificaciones en la absorción transdérmica del principio activo o por acción directa sobre la estructura y propiedades de la membrana en este caso mostrando diferencia respecto a la membrana vegetal.⁶⁶

Se determinó un K_p de 0.3343 ± 0.008126 con membrana sintética Strat-M®, mientras que el K_p obtenido en el ensayo con cutícula de maguey fue de 0.08283 ± 0.001645 cm/h. En estos resultados si se observó diferencia significativa.

La **curcumina** extraída de *Curcuma longa L.*, es el principal polifenol de la cúrcuma y el principal responsable de sus propiedades medicinales y farmacológicas. Este compuesto ha demostrado tener una amplia gama de actividades funcionales y biológicas.⁵⁰

Presenta una estructura fenol-dicetónica, que dotan a la molécula de un comportamiento químico característico, sensible al entorno químico adyacente, como a la propia reactividad de dichos grupos funcionales.⁶⁰ Tiene un peso molecular de 368.38 Da, sus características estructurales la definen como un ácido débil, tiene un pka de 8.11 ± 0.46 y un coeficiente de partición de 2.92 ± 0.48 calculado, estos parámetros cumplen respecto a lo descrito anteriormente para ser candidato a estos experimentos, sin embargo, su solubilidad acuosa baja y prácticamente insoluble en agua a pH ácido o neutro,

fue motivo de ajustar el vehículo y se realizó una solución de etanol-agua (50:50).

Tales características desfavorecieron la experimentación. Además de que esta molécula presenta tautomería ceto-enólica, siendo el cetoenol el tautómero predominante.

En las condiciones de experimentación establecidas este compuesto no permeaba y se determinó un K_p de 0 para ambas membranas.

La **glucosa** es un carbohidrato, pesa 180.16 Da. De acuerdo con su estructura puede presentar un carácter de ácido débil y es una molécula hidrofílica. Tiene un pka de 12.45 ± 0.20 y un coeficiente de partición de -3.17 ± 0.845 calculado. Esta molécula no genera iones eléctricamente cargados y no se genera ninguna disociación, esta molécula no cumple los parámetros descritos para ser un buen candidato, sin embargo, se sabe que este compuesto se emplea para verificar la permeabilidad de la membrana en experimentos de difusión.

Se observó que el K_p obtenido para glucosa fue de 1.2811 ± 0.09283 cm/h establecido para los ensayos realizados con membrana sintética Strat-M® este también fue el valor más alto obtenido de todos sus ensayos, esto puede estar relacionado con la baja tortuosidad de la vía para compuestos hidrofílicos en Strat-M®, por lo que la permeabilidad de dichos compuestos es mayor.³⁰ De acuerdo con Haq A. et al., que reporta valores altos para compuestos hidrofílicos en experimentos realizados con Strat-M® Millipore.³²

Estos resultados demuestran que el K_p en membrana sintética es dos veces mayor respecto a estudios previos realizados en este laboratorio por

Esparza-Martínez y Pérez-Romo, en 2015⁵², que determinó un K_p de 0.634190 ± 0.24129 cm/h para el ensayo de cutícula de maguey estos resultados demostraron diferencia significativa.

Microscopia electrónica de barrido (MEB).

Se realizó microscopia electrónica de barrido que permitió observar ambas caras, así como también el plano transversal de las muestras de las membranas en estudio.

Las micrografías obtenidas de la membrana Strat-M® demostró que sus características morfológicas coinciden con lo descrito en literatura. Es una membrana que proporciona predicciones útiles basadas en la partición en la difusión pasiva de medicamentos y concuerda con lo establecido por Uchida et al., en 2014 entre otros trabajos.^{53,62,30}

Respecto a la cutícula de maguey se lograron apreciar sus características morfológicas. La micrografía de ambas superficies reveló que contiene estomas con sus respectivos ostiolos, de acuerdo a lo descrito en la literatura.^{67,68}

Las ceras son la principal barrera limitante a la difusión de solutos a través de la cutícula, a estas es atribuible la discrepancia de los resultados obtenidos en algunos de los ensayos realizados y la posibilidad que las moléculas quedarán atrapadas entre los polímeros lipofílicos que la constituyen,⁶⁸ a pesar de esta asertividad respecto a la membrana cuticular, basados en estudios realizados por Vargas Rodríguez et al., reporta que la permeabilidad de la cutícula de maguey es mayor en la cara adaxial (del exterior al interior) de la membrana.

