



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO

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

**“LIBERACIÓN TRANSDÉRMICA PROMOVIDA POR MICROAGUJAS DE UN
FÁRMACO ANOREXÍGENO FORMULADO EN NANOPARTÍCULAS”**

TESIS

PARA OPTAR POR EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA

IVÁN OMAR CALDERÓN LOJERO



TUTOR: Dra. Flora Adriana Ganem Rondero

AÑO: 2010



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.

A mis padres con todo mi cariño, respeto y profunda admiración;
porque sin ustedes no sería quien soy.

"No son los títulos quienes honran a los hombres, sino los hombres los que honran sus títulos."

Niccolò Machiavelli

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología CONACyT por la beca otorgada para la realización de este trabajo.

A la Coordinación de Estudios de Posgrado (D.G.E.P.) por la beca otorgada para la escritura de este trabajo.

A los proyectos CONACyT-81883 y PAPIIT-IN209709 por el apoyo económico para la realización del proyecto.

Al Sr. Draucin Jiménez del taller de vidrio soplado, FES-Cuautitlán, por la fabricación de las celdas estáticas de permeación.

Al Sr. Rodolfo Robles del Laboratorio de Microscopía Electrónica de Barrido, FES-Cuautitlán, por su colaboración en la microscopía electrónica de barrido.

A la Ing. Ana Lía Reyes, MTS Rollers México (NANOTS), por la donación del rodillo con microagujas de 500 μm .

Al M. en C. Gerardo Leyva del Laboratorio de Apoyo a la Investigación en Posgrado, FES-Cuautitlán, por su colaboración con la determinación de tamaño y potencial Z.

Al M. en F. Germán Garrido del Laboratorio de Apoyo a Histología y Biología, FES-Cuautitlán, por su colaboración en microscopía óptica y de fluorescencia.

Al Dr. Víctor Castaño (CEFATA), al Dr. Víctor Ramírez (INB) y a la Ing. Nydia Hernández (INB- Unidad de Microscopía), UNAM-Campus Juriquilla, por su colaboración en la microscopía confocal láser.

A los miembros del jurado, por sus valiosas atribuciones y comentarios al presente trabajo.

Al Dr. David Quintanar y a los miembros del Posgrado en Tecnología Farmacéutica, especialmente a Lizbeth, Clara y Lupita, por sus recomendaciones.

A la Dra. Ganem no tan sólo por dirigir este proyecto, sino por ser parte de él; gracias doctora por apoyarme y por la confianza depositada en mi.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

JURADO ASIGNADO

Presidente: Dra. María Isabel Aguilar Laurents

Primer vocal: Dra. Alma Luisa Revilla Vázquez

Segundo vocal: Dra. Helgi Helen Francisca Jung Cook

Tercer vocal: Dra. Luz María Melgoza Contreras

Secretario: Dra. Patricia Guadarrama Acosta

“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”

LUGAR DONDE SE REALIZÓ EL TRABAJO

Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán

Laboratorio de Posgrado en Tecnología Farmacéutica

L-223

Este trabajo fue presentado en modalidad cartel:

XLII Congreso Nacional de Ciencias Farmacéuticas

Ciudad de Cancún Quintana Roo, octubre 2009

“Preparación y caracterización de un sistema nanoparticulado biodegradable conteniendo un fármaco anorexígeno destinado al tratamiento de la obesidad”

QuimiUNAM.

Ciudad de México, noviembre 2009

“Nanotechnology Combination in Transdermal Drug Delivery: cutting-edge enhancement generation”

Este trabajo fue presentado en modalidad de ponencia:

Simposio de Micología 2009

Ciudad de México, noviembre 2009

“Liberación transdérmica promovida por microagujas de un fármaco formulado en un sistema nanoparticulado”

CONTENIDO

INDICE DE ECUACIONES.....	ix
INDICE DE FIGURAS	x
INDICE DE TABLAS	xii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xiii
SUMMARY	1
RESUMEN	2
1. Introducción.....	3
2. Marco teórico	5
2.1 Vía Transdérmica	5
2.1.1 Primera Generación.....	13
2.1.2 Segunda Generación.....	14
2.1.3 Tercera Generación	15
2.1.4 Ventajas de los sistemas de administración transdérmicos	15
2.1.5 Desventajas de los sistemas de administración transdérmicos	16
2.1.6 Perspectivas.....	16
2.2 La Piel.....	17
2.2.1 Generalidades.....	17
2.2.2 Características y estructura de la piel.....	18
2.2.3 Eficacia como barrera	23
2.2.4 Mecanismos de transporte.....	24
2.3 Promotores de Absorción Transdérmica.....	28
2.3.1 Promotores químicos	30
2.3.2 Promotores físicos	31
2.3.3 Acarreadores	46
2.4 Métodos de preparación de nanopartículas	56
2.4.1 Técnica de emulsificación/evaporación.....	56

2.4.2	Técnica de homogenización a alta presión.....	56
2.4.3	Técnica de microemulsión.....	57
2.4.4	Difusión del disolvente (SDM) en medio acuoso.....	58
2.4.5	Técnica de hidratación de película / homogenización a alta presión.....	58
2.4.6	Técnica de membrana contráctil.....	58
3	Hipótesis del trabajo.....	60
4.	Objetivos.....	60
4.1	Objetivo general.....	60
4.2	Objetivos particulares.....	60
5.	Metodología.....	61
5.1	Materiales.....	61
5.2	Reactivos.....	61
5.3	Equipos.....	62
5.4	Métodos.....	64
5.4.1	Espectros de Absorción.....	65
5.4.2	Determinación de las condiciones óptimas de análisis por HPLC para la cuantificación de clorhidrato de sibutramina (CS).....	65
5.4.3	Validación del método analítico para cuantificar CS en una matriz biológica (PBS pH 4.5 en contacto con piel).	65
5.4.4	Validación parcial del método analítico para cuantificar CS extraído de la piel.....	67
5.4.5	Validación parcial del método analítico para cuantificar CS en metanol.....	68
5.4.6	Preparación de las nanopartículas.....	69
5.4.7	Caracterización de nanopartículas.....	70
5.4.8	Cinéticas de permeación.....	71
5.4.9	Método de extracción de CS retenido en la piel.....	73
5.4.10	Estudios de microscopía e histología.....	73
6	Resultados y Discusión.....	76
6.1	Espectros de absorción.....	76

6.2	Validación analítica.....	76
6.2.1	Método para CS en matriz biológica (PBS pH 4.5 en contacto con piel)	77
6.2.2	Método para CS en matriz biológica (MeOH en contacto con piel)	82
6.2.3	Método para CS en metanol.....	87
6.3	Preparación y caracterización de nanopartículas.....	92
6.3.1	Eficiencia de entrapamiento	92
6.3.2	Tamaño de partícula	92
6.3.3	Potencial Z	93
6.3.4	Calorimetría diferencial de barrido	93
6.3.5	Microscopía electrónica de barrido (SEM)	94
6.4	Cinéticas de Permeación	95
6.5	Estudios histológicos y microscopicos	106
6.5.1	Microscopía óptica de campo claro y fluorescencia.....	106
6.5.2	Microscopía electrónica de barrido.....	110
6.5.3	Microscopía confocal láser	112
7	Conclusiones	119
8	Perspectivas	121
9	Referencias	122
10	Anexos	132
10.1	Anexo I.....	132
10.1.1	Propiedades del CS	132
10.1.2	Mecanismo de acción del CS	132
10.1.3	Formas farmacéuticas convencionales para CS.....	133
10.2	Anexo II.....	133
10.2.1	Determinación de las condiciones óptimas para cuantificar CS.....	133

INDICE DE ECUACIONES

ECUACIÓN 1 DIFUSIÓN PASIVA DE UN NO ELECTROLITO EN AUSENCIA DE FLUJO ESTACIONARIO.....	24
ECUACIÓN 2 FLUJO TRANSDÉRMICO EN EL ESTADO ESTACIONARIO.....	25
ECUACIÓN 3 EXPRESIÓN MATEMÁTICA PARA CALCULAR EL LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN.....	67
ECUACIÓN 4 EXPRESIÓN MATEMÁTICA PARA CALCULAR EL LÍMITE DE DETECCIÓN.....	67
ECUACIÓN 5 ECUACIÓN DE HENRY.....	70
ECUACIÓN 6 FLUJO EN EL ESTADO ESTACIONARIO EN FUNCIÓN DEL TIEMPO.....	95
ECUACIÓN 7 COEFICIENTE APARENTE DE PERMEABILIDAD.....	96
ECUACIÓN 8 FACTOR DE PROMOCIÓN.....	96

INDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. NÚMERO DE FÁRMACOS APROBADOS POR LA FDA DESDE 1979.	6
FIGURA 2. CORTE HISTOLÓGICO DE LA PIEL.	18
FIGURA 3. CAPAS DE LA PIEL.	18
FIGURA 4. ESQUEMA DE LA EPIDERMIS.	19
FIGURA 5. UNIÓN DERMOEPIDÉRMICA.	21
FIGURA 6. EJEMPLIFICACIÓN SIMPLIFICADA DE LAS RUTAS DE PENETRACIÓN EN LA PIEL.	26
FIGURA 7. ETAPAS DE ABSORCIÓN TRANSEPIDERMAL.	27
FIGURA 8. PROMOTORES DE ABSORCIÓN TRANSDÉRMICA.	29
FIGURA 9. ACCIÓN DE LOS PROMOTORES DE ABSORCIÓN TRANSDÉRMICA.	30
FIGURA 10. ESQUEMA DE MICROAGUJAS.	31
FIGURA 11. ARREGLO DE MICROAGUJAS.	33
FIGURA 12. PROCESO DE FORMACIÓN DE MICROAGUJAS POR VÍA HÚMEDA.	34
FIGURA 13. CLASIFICACIÓN DE LOS SISTEMAS ACARREADORES.	46
FIGURA 14. ESTRUCTURA QUÍMICA DEL PLGA.	54
FIGURA 15. RODILLOS CON MICROAGUJAS.	72
FIGURA 16. DIRECCIONES PARA LAS MICROPERFORACIONES.	72
FIGURA 17. CELDA TIPO FRANZ.	73
FIGURA 18. ESPECTROS DE ABSORCIÓN DEL CS EN DIFERENTES MEDIOS.	76
FIGURA 19. CROMATOGRAMA DE CS, MATRIZ BIOLÓGICA Y CS EN MATRIZ BIOLÓGICA (PBS pH 4.5 EN CONTACTO CON PIEL). ...	78
FIGURA 20. RECTA DE CALIBRACIÓN PARA CS (PBS pH 4.5 EN CONTACTO CON PIEL).	79
FIGURA 22. CROMATOGRAMA DE LA MATRIZ BIOLÓGICA Y CS EN MATRIZ BIOLÓGICA (MeOH EN CONTACTO CON PIEL)	83
FIGURA 23. RECTA DE CALIBRACIÓN PARA CS EN MATRIZ BIOLÓGICA (MeOH EN CONTACTO CON PIEL).	84
FIGURA 25. CROMATOGRAMA DE MeOH Y DE CS EN MeOH.	88
FIGURA 26. RECTA DE CALIBRACIÓN PARA CS EN MeOH.	89
FIGURA 28. COMPARACIÓN DE TAMAÑO DE PARTÍCULA EN LOTES CON DIFERENTE CARGA DE CS.	92
FIGURA 29. COMPARACIÓN DEL POTENCIAL ZETA EN LOTES CON DIFERENTE CARGA DE CS.	93
FIGURA 30. TERMOGRAMAS DE LOTES DIFERENTES DE NANOPARTÍCULAS.	94
FIGURA 31. MICROGRAFÍAS DE NANOPARTÍCULAS DE PLGA Y CS.	94
FIGURA 33. CINÉTICA DE PERMEACIÓN DE CS EN NBS.	98
FIGURA 34. MEDIAS DE LOS TIEMPOS DE LATENCIA PARA LOS DIFERENTES TRATAMIENTOS.	100
FIGURA 35. ANÁLISIS LONGITUD DE LA AGUJA – FORMULACIÓN PARA EL TIEMPO DE LATENCIA.	100
FIGURA 36. MEDIAS DE LOS FLUJOS PARA LOS DIFERENTES TRATAMIENTOS.	101
FIGURA 37. ANÁLISIS LONGITUD DE LA AGUJA – FORMULACIÓN SOBRE EL FLUJO DE CS.	101
FIGURA 38. CANTIDAD MÁXIMA PERMEADA.	102
FIGURA 39. COEFICIENTES APARENTES DE PERMEACIÓN PARA LOS DIFERENTES TRATAMIENTOS.	103
FIGURA 40. CANTIDAD DE CS RETENIDA EN PIEL.	104
FIGURA 41. GRÁFICO DE MEDIAS DE CS RETENIDO EN PIEL.	105
FIGURA 42. CORTE HISTOLÓGICO DE PIEL; CONTROL Y PRETRATADA CON MICROAGUJAS DE 200µM.	106
FIGURA 43. SEÑALIZACIÓN DE DAÑO EN EL ESTRATO CÓRNEO POR MICROAGUJAS DE 200µM.	107
FIGURA 44. PIEL PRETRATADA CON MICROAGUJAS DE MICROAGUJAS DE 200µM.	108
FIGURA 45. IMAGEN DE MICRO-ORIFICIO POR MICROSCOPÍA DE FLUORESCENCIA, 500 µM.	108
FIGURA 46. IMAGEN DE MICRO-ORIFICIO POR MICROSCOPÍA DE FLUORESCENCIA, 200 µM.	109
FIGURA 47. IMAGEN CONTROL POR MICROSCOPÍA DE FLUORESCENCIA.	109
FIGURA 48. MICROGRAFÍAS DEL MICROAGUJERO.	110

FIGURA 49. MICROGRAFÍA DE LA CAVIDAD DEL MICROAGUJERO	111
FIGURA 50. SECUENCIA DE CORTES A DIFERENTES PROFUNDIDADES PARA LA PERMEACIÓN DE NBS A LOS 15 MIN (500 μ M). ...	112
FIGURA 51. SECUENCIA DE CORTES A DIFERENTES PROFUNDIDADES PARA LA PERMEACIÓN DE NBS A LOS 60 MIN (500 μ M). ...	113
FIGURA 52. SECUENCIA DE CORTES A DIFERENTES PROFUNDIDADES PARA LA PERMEACIÓN DE NBS A LOS 15 MIN (CONTROL). .	113
FIGURA 53. SECUENCIA DE CORTES A DIFERENTES PROFUNDIDADES PARA LA PERMEACIÓN DE NBS A LOS 60 MIN (CONTROL). .	114
FIGURA 54. CORTES TRANSVERSALES DE LA PIEL CON NANOPARTÍCULAS	115
FIGURA 55. VISTAS ORTOGONALES DE LS PIRL CON LOS DIFERENTES TRATAMIENTOS.	116
FIGURA 56. SECUENCIA DE CORTES A DIFERENTES PROFUNDIDADES DE LOS DEPÓSITOS CREADOS CON EL EMPLEO DE NBS.	117
FIGURA 57. DEPÓSITO DE NBS.	117
FIGURA 58. CORTES TRANSVERSALES Y SECCIONES ORTOGONALES DE LA PIEL.....	118
FIGURA 59. ESTRUCTURA QUÍMICA DEL CS.....	132

INDICE DE TABLAS

TABLA 1 PRODUCTOS DE LIBERACIÓN TRANSDÉRMICA ACEPTADOS POR LA FDA EN LAS ÚLTIMAS DÉCADAS	8
TABLA 2 SISTEMAS DE LIBERACIÓN TRANSDÉRMICA EN DESARROLLO CLÍNICO	11
TABLA 3 CARACTERÍSTICAS MÁS IMPORTANTES DE LOS ESTRATOS EPIDÉRMICOS	20
TABLA 4 IMPORTANCIA RELATIVA DE LOS APÉNDICES SOBRE LA PERMEABILIDAD DEL AGUA A TRAVÉS DE LA PIEL ¹	25
TABLA 5 PERMEACIÓN DE DIFERENTES FÁRMACOS MEDIADA POR MICROAGUJAS	36
TABLA 6 EFECTO SINÉRGICO DE MICROAGUJAS Y OTROS PROMOTORES PARA DISTINTAS MOLÉCULAS.....	42
TABLA 7 RESULTADOS OBTENIDOS PARA UNA MUESTRA DE 0.4 µG/ML DE CS EN MATRIZ BIOLÓGICA (PBS/PIEL).....	78
TABLA 8 VALORES DE AUC Y PARÁMETROS DE REGRESIÓN PARA (PBS/PIEL).....	79
TABLA 9 PARÁMETROS DE LINEALIDAD (PBS/PIEL).....	80
TABLA 10 PRECISIÓN DEL MÉTODO(PBS/PIEL).....	80
TABLA 11 EXACTITUD DEL MÉTODO (PBS/PIEL)	81
TABLA 12 ANÁLISIS DE PRECISIÓN INTER-DÍA (PBS/PIEL).....	81
TABLA 13 RESULTADOS OBTENIDOS PARA UNA MUESTRA DE 5 µG/ML DE CS EN MATRIZ BIOLÓGICA (MeOH/PIEL).....	83
TABLA 14 VALORES DE AUC Y PARÁMETROS DE REGRESIÓN (MeOH/PIEL)	84
TABLA 15 PARÁMETROS DE LINEALIDAD (MeOH/PIEL).....	85
TABLA 16 PRECISIÓN DEL MÉTODO (MeOH/PIEL)	85
TABLA 17 EXACTITUD DEL MÉTODO (MeOH/PIEL)	86
TABLA 18 ANÁLISIS DE PRECISIÓN INTER-DÍA (MeOH/PIEL).....	86
TABLA 19 RESULTADOS OBTENIDOS PARA UNA MUESTRA DE 20 µG/ML DE CS EN METANOL.....	88
TABLA 20 VALORES DE AUC Y PARÁMETROS DE REGRESIÓN (MeOH)	89
TABLA 21 PARÁMETROS DE LINEALIDAD (MeOH).....	90
TABLA 22 PRECISIÓN DEL MÉTODO (MeOH)	90
TABLA 23 EXACTITUD DEL MÉTODO (MeOH)	91
TABLA 24 ANÁLISIS DE PRECISIÓN INTER-DÍA (MeOH)	91
TABLA 25 ENTRAMPE DE CS INCREMENTANDO LA CARGA	92
TABLA 26 TIEMPOS DE LATENCIA DE CS EN SOLUCIÓN.	97
TABLA 27 FLUJOS DE CS EN SOLUCIÓN	97
TABLA 28 FLUJOS DE CS EN NBS.....	99
TABLA 29 TIEMPOS DE LATENCIA PARA CS EN NBS.....	99
TABLA 30 TIEMPOS DE LATENCIA EN FUNCIÓN DE LOS DIFERENTES TRATAMIENTOS	100
TABLA 31 FLUJOS EN FUNCIÓN DE LOS DIFERENTES TRATAMIENTOS CON DIFERENTES FORMULACIONES.....	101
TABLA 32 CANTIDAD MÁXIMA PERMEADA	102
TABLA 33 COEFICIENTES APARENTES DE PERMEACIÓN	103
TABLA 34 FACTORES DE PROMOCIÓN PARA LOS SISTEMAS PROBADOS.....	103
TABLA 35 CONTRASTE MÚLTIPLE DE RANGO PARA CANTIDAD RETENIDA.....	104
TABLA 36 PARES QUE MUESTRAN DIFERENCIAS ESTADÍSTICAMENTE SIGNIFICATIVAS EN LA CANTIDAD RETENIDA	105

LISTA DE ABREVIATURAS

Abreviatura	Significado
AUC	Área Bajo la Curva (<i>Area Under the Curve</i>)
b	Ordenada al origen
C.V.	Coefficiente de Variación
CB	Cascade Blue®
C _{est}	Concentración analizada
C _{exp}	Concentración Nominal
CMC	Carboximetil Celulosa
CS	Clorhidrato de Sibutramina
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol
DNA	Ácido desoxirribonucleico (<i>Deoxyribonucleic acid</i>)
DSC	Calorimetría Diferencial de Barrido (<i>Differential Scanning Calorimetry</i>)
FDA	Administración de Alimentos y Fármacos (<i>Food and Drug Administration</i>)
HPLC	Cromatografía de Líquidos de Alto Desempeño (<i>High-performance Liquid Chromatography</i>)
IC	Intervalos de confianza
LSCM	Microscopía Láser Confocal (<i>Laser Scanning Confocal Microscopy</i>)
m	Pendiente
NBs	Nanopartículas Poliméricas Biodegradables
o/w	Aceite en agua (<i>oil/water</i>)
°C	Grados centígrados
p.a.	Principio activo
PBS	Solución Salina Amortiguadora de Fosfatos (<i>Phosphate Buffered Saline</i>)
PLGA	Poli(láctico-co-glicólico)
PVAL	Alcohol Polivinílico
r ²	Coefficiente de determinación

SC	Estrato córneo (<i>Stratum corneum</i>)
SD	Desviación estándar (<i>Standard deviation</i>)
SEM	Microscopía Electrónica de Barrido (<i>Scanning Electron Microscopy</i>)
TEA	Trietilamina
UV	Ultravioleta
w/o	Agua en aceite (<i>water/oil</i>)
w/v	Peso/volumen (<i>weight/volume</i>)
WHO	Organización Mundial de la Salud (<i>World Health Organization</i>)

SUMMARY

Nowadays combination products for transdermal drug delivery enhancement are state-of-the-art. Not only do they provide high technology devices and techniques to improve the passage of drugs through the skin, they also aid to avoid drug degradation besides yielding drug targeting. In recent years microneedles have demonstrated a remarkably effect on permeation of several drugs in a minimal invasive manner whilst nanoparticle systems have been widely used for being a great promise for advancing patient care. When both technologies are employed in conjunction, advancements on this research area are achieved, holding the opportunity of a modified release over time, easy-to-use products and lower concentration into such devices.

The objective of this work was to prepare and characterize biodegradable nanoparticles loaded with a model drug, sibutramine hydrochloride monohydrate (CS), and evaluate their penetration into skin when microneedles are used to enhance this route. Microscopy techniques such as SEM, LSCM, fluorescence and optical showed that microneedles (200 and 500 μm length) pierced and disrupted stratum corneum, the outermost layer of the skin allowing the passage of nanoparticles.

Sibutramine loaded nanoparticles possessed convenient properties to be stable for over a month and an acceptable concentration of drug to be released after permeation studies with porcine skin (determined by HPLC). The results obtained corroborated previous studies, in which transdermal delivery is dramatically increased by microneedles facilitating the diffusion of nanoparticles formulations through and in the skin. The potential use of nanoparticles as a carrier system, and microneedles, offers a synergic enhancement technique. Furthermore, this type of nanoparticles is an attractive option for transdermal delivery owe to their biodegradability.

RESUMEN

Hoy en día la vanguardia para los promotores de absorción transdérmica está direccionada a la combinación de estos mismos; no solo para proveer distintos dispositivos de alta tecnología para favorecer el paso de las moléculas de interés farmacéutico a través de la piel, sino que también ayudan a proteger al principio activo de la degradación y a una posible vectorización. En los últimos años las microagujas han demostrado tener un alto impacto en la permeación de diferentes moléculas en la piel, de una manera mínimamente invasiva; mientras que las nanopartículas han sido exhaustivamente estudiadas por ser una gran promesa para el avance en el cuidado de la salud. Drásticas mejoras pueden ser alcanzadas cuando ambas tecnologías son empleadas en conjunto, como lo son: una liberación controlada, prácticos dispositivos para una fácil administración y una reducción en la frecuencia de dosis.

El objetivo de este trabajo fue el de preparar y caracterizar un sistema nanoparticulado a partir de un polímero biodegradable con un fármaco modelo, clorhidrato de sibutramina (CS), evaluar su penetración en piel cuando ésta es pretratada con microagujas (200 y 500 μm) y demostrar el daño al estrato córneo (barrera de permeabilidad), así como el paso de las nanopartículas a través de éste, con distintas técnicas microscópicas (SEM, LSCM, fluorescencia y óptica).

