



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

**EVALUACIÓN DEL EFECTO DE DISTINTOS EXCIPIENTES EN LA ABSORCIÓN A
TRAVÉS DE PIEL *IN VITRO* DE UN CORTICOSTEROIDE**

**PROYECTO DE INVESTIGACIÓN
PARA OPTAR POR EL GRADO DE**

MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA

Q. MIGUEL ANGEL ROMERO AGUILAR

Dra. Flora Adriana Ganem Rondero

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

Ciudad Universitaria, Cd. Mx. febrero de 2020



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Agradecimientos

A la UNAM por brindarme la mejor formación académica.

A mi tutora, la Dra. Flora Adriana Ganem Rondero, por sus consejos, todo el apoyo, guía y paciencia brindado durante la realización del proyecto.

Al CONACYT por la beca otorgada (884963) para la realización de mis estudios de maestría.

A los proyectos PAPIIT/UNAM (IN226119) y PIAPI/UNAM (1803) por los recursos otorgados para la realización del proyecto.

A la Dra. María Guadalupe Nava Arzaluz, la M. en C. Brígida del Carmen Camacho Enríquez, la Dra. María Gabriela Vargas Martínez y mis compañeros Dr. Sergio Bernal, Dra. Angélica Villanueva, Dra. Laura Hernández, Dr. Marco Espinosa, LF. Sergio Miranda por la asesoría y capacitación que me brindaron.

A mi esposa Edith, mi hijo Isaac, mi madre Josefina y mis hermanos Lucía y Marco por todo su apoyo.

Este trabajo se realizó en el laboratorio de Investigación y Posgrado en Tecnología Farmacéutica (L-322) dentro las instalaciones de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Campo 1, UNAM.

Los avances de trabajo fueron presentados en

4° Congreso De Ciencia, Educación Y Tecnología, que se llevó a cabo del 19 al 22 de junio de 2018 en las instalaciones de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, con el título “VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO PARA LA CUANTIFICACIÓN DE BETAMETASONA EN ESTUDIOS DE PERMEACION EN PIEL”.

5° Congreso de Ciencia, Educación y Tecnología, que se llevó a cabo del 17 al 21 de junio de 2019 en la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, con el título “ESTUDIO DEL EFECTO DE MODULADORES DE PERMEACIÓN SOBRE LA BARRERA CUTÁNEA MEDIANTE PRUEBAS BIOFÍSICAS”.

Dedicado a mi esposa Edith y mi hijo Isaac, este proyecto no fue fácil, pero estuvieron motivándome y ayudándome hasta donde sus alcances lo permitían, gracias por la paciencia y amor que me brindaron a cada paso.

Índice

1. Introducción	1
2. Marco Teórico	1
2.1. La piel	1
2.2. Vías de permeación transdérmica	2
2.3. Moduladores de la permeación	3
2.4. Espectroscopía de Infrarrojo, pérdida de agua transepidermal y grado de eritema	5
2.5. Corticosteroides: La betametasona	6
3. Objetivos	6
3.1. General	6
3.2. Particulares	7
4. Metodología	7
4.1. Reactivos	7
4.2. Equipos	7
4.3. Material biológico	7
4.4. Otros materiales	8
4.5. Métodos	8
5. Resultados y discusión	10
5.1. Método de cuantificación	10
5.2. Grado de eritema	10
5.3. Pérdida de agua transepidermal	11
5.4. Espectroscopía de Infrarrojo por Transformada de Fourier / Reflectancia Total Atenuada	12
5.5. Estudios de permeación	18
5.6. <i>Tape stripping</i>	19
6. Conclusiones	20
7. Referencias	21

1. Introducción

La piel actúa como una barrera bio-física entre el cuerpo y el medio ambiente para prevenir la pérdida excesiva de agua y la absorción de xenobióticos (1). La función de barrera de la piel es proporcionada por el estrato córneo (EC), una estructura simple tipo ladrillo-mortero que mide entre 10-15 micrómetros de espesor y está compuesta por una capa cornificada de células muertas y aplanadas, ricas en proteínas (corneocitos) incrustadas en una matriz lipídica de composición única, la cual consiste en una mezcla casi equimolar de cerca de 20 tipos de ceramidas de diversas longitudes de cadena, lípidos, colesterol y una mezcla de ácidos grasos libres de 18-36 carbonos (2). El EC tiene origen en el final del proceso de diferenciación equilibrada, comenzando en la capa basal de la epidermis, donde las células progenitoras se dividen y los queratinocitos recién emergidos son empujados hacia el lado apical de la epidermis (3) (fig. 1). En los últimos 20 años, la estructura y bioquímica del EC ha sido estudiada ampliamente, demostrando la gran importancia de los lípidos, especialmente las ceramidas (3), por lo que puede asumirse que cualquier daño en estos lípidos ya sea por enfermedad o lesiones puede aumentar la permeabilidad y disminuir las propiedades de barrera de la piel (4).

El interés de la formulación de un sistema transdérmico radica en la posibilidad de modificar de manera reversible las propiedades de barrera de la piel, ya sea por métodos físicos o químicos para la administración de fármacos, logrando de esta manera reducir la frecuencia de administración, consiguiendo periodos prolongados inter-administración y una menor dosis del fármaco necesaria para alcanzar un efecto terapéutico, con la reducción simultánea de los efectos secundarios no deseados, comunes en la mayoría de las formas de administración sistémica (5). A pesar de que la piel ha sido ampliamente utilizada como una ruta de administración para terapia local, también ha resultado una excelente alternativa para la administración sistémica en relación a las vías convencionales como la oral y la parenteral (6).

2. Marco Teórico

2.1. La piel

La piel es el órgano más grande del organismo y corresponde a cerca del 16 % del peso total. Está compuesta de tres capas, la epidermis, la dermis y la hipodermis (fig. 1A y tab. 1). Una de las funciones principales de la piel es fungir como barrera para evitar la entrada de agentes exógenos, incluyendo microorganismos (fig. 1B). Los mecanismos por los cuales puede hacer esto incluyen la producción de péptidos antimicrobianos, células de Langerhans epidérmicas residentes y células T epidérmicas transitorias; además, la baja hidratación del EC y la continua descamación ayuda a prevenir cualquier crecimiento sostenido de organismos (7). Adicionalmente, juega un papel muy importante en la termorregulación y previene la excesiva pérdida de agua del organismo (8).

La piel, además de actuar como una barrera biofísica entre el cuerpo y el medio ambiente ha sido ampliamente utilizada como una ruta de administración para terapia local y sistémica (1). Los vehículos empleados en los productos tópicos y transdérmicos tienen un efecto modulador, ya sea aumentando o retardando la absorción de fármacos. La pérdida de agua transepidermal (TEWL, por sus siglas en inglés) es uno de los parámetros más importantes para evaluar la función de barrera de la piel. Un TEWL bajo es

generalmente característico de una función de protección de la piel adecuada, mientras que valores elevados han sido observados en enfermedades como la dermatitis atópica y la psoriasis (9).

Tabla 1. Estructura y composición de la piel (7)

Composición de la piel	
Epidermis	<p>Estrato basal: Generalmente compuesta por una capa gruesa de células que dan origen a todas las células, entre ellas los queratinocitos.</p> <p>Estrato espinoso: Las células basales se mueven hacia la superficie formando una capa de células poliédricas conectadas por desmosomas, en esta capa se localizan las células de Langerhans.</p> <p>Estrato granuloso: Las células descargan sus componentes lipídicos en el espacio intercelular (importante en la función de barrera y la cohesión del EC). Los queratinocitos en la capa granular contienen gránulos intracelulares de queratohialina. El citoplasma también contiene gránulos lamelares más pequeños (cuerpos de Odland), los cuales contienen lípidos que son secretados en el espacio intercelular conformando la matriz lipídica que rodea a los corneocitos del EC.</p> <p>Estrato lúcido: Las células que se encuentran en esta capa todavía están nucleadas y se denominan células de transición.</p> <p>Estrato córneo: Es la capa más externa de la epidermis y está compuesta de las células que han migrado desde el estrato granuloso, que han perdido sus núcleos y orgánulos citoplasmáticos. Esta capa suele ser más gruesa en las palmas de las manos y las plantas de los pies. Sus componentes principales son:</p> <ul style="list-style-type: none"> ❖ Corneocitos: Apilados de 18-20 capas, dependiendo de la zona del cuerpo, funciona como barrera física. ❖ Corneodesmosomas: Funcionan como “remaches” que mantienen los corneocitos juntos, se degradan gradualmente produciendo una descamación ordenada. ❖ Lípidos: Llenan la tortuosidad entre los corneocitos incrustados, su composición lipídica provee la barrera permeable. ❖ Barrera de enzimas lipolíticas y proteolíticas: Se involucran en los procesos pro-barrera y degradación de los desmosomas, contribuyen a la actividad biológica en el EC.
Dermis	<p>Está limitada externamente por su unión con la epidermis e internamente por la hipodermis, su grosor varía ampliamente dependiendo de la zona del cuerpo, contiene fibroblastos que sintetizan fibras de colágeno y elastina, las cuales proporcionan la elasticidad a la piel, sus propiedades cambian tanto cualitativa como cuantitativamente con el envejecimiento.</p>
Hipodermis	<p>Contiene células grasas, llamadas adipocitos, protege al cuerpo contra lesiones mecánicas, su principal función es la de almacenar energía en forma de grasa.</p>

2.2. Vías de permeación transdérmica

Las tres rutas principales de permeación a través del EC son las vías intercelular, intracelular y folicular (fig. 1C) (10). No obstante, la mayoría de las moléculas ingresan por vía intercelular, seguida de la folicular en donde suelen acumularse nanopartículas, formando un depósito a partir del cual puede ocurrir la liberación de los fármacos. La intracelular es muy poco probable pues los compuestos tendrían que atravesar la densa masa proteínica de los corneocitos y la matriz lipídica intercelular.