Se indago el espesor de la epidermis humana de acuerdo con estudios en varios sujetos realizado por Sandby-Moller et al., es de $83.7 \pm 16.6 \mu\text{m}^{69}$ para realizar una comparación con las determinaciones realizadas en este trabajo de las membranas en estudio. Para Strat-M® y la cutícula de maguey se determinó un espesor de $278.3 \pm 8.391 \mu\text{m}$ y $127.3 \pm 5.543 \mu\text{m}$, respectivamente. Como se puede advertir, las dos membranas son de mayor grosor que el grosor de la epidermis humana. Se observó que a pesar de que la membrana sintética tiene un espesor mayor que la membrana vegetal, de manera general los resultados de K_p obtenidos de los compuestos probados fueron mayores en esta membrana.

No obstante que las membranas son distintas en morfología y grosor, se encontró un coeficiente de correlación de $(r) = 0.9686$, lo que sugiere que la membrana de maguey tiene un potencial como membrana para realizar estudios de permeabilidad de fármacos y productos naturales.

Se debe considerar que son pocos los compuestos ensayados para poder sustentar contundentemente esta aseveración. Lo último sale de los alcances de esta tesis. Sin embargo, en nuestro grupo de investigación se continúa evaluando la permeabilidad de más compuestos.

9. Conclusiones

Se evaluó la permeabilidad de los fármacos pirfenidona y cafeína, de los productos naturales 7-hidroxi-3,4-dihidrocajalina, piperina, curcumina y de la glucosa en dos tipos de membranas, la cutícula de maguey y la sintética Strat-M® Millipore. Los resultados de las pruebas estadísticas mostraron diferencia significativa respecto a los ensayos de permeabilidad con la membrana sintética Strat-M® Millipore con excepción del fármaco pirfenidona.

Se determinó una correlación (r) de 0.9686 de la permeabilidad entre la cutícula de maguey y la membrana sintética comercial Strat-M® Millipore.

Este trabajo es importante ya que se desarrolló una metodología innovadora, realizando estudios de difusión empleando una membrana vegetal, la cutícula de maguey, que podría ser útil para realizar estudios de permeabilidad.

10. Perspectivas

- Se sugiere continuar estudiando la permeabilidad de la cutícula de maguey ya que podría sustituir a las membranas sintéticas y las provenientes de tejido animal.
- Realizar experimentos empleando compuestos con solubilidad alta, baja permeabilidad y viceversa para observar el perfil de permeación de los mismos en la cutícula de maguey.
- Realizar experimentos comparando la permeabilidad de ambas caras de la cutícula de maguey.
- Efectuar experimentos *in vivo*, comparando la permeabilidad con la de cutícula de maguey.
- Realizar experimentos de permeabilidad *in vitro* empleando otras especies de Agave.