Las nanopartículas cargadas con clorhidrato sibutramina mostraron ser estables en suspensión por un mes y con una eficiencia de carga aceptable para poder ser liberada a través de la piel de oreja de cerdo (determinada vía HPLC). Los resultados obtenidos corroboran estudios previos, en los cuales la liberación transdérmica es incrementada por el uso de microagujas, facilitando la difusión de las nanopartículas dentro y a través de la piel.

El empleo de microagujas y nanopartículas tiene un efecto sinérgico para la permeación; mientras que el sistema biodegradable podría ser una alternativa para la liberación transdérmica de clorhidrato de sibutramina.

1. INTRODUCCIÓN

La vía transdérmica es una moderna alternativa para la liberación de moléculas con efecto terapéutico, sin embargo debido a las propiedades que presenta el estrato córneo como barrera de permeabilidad; el número de moléculas capaces de permear se limita a aquellas que reúnan las propiedades fisicoquímicas para atravesar tal barrera. El empleo de promotores de absorción y su efecto han sido vastamente investigados; estos promotores se pueden clasificar en dos grandes grupos: los químicos y los físico-mecánicos, estos últimos son el sujeto de estudio en el presente trabajo.

Se eligieron las microagujas como promotores físico-mecánicos debido a los resultados prometedores que se han reportado para estos dispositivos y las múltiples ventajas que ofrecen. Por otro lado, el fármaco modelo a estudiar, clorhidrato de sibutramina (CS), se formuló en nanopartículas poliméricas biodegradables (NBs), de modo que el propósito fue evaluar el efecto en conjunto de las microagujas y las NBs sobre el paso de CS a través de la piel.

El CS es empleado para el tratamiento de la obesidad, la cual de acuerdo a la organización mundial de la salud (WHO) se define como la acumulación excesiva o anormal de grasa que representa un riesgo para la salud. En la actualidad este problema se presenta no tan sólo en los países del primer mundo como solía ser, también es un problema que crece en los países en vías de desarrollo ⁽¹⁾.

En el 2006 la WHO publicó que un estudio realizado en el 2005 revelaba que aproximadamente 1.6 mil millones de adultos (mayores a 15 años) tenían sobrepeso y que al menos 400 millones de adultos eran obesos, de igual manera que 20 millones de niños padecen de sobrepeso a la edad de 5 años.

En este mismo artículo la WHO pronostica que para el 2015, aproximadamente 2.3 mil millones de adultos tendrán sobrepeso y más de 700 millones serán obesos. Para combatir dicho malestar en nuestra sociedad, lo más recomendado es la prevención. Sin embargo, en personas en las cuales persiste este problema lo mejor es tener una dieta saludable y la práctica de alguna actividad física, ya que la obesidad está asociada con la diabetes, enfermedades cardiovasculares, hipertensión y problemas con la vesícula biliar ⁽²⁾.

Actualmente el CS se administra por vía oral, pero el hecho de poderlo administrar vía transdérmica tendría diversas ventajas como la posibilidad de reducir la frecuencia de dosificación.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 VÍA TRANSDÉRMICA

Hoy en día, la vía transdérmica representa una atractiva alternativa en relación a la vía oral para la administración de fármacos, la cual también ha sido propuesta como una ruta capaz de sustituir a las dolorosas inyecciones hipodérmicas⁽³⁻⁶⁾. A lo largo de la historia, el ser humano ha usado cientos de sustancias en la piel con fines terapéuticos, en la actualidad una gran variedad de formulaciones existen en el mercado para tratamientos tópicos y transdérmicos.

El primer sistema transdérmico de liberación sistémica, un parche conteniendo escopolamina para tratamiento de enfermedades relacionadas con el sistema locomotor, fue lanzado en los Estados Unidos de Norteamérica en 1979. Dicho parche constituyó un sistema revolucionario, pues permitía la liberación de escopolamina hasta por 3 días. Después de una década, el parche de nicotina tuvo un éxito rotundo, incrementando la popularidad de esta vía entre los profesionales de la medicina y el público en general.

Actualmente 19 sistemas para la liberación transdérmica han sido desarrollados incluyendo fármacos como el estradiol, fentanilo, nitroglicerina, lidocaína, testosterona, entre otros. Algunos incluyen combinaciones de fármacos como los anticonceptivos y algunas hormonas, o bien utilizan nuevas tecnologías, como es el caso de sistemas iontoforéticos y ultrasónicos para la analgesia⁽⁷⁾.

En promedio, de 1979 a 2002, un nuevo parche era aprobado cada 2.2 años, sin embargo al pasar de los años de 2003 a 2007 se calcula que la cifra se ha más que triplicado, saliendo al mercado un nuevo sistema transdérmico cada 7.5 meses, lo que se ha estimado en más mil millones de dispositivos transdérmicos manufacturados cada año durante los últimos años. En la figura 1 se muestra la tendencia reportada del número de fármacos formulados y aprobados por la FDA para vía transdérmica⁽⁷⁾, mientras que en la tabla 1, se enumeran estos fármacos.

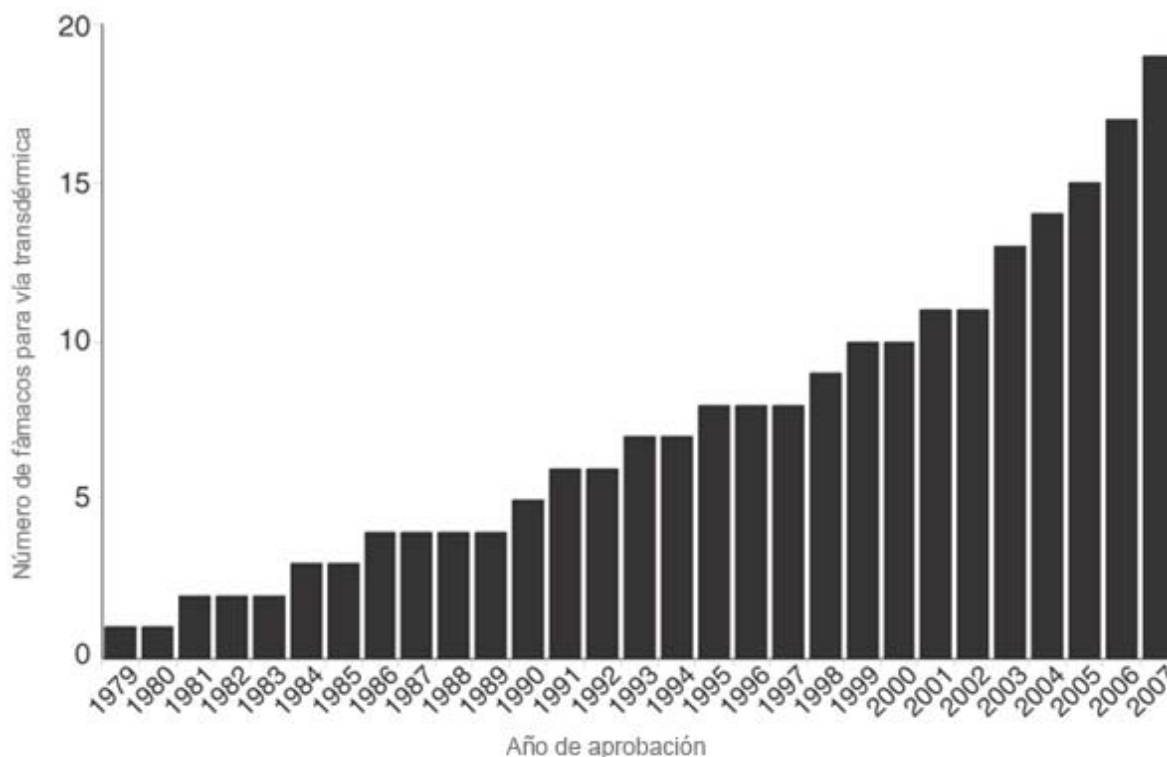


Figura 1. Número de fármacos aprobados por la FDA desde 1979⁽⁷⁾.

A pesar de que las vías oral y parenteral siguen siendo las más difundidas, la vía transdérmica tiene una gran variedad de ventajas en relación a ellas. En particular, se recomienda para fármacos susceptibles de ser degradados en el tracto gastrointestinal, ya sea por efecto enzimático o del pH, o bien porque sufren un importante efecto de primer paso hepático, siendo metabolizados en hígado antes de alcanzar su sitio de acción. Por otro lado, a pesar de que la vía parenteral permite la administración de una gran variedad de fármacos diversas desventajas persisten, lo invasiva y traumática que resulta, así como la generación de peligrosos desechos médicos infecto-contagiosos, y el riesgo de enfermedades de transmisión por el re-uso de las agujas, especialmente en los países en vías de desarrollo, han motivado la búsqueda de rutas alternas, entre ellas la transdérmica⁽⁸⁾.

Además de ser mínimamente invasivos, los dispositivos transdérmicos pueden ser administrados por el propio paciente sin mayor capacitación médica, permitiendo la liberación de fármacos por periodos de tiempo prolongados (hasta una semana), lo que los convierte en sistemas fácilmente aceptados por el paciente. Una ventaja más es la posibilidad de conseguir ya sea un efecto local o bien uno sistémico.

De igual manera, la utilización de esta vía para la administración de vacunas y así evitar el uso de molestas agujas hipodérmicas ha sido de particular interés en los últimos años⁽⁹⁾. Éste método de vacunación puede mejorar la respuesta inmune y es posible una vectorización en las células inmunogénicas de la piel, las células de Langerhans.

Probablemente el gran reto que enfrenta la vía transdérmica es que está limitada a un reducido número de fármacos. Actualmente los métodos de liberación tradicionales están disponibles sólo para moléculas de bajo peso molecular, que exhiban un coeficiente de partición octanol/agua intermedio y que posean una cierta potencia (mg/día)^{(3) (4; 5; 6; 3)}. Otro desafío muy peculiar es el de lograr la penetración de las moléculas hidrofílicas, péptidos y macromoléculas, incluyendo los tratamientos genómicos que emplean DNA o RNA⁽¹⁰⁾.

Tabla 1. Productos de liberación transdérmica aceptados por la FDA en las últimas décadas, sin incluir aerosol, crema, ungüento o gel (adaptada ⁽⁷⁾).

Año	Fármaco	Nombre comercial	Indicado	Comercializadora
1979	Escopolamina	Transderm-Scop	Enfermades del sistema locomotor	Novartis Consumer Health (Parsippany, NJ, USA)
1981	Nitroglicerina	Transderm-Nitro	Angina de pecho	Novartis (East Hannover, NJ, USA)
1984	Clonidina	Catapres-TTS	Hipertensión	Boehringer Ingelheim (Ridgefield, CT, USA)
1986	Estradiol	Estraderm	Síntomas menopáusicos	Novartis
1990	Fentanilo	Duragesic	Dolores crónicos	Janssen Pharmaceutica (Titusville, NJ, USA)
1991	Nicotina	Nicoderm, Habitrol, ProStep	Cesar de fumar	GlaxoSmithKline (Philadelphia), Novartis Consumer Health, Elan (Gainesville, GA, USA)
1993	Testosterona	Testoderm	Deficiencia de testosteroe	Alza (Mountain View, CA, USA)
1995	Lidocaína con epinefrina	Iontocaine	Analgesia dérmica	Iomed (Salt Lake City, UT, USA)
1998	Estradiol con noretidrona	Combipatch	Síntomas menopáusicos	Novartis
1999	Lidocaína	Lidoderm	Neuralgia postherpética	Endo Pharmaceuticals (Chadds Ford, PA, USA)

Tabla 1 Continuación

2001	Etil-estradiol con norelgestromin	Ortho Evra	Anticonceptivo	Ortho-McNeil Pharmaceutical (Raritan, NJ, USA)
2003	Estradiol con lenorgestrol	Climara Pro	Síntomas menopáusicos	Bayer Healthcare Pharmaceuticals (Wayne, NJ, USA)
2003	Oxibutinina	Oxytrol	Antiespasmódico	Watson Pharma (Corona, CA, USA)
2004	Lidocaína	SonoPrep	Anestesia local	Echo Therapeutics (Franklin, MA, USA)
2005	Lidocaína con tetracaína	Synera	Analgesia dérmica	Endo Pharmaceuticals
2006	Clorhidrato de fentanilo	lonsys	Analgesia epidural, trabajo de parto	Alza
2006	Metilfenidato	Daytrana	Síndrome de déficit de atención	Shire (Wayne, PA, USA)
2006	Selegilina	Emsam	Antiparkinsoniano y antidepresivo	Bristol-Myers Squibb (Princeton, NJ, USA)
2007	Rotigotina	Neupro	Antiparkinsoniano	Schwarz Pharma (Mequon, WI, USA)
2007	Rivastigmina	Exelon	Demencia	Novartis
2008	Granisetron	Sancuso	Nausea y vómito	Prostrakan (Galashiels, UK)

La vía transdérmica ofrece una oportunidad convincente para mejorar la administración de vacunas. Aunque las vacunas por lo general son macromoléculas, partículas virales o algunas otras moléculas de naturaleza supramolecular, su baja dosis les permite ser candidatas a esta vía, además de lo atractivo que resulta el hecho de que la cantidad de células epidermales de Langerhans y células dendríticas probablemente desencadenen una respuesta inmune mucho más rápida con una menor dosis ⁽⁹⁾.

El gran énfasis en esta forma de vacunación ha sido de empatía para farmacéuticas tales como Sanofi Pasteur (Paris), Becton Dickinson (Franklin Lakes, NJ, USA) para el caso de la vacuna contra la influenza formulada en microarreglos o bien Iomai (Gaithersbur, MD, USA) con una gran inversión actualmente para el portafolio de vacunas.

Debido a la administración no invasiva de los parches (uso externo), así como el control de los mismos por parte del paciente, es posible desarrollar una liberación modulada o pulsátil, la que puede incluir un control por retroalimentación. Recientemente ha sido aprobado en los Estados Unidos de Norteamérica el uso de un parche conteniendo fentanilo, un potente analgésico, que emplea un sistema de liberación regulada por iontoforesis ⁽¹¹⁾.

Finalmente la vía transdérmica no tan sólo tiene como principal objetivo la liberación de fármacos a través de la piel, de igual manera su empleo puede ser enfatizado en el extraer moléculas de interés del organismo (extracción de fluidos biológicos) ⁽¹²⁾, lo que se ha logrado con el monitoreo de glucosa, mediante la extracción de líquido intersticial utilizando un dispositivo eléctrico ⁽¹²⁾.

Desde una perspectiva general, se ha propuesto la clasificación de los sistemas de liberación transdérmica en tres generaciones: la primera; en la cual los fármacos empleados, generalmente de bajo peso molecular, no representan mayor problema para penetrar la piel, la segunda; con la que se inicia el empleo de promotores de permeación para facilitar el transporte a través de la piel, teniendo un éxito moderado en lo que se refiere a la permeación de bajas cantidades de moléculas pequeñas. Por último, la tercera generación implica la posibilidad de facilitar el transporte de macromoléculas (proteínas y DNA) y vacunas basadas en virus. De hecho, algunos de estos fármacos ya se encuentran en etapa clínica, como se muestra en la tabla 2.

Tabla 2. Sistemas de liberación transdérmica en desarrollo clínico ⁽⁷⁾

Fármaco	Indicación terapéutica	Tecnología	Fase Clínica	Comercializadora
AB-1001	Nausea y vómito	Pasiva	3	Abeille Pharmaceuticals (Princeton, NJ, USA)
Aciclovir	Herpes labial	Iontoforesis	2	Transport Pharmaceuticals (Framingham, MA, USA)
Buprenorfina	Dolor	Pasiva	3	Purdue Pharma (Stamford, CT, USA)
Hormona de la fertilidad	Esterilidad	Iontoforesis	1	Vyteris/Ferring (Fair Lawn, NJ, USA/Parsippany, NJ, USA)
Enterotoxina termolabil de <i>E. coli</i>	Diarrea de viajero	Abrasión	2	Iomai Corporation (Washington D.C., USA)
Hormona del crecimiento	Deficiencia en hormona del crecimiento	Ablación térmica	1	TransPharma Medical/ Teva Pharmaceuticals (Lod, Israel/Petach Tikva, Israel)
Vacuna contra la influenza	Influenza, profilaxis	Microagujas	Pre-registro	Becton Dickinson/Sanofi-Pasteur (Franklin Lakes, NJ, USA/Lyon, France)
Insulina	Diabetes mellitus	Ablación térmica	1	Altea Therapeutics (Atlanta, GA, USA)

Tabla 2 Continuación

Insulina	Diabetes mellitus	Acarreador vesicular	2	Phosphagenics (Melbourne)
Ketoprofeno	Osteoartritis	Calor	3	ZARS (Salt Lake City, UT, USA)
Hormona paratiroides (1-34)	Osteoporosis	Microagujas	2	Zosano (Fremont, CA, USA)
Sufentanil	Dolor crónico	Pasiva	2	Durect/Endo (Cupertino, CA, USA)
Testosterona	Disfunción sexual femenina	Spray	2	Acrux/VIVUS (West Melbourne, Australia/Mountain View, CA, USA)
Testosterona	Hipogonadismo en varón	Promotores Químicos (SEPA)	2	MacroChem (New York)
Testosterona	Bajo deseo sexual	Pasiva	Pre-registro	Procter & Gamble/Watson (Cincinnati/Corona, CA, USA)
Acetato de Triamcinolona	Dermatosis	Promotores Químicos (Azona)	Pre-registro	Echo Therapeutics (Franklin, MA, USA)

2.1.1 PRIMERA GENERACIÓN

La primera generación de liberación transdérmica es responsable de la mayoría de los parches transdérmicos que se encuentran en uso clínico. Un avance significativo se tuvo en la tecnología y en la aceptación por parte del paciente. Sin embargo, el mayor inconveniente fue que sólo los fármacos que presentaban una naturaleza afín a la piel, un peso molecular de pocos daltons y una eficacia con baja dosis eran aceptados.

En esta primera generación la principal limitante fue la barrera que impone el estrato córneo, con un grosor de apenas 10-20 μm , para la permeación de sustancias. En tejido más profundo y con un grosor de 50 a 100 μm se encuentra la epidermis viable, la cual es avascular, y no es sino hasta la dermis con un grosor de 1-2 mm y rica en capilares, donde se concentra una alta vascularización, misma que favorece la absorción sistémica de fármacos.

El estrato córneo presenta una estructura de “ladrillo y cemento”, donde los ladrillos representan a las células muertas o corneocitos que están compuestos principalmente de queratina entrecruzada, y el cemento simboliza los lípidos en la piel, organizados en bicapas.

El transporte a través del estrato córneo involucra un proceso de difusión vía los lípidos intercelulares, los cuales están rodeando a los corneocitos. Las moléculas hidrofílicas viajan por la cabeza de la bicapa lipídica, mientras que las sustancias lipofílicas pasan por las cadenas hidrocarbonadas de la bicapa. Al atravesar la membrana, las moléculas se disuelven en el material lipídico que constituye la membrana de acuerdo a su liposolubilidad y a su coeficiente de partición, luego las moléculas del principio activo dejan la membrana lipídica y se disuelven nuevamente en el medio acuoso de las capas más profundas, esta vez dentro de la membrana de acuerdo a un gradiente de concentración.

Este transporte depende primordialmente de la naturaleza de la molécula y las propiedades que ésta posea. En esta primera generación también se encuentran aerosoles, geles y otras formulaciones tópicas para la piel, incluyendo aquellas que involucran la formación de sistemas sobresaturados por evaporación de algún componente de la formulación.

2.1.2 SEGUNDA GENERACIÓN

En esta generación se reconoce la necesidad del empleo de promotores de absorción para ampliar el rango de fármacos administrados por esta vía. El promotor ideal deberá de tener las siguientes características: (1) que incremente la permeabilidad por medio de la disrupción reversible del estrato córneo, (2) que provea una fuerza extra al transporte de las sustancias dentro de la piel y (3) que evite el daño en tejidos más profundos.

Los promotores pueden clasificarse de manera muy general en químicos y físicos. Los promotores químicos son excipientes o aditivos que se incluyen en la formulación para cumplir con esta y otras funciones. Su mecanismo de acción está básicamente asociado a la interacción con los componentes de la piel (*v.gr.* lípidos y proteínas), alterándolos de manera reversible.

Como la vía de transporte para la mayoría de las moléculas es la intercelular, los promotores más efectivos actúan fluidizando los lípidos y de esta forma generan regiones de desorden donde la difusión de los fármacos se ve facilitada; además, los promotores químicos pueden también incrementar el coeficiente de partición en el estrato córneo.

Por otro lado, los promotores de tipo físico incluyen técnicas como la iontoforesis, ultrasonido, magnetoforesis, láser, etc. De estos, la que ha mostrado mayor auge es la iontoforesis que consiste en la aplicación de una pequeña corriente eléctrica para promover el paso de sustancias con y sin carga a través de la piel. Este tipo de promotores cumplen con el incremento del paso de fármaco a través de la piel sin dañar tejidos profundos. Como resultado, ésta, la segunda generación, dio lugar a un avance clínico de moléculas pequeñas, con una efectividad moderada para macromoléculas⁽³⁻⁶⁾.

Cabe mencionar que en esta generación también quedan incluidos aquellos acarreadores o vectores destinados al transporte de activos a través del estrato córneo y hacia tejidos profundos de la piel. La inclusión de fármacos en estos vectores tiene como finalidad facilitar su transporte, protegerlos del medio biológico, dirigir su liberación hacia ciertos sitios o receptores, o bien lograr una liberación prolongada o controlada. Entre los acarreadores más empleados por vía transdérmica se encuentran los liposomas, dendrímeros, nanopartículas, complejos de inclusión con ciclodextrinas, entre otros^(13; 14).

Finalmente, la segunda generación incluye el uso de profármacos, que son entidades sin actividad farmacológica, pero con mejores características de permeabilidad en relación al fármaco del cual surgen. La idea es que una vez que el profármaco penetra al medio biológico, por acción química o enzimática se transforma en la entidad química farmacológicamente activa (propriadamente dicho, el fármaco). El problema con los profármacos es que al ser considerados como nuevas moléculas, requieren como tales contar con la aprobación de la FDA o de las autoridades regulatorias del país en que se proponen.

2.1.3 TERCERA GENERACIÓN

La tercera generación incluye estrategias que han tenido un mayor impacto en la vía transdérmica, logrando la permeación de macromoléculas ya que su principal objetivo es generar una alteración importante pero reversible del estrato córneo, logrando así una liberación de fármacos de manera más efectiva.

En la tercera generación se incluyen técnicas como el uso de microagujas, microabrasión, abrasión térmica, entre otras. Asimismo se retoman algunas incluidas en la segunda generación como la iontoforesis o los acarreadores. Incluso, esta tercera generación, se caracteriza por el uso de estrategias combinadas para lograr un efecto sinérgico ⁽¹⁵⁾.

2.1.4 VENTAJAS DE LOS SISTEMAS DE ADMINISTRACIÓN TRANSDÉRMICOS ⁽¹⁶⁾

- Pueden sustituir a la vía oral.
- Evitan degradaciones por tracto gastrointestinal.
- Pueden sustituir multidosis en una sola administración.
- Aumentan el tiempo en circulación sistémica de los medicamentos que tienen un tiempo de vida media corta.
- Una vez retirado el dispositivo, el efecto del medicamento disminuye rápidamente.
- En caso de algún accidente o emergencia, se identifica rápidamente el fármaco administrado.
- Disminución del efecto de primer paso hepático.

2.1.5 DESVENTAJAS DE LOS SISTEMAS DE ADMINISTRACIÓN TRANSDÉRMICOS ⁽¹⁶⁾

- Tecnología compleja.
- Elevados costos.
- Se limitan a cierto número de fármacos.
- Acción dependiente del tiempo de permanencia del dispositivo en piel.
- Variaciones interindividuales.
- Alergias, irritación, enrojecimiento o algunas manifestaciones al momento de administrarse.
- Crecimiento de bacterias.