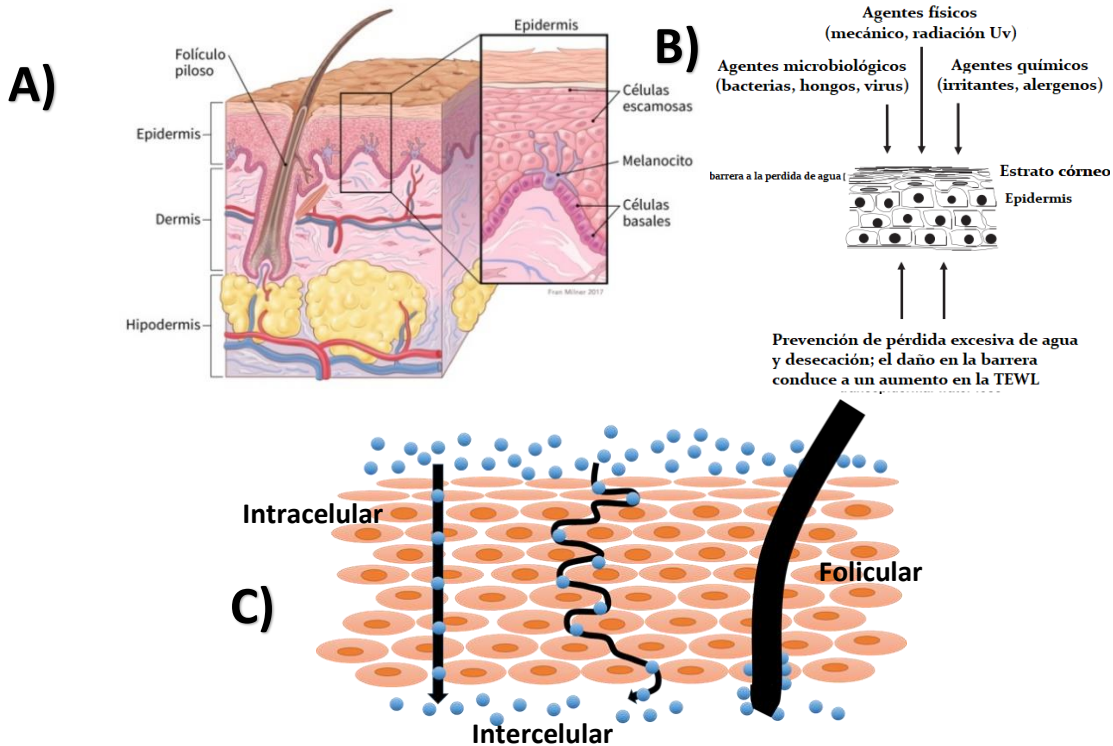


Figura 1. A) Estructura de la piel (11). B) Función de barrera del EC (1). C) Rutas de permeación transdérmica (10). TEWL: Pérdida de agua transepidermal (por sus siglas en inglés)

2.3. Moduladores de la permeación

Los moduladores de permeación son compuestos o estrategias que alteran de manera reversible la barrera de permeación de la piel. De manera general, pueden clasificarse en promotores o retardadores. La clasificación se basa en las características del compuesto, los mecanismos de acción, las técnicas de caracterización y el papel en la administración del medicamento (12). A pesar del comportamiento contrastante de los promotores y los retardadores, se los conoce colectivamente como "moduladores o modificadores de penetración", ya que ambos actúan modificando la estructura del EC. La permeabilidad de la piel se ve afectada principalmente por las propiedades fisicoquímicas de la molécula, el tipo de formulación, el método de liberación y el tipo de piel (12), también existe la posibilidad de manipular el flujo de la permeación cambiando la actividad termodinámica del fármaco en la formulación (13); sin embargo, la propiedad de promotor o retardante puede invertirse dependiendo del vehículo y la formulación (14), por lo que es importante tener en mente que el efecto modulador es altamente dependiente del disolvente usado y las propiedades fisicoquímicas de los vehículos (15).

2.3.1. Promotores

Hasta la fecha ningún promotor ha demostrado ser ideal, sin embargo, existen propiedades que son deseables, tales como: no ser tóxico, irritante o causar alergia, ser de acción rápida, tener una actividad y duración del efecto predecible y reproducible, no presentar actividad farmacológica (sin unión a los sitios receptores), mantener una función de forma unidireccional (facilitando el ingreso del agente terapéutico, evitando pérdida de material endógeno del cuerpo), permitir una rápida y completa restauración de las propiedades de barrera una vez que se retire, además de ser compatible con los excipientes y fármacos,

finalmente ser aceptable cosméticamente con un "sensorial" apropiado para la piel. Aunque ningún promotor cumple con todos ellos, algunos productos químicos demuestran varios de los atributos anteriores (16).

Los promotores se pueden dividir en promotores químicos (disolventes o compuestos capaces de alterar de manera reversible la barrera de permeabilidad) e.g., etanol, surfactantes, sales biliares, ácidos grasos, ciclodextrinas, urea, ácido salicílico; y promotores físicos, e.g., sonoforesis, iontoforesis, electroporación, radio frecuencia, láser, vapor súper caliente, microagujas e inyector libre de agujas. Adicionalmente existen los nanoacarreadores, que pueden ser combinados con otras técnicas para promover el paso de los activos y en algunos casos crear depósitos (e.g., nanopartículas en folículo piloso) (17).

Los posibles mecanismos de acción pueden variar sus efectos directos sobre la piel, por ejemplo, un promotor efectivo puede actuar alterando los lípidos y/o proteínas del EC, modificando la partición EC/vehículo (16), alterando la composición del EC o bien disminuyendo el grosor de la piel, facilitando el paso a través del EC (13). Los mecanismos de acción recopilados en la tabla 2 explican los efectos potenciadores sobre el EC (16).

2.3.2. Retardantes

Los retardantes de permeación, a diferencia de los potenciadores o promotores, disminuyen la difusión de los activos aplicados al fortalecer la organización lipídica intercelular del EC, e.g., para diclofenaco, naproxeno y piroxicam la presencia de alquilgliceroles hace más eficiente la barrera del EC, lo que se traduce en la reducción de la permeación del fármaco (15). Los retardantes reportados en la literatura son a menudo análogos estructurales de promotores potentes, e.g., 3-dodecanoiloxazolidin-2-ona es un análogo estructural del laurocapram (14). Dentro del área cosmética (filtros UV, repelentes, etc.) y la industria agroquímica (pesticidas), entre otros, este comportamiento es de suma importancia ya que lo que se espera de estos agentes es que permanezcan en la superficie de la piel y no penetren, evitando provocar efectos sistémicos no deseados; hay también activos que se espera que penetren en la piel, pero que permanezcan en ella sin pasar a circulación sistémica (efecto local) (18).

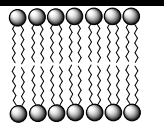
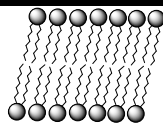
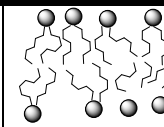
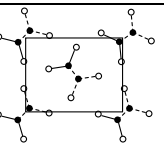
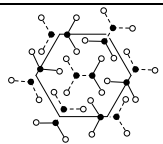
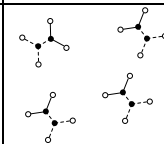
Tabla 2. Mecanismo de acción de los promotores (16)

Acción directa	Acción indirecta
<p>Acción sobre la queratina intracelular del EC, desnaturalizando o modificando su conformación, aumentando la hidratación e incrementando el volumen de los corneocitos.</p> <p>Afectación de los desmosomas disminuyendo la cohesión entre corneocitos.</p> <p>Modificación de los dominios lipídicos intercelulares reduciendo la función de la barrera formada por la bicapa lipídica. Los promotores (e.g., surfactantes) se insertan entre las cadenas lipídicas disminuyendo la temperatura de transición vítrea de los lípidos y promueven con ello el incremento en la proporción de isómeros gauche, lo que se traduce en dominios lipídicos desordenados.</p>	<p>Modificación de la actividad termodinámica del vehículo. La evaporación de un disolvente presente en la formulación (e.g., etanol), genera <i>in situ</i> un vehículo sobresaturado que promueve la penetración del fármaco.</p> <p>Flujo del promotor hacia el interior de la piel (e.g., disolventes como el etanol), alterando la composición del EC y promoviendo el transporte de activos (incremento de la partición hacia el EC).</p>

2.4. Espectroscopía de Infrarrojo, pérdida de agua transepidermal y grado de eritema

La FTIR/ATR (espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier con reflexión total atenuada) ha sido ampliamente utilizada para estudiar el efecto de una formulación sobre los componentes de la piel, ya que provee información sobre el ordenamiento conformacional de los lípidos y proteínas de membrana. Entre las bandas más estudiadas se encuentran las que corresponden a las cadenas hidrocarbonadas de los lípidos (*estrechamiento simétrico* 2850 cm^{-1} y *asimétrico* 2920 cm^{-1}), así como las de *tijereteo* alrededor de 1468 cm^{-1} y las de *rocking* en 720 y 730 cm^{-1} , las cuales indican la presencia del empaquetamiento ortogonal. La separación de estas bandas es indicativo del grado de interacción entre los dominios ortorrómbico y hexagonal (tab. 3), un doblete en ese intervalo corresponde a la interacción de las cadenas de lípidos adyacentes por un acoplamiento de corto alcance (19). De forma similar un singulete en 721 cm^{-1} indica la prevalencia de un empaquetamiento hexagonal. Estas bandas se observan en un intervalo de $20\text{-}40\text{ °C}$ (2). Las posiciones de las bandas amida I y amida II proporcionan información sobre la estructura secundaria de las proteínas (20). Se ha reportado que un desplazamiento de las bandas relacionadas con lípidos hacia números de onda mayores, está asociado con la desorganización de los mismos, debido a un incremento en la proporción de isómeros *gauche*, lo que comúnmente se conoce como “fluidización de los lípidos”. Esta desorganización normalmente correlaciona muy bien con incrementos en los valores de TEWL y mayor cantidad permeada hacia y a través de la piel. Por el contrario, un desplazamiento de estas bandas hacia números de onda menores, se asocia con un incremento en el ordenamiento de los lípidos (incremento en la proporción de isómeros *trans*), disminución en los valores de TEWL y menor permeabilidad de la piel (2). En diversas ocasiones, parámetros adicionales son evaluados con el fin de obtener información extra sobre la fisiología de la piel o las reacciones que se pueden ir presentando en ella, como consecuencia el color de la piel o grado de eritema (GE), permanece como un parámetro valioso que se puede cuantificar objetivamente mediante diversos métodos instrumentales (21). Aunque no es deseable que una formulación provoque irritación en la piel, en general, hay una correlación directa entre la eficacia de un promotor y la irritación provocada (a mayor irritación, mayor permeabilidad). Esto sucede con algunos surfactantes iónicos, por lo que se prefiere el uso de los no iónicos, los cuales, aunque no son tan efectivos, no dañan la piel.

Tabla 3. Comportamiento de los lípidos en el EC (19)

	Ortorrómbico	Hexagonal	Cristal líquido
Conformación de la cadena			
Empaquetamiento lateral			

2.5. Corticosteroides: La betametasona

En general los corticosteroides son usados para el tratamiento de procesos inflamatorios de la piel que no sean producidos por infecciones, por ejemplo, dermatitis atópica, eczema, quemaduras de sol y picaduras de insectos, por lo que no son eficaces en el tratamiento de: urticaria aguda o crónica, mastocitosis cutánea, acné vulgar, rosácea, dermatitis periorificial, queratosis pilar, psoriasis ungueal, ictiosis, pudiendo empeorar las lesiones ulceradas o infectadas. En el caso del prurito sólo son beneficiosos si la causa del picor es la inflamación (5). Sin embargo, su uso prolongado puede causar varios efectos adversos ya sean sistémicos como la supresión renal, hiperglicemia y glaucoma o locales como acné o alteraciones en la piel, por lo que se buscan formulaciones y técnicas que disminuyan su absorción y paso a circulación sanguínea favoreciendo su retención en la piel. Cuanto más soluble es un corticoide en agua, menor es su eficacia y potencia, ésta es la razón por la cual los corticoides modernos presentan moléculas fuertemente sustituidas, menos polares y menos solubles (22).