11. Referencias

1. Jiménez MM, Pelletier J, Bobin MF, Martini MC. Influence of encapsulation on the in vitro percutaneous absorption of octyl methoxycinnamate. *Int J Pharm.* 2004;272(1-2):45-55. doi:10.1016/j.ijpharm.2003.11.029
2. Simon A, Amaro MI, Healy AM, Cabral LM, de Sousa VP. Comparative evaluation of rivastigmine permeation from a transdermal system in the Franz cell using synthetic membranes and pig ear skin with in vivo-in vitro correlation. *Int J Pharm.* 2016;512(1):234-241. doi:10.1016/j.ijpharm.2016.08.052
3. Barbero AM, Frasch HF. Pig and guinea pig skin as surrogates for human in vitro penetration studies: A quantitative review. *Toxicol Vitro.* 2009;23(1):1-13. doi:10.1016/j.tiv.2008.10.008
4. EU Cosmetic Regulations | Directive 76/768/EEC, New EU Cosmetic Products Regulation (EC) No 1223/2009 and REACH | CIRCS. http://www.cirs-reach.com/Cosmetics_Registration/eu_cosmetics_directive_cosmetics_registration.html. Accessed November 26, 2018.
5. Haigh JM, Smith EW. The selection and use of natural and synthetic membranes for in vitro diffusion experiments. *Eur J Pharm Sci.* 1994;2(5-6):311-330. doi:10.1016/0928-0987(94)90032-9
6. Vivek J. Formulation development - In Vitro Diffusion Studies in Transdermal Research: A Synthetic Membrane Model in Place of Human Skin. <https://drug-dev.com/in-vitro-diffusion-studies-in-transdermal-research-a-synthetic-membrane-model-in-place-of-human-skin/>. Published 2012. Accessed February 15, 2019.
7. Brusco H alicia, López Costa JJ, Loidl CF. *Histología Médico-Práctica*. Barcelona, España; 2014.
8. Elaine Nicpon M. *Anatomía y Fisiología Humana*. 9a edición. Madrid (España): Pearson Educación; 2008. https://www.academia.edu/27665189/N_Marieb_Elaine_-_Anatomia_Y_Fisiologia_Humana_9ed. Accessed August 20, 2018.
9. Geneser F, Bruel A, Christensen EI, Tranum-Jensen J, Qvortrup K. *Histología*. 4ta edició. (Panamericana EM, ed.). México, D.F.; 2014.
10. Klaus W, A. L, I. S, Gilchrest B, Paller AS, Leffell DJ. *Fitzpatrick. Dermatología En Medicina General*. septima ed.; 2009.
11. Arenas Guzman R. *Dermatología. Atlas, Diagnóstico y Tratamiento*. 6a ed. Mc Graw-Hill Interamericana.; 2015. <https://accessmedicina.mhmedical.com/book.aspx?bookid=1538>. Accessed

March 4, 2019.

12. Allevato MA. *Sistemas Terapéuticos Transdérmicos*. 30th ed.; 2007.
13. Clarí Pons MA. *Estudios "in Vitro" e "in Vivo" de La Absorción Percutánea de La Bemiparina: Métodos de Valoración*. Valencia; 2004.
14. Ramachandran C, Fleisher D. Transdermal delivery of drugs for the treatment of bone diseases. *Adv Drug Deliv Rev*. 2000;42(3):197-223. doi:10.1016/S0169-409X(00)00062-4
15. M.D E, M. P. Epidermal Lipids, Barrier Function, and Desquamation. *J Invest Dermatol*. 1983;80(1):S44-S49. doi:10.1038/JID.1983.12
16. Barry BW. Novel mechanisms and devices to enable successful transdermal drug delivery. *Eur J Pharm Sci*. 2001;14(2):101-114. doi:10.1016/S0928-0987(01)00167-1
17. Hadgraft J. Recent developments in topical and transdermal delivery. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet*. 1996;21(2):165-173. doi:10.1007/BF03190266
18. Scheuplein R, Blank IH. Permeability of the Skin. 2019;51(4). doi:10.1152/physrev.1971.51.4.702
19. Lademann J, Otberg N, Jacobi U, Hoffman RM, Blume-Peytavi U. Follicular penetration and targeting. *J Invest Dermatol Symp Proc*. 2005;10(3):301-303. doi:10.1111/j.1087-0024.2005.10121.x
20. Naik A, Kalia YN, Guy RH. Transdermal drug delivery: Overcoming the skin's barrier function. *Pharm Sci Technol Today*. 2000;3(9):318-326. doi:10.1016/S1461-5347(00)00295-9
21. Simon L, Kim KS, Kanneganti K. Effects of epidermal turnover on the dynamics of percutaneous drug absorption. *Math Biosci*. 2011;229(1):16-21. doi:10.1016/j.mbs.2010.10.004
22. Villarino N, Landoni M. *Administración Transdérmica de Fármacos, Una Alternativa Terapéutica*. Vol 1. Buenos Aires, Argentina; 2006. http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/11189/Documento_completo.pdf?sequence=1. Accessed January 29, 2019.
23. Schumm P, Scoglio CM, van der Merwe D. A network model of successive partitioning-limited solute diffusion through the stratum corneum. *J Theor Biol*. 2010;262(3):471-477. doi:10.1016/j.jtbi.2009.10.016
24. Couto A, Fernandes R, Cordeiro MNS, Reis SS, Ribeiro RT, Pessoa AM. Dermic diffusion and stratum corneum: A state of the art review of mathematical models. *J Control Release*. 2014;177(1):74-83. doi:10.1016/j.jconrel.2013.12.005
25. Tari D, Haryan S, Patankar K, et al. A simple egg membrane model for understanding diffusion characteristics of nanoparticles and amino acids. *Curr Sci*. 2017;112(7):1574-1578. doi:10.18520/cs/v112/i07/1574-1578