2.1.6 PERSPECTIVAS

En general la primera generación permanecerá en el mercado para aquellas sustancias que cumplen con los requerimientos necesarios para atravesar la piel por difusión pasiva y también para todos aquellos medicamentos los cuales están a punto de perder la patente y que requieren vías novedosas de administración.

En cuanto a la segunda generación, tendrá un impacto moderado en el mundo de la liberación transdérmica, ya que si bien incrementa la permeabilidad de dichas sustancias, éstas siguen siendo pequeñas; aunado a esto, algunos de los promotores químicos irritan la piel o no han sido completamente aprobados por la FDA.

Actualmente, el mayor enfoque se centra en la tercera generación, que se encuentra en sus inicios, ofreciendo estrategias factibles para la facilitación del paso de sustancias especialmente macromoléculas, proteínas, partículas nanométricas y micrométricas. Esta tercera generación implica también la combinación de diferentes técnicas promotoras, que presenten un efecto sinérgico, al poseer distintos mecanismos de acción.

2.2 LA PIEL

2.2.1 GENERALIDADES

La piel es la barrera semipermeable más extensa en el cuerpo humano, mismo al que recubre. Se define como tegumento, del latín *tegmentum* “lo que cubre”, cuenta como límite los orificios naturales donde se prolongan las mucosas, tal delimitación aparece sin transición alguna y la diferencia en el aspecto exterior entre piel y mucosa, se debe a una diferencia estructural.

Aparte de las funciones como membrana biológica semipermeable, actúa como: escudo protector contra el calor, la luz, lesiones e infecciones, sistema termorregulador y regulador del intercambio de fluidos, teniendo una gran función en contra de los microorganismos.

Es el órgano sensorial para la temperatura, la presión, el tacto y el dolor; protege tejidos finos subyacentes contra luz UV, desempeña un papel en el metabolismo, incluyendo síntesis de la vitamina D y la biotransformación de algunos productos químicos⁽¹⁷⁾.

La piel reviste a todo el cuerpo y es un órgano completo anatómico y funcional ligado a la fisiología y patología de todo el organismo. La extensión del órgano cutáneo es variable según la talla y la complexión del individuo, una persona de 70 kg que mide 1.70 m está cubierta por 1.85 m² de piel, con un volumen de 4000 cm³ y 2.2 mm de espesor como promedio.

Su peso es de 4.2 kg que equivale al 6 % de peso corporal, más del doble que el del cerebro y el del hígado. Contiene 1.8 cm³ de sangre, un 30 % de la sangre total del organismo. Es pues el órgano más extenso y de mayor peso y volumen⁽¹⁸⁾.

Además es capaz de la transmisión de sensaciones del entorno externo. En la figura 2 se muestra un corte histológico de la piel teñida con hematoxilina-eosina, en donde es posible ver algunas de las capas que la conforman.



Figura 2. Corte histológico de la piel (Tinción: Hematoxilina Eosina, Fluorescencia)¹.

2.2.2 CARACTERÍSTICAS Y ESTRUCTURA DE LA PIEL

Como se muestra en la figura 3, la piel se conforma, *grosso modo*, de 3 capas: epidermis, dermis e hipodermis⁽¹⁸⁾, y tiene diferentes órganos anexos o también llamados accesorios como uñas, vellos, glándulas, macrófagos, linfocitos, células de Langerhans, entre otras⁽¹⁹⁾.

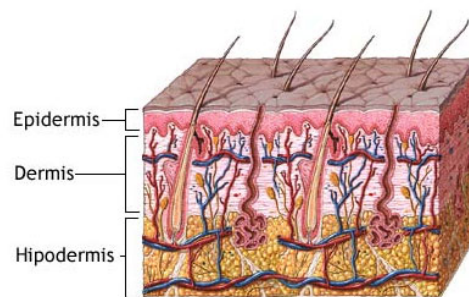


Figura 3. Capas de la piel².

¹ Imagen tomada por el M.F. Germán Garrido en el Laboratorio de Apoyo a Histología y Biología, FES-Cuautitlán, Campo 4.

² Imagen tomada de <http://www.shands.org/health/graphics/images/es/8912.jpg> (octubre, 2009)

2.2.2.1 EPIDERMIS

Capa más externa de la piel, es especialmente gruesa en las palmas de las manos y los soles de los pies (1.5 milímetros) mientras que en los párpados es de apenas 0.5 milímetros. La epidermis contiene: melanocitos (células encargadas de la pigmentación), células de Langerhans (implicadas en el sistema inmune de la piel), células de Merkel y nervios sensoriales.

No hay vasos sanguíneos en la epidermis, pero su capa más profunda es provista por un fluido de linfa ⁽²⁰⁾. Está compuesta por cinco estratos diferentes (*fig. 4*): córneo, lúcido, granuloso, mucoso de Malpighi o espinoso y basal. Algunas de sus características principales son: no existen terminaciones nerviosas, ni vasos sanguíneos, tiene una renovación constante y se nutre con oxígeno y nutrimentos de las capas anteriores. La tabla 3 muestra algunas características importantes de estos estratos.

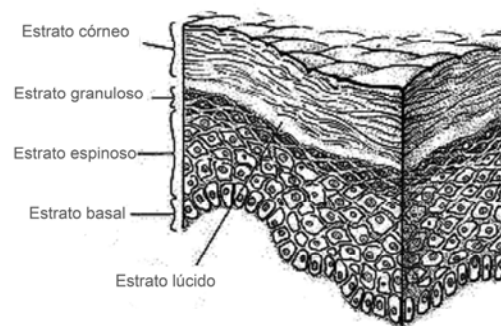


Figura 4. Esquema de la epidermis ⁽²¹⁾.

Tabla 3. Características más importantes de los estratos epidérmicos ^(18; 22; 23)

	BASAL	ESPINOSO	GRANULOSO	LÚCIDO	CÓRNEO
Capas	1	8-10	3-5	3 -5	25-30
Células	Queratinocitos cúbicos o cilíndricos.	Queratinocitos poliédricos; prolongaciones de melanocitos, células de Langerhans y Merkel.	Queratinocitos planos. Proteínas ricas en histidina y cistina	Corneocitos	Corneocitos
Características	Producir nuevos queratinocitos; melanocitos; células de Langerhans y de Merkel.	Aplanamiento de queratinocitos según el crecimiento. Cohesión a la epidermis con suficiente espacio entre las células para la circulación de la linfa.	Producción de queratohialina. Organización de filamentos intermedios en haces gruesos. Los gránulos lamelares liberan una secreción rica en lípidos (cemento).	Existencia de una íntima oposición por filamentos intermedios. Células eosinófilas en las cuales está muy avanzado el proceso de queratinización. Desaparición y degradación de núcleo y organelos citoplasmáticos a medida que la célula se llena de queratina.	Fuerte membrana protectora. Presencia de queratohialina y secreción de gránulos lamelares. Gran cantidad de queratina (ladrillos).

2.2.2.2 UNIÓN DERMOEPIDÉRMICA

Como puede observarse en la figura 5, esta unión se encuentra entre la dermis y la epidermis, donde se lleva a cabo el intercambio de nutrientes entre ambas capas. Cumple con las siguientes funciones: soporte mecánico, regulación de permeabilidad, fijación de células, morfogénesis de células epiteliales. Esta capa principalmente consta de las siguientes zonas: membrana plasmática de la célula basal, lámina lúcida, lámina densa y la zona fibrosa ⁽²³⁾.

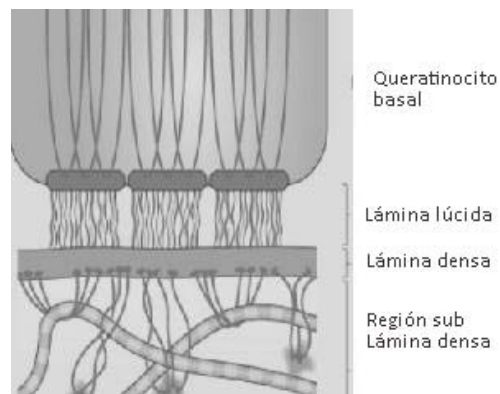


Figura 5. Unión dermoepidérmica ³.

2.2.2.3 DERMIS

La dermis es una capa resistente y elástica que contiene el tejido fino fibroso blanco entrelazado con las fibras elásticas amarillas. Presenta igualmente dos capas, el cuerpo papilar y el corion o dermis propiamente dicha. El corion, como todo tejido de sostenimiento, tiene una estructura resistente, formada por una especie de argamasa con haces y fibrillas entrecruzadas. En este entramado se encuentran elementos tan importantes como el colágeno y la elastina. En la dermis se reconocen dos capas con estructuras diferentes: la capa papilar y la capa reticular.

La capa papilar, consiste en tejido conectivo laxo ubicado inmediatamente por debajo de la epidermis. Las fibras colágenas localizadas en esta parte de la dermis no son tan gruesas como las de la protección más profunda.

³ Adaptada de <http://www.uv.es/derma/CLindex/CLdermatopat/CLdermatopatologia.html>, octubre, 2009.

De modo similar, las fibras elásticas son aquí filiformes y forman un reticulado irregular, la capa papilar es relativamente fina e incluye la sustancia de las papilas y las crestas dérmicas. Contiene vasos sanguíneos que irrigan pero no penetran en la epidermis, también contiene prolongaciones nerviosas, algunas de las cuales finalizan en la dermis y otras perforan la lámina basal y entran en el compartimiento epitelial. Los vasos sanguíneos y las terminaciones nerviosas sensoriales están muy concentrados, por lo que son muy visibles en las papilas dérmicas⁽²³⁾.

Capa reticular subyacente a la capa papilar: su espesor varía en las distintas partes de la superficie corporal, pero siempre es considerada más gruesa y menos celular que la capa papilar. Se caracteriza por presentar haces gruesos e irregulares de colágeno y por la presencia de fibras elásticas más gruesas. Las fibras colágenas y elásticas no tienen una orientación aleatoria, sino que forman líneas regulares de tensión en la piel, denominadas líneas de Langer. Las incisiones cutáneas paralelas a las líneas de Langer curan con cicatrices mínimas.

Muchas estructuras se encuentran en la dermis, incluyendo: vasos sanguíneos, tubos capilares y recipientes linfáticos, conclusiones de nervios sensoriales, glándulas del sudor y sus conductos, glándulas sebáceas, folículos del pelo, bulbos del pelo y raíces del pelo.

2.2.2.4 HIPODERMIS O TEJIDO CELULAR SUBCUTÁNEO

Ésta es la capa más profunda de la piel, conecta o ata la dermis con los órganos subyacentes. Esta capa se compone principalmente de tejidos finos conectivos fibrosos flojos y de células grasas (adipocitos) entrelazados con los vasos sanguíneos. Las mujeres tienen una hipodermis generalmente cerca del 8 % más gruesa que los hombres. Entre las funciones más importantes de la hipodermis está el almacenamiento de lípidos, fungir como barrera aislante, amortiguamiento contra golpes, y regulación de temperatura⁽²³⁾.

2.2.3 EFICACIA COMO BARRERA

La piel intacta es una barrera eficaz contra muchos productos químicos y la capa situada en la superficie de la piel, el estrato córneo, es la parte más eficaz de esta barrera; sin embargo, la exposición de la superficie cutánea a algunos productos químicos puede dar lugar a consecuencias serias o fatales. Por ejemplo, tan solo 100 ml de ácido fluorhídrico concentrado derramado sobre un área pequeña de la piel puede dar lugar a lesiones muy graves; o bien está el caso de las personas expuestas por tiempos prolongados a plaguicidas organofosforados o algún otro compuesto orgánico el cual puede ser absorbido por la piel.

El estrato córneo puede ser atacado directamente por los álcalis y ofrece una protección mínima contra los materiales liposolubles tales como disolventes orgánicos. La absorción química limitada puede ocurrir a través de los folículos del pelo y de las glándulas sebáceas; sin embargo, el camino principal para la absorción de la piel está a través de las células epidérmicas.

Por otro lado, el estrato córneo ofrece una protección eficaz contra la pérdida de los fluidos internos del organismo. Se dice que si se retirara el estrato córneo de la superficie de nuestra piel, nos deshidataríamos, al perder toda el agua del organismo. La eficacia del estrato córneo como barrera ha sido evidenciada empleando diversas técnicas biofísicas, sin embargo, la más empleada es la medida de la pérdida de agua transepidermal (TEWL, *Transepidermal Water Loss*). Esta técnica mide la diferencia de presión de vapor entre la superficie cutánea y el medio ambiente, lo que permite una medida directa de la cantidad de agua que se pierde a través de nuestra piel.

Aunque los valores normales de TEWL son muy variables y dependen de diversos factores personales (*v.gr.* emocionales, actividad física) y ambientales (*v.gr.* temperatura y humedad relativa), en general, para una persona en estado de reposo estos oscilan entre 4 y 12 g/hm². Un incremento en los valores de TEWL puede ser indicativo de una alteración de la barrera de permeabilidad⁽²⁴⁾.⁽²⁴⁾. El hecho de retirar capas de estrato córneo empleando cintas adhesivas (*Tape stripping*) o con solventes orgánicos trae como consecuencia un incremento importante del TEWL. Así pues, esta técnica es muy empleada para evaluar el estado de la barrera de permeabilidad, al medir la intensidad y duración del efecto de promotores de absorción.

2.2.4 MECANISMOS DE TRANSPORTE

El transporte depende de las propiedades fisicoquímicas del principio activo y de la forma farmacéutica; es decir, está en función de factores farmacotécnicos los que en último término controlan la secuencia liberación y absorción.

El principio activo puede no ser absorbido, así por ejemplo, si la molécula del fármaco se adhiere a la superficie de la piel por uniones iónicas, por puentes de hidrógeno o por fuerzas de van der Waals, el fenómeno se designa como adsorción. Si por el contrario, el principio activo llega a las capas internas de la piel pero no llega a los capilares, el fenómeno se designa como penetración. Solamente si el principio activo permea o atraviesa la pared de los capilares y llega a la circulación sistémica, se dice que ha habido absorción. Los términos penetración y permeación de manera general se designan como fenómenos de sorción.

En lo referente al transporte a través de la piel, éste se lleva a cabo por difusión pasiva, caracterizado por realizarse a través de una membrana semipermeable. Esta difusión depende de la concentración y por tanto del gradiente que se genera hacia las diferentes capas subcutáneas. ^(25; 26).

La interpretación fisicoquímica de este mecanismo, se hace aplicando la Ley de Fick ya que la mayoría de principios activos administrados por esta vía son electrolitos, ya sea bases débiles o ácidos débiles, por consiguiente, la absorción se lleva a cabo hasta que se obtenga el estado de equilibrio a ambos lados de la membrana ⁽²⁷⁾.

Entonces:

$$J = -D \frac{\delta C}{\delta x}$$

Ecuación 1. Difusión pasiva de un no electrólito en ausencia de flujo estacionario.

Teniendo que el flujo (J) está en función del coeficiente de difusión (D) y del gradiente de concentración a través de una distancia x ($\delta C/\delta x$).

Al no poderse medir con facilidad el gradiente de concentración, se hace una aproximación mediante el producto del coeficiente de permeabilidad (P_s) y la diferencia de concentración a través de la piel (C_s). El flujo transdérmico en el estado estacionario J_s a través de la barrera de la piel estará expresado como:

$$J_s = P_s C_s$$

Ecuación 2. Flujo transdérmico en el estado estacionario.

La difusividad del agua, estudiada por Berenson y Burch ⁽²⁸⁾, es de $5 \times 10^{-10} \text{ cm}^2/\text{s}$ en el estrato córneo y de $2 \times 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$ en la dermis, lo que permite comprobar que el estrato córneo es la principal barrera que se opone al transporte de agua a través de la piel.

Tabla 4. Importancia relativa de los apéndices sobre la permeabilidad del agua a través de la piel ⁽²⁸⁾

Vía de penetración	Volumen fraccional	Difusividad
Folículos pilosos	$1-2 \times 10^{-3}$	$5-20 \times 10^{-8}$
Glándulas sudoríparas	$3-5 \times 10^{-4}$	$1-20 \times 10^{-6}$
Intercelular	-0.01	$1-10 \times 10^{-11}$
Transcelular	0.999	$5-10 \times 10^{-10}$

Para moléculas no polares la resistencia de la dermis es algo más importante, aunque sigue siendo despreciable en comparación a la de la epidermis. Experiencias posteriores empleando trazadores isotópicos para localizar las sustancias que penetran el estrato córneo demuestran una distribución que corresponde a una difusividad uniforme a lo largo del espesor del mismo. Otra vía de penetración de principios activos a través de la piel son los apéndices, aunque éstos son una vía de transferencia de materia comparativamente pequeña (tabla 4).

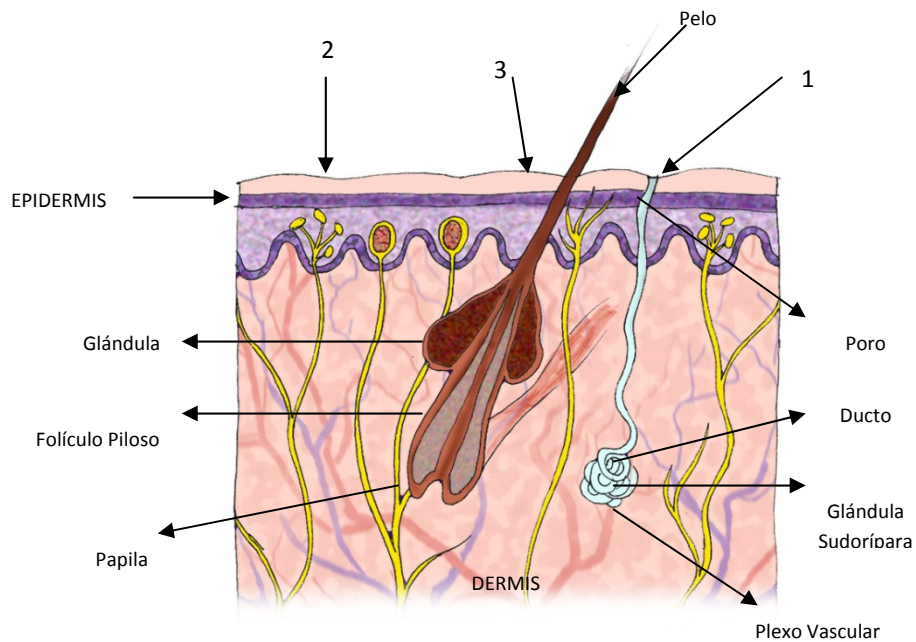


Figura 6. Ejemplificación simplificada de las rutas de penetración en la piel; (1) a través de los ductos sudoríparos; (2) directamente a través del estrato córneo; (3) vía folículos pilosos.

En la tabla 4 se muestran los porcentajes del área total que corresponde a cada vía de administración así como los valores para la difusividad del agua. Estos valores indican que los apéndices representan una vía de administración poco significativa en comparación al estrato córneo, sin embargo, hay casos en los cuales pueden constituir una alternativa según las características de la formulación. En la figura 6 se pueden apreciar gráficamente las rutas de penetración en piel.

Desde el punto de vista farmacotécnico, las formas de administración tópica son las más difíciles de formular debido a que constituyen el único grupo donde el principio activo y la base o vehículo tiene igual importancia⁽²⁹⁾.

Esto es lo que se refleja en la diferencia de la actividad terapéutica de preparados que contienen un mismo principio activo, bajo la misma forma química, pero que están formuladas en bases de diferente composición, lo que de manera general ocurre en los producidos por diferentes laboratorios.

Cuando se administra una forma farmacéutica por la vía transepidérmica ya sea ésta una pomada, crema, jalea, gel o una emulsión líquida, el transporte se lleva a cabo por una serie de etapas en cada una de las que se forma una interfase a través de la cual se cumple la secuencia de liberación, penetración, permeación y absorción según sea el objetivo que se busque o la respuesta que se desee (29).

Esa secuencia puede ser modificada ya sea acelerando o retardando el proceso por medio de la formulación o la técnica de administración, es decir aplicando métodos como elevación de la temperatura, oclusión, masaje, vendajes, etc. (fig. 7).

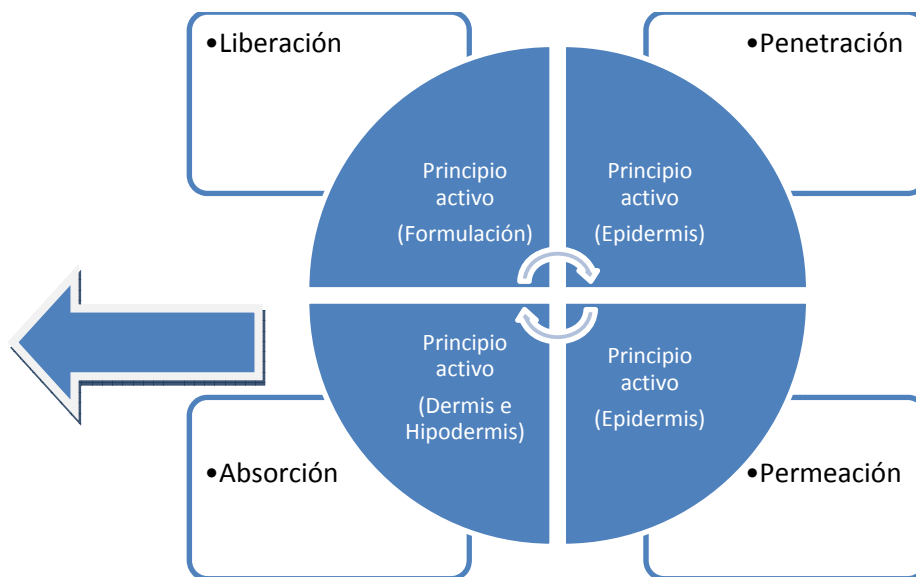


Figura 7. Etapas de absorción transepidérmica.

2.3 PROMOTORES DE ABSORCIÓN TRANSDÉRMICA

Desde un punto de vista farmacológico la piel es sujeto de estudio para el paso de distintos fármacos, como ya se ha descrito en secciones anteriores. La vía transdérmica incorpora en sus formulaciones sustancias exógenas que promueven la absorción del fármaco, o si es el caso dispositivos que ofrezcan la misma promoción de absorción.

Karande *et al.*⁽³⁰⁾ lograron un avance significativo en el área de promotores. Los autores sugieren el empleo de espectroscopía de infrarojo usando transformadas de Fourier como prueba para determinar el tipo de promotores de absorción. Los promotores reducen la barrera epitelial, permitiendo el paso de moléculas de hasta 10 kDa. Como ya se mencionó, las rutas potenciales para el paso de los fármacos a través de la piel son 3 (*vid. fig. 6*), las principales, folículo piloso, glándulas sudoríparas o bien por el estrato córneo, siendo este último el que provee la mayor área efectiva para la administración de fármacos (99.9 %).

La estructura de la piel, como bien ha sido descrita previamente, se compone de corneocitos, células muertas conformadas por queratina hidratada empujados en bicapas lipídicas de ceramidas, ácidos grasos, ésteres de colesterol y colesterol. Dichas capas constituyen una mezcla interconectada de estructuras cristalinas, semi-cristalinas, gel y cristal líquido siendo una estructura compleja para el paso de la mayoría de los fármacos. Tal razón por la que es representada, la piel, como una estructura de ladrillos y cemento, y es por eso que el objetivo primordial de los promotores de absorción es el de mejorar o permitir el paso de las moléculas ya sea por una interrupción temporal o franqueo al estrato córneo⁽¹⁶⁾.

Los promotores de absorción son compuestos químicos, farmacológicamente inactivos, con propiedades fisicoquímicas que permiten modificar reversiblemente la resistente barrera del estrato córneo, ayudando a los fármacos a penetrar en los tejidos, para actuar de manera local o sistémica. De la misma manera pueden ser de tipo mecánicos con propiedades similares para la misma finalidad (*fig. 8*)^(31; 32).