La betametasona, cuya estructura se muestra en la figura 2 ($\log p=1.83_{\text{exp}}$) es un potente corticosteroide usado para una amplia variedad de enfermedades inflamatorias como el asma, la artritis, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa y problemas de la piel, entre otras (23). Aplicado en piel tiene un efecto inhibitorio de la síntesis de la poliamina, componente activo en la proliferación y crecimiento celulares, produce supresión del sistema inmune, inhibición de la síntesis del ADN de los queratinocitos y vasoconstricción (23). Su administración transdérmica ayuda a mitigar los efectos a largo plazo generados por el uso de corticosteroides por otras vías.

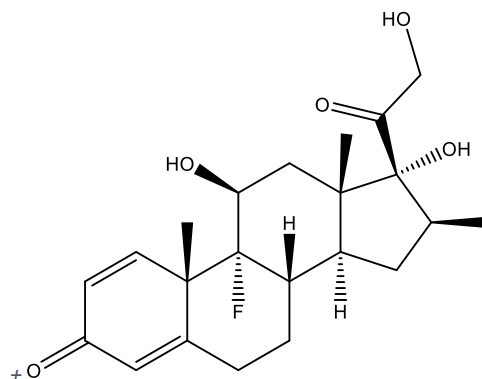


Figura 2. Estructura de la betametasona

3. Objetivos

3.1. General

Evaluar y comparar el efecto de distintos vehículos sobre la barrera de permeabilidad de la piel, empleando técnicas como espectroscopía de infrarrojo por transformada de Fourier (FTIR/ATR), pérdida de agua transepidermal (TEWL), y grado de eritema (GE), así como mediante pruebas de permeación en piel *ex vivo*, utilizando como fármaco modelo betametasona.

3.2. Particulares

- 3.2.1. Desarrollar métodos analíticos por espectrofotometría UV/visible y por HPTLC (cromatografía de capa fina de alta resolución, por sus siglas en inglés), para la cuantificación de betametasona en los estudios de permeación.
- 3.2.2. Realizar estudios de permeación de betametasona, incluida en distintos vehículos (PEG 300 en Transcutol® (20 % v/v), alcohol batílico en Transcutol® (1 % w/v) y Transcutol®, a través de piel *ex vivo* empleando celdas de permeación verticales tipo Franz.
- 3.2.3. Estudiar la distribución del fármaco en la piel al finalizar los estudios de permeación, mediante la técnica de *tape stripping*.
- 3.2.4. Evaluar el efecto de los vehículos sobre los componentes membranales mediante FTIR/ATR, TEWL y GE.
- 3.2.5. Comparar los resultados obtenidos con los distintos excipientes, sentando las bases para estudios posteriores en líneas celulares, para la propuesta de formulaciones y para la realización de pruebas *in vivo*.

4. Metodología

4.1. Reactivos

- ❖ Betametasona micronizada (donada por Laboratorios Senosiain S.A. de C.V., México).
- ❖ Alcohol batílico (Sigma-Aldrich, U.S.A.).
- ❖ Transcutol P® (Gattefossé, Francia).
- ❖ Metanol (Fermont, México).
- ❖ Hidróxido de sodio (Fermont, México).
- ❖ Fosfato de potasio monobásico (Fermont, México).
- ❖ Kollisov® PEG E 300 (Sigma, Alemania).
- ❖ Brij 58 (Sigma, U.S.A).
- ❖ Cloroformo (Química Suastes, México).

4.2. Equipos

- ❖ Balanza analítica (Shimadzu ATX224, Filipinas).
- ❖ Microbalanza (Mettler, Suiza).
- ❖ Potenciómetro (Corning 430, U.S.A.).
- ❖ Recirculador de líquidos con termostato (PolyScience, U.S.A.).
- ❖ Baño de agua para permeación (fabricado en una casa de acrílicos).
- ❖ Parrilla de agitación magnética (IKA® C-MAOHS7, U.S.A.).
- ❖ Agitador magnético multiplaza (IKA® RO15PS, U.S.A.).
- ❖ Celdas de permeación tipo Franz modificadas.
- ❖ Dermatoma eléctrico (Zimmer®, U.S.A.).
- ❖ Tewameter® TM 300 (Courage+Khazaka electronic GmbH, Alemania).
- ❖ Mexameter® MX 18. (Courage+Khazaka electronic GmbH, Alemania).
- ❖ Espectrofotómetro UV/visible (U-500 HITACHI, China).
- ❖ Espectrofotómetro de infrarrojo (ABB-MB3000, Canadá) acoplado a dispositivo ATR MIRacle™ con cristal de ZnSe (ABB, Canadá).
- ❖ Automatic TLC sampler 4,(Camag, Suiza).
- ❖ TLC Scanner 3, (Camag, Suiza).

4.3. Material biológico

Orejas de cerdo obtenidas del rastro antes de ser sometidas a tratamiento con agua caliente.

4.4. Otros materiales

- ❖ Cinta adhesiva para empaque Tuck® T-182 (Industrias Tuck, México).
- ❖ Placas para TLC de aluminio con sílica gel 60 F₂₅₄. (WEPA APOTHEKENBEDARF GmbH & Co.KG, Alemania).
- ❖ Membranas Strat M® (Merck Millipore, Irlanda).

4.5. Métodos

4.5.1. Medición de GE, TEWL y FTIR/ATR

Las pruebas se realizaron en seis voluntarios sanos sobre la zona interna del antebrazo (previa firma de carta de consentimiento informado). Se marcaron zonas de 2x2 cm con 1 cm de espacio entre cada una, las cuales fueron asignadas para un contacto con los vehículos de 30, 60, 120 y 180 min (fig. 3), enseguida les fue tomado el valor inicial (t=0) con el equipo correspondiente (apartado 4.5.1.1.-4.5.1.3.), a continuación, se colocó el volumen necesario para cubrir la zona asignada (90 µL de las soluciones), utilizando agua destilada como control, finalmente se generó un ambiente oclusivo cubriendo el antebrazo con plástico adherible. Al cumplirse cada tiempo establecido se descubrió la zona, se limpió con algodón ligeramente humedecido y se dejó secar al aire libre por 15 min antes de la obtención de la medición. Para el análisis de resultados de GE y TEWL se usó la siguiente relación: (v_1/v_0) , donde v_1 corresponde al valor después de la aplicación del vehículo y v_0 al valor obtenido antes del tratamiento (piel no tratada). De esta manera es posible intuir un aumento [$(v_1/v_0) > 1$] o disminución [$(v_1/v_0) < 1$] en la propiedad analizada. Posteriormente, con la relación de valores se realizó un análisis de varianza (ANOVA por sus siglas en inglés). En el caso de FTIR/ATR, para las pruebas con voluntarios se registraron cambios en la forma (e.g., ensanchamiento o aparición de hombros) y desplazamiento de las bandas; mientras que para los análisis con piel de cerdo se aplicó la segunda derivada a los datos en los intervalos seleccionados.

4.5.1.1. Grado de eritema (GE)

Se determinó realizando 10 mediciones por zona, empleando un Mexameter® MX 18 (Courage+Khazaka electronic GmbH, Alemania).

4.5.1.2. Pérdida de agua transepidermal (TEWL)

Se determinó efectuando 50 mediciones por zona, empleando un Tewameter® TM 300 (Courage+Khazaka electronic GmbH, Alemania).

4.5.1.3. Espectroscopía de infrarrojo por transformada de Fourier/ Reflectancia total atenuada (FTIR/ATR)

Se empleó un Espectrómetro FT-IR MB3000 (ABB-MB3000, Canadá) con dispositivo ATR MIRacle™ (cristal de ZnSe). Se obtuvieron 150 interferogramas con resolución de 16 cm⁻¹ (voluntarios) y 2 cm⁻¹ (piel de cerdo) en un rango de 3000-650 cm⁻¹. Se obtuvieron los datos del espectro, se corrigió línea base en los intervalos planteados, se convirtieron las señales de % Transmitancia a Absorbancia (Excel) y se normalizaron los datos usando mínimos y máximos mediante el software Prism 5. Posteriormente se calculó la segunda derivada (24).

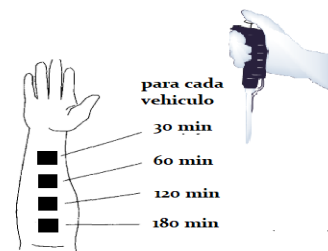


Figura 3. Área de aplicación para cada vehículo

4.5.2. Estudios de permeación

Para estos estudios, se empleó piel de la parte posterior de la oreja de cerdo, mencionado en la sección 4.3. Una vez separada de la oreja, la piel se cortó con un Dermatoma eléctrico (Zimmer®, U.S.A.) a un grosor aproximado de 750 µm y se montó entre el compartimiento donador y el receptor de celdas tipo Franz. En el compartimiento receptor se colocó una solución de Brij 58® al 5% en buffer de fosfatos (pH=7.4) y en el donador se colocaron 0.5 mL de los siguientes vehículos saturados con betametasona: PEG 300 en Transcutol® (20 % v/v), alcohol batílico en Transcutol® (1 % w/v), o Transcutol®. Los sistemas se mantuvieron en agitación por 32 h en baño de agua a 37 °C, tomando el volumen total del receptor restituyéndolo cada 4 h. Concluido el tiempo, se retiró la piel, se enjuagó y limpió suavemente para retirar el exceso de formulación y se almacenó en congelación a -20 °C hasta su uso en la prueba de *tape stripping*. Se validó un método espectrofotométrico UV/visible para la cuantificación de betametasona en buffer de fosfatos 0.2M (pH= 7.4) con Brij 58® al 5% ($y = 0.0412x + 0.0019$, $r^2 = 0.9977$, $CV_{PI} = 1.72$, $LC = 0.97558$ µg/mL, $LD = 0.32194$ µg/mL).

Para determinar las concentraciones del donador se saturó el medio con betametasona, posteriormente se centrifugó y se recolectó el sobrenadante, se tomó un volumen conocido y se llevó al aforo con la solución de Brij 58® al 5% en buffer de fosfatos 0.2 M y pH=7.4, el valor obtenido se interpoló usando la curva de calibración por UV/visible.

Para calcular la concentración del fármaco remanente en la piel se utilizó la piel después de haber practicado el *tape stripping*, la cual se recortó en trozos pequeños y se puso en agitación por 24 h en metanol. Concluido ese tiempo se evaporó el disolvente y se reconstituyó con el medio utilizado como receptor en los estudios de permeación y el valor se interpoló en la curva de calibración construida por UV/visible.