26. Korinth G, Schaller KH, Drexler H. 4. *Arch Toxicol.* 2005;79(3):155-159. doi:10.1007/s00204-004-0618-4
27. Kladt C, Dennerlein K, Göen T, Drexler H, Korinth G. Evaluation on the reliability of the permeability coefficient (Kp) to assess the percutaneous penetration property of chemicals on the basis of Flynn's dataset. *Int Arch Occup Environ Health.* 2018;91(4):467-477. doi:10.1007/s00420-018-1296-5
28. Barbero AM, Frasch HF. Pig and guinea pig skin as surrogates for human in vitro penetration studies: A quantitative review. *Toxicol Vitro.* 2009;23(1):1-13. doi:10.1016/J.TIV.2008.10.008
29. Ng SF, Rouse JJ, Sanderson FD, Eccleston GM. The relevance of polymeric synthetic membranes in topical formulation assessment and drug diffusion study. *Arch Pharm Res.* 2012;35(4):579-593. doi:10.1007/s12272-012-0401-7
30. Uchida T, Kadhum WR, Kanai S, Todo H, Oshizaka T, Sugibayashi K. Prediction of skin permeation by chemical compounds using the artificial membrane, Strat-M™. *Eur J Pharm Sci.* 2015;67:113-118. doi:10.1016/j.ejps.2014.11.002
31. Karadzovska D, Riviere JE. Assessing vehicle effects on skin absorption using artificial membrane assays. *Eur J Pharm Sci.* 2013;50:569-576. doi:10.1016/j.ejps.2013.02.020
32. Haq A, Dorrani M, Goodyear B, Joshi V, Michniak-Kohn B. Membrane properties for permeability testing: Skin versus synthetic membranes. *Int J Pharm.* 2018;539(1-2):58-64. doi:10.1016/J.IJPHARM.2018.01.029
33. Castro, A. and Guerrero J. El agave y sus productos. *Temas Sel Ing Aliment.* 2013;7(2):53-61. doi:doi: 10.4067/S0718-07642011000600002
34. Mora-López JL, Reyes-Agüero JA, Flores-Flores JL, Beatriz Peña-Valdivia C, Aguirre-Rivera JR. *Variación Morfológica y Humanización de La Sección Salmianae Del Género Agave.* <http://www.colpos.mx/agrocien/Bimestral/2011/may-jun/art-6.pdf>. Accessed August 24, 2018.
35. José Jacinto R, García Moya E. Remoción Cuticular ("Mixiote") y Desarrollo Foliar en los Agaves Pulqueros (Agave Salmiana y A. Mapisaga). *Boletín la Soc Botánica México.* 2000;79(66):73-79. doi:10.17129/botsci.1613
36. Aguilar Juárez, Beatriz; Enríquez del Valle, José Raymundo; Rodríguez Ortíz, Gerardo; Granados Sánchez, Diódoro; Martínez Cerero B. El estado actual de Agave salmiana y A. mapisaga del Valle de México. *Rev Mex Agrosistemas.* 2014;1(2):106-120.
37. Heredia, A., Casado, C.G, Laguna, L. Reina, J.J, Serrano, J.M, Dominguez E. *La Cutícula Vegetal: Estructura y Funciones.* Vol 12.; 1998. https://www.miteco.gob.es/es/parques-nacionales-oapn/publicaciones/ecologia_12_18_tcm30-100621.pdf. Accessed

November 26, 2018.