Algunas de las propiedades ideales para los promotores son las siguientes ⁽¹⁶⁾:

1. No tóxico, no irritante ni alergénico.
2. Rápida acción con actividad y duración del efecto predecible y reproducible.
3. Sin efecto farmacológico dentro del organismo.
4. Efecto unidireccional.
5. Efecto reversible.
6. Compatible con excipientes y fármacos en diferentes formulaciones.
7. Cosméticamente aceptable.

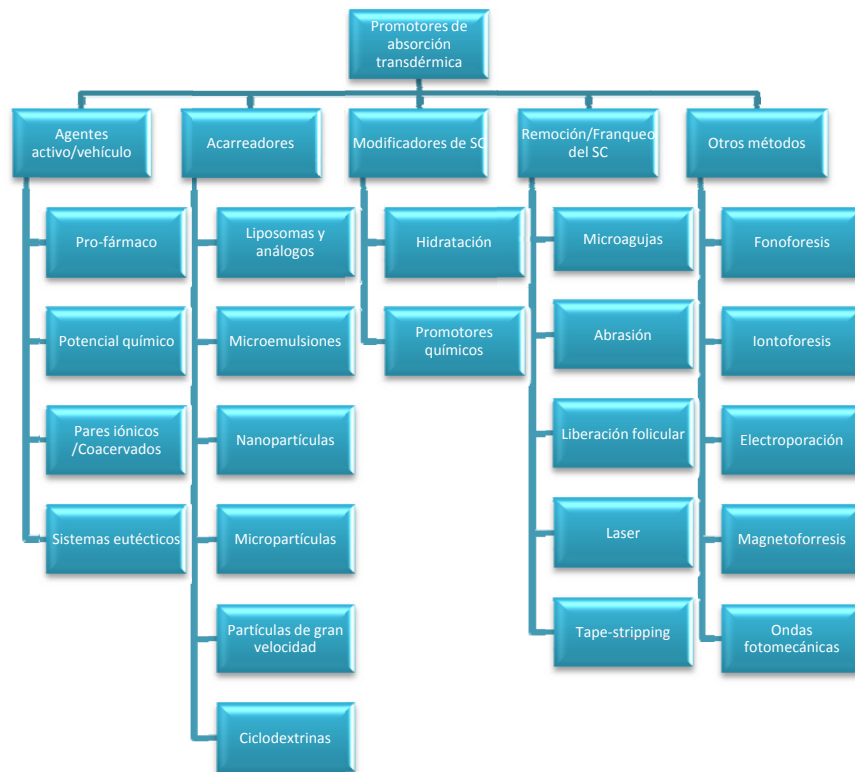


Figura 8. Promotores de absorción transdérmica [modificada ⁽¹⁶⁾].

2.3.1 PROMOTORES QUÍMICOS

La acción de estos promotores de penetración es compleja, sin embargo, la mayoría de ellos interactúan a nivel intercelular como se muestra en la figura 9, y pueden actuar directamente sobre ⁽³³⁾:

3. Queratina (SC): modificando su conformación intracelular al desnaturalizarla o modificarla o bien por un hinchamiento resultado de la hidratación.
4. Desmosomas: desestabilizando la cohesión que existe en los corneocitos.
5. Lípidos intercelulares: modificando las bicapas lipídicas, insertándose en las mismas y provocando una modificación en su configuración.
6. El coeficiente de partición en la piel.

E indirectamente:

1. Modificando la actividad termodinámica del fármaco.
2. Solubilizando al fármaco.

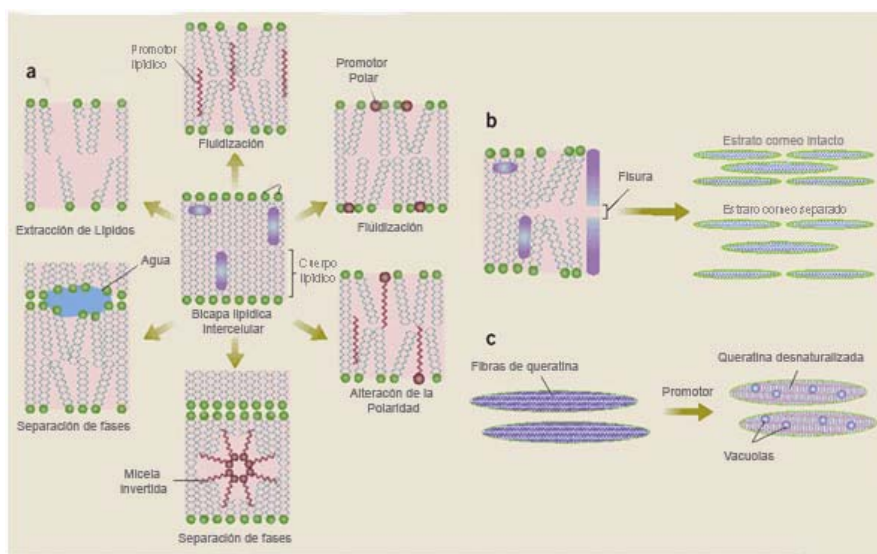


Figura 9. Acción de los promotores de absorción transdérmica. (a) acción de los promotores en los lípidos intercelulares; (b) acción a nivel de estructuras de desmosomas y proteínas (clínicamente inaceptable); (c) acción a nivel de corneocitos ⁽³⁴⁾.

2.3.2 PROMOTORES FÍSICOS

Por otro lado encontramos a los promotores de absorción físicos, que son mínimamente invasivos y la mayoría actúa ya sea por remoción del estrato córneo o franqueo, puede ser por medio de una fuerza eléctrica o bien mecánica. Como el caso de las microagujas que se puede ejemplificar en las figuras 10 y 11.

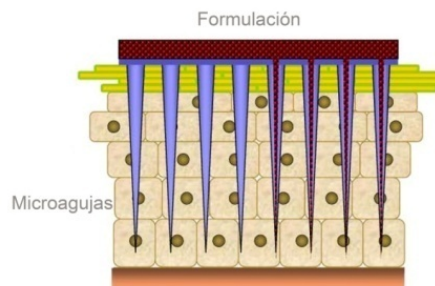


Figura 10. Esquema de microagujas; ejemplo de un promotor físico ⁽³⁵⁾.

2.3.2.1 MICROAGUJAS

Desde el comienzo de los procesos microelectrónicos, diferentes dispositivos han sido fabricados a escala más y más pequeña, y producidos en diferentes sustratos como el silicón, metal o polímeros. A medida que la tecnología ha ido mejorando, dichos microdispositivos se han ido haciendo más pequeños, rápidos, confiables, reproducibles y con muchas más capacidades, mejores que los que ya se habían manufacturado, incluyendo transistores, capacitores, inductores y diodos. El diseño de estos microdispositivos a recurrido a algunos procesos como la fotolitografía y el enmascaramiento.

Aunque la gran mayoría de los microdispositivos que hasta ahora han sido fabricados han beneficiado más al campo computacional, también pueden ser aplicados en el área de la salud, donde es un gran reto el conseguir sistemas microelectromecánicos biológicamente compatibles, para lo cual se necesita un mayor avance tecnológico ya que dicha industria está aún en sus comienzos.

Conforme la tecnología avanza, ésta introduce el desarrollo de dispositivos con métodos más robustos, haciéndolos más fáciles y asequibles. Tal es el caso de las microagujas, un dispositivo no implantable que ha demostrado gran utilidad e importancia para el mundo de la tecnología farmacéutica.

Aplicaciones de las microagujas:

- Medir niveles de glucosa en sangre ⁽³⁶⁾.
- Liberación transdérmica ⁽³⁷⁾.
- Vectorización.
- Biología Molecular.

2.3.2.1.1 MICROAGUJAS PARA LA LIBERACIÓN TRANSDÉRMICA

El concepto de microagujas data de finales de los 40's y principios de los 50's ⁽³⁸⁾ cuando se utilizaban en el área de la salud como microprocesadores. Como ejemplo los microencefalogramas ⁽³⁹⁾. Pero fue en 1976 cuando la corporación ALZA® ⁽⁴⁰⁾ patentó el primer dispositivo, que como la patente lo describe es un reservorio de fármaco con proyecciones (50-100 μm de longitud) extendidas desde el reservorio, supuesto a penetrar el estrato córneo y la epidermis para liberar el fármaco.

Sin embargo, este supuesto fue demostrado hasta 1998, cuando se le dio una aplicación a nivel farmacéutico. Las microagujas son como las agujas tradicionales, solo que a diferencia de las tradicionales, las microagujas son fabricadas a microescala; generalmente sus dimensiones oscilan entre 100-1000 μm en longitud y de 1-10 μm de diámetro ⁽⁴¹⁾.

Las microagujas han sido fabricadas con diferentes materiales como: metales, silicón, dióxido de silicón, polímeros (biocompatibles y/o biodegradables), cristal, entre otros. Cada uno requiere un diferente proceso de manufactura y da lugar a distintas microagujas ya sean curvas o rectas, sólidas o huecas. La figura 11 muestra un arreglo de microagujas.

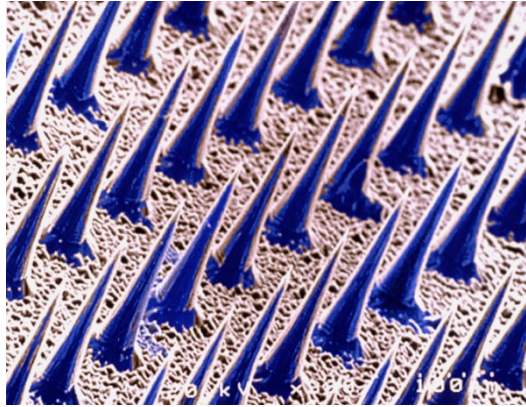


Figura 11. Arreglo de microagujas ⁽⁴¹⁾.

2.3.2.1.2 VENTAJAS DE LAS MICROAGUJAS

Las agujas convencionales pueden atravesar completamente la piel para liberar el fármaco de una manera eficaz, sin embargo suelen ser dolorosas y pueden ser causales de infecciones. La mayor ventaja de las microagujas radica en que con la longitud que tienen (100-1000 μm) pueden atravesar el estrato córneo sin llegar a terminaciones nerviosas evitando el dolor y dando consigo una liberación adecuada y efectiva del fármaco que se administre, ya que con tal longitud se asegura la disrupción del estrato córneo ^(37; 42).

En lo relacionado a los procesos, las microagujas pueden ser producidas en lotes, teniendo una alta precisión y exactitud siendo un método reproducible, robusto y de bajo costo ⁽⁴¹⁾.

2.3.2.1.3 FABRICACIÓN

Existen distintos tipos de materiales y formas para las microagujas al igual que para sus métodos de manufactura. Las microagujas, por lo general, involucran técnicas de grabado químicas o físicas; por ejemplo las microagujas de silicón son fabricadas por un método de grabado húmedo, como se muestra en la figura 12.

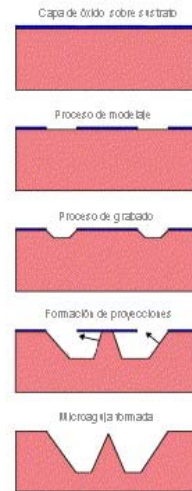


Figura 12. Proceso de formación de microagujas por vía húmeda, modificada de Wilke *et al.* 2005 ⁽⁴³⁾.

Otro método comúnmente empleado es el de grabado por medio de un ión reactivo, sigue el mismo proceso, sólo que para la formación de las proyecciones se emplea SF_6/O_2 , en vez de KOH. El tipo de microaguja fabricada puede ser empleada también como molde para la fabricación de microagujas huecas y/o sólidas, en donde este proceso se conoce como micromoldeo ⁽⁴¹⁾.

En el caso de las microagujas huecas el micromolde es fabricado en un material fotoresistente, el molde cubre todo el arreglo excepto por las puntas que son removidas por otro proceso de grabado ⁽⁴¹⁾.

2.3.2.1.4 TIPOS DE MICROAGUJAS

Existen dos tipos de microagujas, sólidas y huecas. Las microagujas sólidas, primeramente desarrolladas por Hashmi *et al.* ⁽⁴⁴⁾ para la liberación intracelular en la medicina genómica, consisten en un arreglo hecho de algún sustrato: cristal, silicón, metal o polímeros; con este último material se pueden fabricar microagujas biodegradables ⁽⁴⁵⁾.

Estas microagujas pueden estar cubiertas con algún fármaco para ser insertado, o bien perforar previamente para luego aplicar alguna formulación. Las microagujas huecas son similares a las sólidas con la diferencia de que la punta puede ser plana, biselada, redonda o recta y con un agujero el cual permite que estas sean llenadas con alguna formulación, sirviendo como conducto para la liberación de un fármaco contenido en un sistema de liberación, verbigracia: un parche; o bien que se utilicen para la extracción de fluidos biológicos.

2.3.2.1.5 MICROAGUJAS EN LA ACTUALIDAD

Como se describió en la sección anterior han sido desarrolladas diferentes microagujas mismas que han sido probadas para la permeación de diferentes fármacos a través de la piel (tabla 5). La tercera generación de la liberación transdérmica involucra el uso combinado de promotores (*v.gr.* microagujas y algún otro promotor o acarreador) lo que implica en la mayoría de los casos un efecto sinérgico, algunos ejemplos de este tipo se presentan en la tabla 6. En ambas tablas (5 y 6) se describen los distintos fármacos, modelos y estudios que hasta el momento se tienen en el área de las microagujas.

Tabla 5. Permeación de diferentes fármacos mediada por microagujas.

Año	Tipo	Longitud de aguja (μm)	Formulación	Fármaco modelo	Modelo	Estudio	Resultados	Referencia
1998	Sólidas de silicón	150	Solución (PBS)	Calceína	Piel de humano	<i>In vitro</i>	Incrementa hasta en 4 ordenes la magnitud de la permeación Potencial para el estudio de macromoléculas.	(41)
2005	Huecas de silicón; Huecas simétricas (SM); Huecas puntiagudas (PM)	200	Solución	Metilnicotinato	Piel de humano	<i>In vitro</i> & <i>in vivo</i>	<i>In vivo</i> : SM decrecen el tiempo máximo del flujo en sangre, comparados con la formulación tópica (control). PMs demostraron un mayor flujo en comparación con SM y control.	(46)
2005	Silicón	130	Película de quitosán	Calceína Seroalbumina bovina (BSA)	Piel de rata (abdominal)	<i>In vitro</i>	La permeación de ambos fármacos fue mejorada. Las películas de quitosán tienen una liberación controlada; dependencia en la cantidad de quitosán para la liberación.	(47)

Tabla 5 Continuación

2008	Policarbonato biocompatible	200 & 500	Gel (Carbopol 940, 1%)	Calceína	Piel de rata	<i>In vitro</i>	Incrementa la permeación de Calceína 5.46 órdenes.	(48)
2004	Sólidas de titanio	200	Recubiertas con una solución 0.2 wt.% polisorbato 20	Acetato de desmopresina	Piel de cuyo	<i>In vitro</i>	Liberación óptima del fármaco en bajas dosis. Residuos del fármaco en la piel son mínimos.	(49)
2005	Poliméricas biodegradables (PGA)	600	Solución (PBS)	Calceína Seroalbúmina bovina (BSA)	Piel de humano	<i>In vitro</i>	Dependencia de la composición del arreglo. Incrementa: 2 ordenes con arreglos de 20 microagujas. 3 ordenes con arreglos de 100 microagujas.	(45)
2006	Titanio	225, 400 & 600	Parche adhesivo	Ovalbúmina (OVA)	Piel de cuyo	<i>In vitro</i>	La longitud no afecta significativamente la respuesta inmunológica a ninguna dosis. Eficiencia de liberación: 48-58%.	(50)

Tabla 5 Continuación

2006	Sólidas de acero inoxidable, 27G	160	Solución	Isocianato de Fluoresceína (FITC) Dextran (FD) FD-4, FD-10 ó FD-40	Piel de rata (abdominal)	<i>In vitro</i>	Incrementa la permeabilidad en más de 10 órdenes.	(51)
2006	Polisacáridos hidrosolubles	324	Goma de dextrina	Insulina	Piel de rata (abdominal)	<i>In vitro & In vivo</i>	Efecto hipoglucémico, rápida liberación de la insulina.	(52)
2007	Sólidas de acero inoxidable, 30G	550, 700 & 900	Solución (PBS)	Cascade Blue® (CB) Dextran-Cascade Blue® FITC acoplado con dextran.	Piel de humano (abdominal)	<i>In vitro</i>	Incremento dramático en la permeación; no se encontró diferencia significativa en la longitud de la aguja ni en el peso molecular.	(53)
2007	Acero inoxidable	750	Solución de CMC; compuesta de 1% (w/v) (CMC) sal de sodio y 0.5% (w/v) Lutrol F-68 NF	Sulforodamina Calceína Vitamina B Seroalbúmina bovina conjugada con rojo Texas. Wiz™ plásmido luciferasa DNA.	Piel de cerdo	<i>In vitro</i>	Por primera vez se recubren microagujas con plásmidos de DNA y virus. Hasta 1mg puede ser incluido.	(54)

Tabla 5 Continuación

				Virus-Ankara modificado Partículas de sulfato de bario				
2008	CMC Piramidal	600	Matriz de CMC	Sulforodamina B BSA Lisozima	Piel de cerdo	<i>In vitro</i>	Liberación tipo bolo cuando las microagujas son cargadas de p.a. Liberación sostenida cuando se carga el p.a. en la parte externa del arreglo.	(55)
2008	Metálicas huecas; Metálicas solidas; Huecas de silicón	300 300 245	Solución	CB	Piel de humano	<i>In vitro</i>	Drástico incremento en la permeación de CB; a mayor velocidad de perforación mayor es el transporte de CB. El transporte del CB es dependiente de la geometría de la microaguja, y no se observan diferencias entre las sólidas y las de silicón.	(56)
2008	Sólidas de silicón	270	Parche bioadhesivo	Ácido 5-aminolevulínico (ALA)	Piel de cerdo	<i>In vitro & in vivo</i>	Incremento en el flujo de ALA 2.39 ordenes aproximadamente. Incrementa la producción de PpIX.	(57)

Tabla 5 Continuación

2009	Sólidas de maltosa	500 & 200	Solución	IgG Humana Anticuerpos monoclonales IgG	Piel de rata calva	<i>In vitro</i>	Existe una respuesta inmune. La longitud de la aguja al igual que el tamaño del arreglo afecta la respuesta inmune.	(58)
2009	Sólidas biodegradables recubiertas Ácido Poli-L-láctico (PLLA)	880	Solución	OVA	Piel de rata (dorsal)	<i>In vitro</i>	Mientras más microagujas haya en el arreglo y más largas sean inducirán una mayor respuesta de anticuerpos.	(59)
2009	Sólidas metálicas 30G Huecas metálicas Sólidas metálicas, tangencialmente cortadas Huecas de silicón	300 & 550 700 & 900 300 245	Solución	Toxoide Difteria (DT) Subunidad de la vacuna para influenza Toxina cólera como coadyuvante	Piel de rata (abdominal)	<i>In vitro</i>	Inmunización trasncutánea por la vacuna de la influenza es independiente del pretratamiento con microagujas aunque en el caso de DT el pretratamiento es necesario para obtener una respuesta de anticuerpos.	(60)
2009	Sólidas de silicón	30, 60 & 90	Solución de metilcelulosa y poloxamero 188.	Proteína de huevo de pollo OVA BSA	Piel de ratón (oreja)	<i>In vitro</i> <i>In vivo</i>	Incrementa significativamente la respuesta inmune. <i>In vivo</i> Proceso de secado por <i>gas-jet</i> asegura un recubrimiento uniforme.	(61)

Tabla 5 Continuación

2009	Sólidas de acero inoxidable recubiertas	700	Recubrimiento: solución 1% (w/v) (CMC) Sal de sodio; 0.5% (w/v) Lutrol F-68 NF 15% (w/v) trialosa en (PBS)	Formalina-inactivada, Virus de influenza: A/PR/8/34 virus (A/PR8)	Piel de rata (dorsal)	<i>In vitro</i>	Recubrimiento uniforme; mayor inmunización que intramuscular Respuesta rápida de anticuerpos y células T.	(62)
------	-----------------------------------------	-----	------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-------------------------------------------------------------------	-----------------------	-----------------	------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	------

Tabla 6. Efecto sinérgico de microagujas y otros promotores para distintas moléculas

Tipo	Promotor	Acarreador	Fármaco modelo	Modelo	Estudio	Resultados	Referencia
Solubles de maltosa	Iontoforesis 0.4 mA/cm ² 1h	No	Metotrexato	Piel de rata calva	<i>In vitro</i> & <i>In vivo</i>	La liberación es mejorada por el uso de microaguja <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> .	(63)
Sólidas de acero inoxidable	Iontoforesis 0.3 mA/cm ²	No	FITC acoplado con dextran	Piel de rata calva	<i>In vitro</i>	Mejorada la liberación de dextran.	(64)
Macroflux® Acero inoxidable o titanio	Iontoforesis 100 µA/cm ²	No	Oligodesoxinucleótido ISIS 2302 (ODNs)	Piel de cuyo	<i>In vivo</i>	Hay una liberación terapéuticamente aceptable de ODNs en y a través de la piel.	(65)
Solubles de maltosa	Iontoforesis 0.5 mA/cm ²	No	Danipletima	Piel de rata calva	<i>In vivo</i>	El estudio en conjunto da mucho mayores flujos con microagujas que sin ellas.	(66)
Maltosa	Iontoforesis 0.2 mA/cm ² · 1h	No	Calcitonina de salmón (SCT)	Piel de rata calva	<i>In vivo</i>	Un flujo más elevado de SCT.	(67)

Tabla 6 Continuación

Solubles de maltosa	Iontoforesis 0.5mA/cm ²	No	Heparina de bajo peso molecular (LMWH)	Piel de rata calva	<i>In vitro</i>	Incrementa la permeación de LMWH cuando se emplean en conjunto.	(68)
Sólidas de acero inoxidable	Iontoforesis 0.2 mA/cm ²	Nanovesículas	Insulina	Piel de cerdo & Piel de rata	<i>In vitro</i> & <i>In vivo</i>	El uso de promotores físicos incrementa la permeación de insulina.	(69)
Silicón	Electroporación	-	-	-	-	Liberación uniforme a través de las microagujas huecas durante la electroporación.	(70)
Acero inoxidable recubiertas	Electroporación	No	Plasmido de DNA	Piel de ratón	<i>In vitro</i>	Respuesta robusta de anticuerpos.	(71)
Acero inoxidable		Liposomas elásticos	Docetaxel (DTX)	Piel de cerdo	<i>In vitro</i>	El flujo en el estado estacionario del DTX a partir de diferentes formulaciones es incrementado con el uso de microagujas. El tiempo de latencia disminuye.	(72)

Tabla 6 Continuación

Dermarollers®	No	Invasomas	Manitol	Piel de humano (abdominal)	<i>In vitro</i>	La penetración de moléculas hidrofílicas se ve incrementada con el uso de microagujas contenidas en el Dermalroller® en combinación con las nanovesículas.	(73)
Sólidas de silicón	No	Nanoesferas de látex de poliestireno	-	Piel de humano (epidermis)	<i>In vitro</i>	Un incremento en la permeación de nanopartículas.	(74)
Sólidas en base silicón	No	Nanoesferas de poliestireno	Vectores de genes no virales	Piel de humano (epidermis)	<i>In vitro</i>	La difusión de partículas de 100 nm de diámetro está significativamente incrementada al uso de microagujas.	(75)
Sólidas de silicón	No	Nanoesferas de látex	Lípido:poli-cación:pDNA	Piel de humano	<i>In vitro</i>	Migración de las partículas cargadas a los microcanales, por ende a las células de la epidermis viable.	(76)
Silicón	-	Hidrogel / Nanopartículas		Piel de humano (pectoral)	<i>In vitro</i>	Fueron observadas las nanopartículas en la epidermis viable y también localizadas en los microcanales.	(77)

Tabla 6 Continuación

Recubiertas	-	Micropartículas de sulfato de bario	-	Piel de humano	<i>In vitro</i>	Empleando un diseño apropiado de microagujas puede haber una permeación de micropartículas.	(54)
Huecas de vidrio	-	Nanoesferas de PLA Microesferas de látex	-	Esclera de humano	<i>In vitro</i>	La suspensión de moléculas solubles y nanopartículas es liberada dentro de la esclera.	(78)
Acero inoxidable	-	Micropartículas	Calceína BSA	-	<i>In vitro</i>	La doble encapsulación da lugar a un efecto <i>burst</i> inicial mientras que después exhibe una liberación lenta por hasta dos meses.	(79)

2.3.3 ACARREADORES

Se conoce como acarreador o vector, a aquellos sistemas en que el fármaco se encuentra encapsulado, disperso o adsorbido y que cumplen con diversas funciones como proteger al fármaco del medio biológico, favorecer el transporte o distribución hacia distintos órganos o tejidos pudiendo ser incluso altamente específico (vectorización o *drug targeting*) y lograr una liberación prolongada o controlada del principio activo. Como se muestra en la figura 13, los sistemas acarreadores pueden dividirse en tres grandes tipos.