4.5.3. *Tape stripping*

La técnica de *tape stripping* se realizó colocando en una superficie plana la piel empleada en el apartado 4.5.2 sobre la cual se adhirieron secuencialmente trozos de cinta adhesiva para empaque de la marca Tuck® T-182 previamente pesados de 1x1 cm (n=16), posteriormente se hizo incidir en 10 ocasiones un rodillo de 900 g de manera uniforme sobre la superficie de la cinta colocada en la piel, finalmente se desprendió la cinta de la piel y se obtuvo nuevamente el peso de la misma. La diferencia entre el peso final y el inicial de cada cinta se utilizó para calcular la distancia de penetración del fármaco con ayuda de las ecuaciones siguientes:

$$\rho_{SC} = \frac{1g}{cm^3} = v_{SC} , \quad d_{pen} = \frac{v_{SC}}{A_{celda}}$$

Donde ρ_{SC} =densidad del EC, v_{SC} =volumen del EC, A_{celda} =área de la celda=0.7854 cm² y d_{pen} =distancia de penetración.

4.5.4. *Cromatografía en capa fina de alta resolución (HPTLC)*

Se realizó la evaluación de las muestras de *tape stripping* por cromatografía en capa fina (HPTLC) utilizando el procedimiento reportado por Wulandari & Indrayanto (24), con fase móvil cloroformo:metanol:agua (18:5:0.5). Para tomar en cuenta las interferencias debidas a la cinta y la piel,

se construyó una curva con medio preparado a partir del procedimiento del *tape stripping*. Por lo tanto, se empleó piel de la parte posterior de la oreja de cerdo (sec. 4.3), sobre la cual se le colocaron trozos de cinta adhesiva para empaque de la marca Tuck® T-182, a continuación se hizo incidir en 10 ocasiones un rodillo de 900 g de manera uniforme sobre la superficie de la cinta, posteriormente se desprendió la cinta de la piel y se recortó en trozos pequeños que se pusieron en agitación en metanol por 24 h, este procedimiento se realizó en repetidas ocasiones sobre un área específica emulando lo realizado en las muestras reales. De esta forma, el metanol en contacto con las cintas y la piel se empleó como medio para la curva de calibración de betametasona ($RF= 0.63$, $y= 868.15+12.665x$, $r^2= 0.9989$, $LC= 1.90 \mu\text{g}$, $LD= 0.63 \mu\text{g}$).

5. Resultados y discusión

5.1. Método de cuantificación

Los métodos empleados para la cuantificación de betametasona tanto en el medio receptor en los estudios de permeación, como en las extracciones de la piel (método UV/visible) y para la técnica de *tape stripping* (método HPTLC), cumplieron con los criterios establecidos en la guía de validación del colegio de QFB (25) para muestras biológicas.

5.2. Grado de eritema

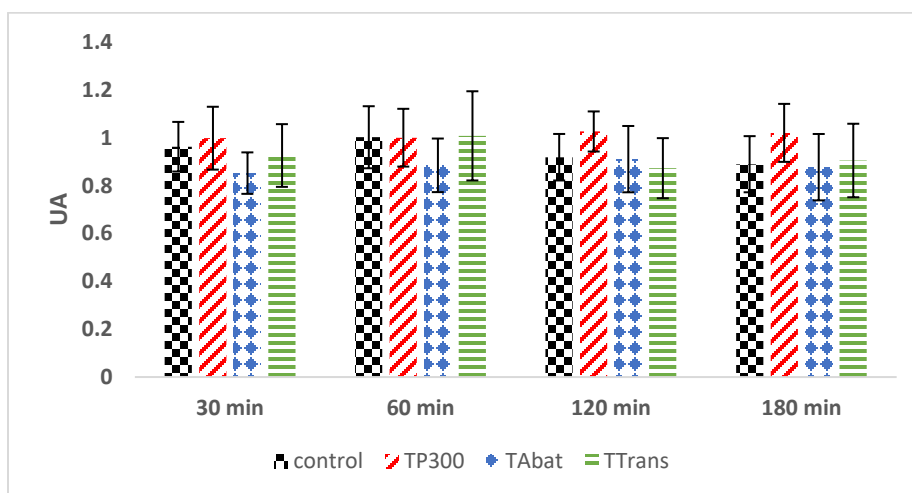


Figura 4. Evaluación de GE en voluntarios ($n=6$). T=después del tratamiento, Trans=Transcutol®, Abat= alcohol batílico/Transcutol®, P300=polietilenglicol/Transcutol®, control= tratamiento con agua

El eritema es un enrojecimiento de la piel ocasionado por procesos inflamatorios o inmunológicos, que resulta de la acumulación de células del sistema inmunitario. Entre las causas de eritema se encuentra la exposición a radiación solar, picaduras de insectos, exposición al calor y contacto con distintas sustancias. En este trabajo se midió el grado de eritema (GE) con la intención de determinar si la exposición a los vehículos estudiados causaba algún grado de irritación en la piel. Como se puede observar en la figura 4, el tratamiento control (agua) muestra que la oclusión generada y un incremento en el tiempo de contacto disminuyen el GE. Se sabe que formas leves de irritación como la sequedad, la rigidez o la aspereza dependen de la hidratación de la piel (20). En el momento de la oclusión el contenido de agua del EC

puede acercarse al 400% del peso seco del tejido, por lo tanto los corneocitos absorben agua y se hinchan (16). Además, las bicapas lipídicas intercelulares pueden formar estructuras parecidas a vesículas, y debido a que el GE se calcula con la cantidad de luz que fue absorbida por la piel (26) la presencia de estas vesículas o el aumento en la distancia debida al hinchamiento de los corneocitos podría interferir en la medición, dando valores de GE menores. De cualquier modo, los valores obtenidos son correspondientes a irritación mínima (según fabricante).

La tabla 4 muestra los resultados de la prueba de múltiples rangos, donde puede verse el comportamiento de los distintos vehículos a los diferentes tiempos de contacto y donde se han identificado grupos homogéneos para los diferentes tiempos, 2 grupos a 60 y 180 minutos y 3 a 30 y 120 min.

Tabla 4. Prueba de múltiples rangos para Grado de eritema. Método: 95.0 porcentaje LSD. No existen diferencias estadísticamente significativas entre aquellos niveles que compartan una misma columna

Sistema	Grupos Homogéneos			
	30 min	60 min	120 min	180 min
TAbat	X	X	X	X
Ttrans	X	X	XX	X
Control	XX	X	X	X
TP300	X	X	X	X

5.3. Pérdida de agua transepidermal

La prueba de pérdida de agua transepidermal o TEWL (por sus siglas en inglés) es una de las técnicas más empleadas para determinar alteraciones en la barrera de permeabilidad de la piel. Como ya se explicó, un incremento en el TEWL implica que la barrera está disminuida y que el ingreso de sustancias exógenas se ve favorecido. Como se puede observar en la figura 5 y en la tabla 5, los valores de la TEWL muestran un aumento y posterior disminución de los valores, lo que indicaría el retorno al estado basal de la piel. Durante los primeros 30 minutos los vehículos no presentan diferencias significativas entre ellos, en los 60 min los vehículos se diferencian presentado una tendencia al aumento, en este caso el PEG 300 es el que se mantiene más cercano al estado basal; para los 120 minutos los vehículos de Transcutol® y PEG 300 tienen un comportamiento similar, mientras que el alcohol batílico muestra una marcada disminución en los valores. Finalmente, a los 180 minutos todos los vehículos tienen diferencias, sin embargo, los valores son muy similares al comportamiento inicial (ver fig. 5 y tab. 5). Habitualmente el contenido de agua del EC es del 15-20% del peso seco, ya que la piel humana contiene una mezcla humectante higroscópica de aminoácidos, derivados de aminoácidos y sales denominadas factor de hidratación natural (NMF por sus siglas en inglés) (27).

En el caso del control se podría considerar la presencia de una vía acuosa de poros en el estrato córneo, que consiste en sitios de degradación del corneodesmosoma incrustados dentro de las bicapas lipídicas que bajo condiciones de alto estrés (como hidratación extensa, iontoforesis o ultrasonido) se pueden expandir e interconectar para formar una "vía de poros" continua. La formación de tal ruta mejoraría notablemente la penetración de fármacos, el agua restante dentro del tejido es "libre" y está disponible para actuar como disolvente dentro de la membrana para permeantes polares (16).

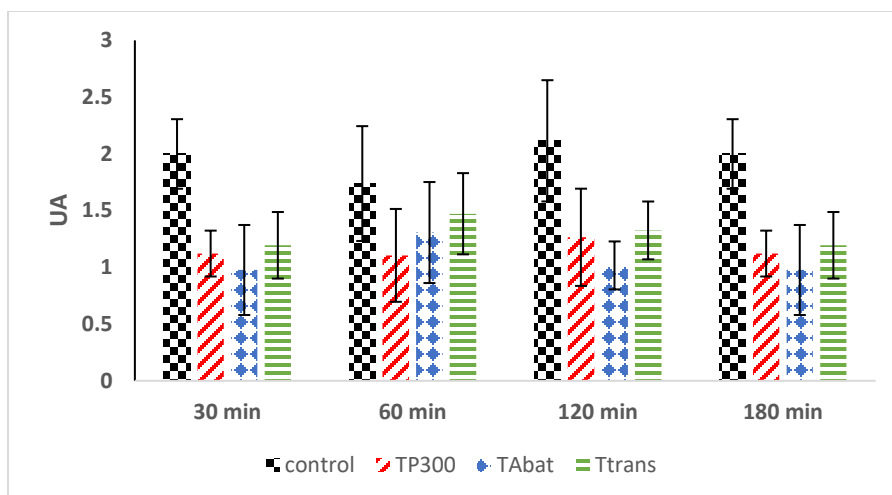


Figura 5. TEWL medido en voluntarios. T=después del tratamiento, trans=Transcutol®, Abat= alcohol batílico/Transcutol®, P300=polietilenglicol/Transcutol®, control=tratamiento con agua

Para el caso de Transcutol® puro es probable que se desplace a las regiones acuosas de las bicapas en el EC, quedando inmovilizado (retenido). Está reportado que los efectos del Transcutol® sobre EC consisten principalmente en (i) aumentar la solubilidad/partición del fármaco en el EC; (ii) mantener la dinámica de hidratación en el EC al ser un disolvente higroscópico; y (iii) fluidización lipídica intercelular (ver análisis FTIR/ATR) (27). Debido a su naturaleza, el alcohol batílico disminuye el efecto del Transcutol®, lo que se ve reflejado en la disminución de TEWL respecto al que se observó con Transcutol® puro. Este efecto ha sido reportado con anterioridad por Bernal-Chávez *et al.* (15) por lo tanto se sustenta la función retardante del alcohol batílico sobre el efecto del Transcutol® en la piel.