38. Tafolla-Arellano JC, González-León A, Tiznado-Hernández ME, García LZ, Báez-Sañudo R. Composición, fisiología y biosíntesis de la cutícula en Plantas. *Rev Fitotec Mex.* 2013;36(1):3-12. doi:ISSN 0187-7380
39. Lallana M, Billard E. C, Elizalde JH, Lallana VH. Breve revisión sobre las características de lacutícula vegetal y penetración de herbicidas. *Ciencia, Docencia y Tecnol.* 2006;XVII(33). <http://www.redalyc.org/html/145/14503310/>. Accessed November 28, 2018.
40. Franz TJ. Percutaneous absorption. On the relevance of in vitro data. *J Invest Dermatol.* 1975;64(3):190-195. doi:10.1111/1523-1747.ep12533356
41. Alves AC, Ramos II, Nunes C, et al. On-line automated evaluation of lipid nanoparticles transdermal permeation using Franz diffusion cell and low-pressure chromatography. *Talanta.* 2016;146:369-374. doi:10.1016/j.talanta.2015.08.070
42. Baena Y, Dallos LJ, Manzo RH, Ponce D'león LF. *Estandarización de Celdas de Franz Para La Realización de Ensayos de Liberación de Fármacos a Partir de Complejos Con Polielectrolitos.* Vol 40.; 2011. www.farmacia.unal.edu.co. Accessed September 13, 2018.
43. Estévez T, Aguilera A, Sáez A, Hardy E. *Diseño y Validación de Una Celda de Difusión Para Estudios de Liberación in Vitro de Biomoléculas.* Vol 17.; 2000.
44. Mecott-Rivera GÁ, Aguilar-Baqueiro JA, Bracho S, et al. Pirfenidone increases the epithelialization rate of skin graft donor sites. *Burns.* 2018;44(8):2051-2058. doi:10.1016/j.burns.2018.07.007
45. Rodrigues F, Alves AC, Nunes C, et al. Permeation of topically applied caffeine from a food by—product in cosmetic formulations: Is nanoscale in vitro approach an option? *Int J Pharm.* 2016;513(1-2):496-503. doi:10.1016/j.ijpharm.2016.09.059
46. Herman A, Herman AP. Caffeine's mechanisms of action and its cosmetic use. *Skin Pharmacol Physiol.* 2012;26(1):8-14. doi:10.1159/000343174
47. Rocha-González HI, Blaisdell-López E, Granados-Soto V, Navarrete A. Antinociceptive effect of 7-hydroxy-3, 4-dihydrocadalin isolated from *Heterotheca inuloides*: Role of peripheral 5-HT₁ serotonergic receptors. *Eur J Pharmacol.* 2010;649(1-3):154-160. doi:10.1016/j.ejphar.2010.09.022
48. Quijia CR, Chorilli M. Characteristics, Biological Properties and Analytical Methods of Piperine: A Review. *Crit Rev Anal Chem.* 2019;0(0):1-16. doi:10.1080/10408347.2019.1573656
49. Verma A, Kushwaha HN, Srivastava AK, et al. Piperine attenuates UV-R induced cell damage in human keratinocytes via NF-κB, Bax/Bcl-2 pathway: An application for photoprotection. *J Photochem Photobiol B Biol.*