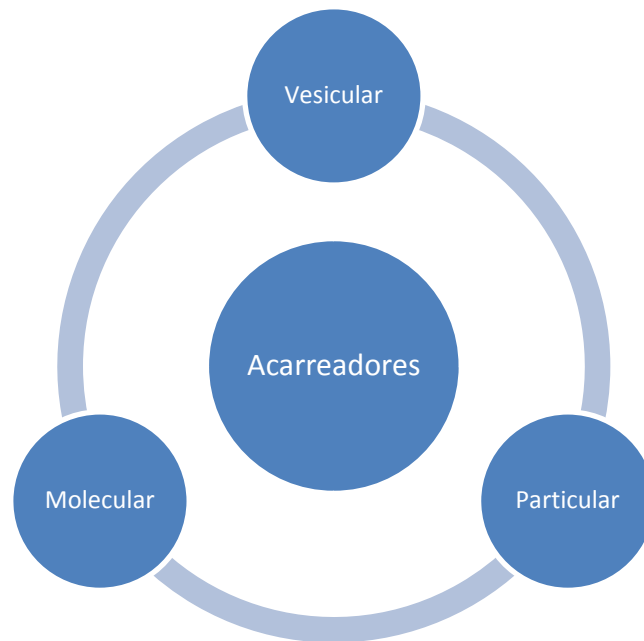


Figura 13. Clasificación de los sistemas acarreadores.

En el sistema vesicular se incluyen: liposomas, transfersomas, etosomas, niosomas y marinosomas.⁽⁸⁰⁻⁸²⁾; mientras que a nivel molecular: ciclodextrinas, dendrímeros y micelas. Por último, pero no menos importante, el particular de tamaño micrométrico o nanométrico.

La inclusión de los principios activos en estos acarreadores se logra mediante diferentes procesos tecnológicos. Con la inclusión del principio activo en un material adecuado, es posible conseguir una liberación modificada, *i.e.*, controlada, sostenida, prolongada o retardada⁽⁸³⁻⁸⁶⁾. Lo que permite garantizar una liberación más lenta del principio o principios activos que la de una forma de liberación convencional.

En la liberación controlada, estos acarreadores pueden ser direccionados hacia ciertos órganos o tejidos, en donde el efecto sea requerido (sitio blanco); además de esto, los acarreadores presentan otras ventajas que aportan beneficios como:

- Conversión de principios activos líquidos en formas sólidas, para un almacenaje y manejo más sencillos.
- Inclusión de principios activos incompatibles en la misma forma de administración.
- Protección de compuestos lábiles frente a la degradación química, como es el caso del palmitato de vitamina A⁽⁸⁷⁾ y el α -tocoferol⁽⁸⁸⁾.
- Enmascaramiento del olor y del sabor del p.a.; verbigracia: el recubrimiento de un principio activo, como el mentol. Aporta ventajas desde el punto de vista de la aceptabilidad por parte del paciente.
- Reducción de efectos irritantes causados por algunas sustancias, p.ej.: el ácido glicólico⁽⁸⁹⁾.
- Desarrollo de un efecto oclusivo, actuando como productos hidratantes^(90; 91).
- Efecto barrera frente a las radiaciones ultravioletas⁽⁹²⁾.

A continuación se describen brevemente los sistemas más comúnmente empleados en las formulaciones como sistemas acarreadores.

2.3.4.1 LIPOSOMAS

Estas vesículas datan de 1965, cuando fueron descubiertas por Bangham *et al.* ⁽⁹³⁾ y desde entonces han sido sujeto de numerosos estudios. En 1986 apareció el primer producto cosmético conteniendo liposomas (Capture[®], Christian Dior) y partir de ése momento su uso se ha generalizado, extendiéndose a un gran número de productos con el fin de transportar y liberar diferentes ingredientes activos en las capas más profundas de la piel ⁽⁹⁴⁾, utilizándose incluso los liposomas como ingredientes activos para mejorar las propiedades de la piel.

Las ventajas principales de éstos vectores radican en su similitud con la naturaleza lipídica de las membranas biológicas y en su gran versatilidad. Son vehículos no tóxicos, cuyas características dependen de su composición, carga, tamaño y procedimiento de preparación. Sin embargo tienen una baja estabilidad debida a su alto contenido en lípidos.

Los productos tópicos dependen en gran medida del cumplimiento de dos objetivos: (1) alcanzar las células del tejido diana (tejido cutáneo) y (2) disponer el principio activo en la situación más favorable para que produzca su efecto.

Algunos estudios como los realizados por Yarosh *et al.* ⁽⁹⁵⁾ muestran que los liposomas pueden alcanzar la epidermis viva facilitando la incorporación de la sustancia activa en el interior de las células, aumentando la concentración del compuesto activo en el lugar de acción, lo que podría contribuir a incrementar su eficacia.

Desde los 90's se han desarrollado liposomas que incorporan diferentes ingredientes activos como enzimas reparadoras del DNA ⁽⁹⁶⁾, α -bisabolol ⁽⁹⁷⁾, ácido retinólico ⁽⁹⁸⁾, antisépticos ⁽⁹⁹⁾ y ácido glicólico, utilizado como agente exfoliante e hidratante ^(89; 100).

2.3.4.2 CICLODEXTRINAS

Viller en 1891 ⁽¹⁰¹⁾ fue el primero en reportar el aislamiento de las ciclodextrinas, sin embargo su difícil producción, caracterización y elevado costo hicieron que la ciclodextrinas se emplearan hasta los 70's con el gran interés de incluir diferentes moléculas en ellas para su aplicación en la dermofarmacia ⁽¹⁰²⁾.

Las ciclodextrinas son moléculas capaces de formar complejos de inclusión con distintos fármacos. En estos complejos tanto la disposición espacial como la afinidad química desempeñan un papel fundamental. Estructuralmente son oligosacáridos cíclicos constituidos por un anillo de moléculas de *D-(+)*-glucopiranosas unidas entre sí, que forman una estructura troncocónica con una cavidad interior. Esta cavidad es de naturaleza apolar, mientras que la superficie es muy hidrófila debido a que los grupos hidroxilos se orientan hacia el exterior.

Las ciclodextrinas, a pesar de disponer de una envoltura de naturaleza hidrofílica que las imposibilita atravesar la piel son capaces de promover la permeación de fármacos a través de la piel en cantidades apreciables ⁽²⁸⁾. Vollmer *et al.* ⁽⁸⁶⁾ demostraron la penetración del principio activo contenido en la hidroxipropil- β -ciclodextrina y su localización en cantidades importantes a nivel del estrato córneo.

Esta ciclodextrina parece dispersarse tanto en las zonas lipofílicas del estrato córneo como en las hidrofílicas de la epidermis. Por tanto, cualquier sustancia incluida de baja solubilidad puede ser depositada en su lugar de acción incrementando su actividad biológica y su especificidad por la célula diana.

En este sentido el ácido glicólico utilizado para el tratamiento de pieles envejecidas mejora su eficacia cuando forma complejos de inclusión con β -ciclodextrinas. La aplicación de este principio activo encapsulado permite mejorar los resultados de los tratamientos anti-edad ya que el ácido glicólico es liberado de forma gradual y sostenida de forma que activa la renovación celular. Además la formación de este complejo permite aplicar productos de pH bajo (3.5-4.5) minimizando los efectos secundarios negativos en la piel (irritaciones, enrojecimiento, erupciones, dolores, etc.). El ácido retinoico también puede ser incluido en 2-hidroxipropil- β -ciclodextrina para mejorar su solubilidad y fotoestabilidad ⁽¹⁰³⁾.

El complejo ácido retinoico- β -ciclodextrina incorporado a una crema base o hidrogel mejora su eficacia y tolerabilidad en el tratamiento del acné si lo comparamos con el vehículo control ⁽¹⁰⁴⁾. La incorporación de oxibenzona a la hidroxipropil- β -ciclodextrina (20%) permite la formación de un reservorio sobre la superficie de la piel lo que incrementa la eficacia del filtro solar ⁽¹⁰⁵⁾.

Las ciclodextrinas son usadas para mejorar la estabilidad, enmascarar olores, prolongar la acción de los perfumes ⁽¹⁰⁶⁾ e incrementar la dispersabilidad de los ésteres de ácidos grasos en un medio acuoso ⁽¹⁰⁷⁾.

2.3.4.3 DENDRÍMEROS

Los dendrímeros son nanoestructuras obtenidas a partir de macromoléculas (*v.gr.* poliamidoamina (PAMAM), polipropilenimina y poliaril éter). Son estructuras ramificadas con un centro interno. El tamaño de partícula oscila entre 1 y 100 nm aunque la mayoría de las veces estas estructuras miden menos de 10 nm.

Hace aproximadamente 20 años el estudio de dendrímeros estaba centrado en su síntesis, propiedades físicas y químicas, pero no fue sino hace trece años que se comenzaron a explorar sus aplicaciones biológicas⁽¹⁰⁸⁾.

La ubicuidad de los dendrímeros radica en las ramificaciones que estos presentan, así como en la multivalencia, peso molecular bien definido, estructura globular y la funcionalidad en el control de su superficie, lo que los hace candidatos viables para la liberación de fármacos^(108; 109).

Su estructura globular y la presencia de cavidades internas permiten entrapar fármacos. De igual manera estas nanoestructuras han mostrado una liberación controlada desde el núcleo. Adicionalmente sus propiedades consisten en que el fármaco entrampado o adsorbido sea de naturaleza hidrofílica o lipofílica⁽¹⁰⁹⁾.

Los dendrímeros son empleados gracias a su tamaño (<10 nm), fácil preparación, funcionalidad y la capacidad que muestran en la superficie para el reconocimiento en procesos biológicos⁽¹¹⁰⁾.

Los dendrímeros hidrosolubles pueden solubilizar pequeñas moléculas al ligarse a ellas, de igual manera pueden ser empleados como recubrimientos para proteger fármacos y tener una posible vectorización. Algunas otras aplicaciones de los dendrímeros incluyen la catálisis, incorporación de genes y DNA, y biomimética⁽¹¹⁰⁾.

Entre sus principales aplicaciones en farmacia se conoce su utilización en terapia y diagnóstico en el tratamiento del cáncer⁽¹¹¹⁾, promotor de la solubilidad y permeabilidad de fármacos⁽¹¹²⁾, y la liberación intracelular⁽¹¹³⁾.

2.3.4.4 MICROPARTÍCULAS

Estos sistemas micrométricos, cuyo tamaño medio oscila entre 1 y 250 micras, permiten la encapsulación de ingredientes activos tanto hidrófilos como lipófilos. Dependiendo de las propiedades físico-químicas del principio activo, del material de recubrimiento (polímero) y del tipo de proceso tecnológico (coacervación, extracción- evaporación del disolvente, polimerización interfacial, etc.) utilizado en su preparación, se pueden diferenciar dos tipos de sistemas ⁽¹¹⁴⁾: Microcápsulas, donde el principio se encuentra incluido en un reservorio líquido o sólido, que se halla envuelto por una fina película de material de recubrimiento, y microesferas donde el principio activo se encuentra altamente disperso de manera homogénea en el material de recubrimiento.

En la actualidad cada vez es más frecuente encontrar en la bibliografía estudios de este tipo de partículas como sistemas transportadores de principios activos de uso tópico, como el caso del Notrosol® ⁽¹¹⁵⁻¹¹⁷⁾. Así podemos señalar que el uso de micropartículas permite mantener concentraciones eficaces del principio activo en su lugar de acción y, además, pueden prolongar el tiempo de permanencia en los distintos estratos de la piel ⁽¹¹⁸⁾.

En este sentido, el empleo de microesferas de nylon ⁽¹¹⁹⁾ también permite alcanzar una concentración eficaz de α -tocoferol; así como una cesión gradual y sostenida del mismo. En la actualidad es posible utilizar microesferas porosas de tamaño variable (ente 10 y 100 μm de diámetro) capaces de incorporar diferentes ingredientes activos. La eficacia de encapsulación varía de acuerdo con el diámetro de la esfera y la tecnología utilizada por cada laboratorio: Micropearl (SEPPIC Inc), Microsponge (Enhanced Derm Technologies, Inc.), Orgasol (Elf Atochem).

En productos protectores solares se pueden utilizar microcápsulas para encapsular octilmetoxicinamato ⁽¹²⁰⁾. Asimismo, Boelcke y Wagner ⁽¹²¹⁾ utilizaron la microencapsulación para incorporar enzimas (proteasas o queratinasas) de aplicación en el desarrollo de productos depilatorios con el fin preservar el ingrediente activo de la inactivación por la presencia de agentes tensoactivos (lauril sulfato sódico).

Una crema limpiadora conteniendo microcápsulas con aceites fue propuesta por Norbury *et al.* ⁽¹²²⁾, la cual tiene una mayor eficacia ya que los aceites son liberados tras su aplicación.

2.3.4.5 NANOPARTÍCULAS

Las nanopartículas desde el punto de vista farmacéutico son acarreadores coloidales de fármacos destinados principalmente a la vectorización o bien a la liberación controlada; usualmente las nanopartículas son formuladas para la administración tópica o sistémica. Pueden estar dispersas en líquidos y así dar lugar a productos inyectables, ungüentos, entre otros o bien ser liofilizadas y estar presentes en dispersiones sólidas o gaseosas.

Sus tamaños oscilan entre los 20 y 1000 nm, cuando se encapsulan principios activos, sin embargo existen tallas de hasta 2 nm en el caso de las nanopartículas metálicas, como es el caso de las nanopartículas de plata.

Las propiedades dependen primordialmente de la técnica usada para su producción, aunque también de otros parámetros como la masa molecular, características del principio activo, surfactantes y otros aditivos⁽¹²³⁻¹²⁵⁾.

En las últimas décadas han sido objeto de estudio constante, sin embargo sólo algunos pocos productos han alcanzado su comercialización a pesar del gran número de patentes que existen, tal es el caso del Abraxame®⁽¹²⁶⁾ y del IRN-SRN⁽¹²⁷⁾.

Los beneficios que se tienen con las nanopartículas es que la sustancia de interés puede ser atrapada, adsorbida o químicamente enlazada con la matriz de las nanopartículas⁽¹²⁸⁾, además de mejorar la eficacia, tienen un tamaño reducido, una mayor área superficial, son fácilmente suspendibles en líquidos, permiten una mayor entrada a células y organelos, además de poder ser esterilizadas por filtración cuando su tamaño es menor a 200 nm⁽¹²⁹⁾.

El mecanismo de formación de las nanopartículas, dependerá primordialmente del método empleado para prepararlas, al igual que de los sustratos, y aquellos estabilizantes empleados durante el proceso.

Las nanopartículas pueden ser empleadas para la liberación de fármacos hidrosolubles, liposolubles, proteínas, vacunas, macromoléculas, entre otras. Pueden ser formuladas para llegar a sistema linfático, cerebro, paredes arteriales, pulmones, hígado, bazo, o para una circulación sistémica a largo plazo^(128; 130; 131).

2.3.4.5.1 POLIMÉRICAS

Las nanopartículas poliméricas son partículas menores a 1 μm de diámetro, y pueden ser preparadas a partir de polímeros naturales o sintéticos. Actualmente las nanopartículas poliméricas son una importante área de investigación para la liberación de fármacos, ya que poseen la habilidad de liberar una gran variedad de principios activos en todo el organismo; y ofrecer una liberación modificada (*v.gr.* acelerada, diferida, prolongada o controlada).

Los polímeros naturales (*v.gr.* proteínas o polisacáridos) no son recomendables para la síntesis de nanopartículas ya que su pureza varía demasiado, y con mucha frecuencia requieren procesos de entrecruzamiento, los cuales afectan al principio activo contenido ⁽¹³⁰⁾.

En contraste, los polímeros sintéticos tiene la ventaja de poseer una alta pureza y reproducibilidad sobre los naturales. Entre los polímeros sintéticos más comúnmente empleados, se encuentra la familia de los poliésteres, la poli(ϵ -caprolactona) (PCL), el ácido poli(láctico) (PLA), el ácido poli(glicólico) (PGA), así como los copolímeros sobre todo de los dos últimos. El empleo de estos polímeros ha sido de gran interés para el área biomédica debido a su biocompatibilidad y propiedades biodegradables; especialmente el caso del ácido poli(láctico-co-glicólico) (PLGA) (*vid. fig.14*) a razón de su aceptación por la FDA en terapia humana ⁽¹³²⁾.

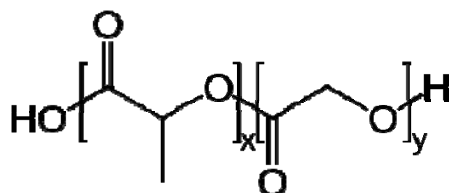


Figura 14. Estructura química del PLGA; x: número de unidades de ácido láctico e y: número de unidades de ácido glicólico.

2.3.4.5.2 LIPÍDICAS

Las nanopartículas lipídicas tienen una estructura similar a las nanoemulsiones. Sus rangos de medida típicamente van de 50 a 1000 nm. La matriz consiste en lípidos o mezclas de lípidos sólidos. Para estabilizar la partícula sólida contra la agregación, se le agregan surfactantes o polímeros. Si las nanopartículas lipídicas se utilizan como acarreadores, los ingredientes activos se disuelven o se dispersan en la matriz del lípido.

Las nanopartículas lipídicas sólidas (SLN) han sido introducidas como un nuevo sistema de liberación para los fármacos en distintas rutas de aplicación ⁽¹³³⁾. También representan un sistema acarreador para principios activos cosméticos debido a sus numerosas ventajas sobre las formulaciones convencionales existentes ⁽¹³⁴⁾.

Las SLN poseen algunas características que las convierten en prometedores acarreadores para la aplicación cosmética:

- La protección contra la degradación química de compuestos lábiles, p. ej. retinol y tocoferol ^(88; 91).
- Dependiendo del tipo de preparación de SLN, es posible una liberación controlada de principios activos.
- Cuando las SLN tienen una membrana cargada con fármaco, dan lugar a una liberación rápida, mientras que cuando el núcleo está cargado, dan lugar a una liberación sostenida ^(83; 84).
- Si las SLN actúan como sistemas oclusivos, pueden ser usadas, por ejemplo, para incrementar el contenido de agua en piel ⁽⁹⁰⁾.

Si las SLN muestran un potencial bloqueo UV, actúan por ejemplo como bloqueadores solares físicos, y pueden ser combinados con bloqueadores solares moleculares para alcanzar una óptima fotoprotección ⁽¹³⁵⁾.

En el caso de bloqueadores solares, las formulaciones que incluyen SLN son excelentes agentes hidratantes de la piel. Es por eso, que las SLN han demostrado, *in vivo*, ser excelentes vehículos para la hidratación de la piel ⁽⁹⁰⁾.

2.4 MÉTODOS DE PREPARACIÓN DE NANOPARTÍCULAS

2.4.1 TÉCNICA DE EMULSIFICACIÓN/EVAPORACIÓN

Con esta técnica la producción de nanopartículas ocurre por la precipitación de un polímero formulado en una emulsión aceite en agua (o/w). El material polimérico o lipídico se disuelve en un disolvente parcialmente miscible o inmiscible en agua, éste es emulsificado en una fase acuosa con ayuda de un molino coloidal seguido de homogeneización a alta presión ⁽¹³⁶⁾. Posteriormente se evapora el disolvente y se precipita al polímero o lípido en la fase acuosa, con ello se da la formación de las nanopartículas. El diámetro medio de las partículas dependerá de los sustratos empleados, p. ej. para el caso del acetato de colesterol como fármaco modelo y una mezcla de lecitina/glicolato de sodio como emulsificante la talla va de 21 nm a 140 nm ⁽¹³⁷⁾. La reproducibilidad de este método fue posteriormente confirmada ⁽¹³⁸⁾, sólo que en este caso el disolvente usado fue cloroformo y para la formación de la emulsión se usó un homogeneizador de alta presión. El diámetro reportado para este sistema es de entre 30 y 100 nm dependiendo de la proporción de lecitina / glicolato de sodio.

2.4.2 TÉCNICA DE HOMOGENIZACIÓN A ALTA PRESIÓN.

En esta técnica la producción de nanopartículas es por medio de la homogenización a altas presiones de los lípidos o polímeros fundidos y una solución acuosa conteniendo al estabilizante. Las gotas de polímero o lípido solidifican y se forman las nanopartículas. Los dos métodos que con mayor frecuencia son utilizados para la producción de nanopartículas son la técnica de homogenización a alta presión caliente y fría. En ambos casos para cargar las partículas con fármaco, éste se disuelve en el polímero o lípido a una temperatura de aproximadamente 5 a 10°C por encima del punto de fusión del lípido o polímero ⁽¹³⁹⁾.

2.4.2.1 HOMOGENIZACIÓN EN CALIENTE

El lípido fundido o polímero se dispersa bajo agitación en una solución acuosa del surfactante que se encuentra a la misma temperatura que la fase lipídica. La pre-emulsión obtenida se homogeniza usando un homogenizador de pistón hueco abierto, entonces la nanoemulsión caliente formada se enfría hasta temperatura ambiente. De esta manera cuando hay una recristalización se forman las nanopartículas.

2.4.2.2 HOMOGENIZACIÓN EN FRÍO

El material fundido conteniendo al fármaco se enfría, lo que provoca la aparición de micropartículas (50 - 100 nm). Estas micropartículas se dispersan en una solución de surfactante frío y así se forma una pre-suspensión que se homogeniza a temperatura ambiente (o menor). La energía necesaria para producir las nanopartículas por esta técnica es considerable.

2.4.3 TÉCNICA DE MICROEMULSIÓN

La preparación de nanopartículas por medio del método de microemulsión (μE) consiste en dispersar una μE caliente (o/w) en un medio acuoso frío bajo agitación mecánica⁽¹⁴⁰⁾. La μE está compuesta del sustrato (*v.gr.* ácido esteárico), surfactante (*v.gr.* polisorbato 20, polisorbato 60 y fosfatidilcolina de soya), co-surfactante(s) (*v.gr.* butanol) y agua. Con ello se forma un sistema transparente y termodinámicamente estable siempre y cuando los componentes se encuentren en las proporciones adecuadas para formar la μE . A una temperatura de 65-70 °C se adiciona la μE a un medio acuoso frío (2-3°C) bajo agitación mecánica lo que asegura que la reducción del tamaño de partícula se deba a la precipitación del material y no a un proceso mecánico.

Comúnmente las relaciones entre la μE y el agua son de 1:25 a 1:50^(141; 142). Por medio de esta técnica se ha preparado el llamado *stealth SLN* que son SLN que presentan en su superficie un recubrimiento que les permite aumentar su tiempo en circulación sanguínea, comúnmente se emplea polietilenglicol (PEG) o algún derivado de éste.