Tabla 5. Prueba de múltiples rangos para TEWL. Método: 95.0 porcentaje LSD. No existen diferencias estadísticamente significativas entre aquellos niveles que compartan una misma columna

Sistema	Grupos Homogéneos			
	30 min	60 min	120 min	180 min
TAbat	X	X	X	X
TTrans	X	X	X	X
TP300	X	X	X	X
Control	X	X	X	X

5.4. Espectroscopía de Infrarrojo por Transformada de Fourier / Reflectancia Total Atenuada

5.4.1. FTIR/ATR en voluntarios

La espectroscopía de infrarrojo ayuda a vislumbrar el mecanismo de acción de sustancias moduladoras de la absorción. En este trabajo se realizaron pruebas tanto *in vivo*, en voluntarios, como *ex vivo*, en piel de cerdo. Las dos bandas relacionadas a los estrechamientos simétricos y asimétricos de las cadenas hidrocarbonadas de los lípidos que aparecen aproximadamente en 2850 y 2920 cm^{-1} , son las más referenciadas y cualquier cambio en ellas es indicativo de alteración de los lípidos intercelulares (la vía de entrada más probable para prácticamente todos los solutos).

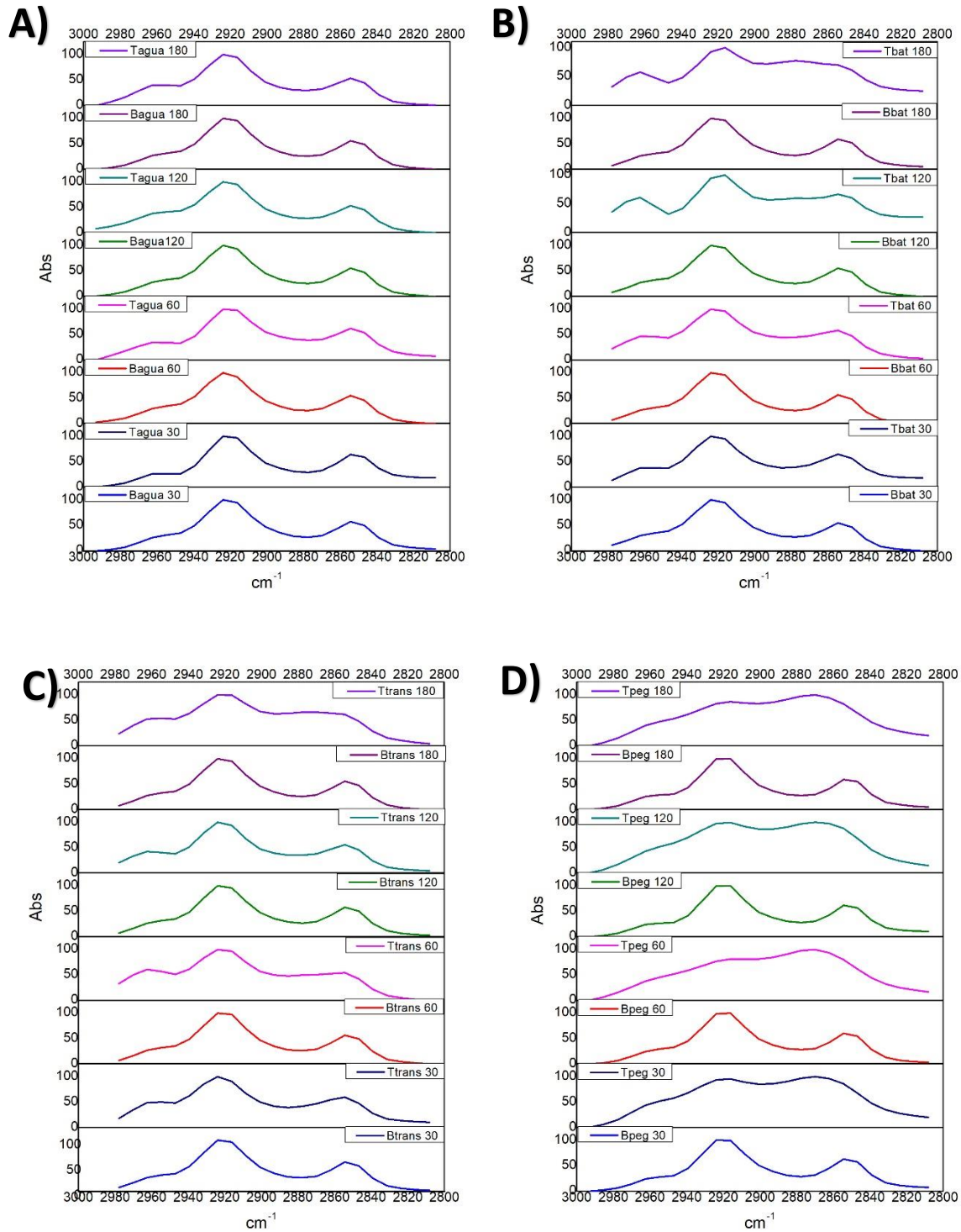


Figura 6. Resultados de las pruebas con FTIR/ATR para la piel de voluntarios después de ser tratada con los distintos vehículos a los 30, 60, 120 y 180 minutos. Se muestran bandas relacionadas a las cadenas hidrocarbonadas de los lípidos a 2850 cm^{-1} y 2920 cm^{-1} . B=antes del tratamiento, T=después del tratamiento, trans=Transcutol®, Abat= alcohol batílico/Transcutol®, P300=polietilenglicol/Transcutol®, tratamiento con agua= control

La figura 6 muestra el comportamiento de estas bandas después del tratamiento de la piel de los voluntarios con los tres vehículos. Como se puede observar, durante el tratamiento control (fig. 6A) no hubo modificación de los lípidos, esto ha sido reportado con anterioridad (16). El incremento en el volumen de los corneocitos por efecto de la sobre-hidratación, no afecta el empaquetamiento lateral de los lípidos del EC. El tratamiento con Transcutol® (fig. 6C) provoca la deformación de la banda en 2854 cm^{-1} , haciéndose cada vez más ancha hasta que a los 180 min la forma de la banda prácticamente se ha perdido, haciéndose más plana, además de la aparición de otra banda en 2962 y 2972 que corresponde al estrechamiento simétrico y asimétrico de CH_3 - de los lípidos de membrana (28). Para el caso del alcohol batílico solo se observa un ligero desplazamiento a valores más bajos para los 120 y 180 min (fig. 6B) y el comportamiento es muy similar al tratamiento con Transcutol® (fig. 6C); sin embargo, al relacionar los desplazamientos de las bandas con el TEWL se observa que el alcohol batílico disminuye los efectos sobre la barrera ejercidos por el Transcutol®, ya que en todos los tiempos sus valores son inferiores, como se mencionó en el apartado anterior esto concuerda con lo reportado por Bernal-Chavez (15). El efecto podría compararse con el comportamiento de los ácidos grasos, en los cuales las cadenas de alquilo saturadas de alrededor de C_{10} - C_{12} unidas a un grupo de cabeza polar constituyen promotores potentes (16). Por otro lado, el efecto solubilizante del Transcutol® y su capacidad humectante y promotora, propiciaría la entrada del alcohol batílico en el EC y su interacción con la barrera, aumentando su eficacia, disminuyendo el efecto del Transcutol® puro. Respecto al PEG 300 (fig. 6D) se observa que modifica la forma e intensidad de las bandas e incluso podría estar incorporado al EC. No obstante, los valores de TEWL presentan un aumento de entre 10-25 %, lo que implica una ligera modificación sobre el empaquetamiento lateral de los lípidos.

5.4.2. FTIR/ATR en piel *ex vivo*

Cuando las colas de los lípidos en la mezcla adoptan una organización lateral ortorrómbica, las vibraciones oscilantes se caracterizan por un doblete a 720 - 730 cm^{-1} aproximadamente. Este doblete es causado por la interacción de las cadenas lipídicas adyacentes a través de un acoplamiento de corto alcance; por el contrario cuando los lípidos adoptan la fase hexagonal, en lugar de un doblete se observa un singulete en 721 cm^{-1} (2). Como se puede observar en la figura 7 la piel sin tratamiento y la tratada con alcohol batílico tienen un comportamiento similar y permanecen sin cambios aparentes. El tratamiento con Transcutol® puro presenta un singulete a 721 cm^{-1} lo que indica la presencia un empaquetamiento hexagonal dominante, la adición de betametasona incrementa la organización hexagonal, reflejado en el aumento de la intensidad de la señal. Durante el tratamiento con PEG 300 no se observan la banda a 720 cm^{-1} , ni un aumento en la de 730 cm^{-1} , la organización lateral se pierde por completo, las cadenas exhiben un alto grado de isomerización *gauche* (19), pudiéndose hablar de la fluidización de los lípidos o la aparición de una fase líquido cristalino, la adición de betametasona en este caso no favorece la intensidad de la fase hexagonal. El intervalo de 1475 - 1460 cm^{-1} también brinda información sobre el empaquetamiento lateral de los lípidos intercelulares (29), de manera similar que para la banda a 720 cm^{-1} , dos bandas separadas es rasgo característico de la presencia de una fase ortorrómbica correspondiente al tijeeteo-CH. Por otro lado, el incremento en la banda alrededor de 1468 cm^{-1} es característico de una fase hexagonal. Como se puede ver en la figura 7, el tratamiento con PEG 300 afecta la intensidad de ambas bandas por lo que es posible la asignación de una fase líquido cristalina.