2017;172(3453):139-148. doi:10.1016/j.jphotobiol.2017.05.018

50. Rafiee Z, Nejatian M, Daeihamed M, Jafari SM. Application of curcumin-loaded nanocarriers for food, drug and cosmetic purposes. *Trends Food Sci Technol.* 2019;88(December 2018):445-458. doi:10.1016/j.tifs.2019.04.017
51. Chen L, Han L, Lian G. Recent advances in predicting skin permeability of hydrophilic solutes. *Adv Drug Deliv Rev.* 2013;65(2):295-305. doi:10.1016/j.addr.2012.05.001
52. Esparza Martínez F de MA, Pérez Romo PA. *Estudio de Permeabilidad En Cutícula de Maguey Como Alternativa Para Estudiar Permeabilidad de Fármacos.* México; 2015.
53. Haq A, Goodyear B, Ameen D, Joshi V, Michniak-Kohn B. Strat-M® synthetic membrane: Permeability comparison to human cadaver skin. *Int J Pharm.* 2018;547(1-2):432-437. doi:10.1016/j.ijpharm.2018.06.012
54. Brilla E, Schosinky K, Esquivel M, Chavarria M. Cuantificación de la glucosa por el método de la O - T oluidina. 1977.
55. Secretaría de Salud, Comisión permanente de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos. *Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos (FEUM)* 11 ed. México.2014. 2011.
56. Parmar VK, Desai SB, Vaja T. RP-HPLC and UV Spectrophotometric Methods for Estimation of Piperfenidone in Pharmaceutical Formulations. *Indian J Pharm Sci.* 2014;76(3):225-229.
57. Galicia Alcántara DM. Estudio de difusióntransdérmicain vitro de 7-hidroxi-3,4-dihidrocajalina aislado de *Heterotheca inuloides* Cass (*Arnica mexicana*) utilizando membranas sintéticas Strat-M. 2015.
58. Gorgani L, Mohammadi M, Najafpour GD, Nikzad M. Sequential Microwave-Ultrasound-Assisted Extraction for Isolation of Piperine from Black Pepper (*Piper nigrum* L.). *Food Bioprocess Technol.* 2017;10(12):2199-2207. doi:10.1007/s11947-017-1994-0
59. Naveen P, Lingaraju H, Deepak M, Medhini B, Prasad KS. Method Development and Validation for the Determination of Caffeine: An Alkaloid from *Coffea arabica* by High-performance Liquid Chromatography Method. *Pharmacognosy Res.* 2018;10(1):88. doi:10.4103/PR.PR_79_17
60. González-Albadalejo J, Sanz D, Claramunt RM, Lavandera JL, Alkorta I, Elguero J. Curcumin and curcuminoids: chemistry, structural studies and biological properties. *An Real Acad Farm.* 2015;81:278-310. <https://www.analesranf.com/index.php/aranf/article/viewFile/1665/1706>. Accessed November 21, 2018.
61. Hernandez Valencia RE. Micromorfología de la epidermis foliar de plantas sanas y enfermas de *Agave tequilana* Weber. 2005. <http://repositorio.uaaan.mx:8080/xmlui/bitstream/handle/123456789/3607/K>

62. Kaur L, Singh K, Paul S, Singh S, Singh S, Jain SK. A Mechanistic Study to Determine the Structural Similarities Between Artificial Membrane Strat-M™ and Biological Membranes and Its Application to Carry Out Skin Permeation Study of Amphotericin B Nanoformulations. *AAPS PharmSciTech*. 2018;19(4):1606-1624. doi:10.1208/s12249-018-0959-6
63. Brain KR, Chilcott RP. Physicochemical Factors Affecting Skin Absorption. *Princ Pract Ski Toxicol*. 2008:83-92. doi:10.1002/9780470773093.ch5
64. Ribeiro ACF, Santos CIAV, Barros MCF, et al. Salt effects on the diffusion of caffeine in aqueous solutions. *Fluid Phase Equilib*. 2013;338:197-203. doi:10.1016/j.fluid.2012.11.017
65. Abdulkarim MF, Abdullah GZ, Chitneni M, et al. Topical piroxicam in vitro release and in vivo anti-inflammatory and analgesic effects from palm oil esters-based nanocream. *Int J Nanomedicine*. 2010;5(1):915-924. doi:10.2147/IJN.S13305
66. Hilton J, Wollen B, Scott RC, Auton TR, Trebilcock KL, Wilks M. Vehicle effects on in vitro percutaneous absorption through rat and human skin. 1994.
67. Caballero A, Roca E. *La Importancia De Los Estomas*. España; 2018.
68. Vargas-rodríguez L, García-vieyra MI, León-bata BI. Physical properties and microscopic structure of the Agave Salmiana cuticle (mixiote). 2018;17:1-9. doi:10.5154/r.rchsza.2017.12.017
69. Sandby-Moller J, Poulsen T, Wulf HC. Epidermal Thickness at Different Body Sites: Relationship to Age, Gender, Pigmentation, Blood Content, Skin Type and Smoking Habits. *Acta Derm Venereol*. 2003;83(6):410-413. doi:10.1080/00015550310015419

12. Anexos

12.1. Curvas Patrón para la determinación de la concentración

En el Cuadro A 1 se muestran las concentraciones empleadas para las curvas patrón construidas de cada uno de los compuestos empleados

Cuadro A 1. Curvas patrón de concentraciones conocidas.