2.4.4 DIFUSIÓN DEL DISOLVENTE (SDM) EN MEDIO ACUOSO

El sustrato y fármaco se disuelven completamente en una mezcla de acetona (12 ml) y etanol (12 ml) a temperatura controlada (50 °C). La solución resultante se vierte sobre un medio acuoso ácido que contiene 1% de PVAL (p/v) bajo agitación mecánica y a temperatura ambiente por 5 min. El pH de la fase acuosa se ajusta adicionando HCl 0.1 M ⁽¹⁴³⁾. Las nanopartículas son producidas de manera muy rápida. Posteriormente el sistema se centrifuga y se resuspende en agua destilada.

El ajuste del pH del medio acuoso ácido es con la finalidad de ajustar el potencial zeta para coacervar las nanopartículas y que sea fácil la separación por centrifugación. La distribución del tamaño de partícula obtenida por este método es bimodal (14 nm y 432 nm).

2.4.5 TÉCNICA DE HIDRATACIÓN DE PELÍCULA / HOMOGENIZACIÓN A ALTA PRESIÓN

La preparación de nanopartículas consiste en disolver en una fase orgánica (*v.gr.* cloroformo) el material, los estabilizantes y/o el fármaco. Después de que se remueve la fase orgánica se forma una capa lipídica que es hidratada en una solución salina y agitada por 5 min a 50 °C. Finalmente la emulsión obtenida (diámetro de entre 1-2 µm) se homogeniza por medio de un sistema de alta presión (aproximadamente cinco ciclos a 60 - 70 y 15 000 psi) para obtener las nanopartículas ⁽¹⁴⁴⁾.

2.4.6 TÉCNICA DE MEMBRANA CONTRÁCTIL

La preparación de nanopartículas por medio de una membrana contráctil permite una producción a gran escala; la fase lipídica está a presión, a una temperatura por encima del punto de fusión del polímero o lípido, la cual pasa a través de una membrana con poros, permitiendo la formación de pequeñas gotas al momento del contacto con la fase acuosa que se encuentra circulando dentro del modulo de la membrana, misma que captura las gotitas formadas en los poros.

Las nanopartículas son formadas por enfriamiento de la solución a temperatura ambiente, la influencia de los parámetros en el proceso (fase acuosa, temperatura de la fase oleosa, velocidad de flujo de la fase acuosa, presión del material y tamaño del poro) sobre el tamaño de las nanopartículas es investigada, el tamaño promedio va de los 70 a los 200 nm. Un ejemplo de este método es el de la vitamina E que ha sido cargada en estas nanopartículas y la estabilidad de estas ha sido demostrada ⁽¹⁴⁵⁾.

3 HIPÓTESIS DEL TRABAJO

El tratamiento de la piel con un arreglo de microagujas favorecerá el transporte de nanopartículas hacia y a través de la piel, siendo mayor al incrementarse la longitud de las microagujas.

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL

- ✓ Estudiar el efecto que tienen las microagujas y la formulación en la permeación *in vitro* del clorhidrato de sibutramina (CS) a través de piel.

4.2 OBJETIVOS PARTICULARES

- ✓ Preparar y caracterizar un sistema nanoparticulado biodegradable formulado con CS.
- ✓ Desarrollar y validar un método para la cuantificación de CS por cromatografía de líquidos de alto desempeño (HPLC).
- ✓ Evidenciar histológicamente la disrupción que causan las microagujas sobre el estrato córneo por medio de diferentes técnicas de microscopía.
- ✓ Realizar estudios de permeación para CS en piel de cerdo intacta y pretratada con arreglos de microagujas de dos longitudes diferentes.
- ✓ Evaluar el efecto de la longitud de las microagujas (200 y 500 μm) y la formulación (solución y nanopartículas) en la permeación de CS a través de la piel..
- ✓ Visualizar la presencia de nanopartículas y su localización en piel intacta y pretratada con microagujas, mediante microscopía confocal.

5. METODOLOGÍA

5.1 MATERIALES

Rodillos CR2 y CR5; arreglos de microagujas cilíndricos, 200 y 500 μm de longitud (MTS-Roller, USA)

Filtros (Millex[®] - GV de 2.5cm de diámetro y poro de 0.22 μm , 0.1 μm , y 0.45 μm Millipore[®], USA)

Celdas de difusión verticales estáticas tipo Franz (Taller de Soplado de Vidrio, FES-Cuautitlán)

Material de cristalería

Biológico

Piel de oreja de cerdo

5.2 REACTIVOS

Hidróxido de Sodio GR (J.T. Baker, México)

Fosfato monobásico de potasio (Fermont, México)

Ácido ortofosfórico GA (J.T. Baker, México)

Clorhidrato de Sibutramina (Moléculas Finas, México)

Polímeros y surfactantes

Alcohol Polivinílico (PVAL), Mowiol[®] (Glomarza, México)

PLGA 50:50; Resomer[®] RG 502H (Boehringer Ingelheim, Alemania)

Colorantes

Rojo de Nilo (Sigma-Aldrich, Alemania)

Azul de Toluidina-Bórax (1%)

Naranja de Acridina (1%)

Hematoxilina –Eosina

Disolventes

Agua desionizada HPLC (Milli-Q®, USA)

Metanol HPLC (Fermont, México)

Trietilamina GA (Sigma-Aldrich, Alemania)

Acetato de Etilo GA (Fermont, México)

5.3 EQUIPOS

Balanza analítica (BBC 32, Boeco, Alemania)

Parrilla eléctrica con agitación (Cimarec®, Thermoline, USA)

Agitador magnético Magnestir® (Lab-Line instruments, USA)

Agitador de velocidad variable (RZR-1; Caframo®, Alemania)

Rotavapor (Laborota® 4000, Heidolph, Alemania)

Ultracentrífuga Óptima® LE-80K (Beckman, USA)

Recirculador de líquidos con termostato (VWR Scientific, USA)

Vortex (M 16715, Mixer, USA)

Espectrofotómetro UV- Vis (Cary IE95031003, Varian, Australia)

Zetasizer Malvern Systems (ZEN 3600, USA)

Sonicador (Branson Branson 5210, USA)

pH metro (Corning 430, USA)

Micrómetro electrónico digital (Digitrix II, Japón)

Calorímetro Diferencial de Barrido DSC (Q 10, TA Instruments, USA)

Microscopio Electrónico de Barrido (JSM-25SII; JEOL, Japón)

Campana para recubrimiento con oro (JFC-1100; JEOL, Japón)

Microscopio Óptico de Campo Claro (Spencer, American Optical, USA)

Microtomo (RM2125RT, Leica, Alemania)

Microscopio Axioskope 40 (Carl Zeiss, USA)

Microscopio Confocal Zeiss Axiovert 200 LSM 510 Meta – Multifótonico (Carl Zeiss, USA)

HPLC modular Varian ProStar, compuesto por Bomba P-210, Automuestreador 400, detector UV 320 (Varian, USA).

Agitador magnético multiplaza 509C (Barnstead International, USA)

5.4 MÉTODOS



5.4.1 ESPECTROS DE ABSORCIÓN

Se determinaron las longitudes de onda (λ) de máxima absorción para CS en metanol, CS en solución amortiguadora de fosfatos (PBS) pH 4.5 en contacto con piel y para CS en metanol en contacto con piel.

5.4.2 DETERMINACIÓN DE LAS CONDICIONES ÓPTIMAS DE ANÁLISIS POR HPLC PARA LA CUANTIFICACIÓN DE CLORHIDRATO DE SIBUTRAMINA (CS)

Las condiciones para la cuantificación del CS se determinaron tomando como precedente lo reportado en la literatura. A partir de ahí, se probaron diferentes fases estacionarias y móviles.

Se prepararon soluciones de CS, matrices biológicas, medios de disolución y CS en las distintas matrices. Se probaron tres diferentes fases estacionarias: Microsorb® C18 (4.6x250 mm), Microsorb® C8 (4.6x250 mm) y Microsorb® CN (4.6x250 mm). La longitud de onda de máxima absorción (225 nm) se estableció a partir de los espectros del CS en diferentes medios, mismos que se mostrarán posteriormente. La fase móvil fue modificada hasta obtener el pico con mejor simetría y una buena resolución lo cual se muestra en el Anexo 2.

5.4.3 VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO PARA CUANTIFICAR CS EN UNA MATRIZ BIOLÓGICA (PBS PH 4.5 EN CONTACTO CON PIEL).

La validación del método analítico se llevó a cabo bajo los protocolos de validación^(146; 147). La fase móvil seleccionada de acuerdo al método optimizado (Anexo 2) fue una mezcla de metanol:solución de trietilamina [TEA] (1% v/v) 65:35, ajustando el pH a 4.5 con ácido ortofosfórico, manteniendo un flujo de 1 mL/min; la fase estacionaria fue una columna Microsorb® CN (4.6x250 mm) Varian, a una longitud de onda de 225 nm.

Partiendo de las condiciones óptimas experimentales para el análisis de CS, se validó el método analítico para cuantificar el CS capaz de permear a la solución receptora en los estudios de permeación. Para ello, se preparó una solución PBS pH 4.5 y se puso en contacto con piel, manteniendo las mismas condiciones a las que se realizaron los estudios de permeación (descritos

posteriormente). Para ello, se extirpó piel de la oreja de cerdo, y la parte interna del tejido se puso en contacto con PBS pH 4.5 en un recipiente parecido al de la celda tipo Franz, agitando durante seis horas. Posteriormente, se filtró el fluido por una membrana Millipore® (0.45 µm) y con dicho fluido (matriz biológica) se procedió a la validación del método analítico empleando las condiciones previamente descritas. Para validar el método se evaluaron los siguientes parámetros: linealidad, exactitud, precisión, límite de detección y límite de cuantificación.

5.4.3.1 Selectividad

Se inyectaron muestras del blanco (matriz biológica: PBS pH 4.5 en contacto con piel), de CS en PBS pH 4.5 (40 µg/mL), y de CS en matriz biológica para verificar que no existiera interferencia por parte de la matriz biológica.

5.4.3.2 Linealidad

Se prepararon siete puntos a diferentes concentraciones en un rango de 0.2-2.8 µg/mL, cada punto se hizo por triplicado. A los resultados se les efectuó un análisis de regresión lineal, calculando la ordenada al origen, la pendiente, el coeficiente de determinación (r^2), error estándar de la pendiente y la calidad de ajuste para cada concentración. La calidad del ajuste se evaluó al comparar la concentración adicionada con la concentración como porcentaje de desviación absoluta.

5.4.3.3 Exactitud

Se prepararon soluciones de 0.2-2.8 µg/mL de CS en la matriz biológica, las cuales se procesaron por triplicado durante dos días. Se determinó su concentración por medio de la interpolación de la respuesta sobre la curva patrón. La concentración analizada (C_{est}) fue comparada con la concentración nominal (C_{exp}) y se calculó la desviación absoluta la cual no debe de exceder del 20%.

5.4.3.4 Precisión

A partir de los datos de linealidad (0.2-2.8 µg/mL), se calculó la precisión a partir del coeficiente de variación porcentual (% C.V.), el cual no deberá de exceder el 15% a excepción del límite de cuantificación en el cual no debe de exceder el 20%. El análisis se realizó por sextuplicado.

5.4.3.5 Límite de cuantificación

Se evaluó mediante el análisis de soluciones diluidas de CS en la matriz biológica. La menor concentración en la que el valor promedio de su determinación analítica estuviese en el + 20% de su valor nominal y con un coeficiente de variación que se encuentre en el mismo intervalo.

Matemáticamente se determinó por la siguiente expresión:

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

Ecuación 3. Expresión matemática para calcular el límite de cuantificación ⁽¹⁴⁸⁾.

5.4.3.6 Límite de detección

Se evaluó por el análisis de soluciones diluidas de CS en la matriz biológica. La cantidad mínima detectable se consideró a aquella que proporciona una señal 3 veces el nivel del ruido.

Matemáticamente se determinó con la siguiente expresión:

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

Ecuación 4. Expresión matemática para calcular el límite de detección ⁽¹⁴⁸⁾.

5.4.4 VALIDACIÓN PARCIAL DEL MÉTODO ANALÍTICO PARA CUANTIFICAR CS EXTRAÍDO DE LA PIEL

Una vez validado el método para la cuantificación de CS en una matriz biológica (PBS pH 4.5 en contacto con piel) se realizó la validación parcial de un método para la cuantificación de CS en metanol en contacto con piel, ya que al final de las pruebas de permeación se recuperó la piel y se extrajo el CS con metanol, es por ello, que se hizo una curva de calibración en este disolvente.

Para simular las condiciones experimentales se preparó una solución de metanol la cual estuvo en contacto con piel durante 24 h en agitación constante (matriz biológica). Se emplearon los parámetros ya antes descritos variando el flujo de 1 mL/min a 1.1 mL/min.

5.4.4.1 Selectividad

Se inyectaron muestras del blanco (matriz biológica: metanol en contacto con piel), y de CS en matriz biológica para ver que no exista interferencia por parte de la matriz biológica.

5.4.4.2 Linealidad

Se trabajó con ocho diferentes concentraciones en un rango de 0.5-10 $\mu\text{g/mL}$, cada punto se hizo por duplicado. A los resultados se les efectuó un análisis de regresión lineal, calculando la ordenada al origen, la pendiente, el coeficiente de determinación (r^2), error estándar de la pendiente y la calidad de ajuste para cada concentración. La calidad del ajuste se evaluó al comparar la concentración adicionada con la concentración como porcentaje de desviación absoluta.

5.4.4.3 Exactitud

Se prepararon soluciones de CS en la matriz biológica, las cuales se procesaron por duplicado durante dos días. Se determinó su concentración por medio de la interpolación de la respuesta sobre la curva patrón. La concentración interpolada fue comparada con la concentración adicionada y se calculó la desviación absoluta la cual no debe de exceder del 20%.

5.4.4.4 Precisión

A partir de los datos de linealidad (0.5-10 $\mu\text{g/mL}$), se calculó la precisión a partir del coeficiente de variación porcentual (% C.V.), el cual no deberá de exceder el 15 %. El análisis se realizó por cuadruplicado.

5.4.5 VALIDACIÓN PARCIAL DEL MÉTODO ANALÍTICO PARA CUANTIFICAR CS EN METANOL

Para la determinación de la cantidad de CS contenida en el sistema nanoparticulado fue necesaria la validación parcial de un método para cuantificar CS en metanol.

5.4.5.1 Selectividad

Se inyectaron muestras del blanco (metanol), y de CS en metanol para ver que no exista interferencia por parte de la matriz.

5.4.5.2 Linealidad

Se realizaron ocho puntos a diferentes concentraciones en un rango de 5-100 $\mu\text{g/mL}$, cada punto se hizo por triplicado. A los resultados se les efectuó un análisis de regresión lineal, calculando la ordenada al origen, la pendiente, el coeficiente de determinación (r^2), error estándar de la

pendiente y la calidad de ajuste para cada concentración. La calidad del ajuste se evaluó al comparar la concentración adicionada con la concentración como porcentaje de desviación absoluta.

5.4.5.3 Exactitud

Se prepararon soluciones 5-100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de CS en metanol, las cuales se procesaron por triplicado durante dos días. Se determinó su concentración por medio de la interpolación de la respuesta sobre la curva patrón. La concentración analizada (C_{est}) fue comparada con la concentración nominal (C_{exp}) y se calculó la desviación absoluta la cual no debe de exceder del 20%.

5.4.5.4 Precisión

A partir de los datos de linealidad (5-100 $\mu\text{g}/\text{mL}$), se calculó la precisión considerando el coeficiente de variación porcentual (% C.V.), el cual no deberá de exceder el 2%. El análisis se realizó por sextuplicado.

5.4.6 PREPARACIÓN DE LAS NANOPARTÍCULAS

La preparación de nanopartículas poliméricas biodegradables (NBs) de PLGA se efectuó de acuerdo al método descrito por Fessi en 1987 ⁽¹³⁶⁾.

Se prepararon lotes variando la carga de fármaco (20%, 40% y 60%, en relación al peso del polímero) haciéndolo por triplicado. El método consistió en lo siguiente: se saturó una PBS pH 10 con acetato de etilo y se separaron las fases. Con la fase acuosa obtenida se preparó una solución estabilizante de alcohol polivinílico al 5%.

El principio activo (CS) y 100 mg del polímero (PLGA 50:50) se disolvieron en 20 mL de acetato de etilo saturado. Se adicionó la fase orgánica lentamente a la fase acuosa agitándose a 19000 rpm durante 5 minutos. Una vez obtenida la emulsión o/w el disolvente orgánico fue eliminado bajo presión reducida por medio de un rotavapor, obteniendo la dispersión nanoparticulada.

Una vez evaporado el disolvente, los lotes se centrifugaron a 12000 rpm por 17 minutos; se resuspendió la pastilla con agua destilada y con agitación constante por 12 h, después de ese proceso el sistema se re-centrifugó bajo las mismas condiciones, este proceso de lavado se realizó 3 veces. Posteriormente se realizó la caracterización de las NBs.

5.4.7 CARACTERIZACIÓN DE NANOPARTÍCULAS

5.4.7.1 Tamaño de partícula

La determinación del tamaño de partícula, la distribución del tamaño de partícula, la desviación estándar así como el índice de polidispersidad, fueron obtenidos con ayuda de un Zetasizer Malvern Systems ZEN 3600, USA. Para todos los lotes de nanopartículas analizados se utilizó como medio de dispersión agua desionizada, todas las lecturas se realizaron a 25 °C, con un ángulo de incidencia del rayo láser de 90°. Las determinaciones se hicieron por triplicado preparando diluciones de una dispersión de nanopartículas.

5.4.7.2 Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC)

Para el estudio calorimétrico, se corrieron termogramas en un calorímetro DSC Q10 (TA Instruments, USA) para el CS, el PLGA (50:50) y las nanopartículas. En el caso de las NBs se tomó una alícuota de la dispersión, secando durante 12 h a temperatura ambiente. El rango de temperatura utilizado para el análisis fue de 0 °C a 300 °C, con una rampa de calentamiento de 10 °C/min.

5.4.7.3 Potencial Z

Se determinó el potencial Z con ayuda de un Zetasizer Malvern Systems ZEN 3600, USA, a la viscosidad y constante dieléctrica del agua, 150 V de corriente eléctrica, a una temperatura de 25 °C y utilizando una celda de capilar doblado, el medio de dispersión fue agua desionizada. El potencial Z de una partícula se obtiene a partir de la ecuación de Henry:

$$U_E = 2 [\xi z f(ka)] / 3\eta$$

Ecuación 5. Ecuación de Henry.

Donde:

z = potencial z

U_E = movilidad electroforética

ξ = constante dieléctrica

η = viscosidad

$f(k_a)$ = función de Henry

Se utilizan dos valores: 1.5 (aproximación de Smolochowski para partículas grandes y medio acuoso) ó 0 (aproximación de Huckel-para partículas pequeñas en medio no acuoso, medio con constante dieléctrica baja)⁽¹⁴⁹⁾.

5.4.7.4 Eficiencia de entrampe

Los lotes preparados conforme al procedimiento previamente descrito fueron analizados por HPLC para determinar la concentración de CS presente en cada lote. Se tomó una alícuota de 1mL de la dispersión de NBs, fue llevado a un volumen de 10 mL con metanol y se dejó en agitación durante 24 h, para que el metanol pudiese difundir por toda la nanopartícula. Se eligió este método ya que se tiene al CS disuelto en metanol y al polímero (PLGA) precipitado. Se filtró la solución final por un filtro Millipore® 0.45 μm y se tomó una alícuota de 1 mL llevándolo a un volumen de 10 mL para el análisis vía HPLC. Este análisis se realizó por cuadruplicado.

5.4.7.5 Morfología

Las nanopartículas se observaron por microscopía electrónica de barrido (SEM), recubriéndolas previamente con oro (1,200 V, 5mAmp y 0.15 Torr durante 6 minutos) [JSM-25SII; JEOL, Japón].

5.4.8 CINÉTICAS DE PERMEACIÓN

5.4.8.1 Obtención de la piel

Se utilizó piel de oreja de cerdo recuperada del rastro después del sacrificio de los animales y antes de tratarla con vapor o agua caliente. Se extirparon porciones de piel utilizando un escalpelo, recortando cuidadosamente los pelos que recubren la piel del cerdo. La piel así aislada se conservó en hojas de aluminio a $-35\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta ser utilizadas.

5.4.8.2 Tratamiento con microagujas

La piel se trató con un arreglo cilíndrico de microagujas contenidas en rodillos (MTS-Roller, USA). Se utilizaron dos diferentes longitudes de microagujas: 200 y 500 μm (*fig. 15*). El tratamiento de la piel se realizó pasando los rodillos sobre la piel (procurando mantener un ángulo y presión constantes), siguiendo cuatro diferentes direcciones como se muestra en la figura 16 esto se realizó para el pretratamiento con 200 μm y 500 μm .

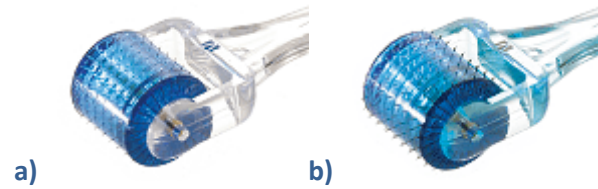


Figura 15. Rodillos con microagujas; a) 200 μm y b) 500 μm .

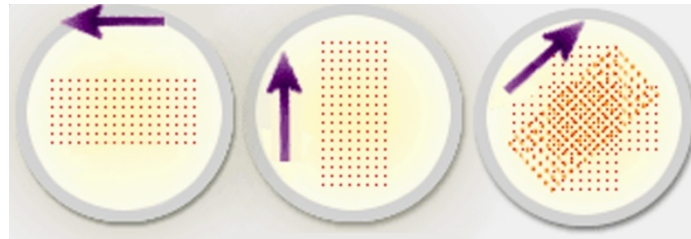


Figura 16. Direcciones para las microperforaciones.

5.4.8.3 Montura de celdas

Para medir el flujo a través de las membranas, se utilizaron celdas verticales tipo Franz (*fig. 17*), donde la membrana es la piel pretratada con microagujas o sin pretratamiento (control). Se determinó el flujo para una solución (PBS pH 4.5) de CS y para el CS formulado en las NBs. En ambos casos se colocaron 2 ml ya sea de la solución o de la dispersión de NBs, ambas con un contenido aproximado de 1.2 mg/ml de CS.

Para ambos estudios el compartimento receptor consistió de una solución PBS pH 4.5, la cual se mantuvo a 37 °C con agitación constante. Durante la permeación se tomaron muestras de 400 μL a los siguientes intervalos: 0.25, 0.5, 1, 2, 3, 4, 5 y 6 horas, reponiendo dicho volumen con medio de disolución (PBS) fresco.

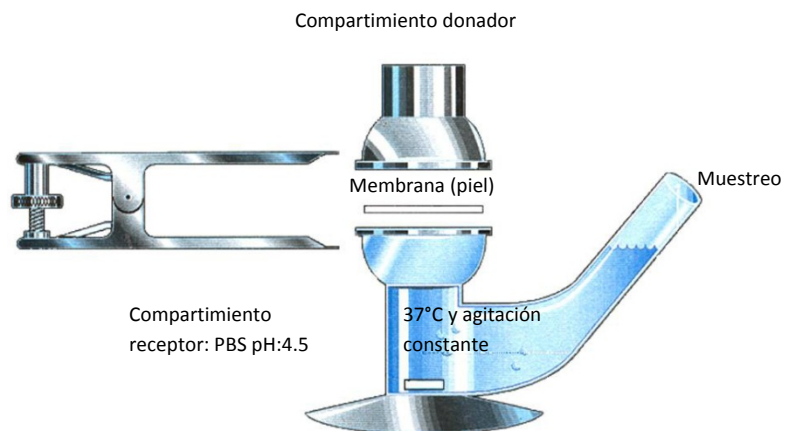


Figura 17. Celda tipo Franz.