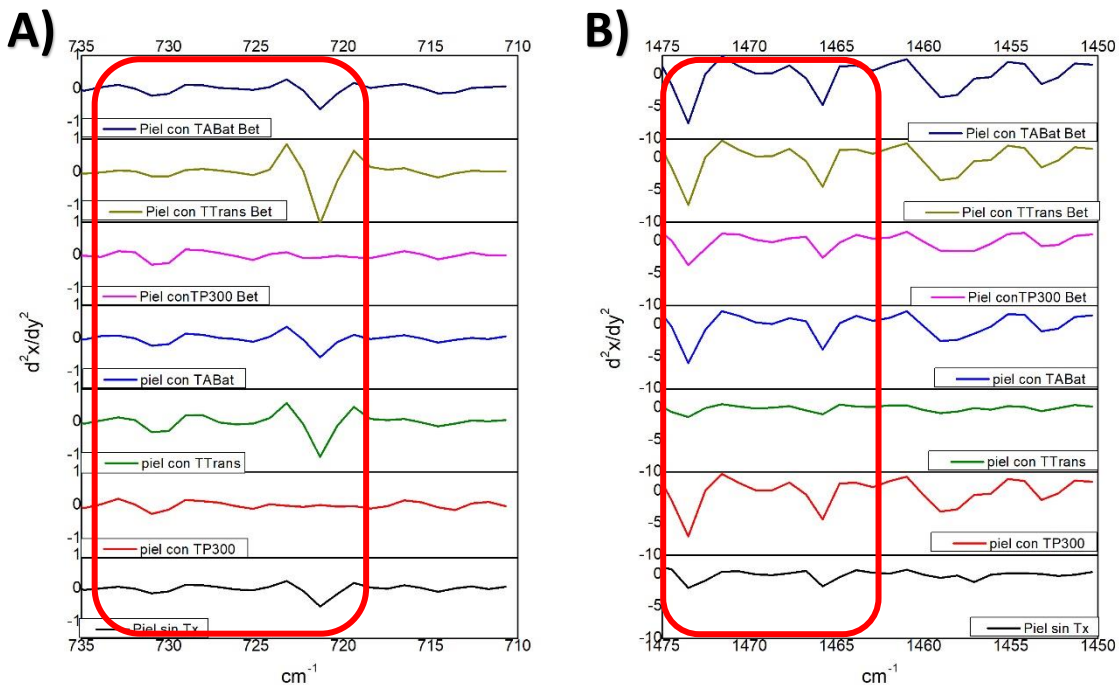


Figura 7. Resultados de las pruebas con FTIR/ATR para piel de cerdo después de ser tratada con los distintos vehículos durante 32 h. Se muestra la segunda derivada de las bandas relacionadas al balanceo (rocking) (A) y tijereteo (scissoring) (B) de las cadenas hidrocarbonadas de los lípidos a 720 cm^{-1} y 1468 cm^{-1} . T=tratamiento, P300=tratamiento con PEG 300, ABat= alcohol batílico, Trans=Transcutol[®], Bet= betametasona

La figura 8 presenta el efecto de los distintos vehículos sobre las bandas de Amidas. La Amida I (fig. 8A) se asocia a las proteínas y la Amida II (fig. 8B) con los residuos de ácidos grasos de las amidas (30)(19). Además de dar información de la estructura de la queratina (29), en ellas se puede observar que existe un efecto sobre las proteínas durante el tratamiento con PEG 300, donde la intensidad de las bandas se ve muy disminuida; mientras que en el caso de Transcutol[®] y alcohol batílico no presentan diferencias significativas respecto al control.

Las bandas en el intervalo de 1720-1740 (fig. 9), se deben al estrechamiento simétrico del C=O por la presencia de fosfolípidos, ésteres y glicéridos (29). La disminución en la intensidad de las bandas con el tratamiento con PEG 300 es indicativo de la afectación sobre los ácidos grasos de la piel. En el caso del tratamiento con alcohol batílico o Transcutol[®] puro, las intensidades en ese intervalo no varían respecto al control (15).

En cuanto a las señales correspondientes al estrechamiento asimétrico (fig. 10A), la banda prácticamente desaparece con el tratamiento con Transcutol[®], lo que podría significar una extracción de lípidos con este disolvente. El alcohol batílico/Transcutol[®] también provoca un ensanchamiento y bandas menos definidas, no obstante, la presencia del alcohol batílico reduce el efecto del Transcutol[®] puro. En ambos casos, el ligero desplazamiento (una unidad para alcohol batílico y tres para Transcutol[®]) hacia números de onda mayores podría relacionarse con un desordenamiento en el empaquetamiento lateral de los

lípidos. Para la banda de estrechamiento simétrico (fig. 10B) también se observa una disminución de las bandas con el tratamiento de Transcutol® y del mismo modo se observa un desplazamiento hacia números de onda mayores (una unidad para alcohol batílico y tres para Transcutol®), lo que implica el desordenamiento del empaquetamiento lateral (19).

A la temperatura de la piel ($\approx 32^\circ\text{C}$), los lípidos del EC humano adoptan predominantemente un empaque ortorrómbico muy denso, sin embargo, una pequeña subpoblación de lípidos también está presente en una organización hexagonal menos densa. Tanto las fases lamelares como el empaque lateral son importantes y se ha demostrado que desempeñan un papel en la función de barrera cutánea (2). En el EC humano, se han identificado 11 subclases principales de ceramidas basadas en cuatro bases esfingoides y tres tipos de cadenas de acilo (31). En cambio, el contenido de ceramidas de cadenas más cortas en el EC de cerdo es elevada en comparación con el EC humano. Los niveles reducidos de ceramidas de acilo contribuyen a un cambio en la organización de los lípidos (niveles reducidos de embalaje ortorrómbicos) y posteriormente a una función de barrera cutánea deteriorada. Esta podría ser la razón del aumento del nivel de lípidos que forman una fase ortorrómbica en el EC humano en comparación con el EC porcino (2), de manera que los cambios en los espectros de IR sean más notorios al usar piel de cerdo.

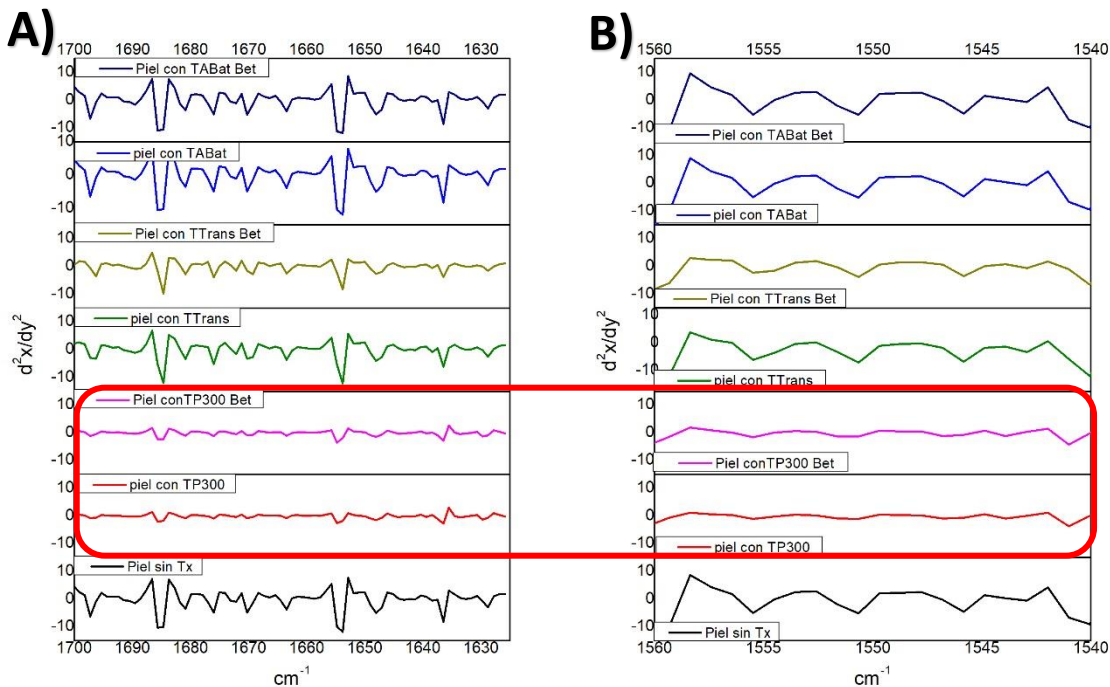


Figura 8. Resultados de las pruebas con FTIR/ATR para piel de cerdo después de ser tratada con los distintos vehículos durante 32 h. Se muestra la segunda derivada de las bandas relacionadas a Amida I (A) y Amida II (B). T=tratamiento, P300=tratamiento con PEG 300, ABat= alcohol batílico, Trans=Transcutol®, Bet= betametasona

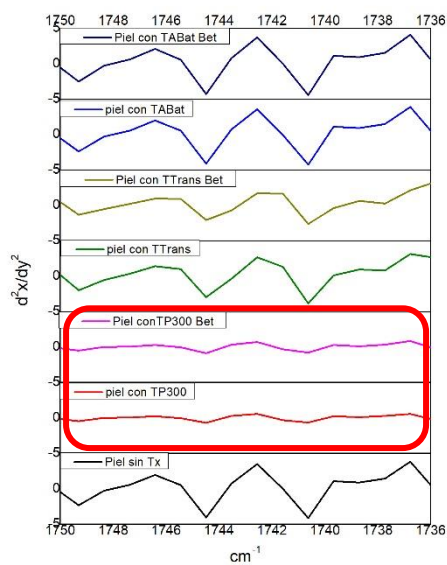


Figura 9. Resultados de las pruebas con FTIR/ATR para piel de cerdo después de ser tratada con los distintos vehículos durante 32 h. Se muestra la segunda derivada de las bandas relacionadas a los ácidos grasos. T=tratamiento, P300=tratamiento con PEG 300, ABat= alcohol batílico, Trans=Transcutol[®], Bet= betametasona

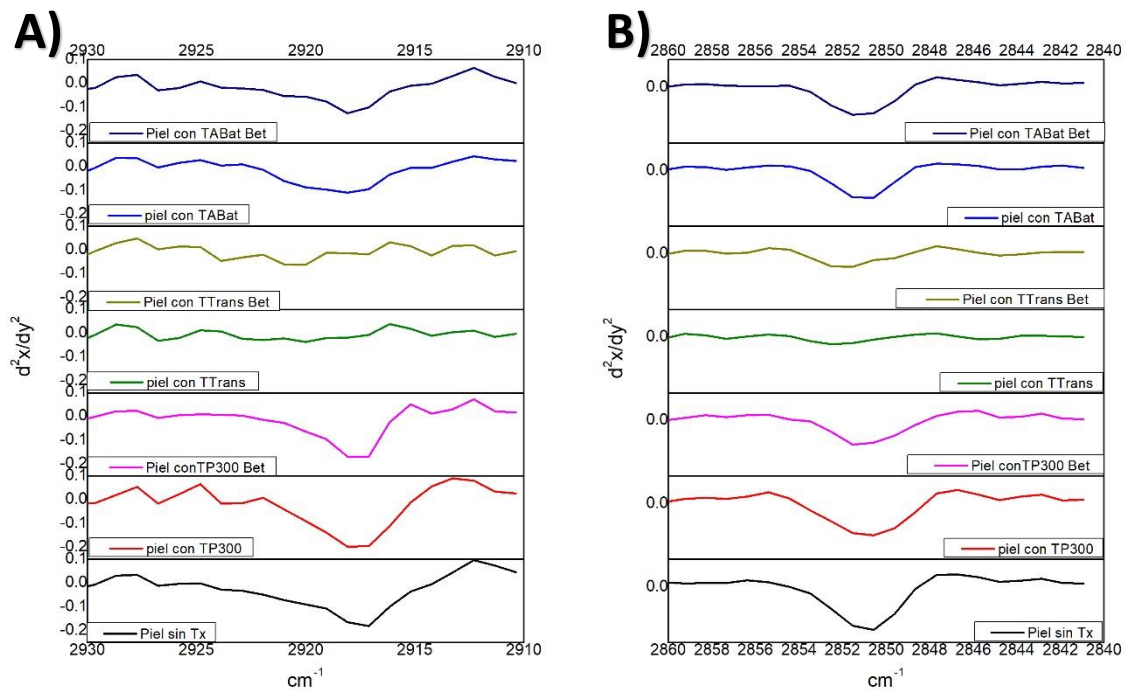


Figura 10. Resultados de las pruebas con FTIR/ATR para piel de cerdo después de ser tratada con los distintos vehículos durante 32 h. Se muestra la segunda derivada de las bandas relacionadas a estiramiento asimétrico (A) y estiramiento simétrico (B). T=tratamiento, P300=tratamiento con PEG 300, ABat= alcohol batílico, Trans=Transcutol[®], Bet= betametasona. Representación de la segunda derivada. (izquierda) (derecha)

La afinidad del Transcutol® preferentemente por entornos más polares se asocia a la perturbación del empaquetamiento de la cabeza de los lípidos intercelulares (27). El Transcutol® es un disolvente que puede aumentar la solubilidad del fármaco, en comparación con otros disolventes farmacéuticos aplicados tópicamente, por lo que puede tener una influencia dramática en la fuerza motriz termodinámica. En ambientes de poca humedad, así como al no considerar la actividad termodinámica, puede parecer que el Transcutol® retrasa en lugar de mejorar la penetración en la piel (27). Los resultados de FTIR correlacionan bien con los resultados de la permeación, donde como ya se mostró, la betametasona fue capaz de permear sólo mediante el uso de PEG 300/Transcutol®, esto puede atribuirse a los efectos sobre los ácidos grasos, el empaquetamiento lateral de los lípidos y las amidas I y II, además de correlacionar adecuadamente con los resultados obtenidos para TEWL y FTIR/ATR con los voluntarios.