Compuesto	Solvente	Concentraciones para curva (mg/mL)
Pirfenidona	acetonitrilo	0.46305, 0.18522, 0.09261, 0.01852, 0.000926 y 0.000185.
7-hidroxi-3,4-dihidrocafeína	acetonitrilo	0.10, 0.050, 0.025, 0.0125, 0.00625, 0.003125 y 0.001563.
Piperina	etanol	0.10, 0.050, 0.0125, 0.00625 y 0.003125.
Curcumina	solución de etanol-agua (50:50)	0.18419, 0.09209, 0.04604, 0.023024 y 0.011512.
Glucosa	solución acuosa de ácido benzoico (0.2 g/100 mL)	5.0, 3.0, 2.0, 1.0, 0.50, 0.250, 0.125.

* Se realizó la lectura de las curvas de igual manera que sus respectivas muestras, descritas en la sección de Metodología, punto 6.2.3 y 6.2.4.

12.2. Gráficas de las curvas calibración construidas

12.2.1 Pirfenidona

Cuadro A 2. Curva patrón de Pirfenidona

Concentración (mg/mL)	AUC		
	área 1	área 2	área 3
0.000185	12883	82935.000000	91907.000000
0.000926	238465	533173.000000	203272.000000
0.018522	345102	205589.000000	382581.000000
0.092610	1748880	1990494.000000	1683170.000000
0.185220	3796291	4054775.000000	3674488.000000
0.463050	9389431	1.087507e+007	1.031533e+007

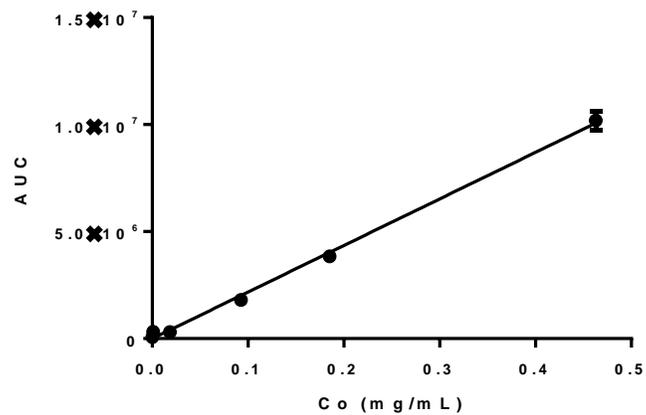


Figura A 1. Curva patrón de pirfenidona, área bajo la curva contra la concentración en (mg/mL).

12.2.2 7-hidroxi-3,4-dihidrocajalina

Cuadro A 3. Curva patrón de 7-hidroxi-3,4-dihidrocajalina

Concentración (mg/mL)	AUC		
	área 1	área 2	área 3
0.000781	58893	57174	56923
0.001563	136724	135696	136312
0.003125	191724	175541	184919
0.00625	881113	639882	712911
0.0125	863051	706415	736099
0.025	1540218	1486099	1407107
0.050	3280562	2843977	2559404
0.10	6268679	6008276	5767721

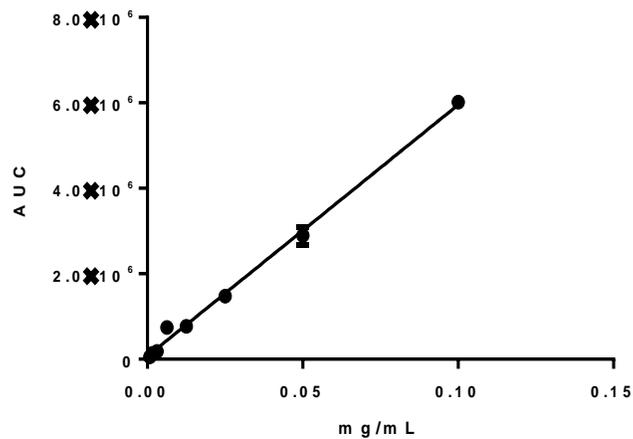


Figura A 2. Curva patrón de 7-hidroxi-3,4-dihidrocajalina, área bajo la curva la concentración en (mg/mL).