5.4.9 MÉTODO DE EXTRACCIÓN DE CS RETENIDO EN LA PIEL

Al finalizar la permeación, se retiró la piel de cada una de las celdas, lavando primeramente con metanol para eliminar el exceso de CS en la superficie, y ya después cuidadosamente con agua. La piel fue cortada en finas porciones, las cuales se colocaron en un vial, se agregaron 10 mL de metanol y se taparon; cada uno de los sistemas se mantuvo en agitación constante durante 24 horas a temperatura ambiente.

Posteriormente las soluciones se filtraron (Millipore® 0.45 μm) y se tomó 1 mL llevándolo a 10mL de aforo, se tomaron 500 μL y se determinó la cantidad de CS por medio de HPLC.

5.4.10 ESTUDIOS DE MICROSCOPÍA E HISTOLOGÍA

Para determinar el efecto que las microagujas tienen sobre el estrato córneo, se recurrió a distintas técnicas microscópicas y de tinción para evidenciar tales efectos. En el presente trabajo se empleó microscopía óptica, de fluorescencia, electrónica de barrido y confocal láser.

5.4.10.1 Óptica de campo claro

Se obtuvo la piel de oreja de cerdo de no más de 6 h después de haber sido sacrificado y se cortaron tiras de aproximadamente 3 cm de ancho por 5 cm de largo. Se emplearon tres de estas tiras, (a) control, (b) tratada con microagujas 200 μm y (c) tratada con microagujas de 500 μm . Las tiras se fijaron a trozos de madera para evitar una excesiva contracción al momento de la fijación.

Se emplearon las tiras extirpadas de las zonas pretratadas con microagujas y controles; inmediatamente después de terminar la sesión, fueron fijadas en Buoin y Karnovski ⁽¹⁵⁰⁾, luego procesadas por el método de rutina de inclusión en parafina ⁽¹⁵⁰⁾.

Se tomaron secciones de aproximadamente 4 μm que fueron teñidas con hematoxilina-eosina. En las muestras tratadas con azul de Toluidina-Bórax (1%) se realizaron los cortes y se hicieron permanentes. Posteriormente las muestras se observaron en un microscopio óptico de campo claro Spencer (American Optical, USA).

5.4.10.2 Fluorescencia

Para el caso de microscopía de fluorescencia, antes de la fijación las muestras fueron impregnadas con una dispersión de nanopartículas cargadas con rojo de Nilo y se realizó el procedimiento descrito con anterioridad.

Los cortes de 4 μm fueron teñidos con naranja de acridina al 1% y se hicieron permanentes con resina sintética. Se observaron en un microscopio Axioskope 40 (Carl Zeiss, USA) con filtro de 450 nm.

5.4.10.3 Confocal Láser

Se preparó una dispersión de nanopartículas conteniendo rojo de Nilo, como marcador fluorescente, la cual se coloca sobre la piel (≈ 1 mm) por 15 min y 2 h, para después ser analizadas por microscopía confocal láser. La piel se tiñó con un colorante de contraste 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI), que está destinado a teñir los núcleos celulares. El DAPI emite a 561 nm, mientras que el rojo de Nilo emite a los 750 nm, dichas emisiones fueron posibles empleando un láser multifotónico Coherent-XR, las muestras se observaron en un microscopio confocal Zeiss Axiovert 200 LSM 510 Meta – Multifotónico (Carl Zeiss, USA).

5.4.10.4 Electrónica de Barrido

Para el estudio por microscopía electrónica de barrido, muestras cutáneas representativas de 1mm^3 fueron fijadas en Karnovsky⁽¹⁴⁸⁾, deshidratadas con alcoholes a concentraciones crecientes hasta alcohol absoluto y postfijadas con tetróxido de osmio al 1%, posteriormente se deshidratan las muestras con CO_2 y son recubiertas con oro por seis minutos. Las muestras se observaron en un microscopio electrónico de barrido JSM-25SII (JEOL, Japón).

6 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 ESPECTROS DE ABSORCIÓN

La longitud de onda óptima determinada fue de 225 nm para CS en diferentes medios, como se muestra en la figura 18 sin haber interferencias por parte de las matrices en las cuales el CS está contenido.

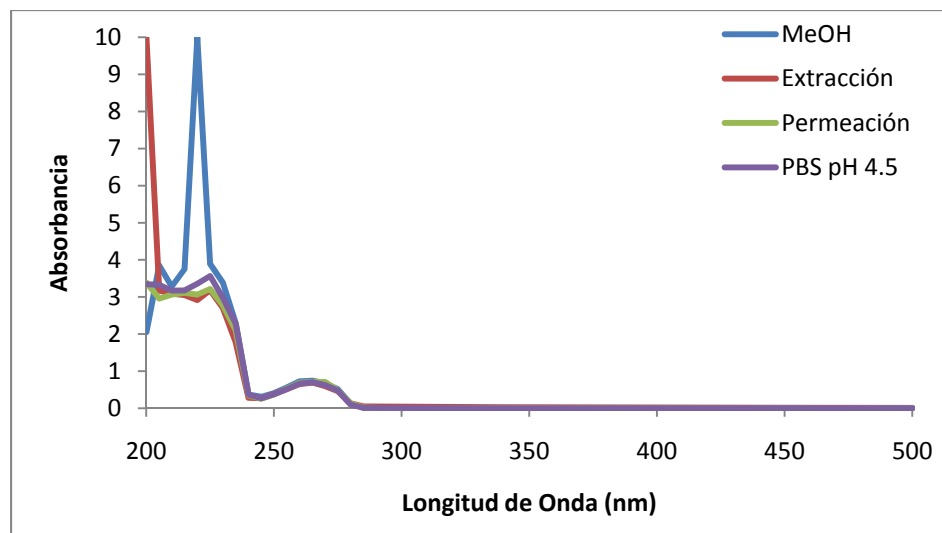


Figura 18. Espectros de absorción del CS en diferentes medios

6.2 VALIDACIÓN ANALÍTICA ^(147; 146; 151)

La finalidad de la validación es la de asegurar la fiabilidad en el método y la confianza de los datos obtenidos. Los parámetros que se evaluaron para la determinación de CS por HPLC fueron los siguientes:

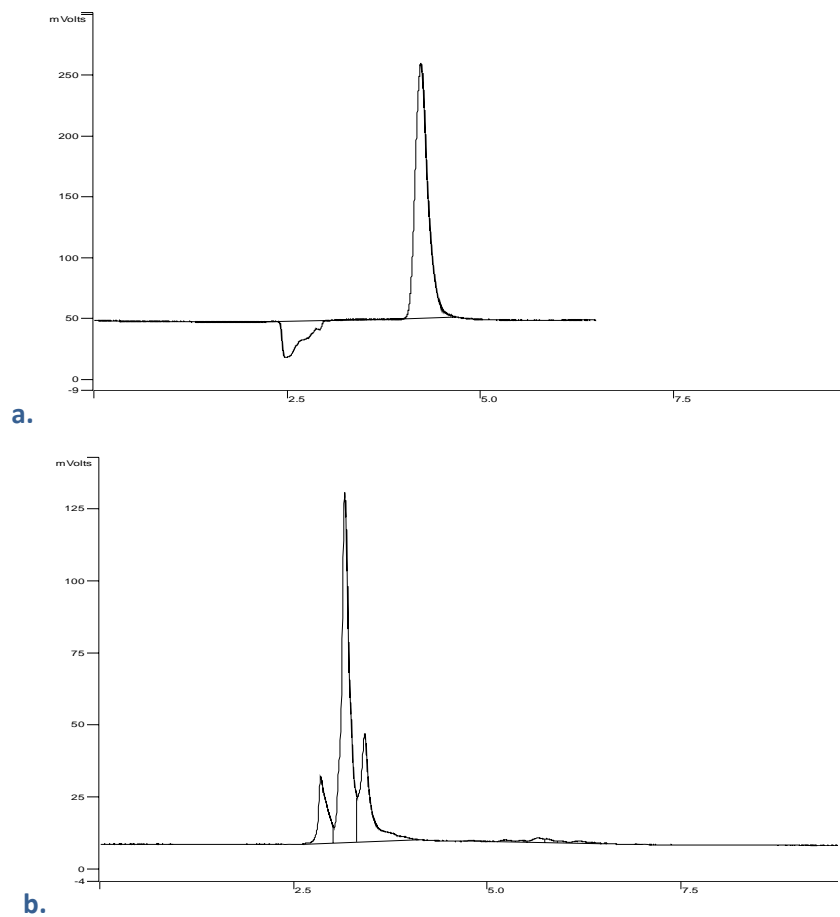
- a. Selectividad
- b. Linealidad
- c. Exactitud
- d. Precisión
- e. Límite de detección y cuantificación⁴

⁴ Sólo se realizó para el método de cuantificación de CS en las cinéticas de permeación.

6.2.1 MÉTODO PARA CS EN MATRIZ BIOLÓGICA (PBS PH 4.5 EN CONTACTO CON PIEL)

6.2.1.1 Selectividad

En la figura 19 se muestran ejemplos de cromatogramas para una solución acuosa de CS (a), la matriz biológica (b) y CS en la matriz biológica (c).



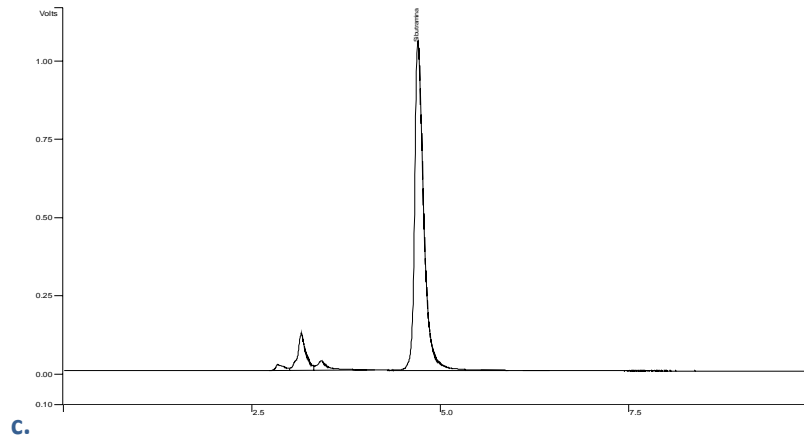


Figura 19. (a) Cromatograma de CS; (b) Cromatograma de matriz biológica; (c) Cromatograma de CS en matriz biológica.

6.2.1.2 Repetibilidad

El tiempo de retención y los resultados de área bajo la curva (AUC) para seis determinaciones realizadas bajo las mismas condiciones se resumen en la tabla 7 para una concentración de CS de 0.4 $\mu\text{g/mL}$.

Tabla 7. Resultados obtenidos para una muestra de 0.4 $\mu\text{g/mL}$ de CS en matriz biológica (PBS pH 4.5 en contacto con piel)

Repetición	AUC	t_R (min)
1	25177	4.682
2	27063	4.682
3	27063	4.625
4	22832	4.672
5	25533	4.634
6	23794	4.659
Media	25244	4.659
SD	1710.3	0.025
% C.V.	6.7752	0.55

Con este análisis se puede observar que el coeficiente de variación es aceptable para una validación analítica en una matriz biológica.

6.2.1.3 Linealidad

En la tabla 8 se detallan los valores individuales de las respuestas cromatográficas (AUC), correspondientes a cada concentración de CS, empleados para construir la curva de calibración.

Tabla 8. Valores individuales de las respuestas cromatográficas obtenidas con concentraciones crecientes de CS y parámetros de regresión.

CS [$\mu\text{g/mL}$]	R1	R2	R3	R4	R5	R6	Media
0.2	11786	12801	12888	12372	12766	12545	12526
0.4	25177	27063	26863	22832	25533	23794	25210
1.2	116427	125843	128883	125100	123303	119321	123146
1.6	159608	168846	169765	159608	164227	159608	163610
2	218414	219859	215855	219143	219318	218720	218552
2.4	279862	287651	264267	279862	277910	269415	276495
2.8	301780	310392	331921	313024	306086	311870	312512
b	-15221	-13404	-15676	-18998	-14422	-18561	-16047
m	115773	118219	119363	119508	116515	117661	117840
r²	0.9913	0.9932	0.9948	0.9947	0.9951	0.9967	0.9961

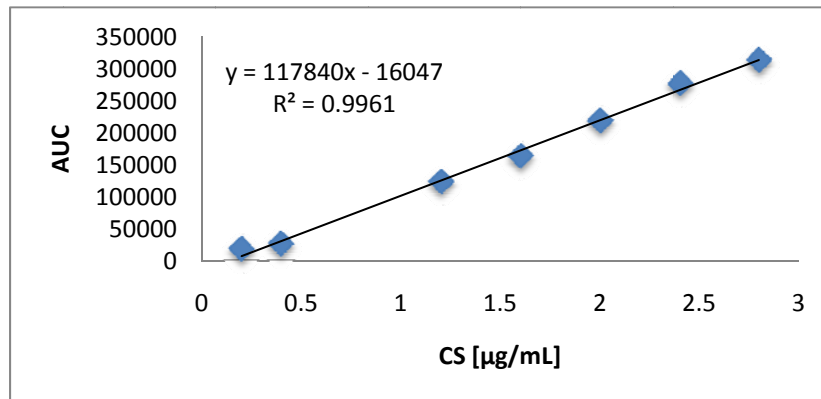


Figura 20. Recta de calibración para CS de 0.2-2.8 $\mu\text{g/mL}$.

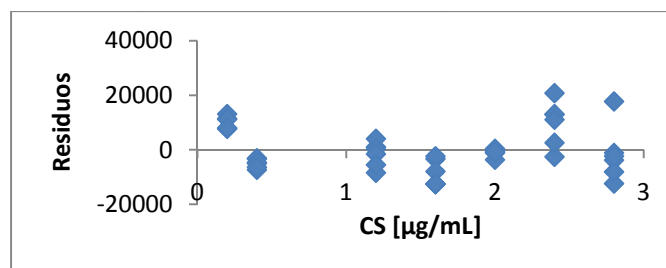


Figura 21. Gráfico de residuales.

En la figura 20 se representa gráficamente la recta de calibrado resultante de la media del análisis por sextuplicado, mientras que en la tabla 9 se muestran los parámetros de regresión, los valores de F del análisis de varianza para evaluar la linealidad y los valores de t para la prueba de la ordenada al origen.

Tabla 9. Parámetros de linealidad

Ordenada al origen	-16047
Pendiente	117434
Coefficiente de correlación	0.9969
Coefficiente de determinación	0.9936
Error estándar de la regresión	8576.283
t_{0.95}	2.013
t_{calculada}	-7,879
F	1.687 E-52
F_{calculada}	10039.934
% C.V.	3.20

El coeficiente de variación hallado, 3.20 %, según el análisis de residuales (*fig. 21*), los valores de los coeficientes de correlación y de determinación (mayores a 0.99), el valor de F (tabla 9), indican que el método es lineal en el intervalo de concentraciones estudiadas, mientras que el valor de t nos indica que la ordenada al origen es diferente de cero.

9.1.1.1 Precisión intra-día

En la tabla 10 se muestran los valores para evaluar la precisión.

Tabla 10. Precisión del método; datos de AUC promedio (n=6), SD = Desviación estándar

CS [µg/mL]	AUC	±(SD)	% C.V.
0.1	2530.500	±(124.664)	4.926
0.2	12526.333	±(408.888)	3.264
0.4	25210.333	±(1669.214)	6.621
1.2	123146.167	±(4556.431)	3.700
1.6	163610.333	±(4769.244)	2.915
2	218551.500	±(1411.762)	0.646
2.4	276494.500	±(8352.034)	3.021
2.8	312512.167	±(10376.389)	3.320

De acuerdo a los valores de la tabla 10, el coeficiente de variación es menor del 15%, lo que demuestra que el método es preciso.

9.1.1.2 Exactitud

En los resultados de la tabla 11, se observa que el coeficiente de variación es menor del 10% por lo que se cumple el criterio de exactitud en una matriz biológica.

Tabla 11. Exactitud del método

C_{exp}	C_{est} Media	SD	% C.V	% Recuperado
0.100	0.149	0.013	8.697	148.587
0.200	0.234	0.012	5.247	116.850
0.400	0.342	0.010	2.819	85.423
1.200	1.175	0.025	2.167	97.954
1.600	1.520	0.022	1.478	95.008
2.000	1.988	0.033	1.646	99.416
2.400	2.482	0.074	2.979	103.408
2.800	2.788	0.071	2.541	99.565

9.1.1.3 Precisión inter-día

En la tabla 12 se muestran los resultados de los coeficientes de variación obtenidos en dos días diferentes; de igual manera, se muestra el % C.V. para la variación inter-día, la cual no deberá exceder al 15%.

Tabla 12. Análisis de precisión inter-día (n=3)

CS [$\mu\text{g/mL}$]	D1			D2			Inter-día
	AUC	+ SD	% C.V.	AUC	+ SD	% C.V.	%C.V.
0.1	2515.333	+192.295	7.645	2545.667	+34.429	1.352	4.499
0.2	12491.667	+612.671	4.905	12561.000	+197.487	1.572	3.238
0.4	26367.667	+1035.985	3.929	24053.000	+1369.000	5.692	4.810
1.2	123717.667	+6494.287	5.249	122574.667	+2957.543	2.413	3.831
1.6	166073.000	+5617.678	3.383	161147.667	+2666.781	1.655	2.519
2	218042.667	+2027.664	0.930	219060.333	+307.451	0.140	0.535
2.4	277260.000	+11907.169	4.295	275729.000	+5554.505	2.014	3.155
2.8	314697.667	+15524.949	4.933	310326.667	+3717.576	1.198	3.066

Según el análisis, no existe un valor mayor al 15% de C.V. en ningún nivel para las muestras analizadas un día u otro.

9.1.1.4 Límite de cuantificación

La recta de calibrado incluye el punto de 100 ng/mL; sin embargo, este límite no cumple la premisa de tener el +20 % de la concentración nominal, por lo que se consideró como límite de cuantificación el de 200 ng/mL, a pesar de que teóricamente (ec. 3) es de 130 ng.

9.1.1.5 Límite de detección

El límite de detección fue de 50 ng determinado al analizar soluciones diluidas, mientras que teóricamente (ec. 4) es de 42.748 ng.

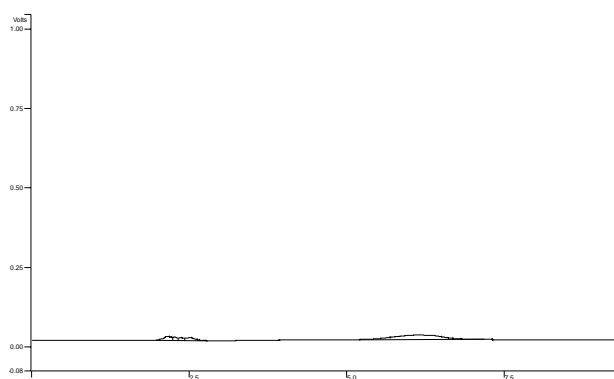
6.2.2 MÉTODO PARA CS EN MATRIZ BIOLÓGICA (MEOH EN CONTACTO CON PIEL)

Para determinar la cantidad de CS retenida en la piel se desarrolló un método, siguiendo las mismas condiciones con las cuales se trata la muestra; para ello, se emplearon secciones de piel que estuvieron en contacto con metanol por 24 h en agitación constante, y la solución resultante fue empleada para preparar los sistemas.

6.2.2.1 Selectividad

Los cromatogramas de la matriz biológica y del CS en la matriz biológica se muestran en la figura 22. Se observa que no hay interferencias en el tiempo de retención.

a.



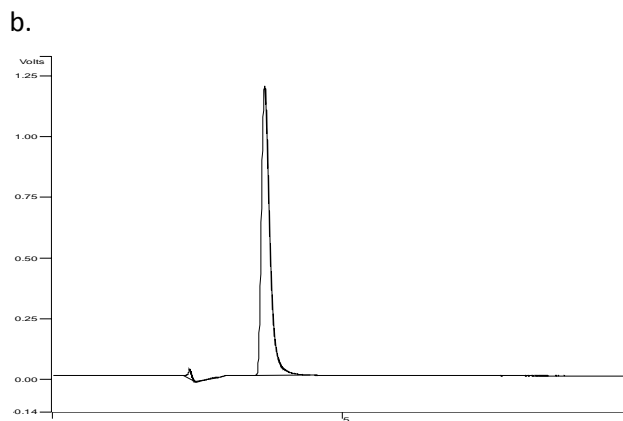


Figura 22. a. Cromatograma de la matriz biológica (MeOH en contacto con piel); b. Cromatograma de CS en la matriz biológica.

6.2.2.2 Repetibilidad

El tiempo de retención y AUC para cuatro determinaciones se resumen en la tabla 13 para una concentración de CS de 5 $\mu\text{g/mL}$.

Tabla 13. Resultados obtenidos para una muestra de 5 $\mu\text{g/mL}$ de CS

Repetición	AUC	t_R (min)
1	82384	4.572
2	98329	4.575
3	91779	4.549
4	95861	4.59
Media	92088.25	4.5715
SD	7010.6753	0.0169
CV %	7.6130	0.3706

Con este análisis se puede observar que el coeficiente de variación es aceptable para una validación analítica parcial de un analito contenido en una matriz biológica.

6.2.2.3 Linealidad del sistema

En la tabla 14 se detallan los valores individuales de las respuestas cromatográficas (AUC), correspondientes a cada concentración de CS.

Tabla 14. Valores individuales de las respuestas cromatográficas obtenidas con concentraciones crecientes de CS y parámetros de regresión.

CS [$\mu\text{g/mL}$]	R1	R2	R3	R4	Media
5	35864	33819	33417	43303	36600.75
10	82384	98329	91779	95861	92088.25
20	195181	197692	212596	221939	206852
30	345549	339797	350376	350376	346524.5
40	492067	483450	490740	486489	488186.5
60	696047	716379	707084	712361	707967.75
80	934927	963599	951164	958061	951937.75
100	1109609	1176148	1203427	1210819	1175000.75
b	-14557	-25156	-24739	-20170	-21155
m	11618	12204	12285	12291	12100
r²	0.9956	0.9988	0.9993	0.9997	0.999

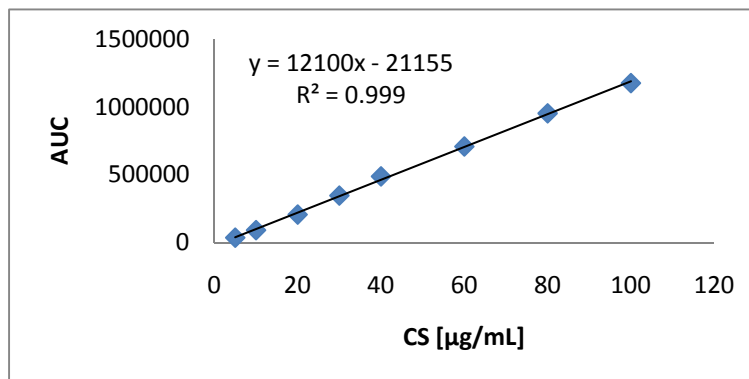


Figura 23. Recta de calibración para CS en matriz biológica (MeOH en contacto con piel).

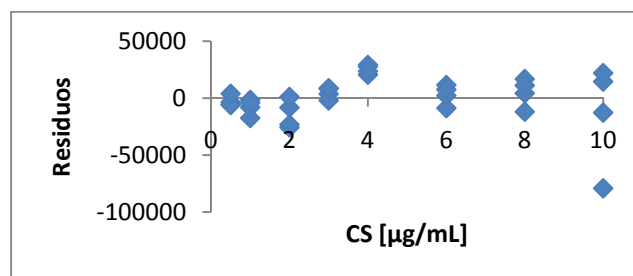


Figura 24. Gráfico de residuales

En la figura 23 se representa gráficamente la recta de calibrado resultante de la media del análisis por cuadruplicado; mientras que, en la tabla 15 se muestran los parámetros de regresión, los valores de F del análisis de varianza para evaluar la linealidad y los valores de t para la prueba de la ordenada al origen.