5.5. Estudios de permeación

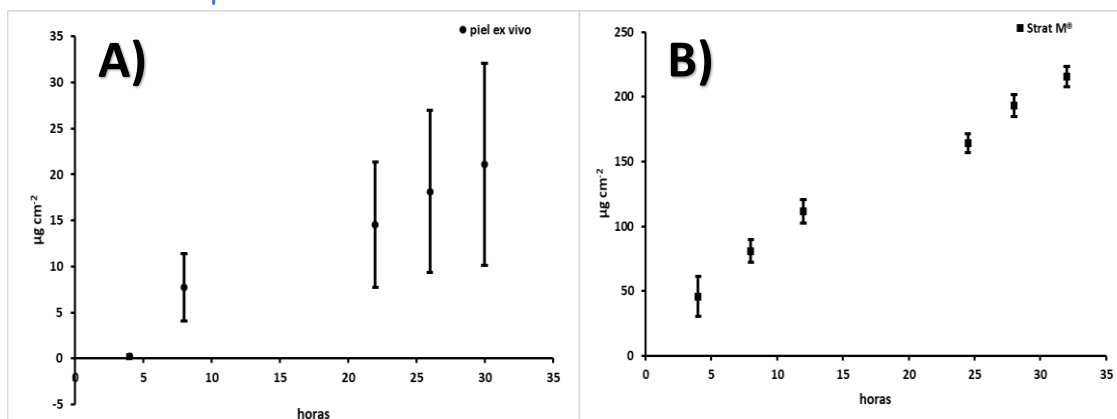


Figura 11. Perfiles de permeación de betametasona incluida en PEG 300/Transcutol®, a través de: (A) piel de cerdo; (B) membrana Strat M®. Se presentan los valores promedio \pm desviación estándar ($n=3$)

Se llevaron a cabo estudios de permeación con los tres vehículos antes mencionados, tanto a través de piel de cerdo, como de membranas sintéticas Strat-M® y lo que se encontró fue que la betametasona no es capaz de permear con los sistemas Transcutol® y alcohol batílico/Transcutol®. El único vehículo con el que el fármaco alcanzó el medio receptor fue PEG 300/Transcutol®. Como puede observarse en la figura 11 y en la tabla 6, la cantidad total permeada a 24 h fue mayor con la membrana Strat-M® (164.11 µg/cm²), que con la piel (16.70 µg/cm²), lo que corresponde a 9.8 veces con un flujo aproximadamente 7.9 veces mayor. Esta membrana está diseñada para simular y predecir la difusión de una amplia gama de compuestos a través de la piel, sin necesidad de utilizar piel *ex vivo* (32), además de que exhibe una permeabilidad diferencial frente a promotores de permeación. Como puede verse, en la figura 11, los resultados con esta membrana presentan una menor variabilidad. Esta membrana está compuesta por dos capas de polietersulfona y una capa de poliolefina, con una estructura porosa impregnada con una mezcla de lípidos que le imparten características similares a las de la piel. No obstante, hay que ser cuidadosos y considerar que en general esta membrana sintética suele ser más permeable que la piel.

Tabla 6. Resultados de la prueba de permeabilidad de betametasona incluida en los tres vehículos estudiados, a través de piel de cerdo y de la membrana sintética Strat-M®. Se reporta la cantidad total permeada a las 24 h, la cantidad de fármaco en el donador después del estudio de permeación y el valor de flujo obtenido. ND= no detectado, NC= no calculado

Vehículo	Promedio a 24 h ($\mu\text{g cm}^{-2}$)	Desviación Estándar ($\mu\text{g cm}^{-2}$)	Flujo $\mu\text{g cm}^{-2} \text{h}^{-1}$	Desviación Estándar $\mu\text{g cm}^{-2} \text{h}^{-1}$
Transcutol®	ND	NC	NC	NC
Alcohol batílico	ND	NC	NC	NC
PEG 300 en piel	16.70	8.28	0.72	0.37
PEG 300 con Strat M®	164.11	11.56	5.71	0.48

Otro aspecto importante, es que cuando los experimentos duran más de un día, puede ocurrir una posible degradación enzimática y contaminación microbiológica del material biológico, lo que no sucede con la membrana sintética (32).

5.6. Tape stripping

Además de determinar la cantidad de fármaco capaz de alcanzar el medio receptor, se recurrió a la técnica de *tape stripping*, con el fin de evaluar la distribución del fármaco en el EC. En la figura 12A, se graficó el número de cinta en función de la distancia determinada en cada una y como se puede observar, estas distancias son homogéneas, las ligeras diferencias pueden atribuirse a las variaciones de grosor naturales en la piel. Cabe mencionar que el EC de la piel se desprende con mayor facilidad al haber sido tratado con las formulaciones que incluían al fármaco. En este sentido, se sabe que durante el uso de algunos corticosteroides tópicos por tiempos prolongados disminuye la cantidad de lípidos neutros y aumenta la TEWL (33) por lo que dicho efecto puede asociarse al tratamiento con donadores saturados durante la experimentación. Del mismo modo en la figura 12B se observa que el tratamiento con PEG 300/Transcutol® permitió que permeara una mayor cantidad de betametasona. Este comportamiento correlaciona bien con los resultados obtenidos en las pruebas de permeación, ya que fue el único sistema donde el fármaco llegó al medio receptor. También, se puede observar que el Transcutol® puro favorece la permeación de una pequeña cantidad de fármaco, y que la adición de alcohol batílico disminuye la permeación.

Todos los vehículos probados en este estudio contenían Transcutol® (dietilenglicol monoetil éter), el cual es un disolvente bien tolerado, no tóxico y biocompatible ampliamente usado en formulaciones para la piel, tanto cosméticas como farmacéuticas, sobre todo por su habilidad para disolver sustancias con pobre solubilidad acuosa (34). Tal fue el caso de la betametasona (empleada como fármaco modelo) y del alcohol batílico (utilizado como modulador). El Transcutol® es un líquido higroscópico capaz de incrementar la acumulación de fármacos aplicados tópicamente en la piel sin necesariamente promover su permeación transdérmica (34). La acción moduladora del Transcutol® depende del fármaco y de la naturaleza de los agentes con los que se combine. Por algunos reportes (e.g., (35)) y por lo encontrado en este trabajo, se sabe que el Transcutol® incrementa la movilidad de los componentes del EC, alterando el empaquetamiento de los lípidos. Se sabe también que promueve la permeación al incrementar la solubilidad de los fármacos co-administrados (34). No obstante, al ser un agente capaz de permear por sí mismo a través de la piel, puede arrastrar consigo al fármaco y sus características hidratantes en la piel

conducen a una cohesión del EC debilitada (20), pero una vez que el flujo del Transcutol® se detiene (probablemente por agotamiento), el fármaco puede cristalizar, formando un depósito en la piel (36). Por los resultados mostrados, su combinación con agentes como el alcohol batílico, contrarrestó el efecto del Transcutol®, lo que coincide con reportes que catalogan al alcohol batílico como retardador de la permeación (15)). Por el contrario, la combinación con el PEG 300 potenció el efecto del Transcutol® y de acuerdo a los resultados de FTIR/ATR, esto puede atribuirse a un incremento en la fluidez de los lípidos del EC y a su extracción (disminución y casi desaparición de algunas de las bandas correspondientes a lípidos del EC). Esto dio como resultado que el PEG 300/Transcutol® fuera el único vehículo que permitió el transporte de la betametasona hasta la solución receptora en los estudios de permeación y la retención de una mayor cantidad de fármaco en el EC de acuerdo a los resultados de la prueba de *tape stripping*. La prueba de TEWL muestra, sobre todo después de 120 y 180 minutos de tratamiento, que el Transcutol® y PEG 300/Transcutol® son los que muestran mayores valores de pérdida de agua, lo que refuerza lo expuesto anteriormente.

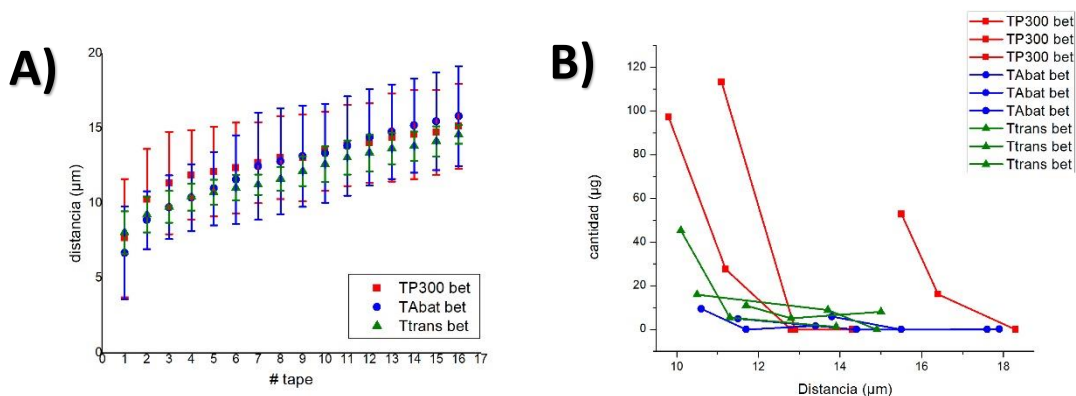


Figura 12. Resultados de la prueba de *tape stripping* para los diferentes tratamientos. A) Distancia calculada para cada cinta; B) distancia de penetración del fármaco dentro del EC. Las barras representan la desviación estándar

Los resultados muestran que sería posible el uso de betametasona en un dispositivo transdérmico, sin embargo, queda a reserva la cantidad de fármaco contenida en el reservorio debido a una posible disminución tanto en la formación de gránulos de queratohialina así como de cuerpos lamelares en la piel debido al tratamiento con corticosteroideos, además de la disminución en el número de bicapas lipídicas intercelulares (37), la oclusión del sistema puede aumentar hasta 100 veces la penetración, lo que también potencia los efectos adversos al incrementar la absorción sistémica (38).