12.2.3 Glucosa

Cuadro A 4. Curva patrón de glucosa

Concentración (mg/mL)	ABS		
	absorbancia 1	absorbancia 2	absorbancia 3
0.125	0.111	0.102	0.120
0.250	0.160	0.180	0.174
0.500	0.302	0.305	0.318
1.0	0.497	0.438	0.470
2.0	0.697	0.779	0.621
3.0	1.146	1.130	1.124
5.0	1.470	1.604	1.483

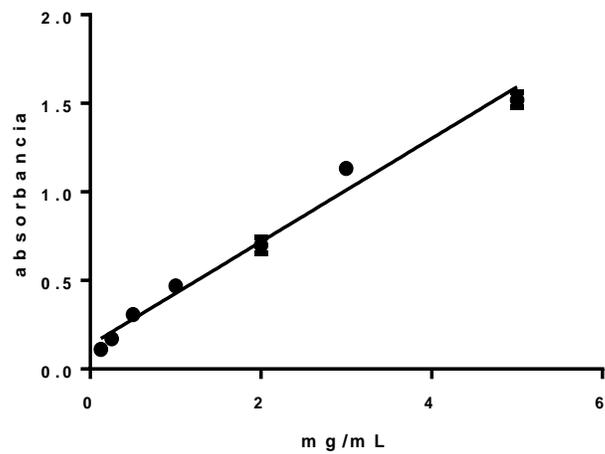


Figura A 3. Curva patrón de glucosa, absorbancia contra la concentración en (mg/mL).

12.2.4 Piperina

Cuadro A 5. Curva patrón de piperina

Concentración (mg/mL)	AUC		
	área 1	área 2	área 3
0.003125	164494	182766	182767
0.006250	297573	336565	338632
0.0125	574051	745594	677964
0.025	1495086	1491095	1524224
0.050	2224224	2436419	1819119
0.10	5389217	5910584	6067005

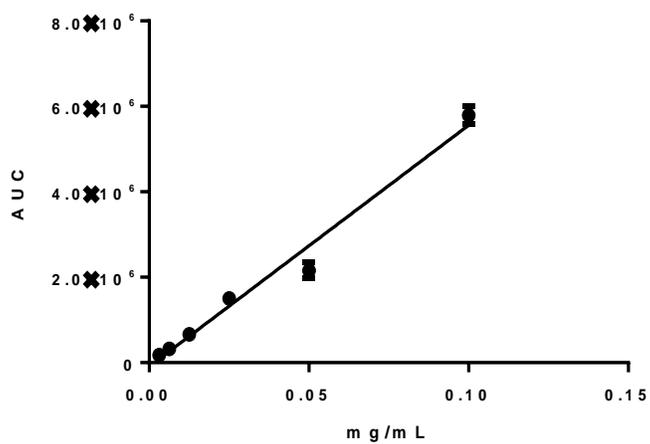


Figura A 4. Curva patrón de piperina, área bajo la curva la concentración en (mg/mL).

12.2.5 Curcumina

Cuadro A 6. Curva patrón de curcumina

Concentración (mg/mL)	ABS		
	absorbancia 1	absorbancia 2	absorbancia 3
0.1842	0.8176666	0.8086666	0.8046667
0.0920	0.5533333	0.5533333	0.6133333
0.046	0.2913333	0.2913333	0.2913333
0.023	0.1593333	0.1593333	0.2033333
0.012	0.1036667	0.1036667	0.065000

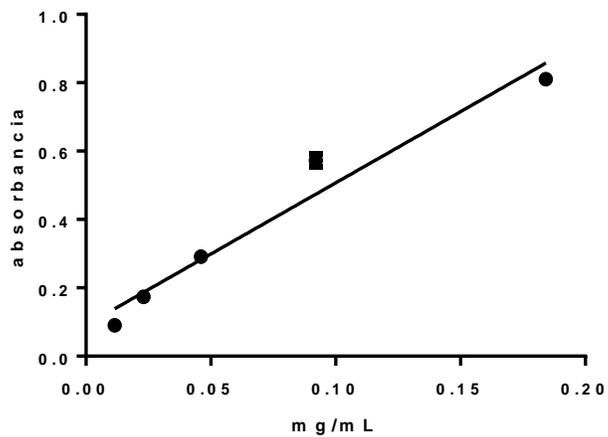


Figura A 5. Curva patrón de curcumina, absorbancia contra la concentración en (mg/mL).