6. Conclusiones

Se evaluó el efecto de tres vehículos (Transcutol®, alcohol batílico/Transcutol® y PEG 300/Transcutol®), sobre las propiedades de barrera de la piel, recurriendo a técnicas biofísicas como la TEWL y FTIR/ATR, así como a permeaciones en piel *ex vivo* y a través de membranas sintéticas Strat-M. De manera general, los resultados muestran que el Transcutol® funge como promotor de absorción y que su acción se ve potenciada al combinarlo con el PEG 300, siendo éste el único vehículo que permitió la permeación

transdérmica y acumulación de una mayor cantidad en la piel de betametasona. Con el alcohol batílico se encontró más bien un efecto retardador. Los resultados de la permeación coinciden con los encontrados en las pruebas de TEWL y de FTIR/ATR, siendo estas dos técnicas de gran utilidad para evaluar el efecto de nuevas formulaciones, permitiendo intuir los posibles mecanismos de acción de los vehículos probados. Ninguno de los vehículos provocó irritación en la piel, como se demostró mediante la prueba de Grado de Eritema. La combinación PEG 300/Transcutol® es potencialmente un excelente vehículo para promover la penetración hacia y a través de la piel de moléculas lipofílicas como la betametasona. No obstante, al incluir esta combinación en una formulación deberá evaluarse el efecto del resto de los componentes que se incorporen. Este trabajo abre nuevas posibilidades para estudiar el efecto de este vehículo en el transporte de otras moléculas con distintas propiedades fisicoquímicas y para probar otras proporciones PEG-Transcutol®.

7. Referencias

1. Proksch E, Brandner JM, Jensen JM. The skin: An indispensable barrier. *Experimental Dermatology*. 2008;17(12):1063–72.
2. Mojumdar EH, Kariman Z, van Kerckhove L, Gooris GS, Bouwstra JA. The role of ceramide chain length distribution on the barrier properties of the skin lipid membranes. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*. 2014;1838(10):2473–83. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamem.2014.05.023>
3. Menon GK, Cleary GW, Lane ME. The structure and function of the stratum corneum. *International Journal of Pharmaceutics*. 2012;435(1):3–9. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2012.06.005>
4. Čuříková BA, Procházková K, Filková B, Diblíková P, Svoboda J, Kováček A, et al. Simplified stratum corneum model membranes for studying the effects of permeation enhancers. *International Journal of Pharmaceutics*. 2017;534(1–2):287–96.
5. Hashimoto N, Nakamichi N, Yamazaki E, Oikawa M, Masuo Y, Schinkel AH, et al. P-Glycoprotein in skin contributes to transdermal absorption of topical corticosteroids. *International Journal of Pharmaceutics*. 2017;521(1–2):365–73. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2017.02.064>
6. Shin SC, Cho CW, Oh IJ. Enhanced efficacy by percutaneous absorption of piroxicam from the poloxamer gel in rats. *International Journal of Pharmaceutics*. 2000;193(2):213–8.
7. Venus M, Waterman J, McNab I. Basic physiology of the skin. *Surgery*. 2011;29(10):471–4. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mpsur.2011.06.010>
8. Machado M, Salgado TM, Hadgraft J, Lane ME. The relationship between transepidermal water loss and skin permeability. *International Journal of Pharmaceutics*. 2010;384(1–2):73–7.

9. Schwindt DA, Wilhelm KP, Maibach HI. Water diffusion characteristics of human stratum corneum at different anatomical sites in vivo. *Journal of Investigative Dermatology*. 1998;111(3):385–9. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1046/j.1523-1747.1998.00321.x>
10. Bolzinger MA, Briançon S, Pelletier J, Chevalier Y. Penetration of drugs through skin, a complex rate-controlling membrane. Vol. 17, *Current Opinion in Colloid and Interface Science*. 2012. p. 156–65.
11. Milner F. 2017. Disponible en: <https://www.franimation.com/>
12. Rai V, Ghosh I, Bose S, Silva SMC, Chandra P, Michniak-Kohn B. A transdermal review on permeation of drug formulations, modifier compounds and delivery methods. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*. 2010;20(2):75–88. Disponible en: [http://dx.doi.org/10.1016/S1773-2247\(10\)50011-X](http://dx.doi.org/10.1016/S1773-2247(10)50011-X)
13. Lane ME. Skin penetration enhancers. *International Journal of Pharmaceutics*. 2013;447(1–2):12–21. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2013.02.040>
14. Kaushik D, Costache A, Michniak-Kohn B. Percutaneous penetration modifiers and formulation effects. *International Journal of Pharmaceutics*. 2010;386(1–2):42–51.
15. Bernal-Chávez SA, Pérez-Carretero LY, Nava-Arzaluz MG, Ganem-Rondero A. Alkylglycerol derivatives, a new class of skin penetration modulators. *Molecules*. 2017;22(1).
16. Williams AC, Barry BW. Penetration enhancers. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2012;64(SUPPL.):128–37. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.addr.2012.09.032>
17. Ganem A. ¿Qué sabe Ud. acerca de... la vía de administración transdérmica? What do you know about ... transdermal drug delivery? *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*. 2011;42:65–8. Disponible en: <http://www.scielo.org.mx/pdf/rmcf/v42n1/v42n1a8.pdf>
18. Hadgraft J, Peck J, Williams DG, Pugh WJ, Allan G. Mechanisms of action of skin penetration enhancers/retarders: Azone and analogues. *International Journal of Pharmaceutics*. 1996;141(1–2):17–25.
19. Boncheva M, Damien F, Normand V. Molecular organization of the lipid matrix in intact Stratum corneum using ATR-FTIR spectroscopy. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*. 2008;1778(5):1344–55.
20. Hoppel M, Baurecht D, Holper E, Mahrhauser D, Valenta C. Validation of the combined ATR-FTIR/tape stripping technique for monitoring the distribution of surfactants in the stratum corneum. *International Journal of Pharmaceutics*. 2014;472(1–2):88–93. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2014.06.011>
21. Clarys P, Alewaeters K, Lambrecht R, Barel AO. Skin color measurements: comparison between three instruments: the Chromameter®, the DermaSpectrometer® and the Mexameter®. *Skin*

- Research and Technology. 2000;6:230–8. Disponible en: <http://web.b.ebscohost.com.ezproxy.fgcu.edu/ehost/pdfviewer/pdfviewer?sid=4fb3a2e8-f118-4461-8790-514e3b326963@sessionmgr114&vid=1&hid=102>
22. Miolo G, Gallochio F, Levorato L, Dalzoppo D, Beyersbergen van Henegouwen GMJ, Caffieri S. UVB photolysis of betamethasone and its esters: Characterization of photoproducts in solution, in pig skin and in drug formulations. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 2009;96(1):75–81. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2009.04.007>
 23. PLM. Diccionario de Especialidades Médicas Para los Médicos (PLM). PLM MÉXICO, S.A. DE C.V.; 2017. Disponible en: www.medicamentosplm.com
 24. Wulandari L, Indrayanto G. HPTLC determination of betamethasone in tablets and its validation. *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies*. 2003;26(16):2709–17.
 25. Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos. Guía De Validación De Métodos analíticos.
 26. Scientific Devices Mexameter® MX 18. GmbH, Courage + Khazaka electronic. 2019 [cited 2019 Apr 14]. Disponible en: <http://courage-khazaka.de/index.php/en/products/scientific/130-mexameter>
 27. Osborne DW, Musakhanian J. Skin Penetration and Permeation Properties of Transcutol®—Neat or Diluted Mixtures. *AAPS PharmSciTech*. 2018;19(8):3512–33.
 28. Olsztyńska-Janus S, Pietruszka A, Kiełbowicz Z, Czarnecki MA. ATR-IR study of skin components: Lipids, proteins and water. Part I: Temperature effect. *Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 2018;188:37–49.
 29. Niu X-Q, Zhang D-P, Bian Q, Feng X-F, Li H, Rao Y-F, et al. Mechanism investigation of ethosomes transdermal permeation. *International Journal of Pharmaceutics*: X. 2019;1(July):100027. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.ijpx.2019.100027>
 30. Tang R, Samouillan V, Dandurand J, Lacabanne C, Lacoste-Ferre MH, Bogdanowicz P, et al. Identification of ageing biomarkers in human dermis biopsies by thermal analysis (DSC) combined with Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR/ATR). *Skin Research and Technology*. 2017;23(4):573–80.
 31. Janůšová B, Zbytovská J, Lorenc P, Vavryšová H, Palát K, Hrabálek A, et al. Effect of ceramide acyl chain length on skin permeability and thermotropic phase behavior of model stratum corneum lipid membranes. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids*. 2011;1811(3):129–37.
 32. Flaten GE, Palac Z, Engesland A, Filipović-Grčić J, Vanić Ž, Škalko-Basnet N. In vitro skin models as a tool in optimization of drug formulation. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2015;75:10–24.

33. Sheu HM, Lee JYY, Kuo KW, Tsai JC. Permeability barrier abnormality of hairless mouse epidermis after topical corticosteroid: Characterization of stratum corneum lipids by ruthenium tetroxide staining and high-performance thin-layer chromatography. *Journal of Dermatology*. 1998;25(5):281–9.
34. Felton LA, Wiley CJ, Godwin DA. Influence of hydroxypropyl- β -cyclodextrin on the transdermal permeation and skin accumulation of oxybenzone. *Drug Development and Industrial Pharmacy*. 2002;28(9):1117–24.
35. Björklund S, Pham QD, Jensen LB, Knudsen NØ, Nielsen LD, Ekelund K, et al. The effects of polar excipients transcitol and dexpanthenol on molecular mobility, permeability, and electrical impedance of the skin barrier. *Journal of Colloid and Interface Science*. 2016;479:207–20.
36. Hadgraft J, Lane ME. Advanced topical formulations (ATF). *International Journal of Pharmaceutics*. 2016;514(1):52–7. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2016.05.065>
37. SHEU H-M, LEE JY-Y, CHAI C-Y, KUO K-W. Depletion of stratum corneum intercellular lipid lamellae and barrier function abnormalities after long-term topical corticosteroids. *British Journal of Dermatology*. 1997;136(6):884–90.
38. Alejandro Lázaro, G; Moreno García F. Corticosteroides tópicos. *Información Terapéutica del Sistema Nacional de Salud*. 2010;34:83–8.