Tabla 15. Parámetros de linealidad

Ordenada al origen	-21155
Pendiente	12100
Coefficiente de correlación	0.999
Coefficiente de determinación	0.997
Error estándar de la regresión	20411.4546
t_{0.95}	2.042
t_{calculada}	-3.487
F	2.614 E-40
F_{calculada}	11451.256
CV%	14.66

El coeficiente de variación hallado, del 14.66 %, según el análisis de residuales (*fig. 24*), los valores de los coeficientes de correlación y de determinación mayores a 0.99, y el valor de F (tabla 15), indican que el método es lineal en el intervalo de concentraciones estudiadas, mientras que el valor de t nos indica que la ordenada al origen es diferente de cero.

6.2.2.4 Precisión intra-día

En la tabla 16 se muestran los valores para evaluar la precisión del método.

Tabla 16. Precisión del método. Datos de AUC promedio [n=4]; SD = Desviación estándar

CS [µg/mL]	Media (SD)	CV%
5	36600.75 (4594.829)	12.554
10	92088.25 (7010.675)	7.613
20	206852 (12658.712)	6.120
30	346524.5 (5029.213)	1.451
40	488186.5 (3953.673)	0.810
60	707967.75 (8811.641)	1.245
80	951937.75 (12429.042)	1.306
100	1175000.75 (46073.839)	3.921

De acuerdo a los valores de la tabla 16, el coeficiente de variación es menor del 15%, lo que demuestra que el método es preciso.

6.2.2.5 Exactitud

De acuerdo a los resultados de la tabla 17, se observa que el coeficiente de variación es menor del 10 % por lo que se cumple el criterio de exactitud en un sistema biológico.

Tabla 17. Exactitud del método

C_{exp}	C_{est}	Media	SD	% C.V.	% Recuperado
5	4.773	0.380	7.956	95.464	
10	9.359	0.579	6.191	93.589	
20	18.844	1.046	5.552	94.218	
30	30.387	0.416	1.368	101.289	
40	42.094	0.327	0.776	105.236	
60	60.258	0.728	1.209	100.430	
80	80.421	1.027	1.277	100.526	
100	98.856	3.808	3.852	98.856	

6.2.2.6 Precisión inter-día

En la tabla 18 se muestran los resultados de los coeficientes de variación obtenidos en dos días diferentes.

Tabla 18. Análisis de precisión inter-día (n=2)

CS [$\mu\text{g/mL}$]	Día 1			CS [$\mu\text{g/mL}$]	Día 2			Inter-día %C.V.
	Media	+SD	% C.V.		Media	+SD	% C.V.	
5	34841.5	+1446.033	4.150	5	38360	+3248.946	8.470	12.554
10	90356.5	+11274.818	12.478	10	93820	+4957.242	5.284	7.613
20	196436.5	+1775.545	0.904	20	217267.5	+8951.018	4.120	6.120
30	342673	+4067.278	1.187	30	350376	+3556.181	1.015	1.451
40	487758.5	+6093.139	1.249	40	488614.5	+2795.663	0.572	0.810
60	706213	+14376.895	2.036	60	709722.5	+6230.763	0.878	1.245
80	949263	+20274.166	2.136	80	954612.5	+8788.651	0.921	1.306
100	1142878.5	+47050.178	4.117	100	1207123	+32579.096	2.699	3.921

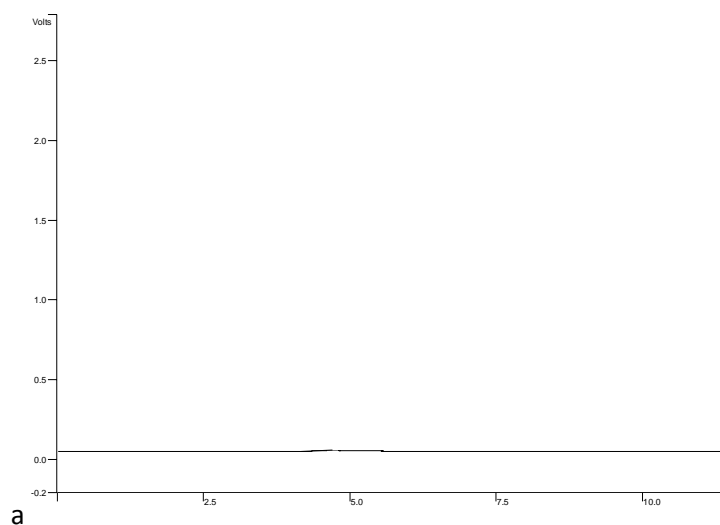
Según el análisis, el % C.V. no excede al 15% entre las muestras día a día, por lo que no hay variaciones en las respuestas entre un día y otro.

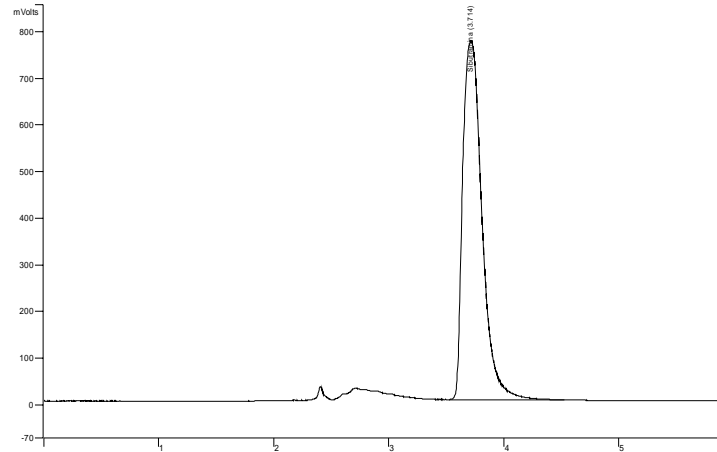
6.2.3 MÉTODO PARA CS EN METANOL

Para el caso de la determinación de CS contenido en la dispersión nanoparticulada, se desarrolló un método en metanol como medio disolvente para cuantificarlo.

6.2.3.1 Selectividad

Los cromatogramas del metanol y del CS en metanol se muestran en a figura 25. Se observa que no hay interferencias en el tiempo de retención del CS (3.8 min).





b.

Figura 25. (a) Cromatograma de MeOH; (b) Cromatograma de CS en MeOH (40 μ g/mL).

6.2.3.2 Repetibilidad

El tiempo de retención y los valores de AUC para una solución de CS en metanol de 20 μ g/mL se muestran en la tabla 19.

Tabla 19. Resultados obtenidos para una muestra de 20 μ g/mL de CS en metanol.

Repetición	AUC	t_R (min)
1	2513465	3.848
2	2533417	3.843
3	2590978	3.845
4	2507279	3.846
5	2516910	3.833
6	2516910	3.819
Media	2529826.5	3.839
SD	31183.8356	0.0111
CV %	1.2326	0.2896

Con este análisis se puede observar que el coeficiente de variación es aceptable, por lo que el método es repetible.

6.2.3.3 Linealidad del sistema

En la tabla 20 se detallan los valores individuales de las respuestas cromatográficas (AUC), correspondientes a cada concentración de CS.

Tabla 20. Valores individuales de las respuestas cromatográficas obtenidas con concentraciones crecientes de CS y parámetros de regresión.

CS [µg/mL]	R1	R2	R3	R4	R5	R6
5	625323	638853	657112	625351	640528	638150
10	1243194	1240522	1275926	1217372	1283896	1224804
20	2513465	2533417	2590978	2507279	2516910	2498269
30	3578313	3623421	3669186	3563979	3565638	3554599
40	5232251	5286519	5438360	5259433	5288722	5381185
50	6466701	6427692	6604535	6452544	6642173	6421291
b	-85701	-64697	-74437	-98512	-107319	-93292
m	130151	129926	133437	130432	132786	130826
r²	0.997	0.9973	0.9962	0.9966	0.9953	0.9946

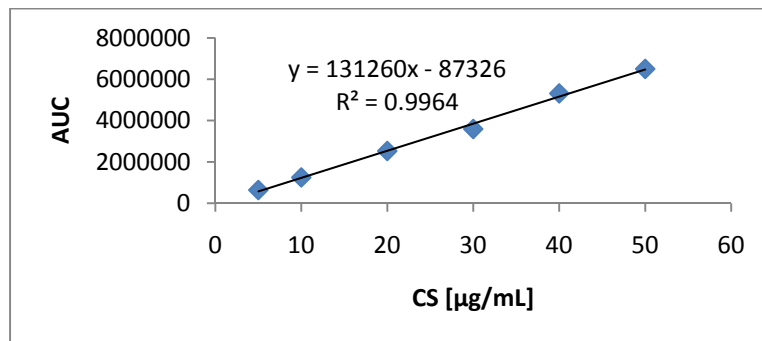


Figura 26. Recta de calibración para CS en MeOH.

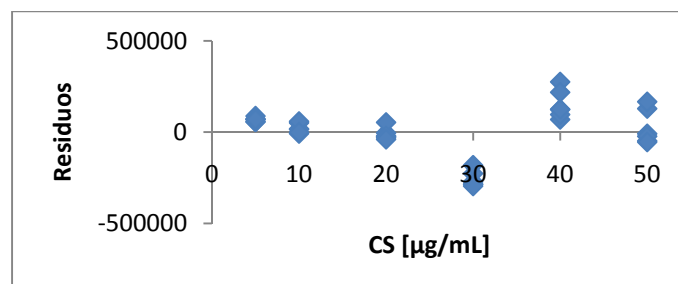


Figura 27. Gráfico de residuos.

En la figura 26 se representa gráficamente la recta de calibrado resultante de la media del análisis por sextuplicado, mientras que en la tabla 21 se muestran los parámetros de regresión, los valores de F del análisis de varianza para evaluar la linealidad y los valores de t para la prueba de la ordenada al origen.

Tabla 21. Parámetros de linealidad

Ordenada al origen	-87326
Pendiente	131260
Coefficiente de correlación	0.999
Coefficiente de determinación	0.996
Error estándar de la regresión	140357.236
t_{0.95}	0.0632
t_{calculada}	-1.958
F	6.3559 E-42
F_{calculada}	7980.4413
CV%	1.61

El coeficiente de variación hallado del 1.61% según el análisis de residuales (*fig. 27*), los valores de los coeficientes de correlación y de determinación mayores a 0.99, y los valores de F y t (tabla 21), indican que el método es lineal en el intervalo de concentraciones estudiadas.

6.2.3.4 Precisión intra-día

En la tabla 22 se muestran los valores para evaluar la precisión del método.

Tabla 22. Precisión del método, datos de actividad promedio (n=6)

CS [µg/mL]	Media +SD	% C.V.
5	637552.833 +11763.615	1.845
10	1247619.000 +27377.140	2.194
20	2526719.667 +34139.255	1.351
30	3592522.667 +45507.619	1.267
40	5314411.667 +80128.713	1.508
50	6502489.333 +97437.407	1.498

De acuerdo a los valores de la tabla 22, el coeficiente de variación es menor del 2%, lo que demuestra que el método es preciso.

6.2.3.5 Exactitud

Tabla 23. Exactitud del método

C_{exp}	C_{est} Media	SD	% C.V.	% Recuperado
5	5.522	0.090	1.623	110.449
10	10.170	0.205	2.016	101.702
20	19.915	0.256	1.284	99.575
30	28.035	0.341	1.216	93.449
40	41.153	0.600	1.458	102.882
50	50.204	0.730	1.454	100.409

De acuerdo a los resultados de la tabla 23, se observa que el coeficiente de variación es menor o igual al 2% por lo que se cumple el criterio de exactitud.

6.2.3.6 Precisión inter-día

En la tabla 24 se muestran los resultados de los coeficientes de variación obtenidos en dos días diferentes.

Tabla 24. Análisis de precisión inter-día (n=3)

CS [$\mu\text{g/mL}$]	Día 1			CS [$\mu\text{g/mL}$]	Día 2			Inter-día % C.V.
	Media	+SD	%C.V.		Media	+SD	% C.V.	
5	640429.333	+15953.017	2.491	5	634676.333	+8163.033	1.286	1.889
10	1253214.000	+19714.490	1.573	10	1242024.000	+36452.119	2.935	2.254
20	2545953.333	+40248.429	1.581	20	2507486.000	+9322.224	0.372	0.977
30	3623640.000	+45436.896	1.254	30	3561405.333	+5952.537	0.167	0.711
40	5319043.333	+106834.471	2.009	40	5309780.000	+63548.933	1.197	1.603
50	6499642.667	+92909.777	1.429	50	6505336.000	+119530.167	1.837	1.633

Con los datos obtenidos, puede considerarse que el método es preciso para un análisis inter-día.

6.3 PREPARACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE NANOPARTÍCULAS

6.3.1 EFICIENCIA DE ENTRAMPE

Se prepararon lotes con cantidades crecientes de CS empleando el método ya descrito en la sección de metodología, con el fin de determinar la cantidad máxima a encapsular; no obstante, para todas las proporciones probadas, la eficiencia de encapsulamiento fue de $54.30\% \pm 0.57$, según el análisis realizado por HPLC, como se observa en la tabla 25.

Tabla 25. Entrampe de CS incrementando la carga (% de fármaco en relación al peso de polímero).

Lote	% Entrampado de CS
20%	53.041 ± 8.672
40%	53.886 ± 4.220
60%	54.906 ± 4.047

Aunque la cantidad encapsulada se incrementó al aumentar la proporción fármaco/polímero, la eficiencia de encapsulamiento se mantuvo constante para todos los porcentajes probados.

6.3.2 TAMAÑO DE PARTÍCULA

La cantidad de fármaco tampoco afectó el tamaño de las nanopartículas y todos los lotes presentaron un tamaño promedio de $256.34 \text{ nm} \pm 43.282$. No teniendo efecto significativo entre lotes (ANOVA, $\alpha = 0.05$).

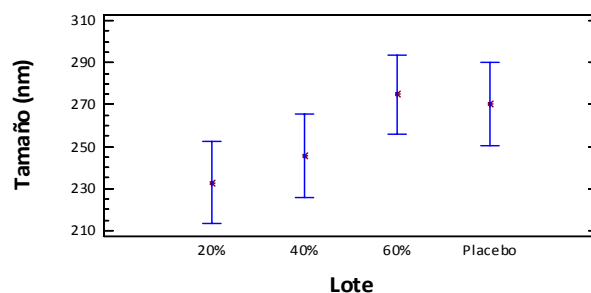


Figura 28. Comparación de tamaño de partícula en lotes con diferente carga de CS ($P > 0.05$, $n = 9$).

6.3.3 POTENCIAL Z

Conforme a la literatura, el potencial Z requerido para que una suspensión sea considerada como estable suele ser de ± 30 mV⁽¹⁵²⁾. La energía de enlace existente entre partícula y partícula es responsable de la formación de agregados de partículas débiles o fuertes. El potencial Z obtenido para los lotes con diferentes cargas fue de -20.20 mV ± 4.523 , lo que permite predecir una buena estabilidad física del sistema, existiendo una diferencia significativa entre los lotes cargados (20%, 40% y 60%) con respecto al placebo, y entre el lote 20% con el lote 40% (Tukey, $\alpha=0.05$).

De acuerdo con los resultados obtenidos se determinó trabajar con el lote con un 60% de carga de CS ya que la estabilidad no se ve afectada con el incremento en carga, en comparación con los otros dos lotes (20% y 40%).

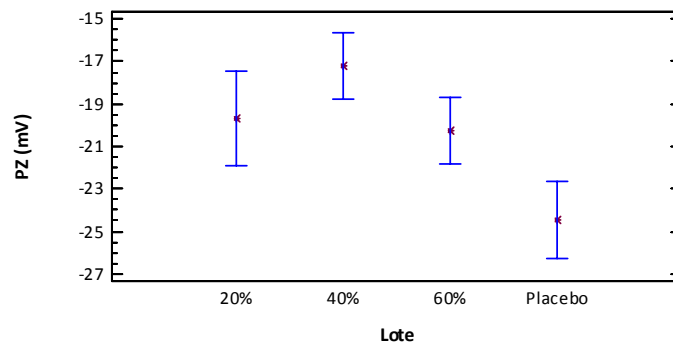


Figura 29. Comparación del potencial zeta en lotes con diferente carga de CS ($P>0.05$, $n=9$).

6.3.4 CALORIMETRÍA DIFERENCIAL DE BARRIDO

Se realizaron estudios de calorimetría diferencial de barrido, para los componentes individuales de las nanopartículas (*v.gr.* polímero y fármaco), así como para las nanopartículas. Como puede verse en la figura 29, la sibutramina presenta una endoterma aproximadamente a los 190 °C, correspondiente a su punto de fusión, mientras que una segunda está presente aproximadamente a los 210 °C que se presume corresponde a la temperatura de descomposición, lo que corrobora la literatura citada^(153; 154), mientras que el PLGA presenta un punto de transición vítrea aproximadamente a los 60 °C.

Con este análisis se puede suponer que el CS está atrapado en las nanopartículas, ya que el punto de fusión del CS no aparece en los termogramas de los lotes cargados con CS (*vid. fig. 30*) Esto ocurrió para todos los porcentajes de principio activo añadido para preparar las nanopartículas, incluso con 60 % de CS con respecto al peso de polímero.

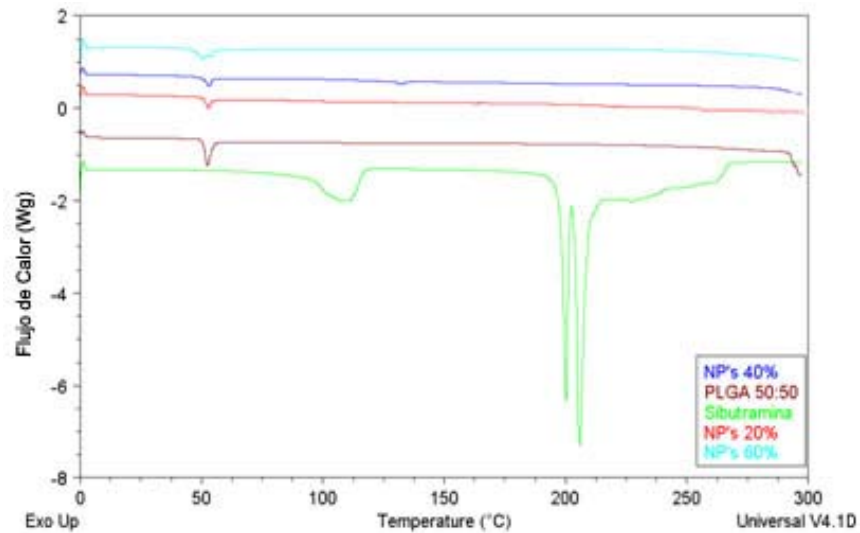


Figura 30. Termogramas de lotes diferentes de nanopartículas.

6.3.5 MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO (SEM)

La microscopia electrónica de barrido permite observar la morfología y caracterizar superficies de distintos materiales; con ella, se permitió confirmar que la forma de las nanopartículas es esférica, además de que el tamaño concuerda con el obtenido por la técnica de dispersión dinámica de luz (*vid. fig. 31*).

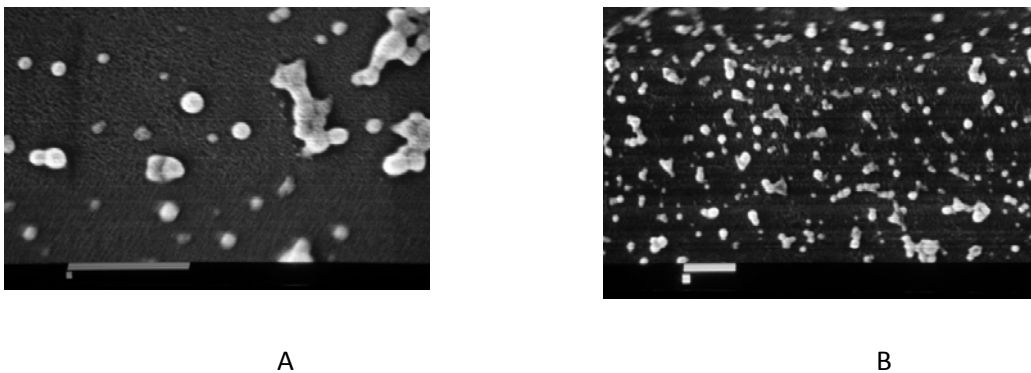


Figura 31. a. Micrografías de nanopartículas de PLGA y CS. (a) 30000x; (b) 10000x. En ambos casos: barra= 1µm

Los datos obtenidos de la caracterización en cuanto al tamaño de partícula y potencial Z son comparables con los que hasta hoy en día se han reportado⁽¹³¹⁾, aunque es importante recalcar que el tamaño, morfología y potencial Z estarán directamente relacionados con el principio activo que se encapsule y con el material que conforma la matriz.

6.4 CINÉTICAS DE PERMEACIÓN

Las permeaciones *in vitro* se realizaron con piel de oreja cerdo porque está plenamente demostrado que guarda una gran similitud histológica y de permeabilidad con la piel humana⁽¹⁵⁵⁻¹⁵⁸⁾. Para cada experimento (n=6) se empleó la piel del mismo donador para reducir variabilidad.

En los estudios de permeación se toman las siguientes consideraciones para que la primera Ley de Fick pueda ser aplicada:

1. El soluto difunde unidireccionalmente, considerando una membrana plana homogénea en cuanto a estructura.
2. El grosor de la membrana presenta un valor finito ($x=1$).
3. La concentración de soluto en el compartimento donador es constante.
4. El compartimento receptor mantiene condiciones de gradiente máximo o sumidero “*sink*” (la concentración de CS no excede del 10% de saturación en el compartimento receptor).

Para la cuantificación de CS presente en el compartimento receptor (PBS pH 4.5) se empleó el método previamente descrito por HPLC. Los valores de flujo se obtuvieron a partir de la primera Ley de Fick.

$$J = \frac{\Delta Q/S}{\Delta t}$$

Ecuación 6. Flujo en el estado estacionario en función del tiempo.

Donde:

$\Delta Q/S$ = cantidad de soluto transferido por unidad de área

Δt = tiempo

Al graficar Q/S vs. t , el flujo (J) en el estado estacionario, corresponde a la pendiente de la parte lineal (para este caso, los puntos de las 3 a las 6 horas). De la misma porción recta se calcula el tiempo de latencia (t_{lat}) extrapolando la recta al eje “x”.

Para el caso del coeficiente aparente de permeabilidad (Kp), este se calcula con la ecuación 7 derivada de la primera Ley de Fick, manteniendo condiciones *sink*.

$$Kp = \frac{J}{C}$$

Ecuación 7. Coeficiente aparente de permeabilidad de la barrera epidermal usando dosis infinita bajo las condiciones de flujo estacionario

El factor de promoción (E) se calcula a partir de la ecuación 8 usando los valores de Kp de las diferentes formulaciones (Kp_f), tomando como referencia la Kp del control (Kp_c).

$$E = \frac{Kp_f}{Kp_c}$$

Ecuación 8. Factor de promoción usando los coeficientes aparentes de permeabilidad.

Para el análisis estadístico fue empleado el software Statgraphics Plus 5.1.

Como ya se explicó se llevaron a cabo permeaciones de CS formulado en una solución y en NBs, a través de piel intacta (control) y piel pretratada con microagujas de dos longitudes. En la figura 31 se puede apreciar el comportamiento de la cinética de permeación para el caso de la solución (1.2 mg/mL) con los dos pretratamientos con microagujas (200 μ m y 500 μ m), no existiendo diferencias significativas (Contraste de Kruskal-Wallis, $\alpha= 0.05$) entre los flujos cuando la piel es pretratada con microagujas (tabla 27). Sin embargo, hay diferencias significativas con respecto al control (Bonferroni, $\alpha=0.05$).

De igual manera se puede observar que el pretratamiento de la piel incrementa el flujo de esta molécula lipofílica pH dependiente en casi 4.6 veces para las microagujas de 500 μ m y 7 veces para las de 200 μ m; lo que coincide con lo reportado en estudios previos (*vid.* tabla 5).

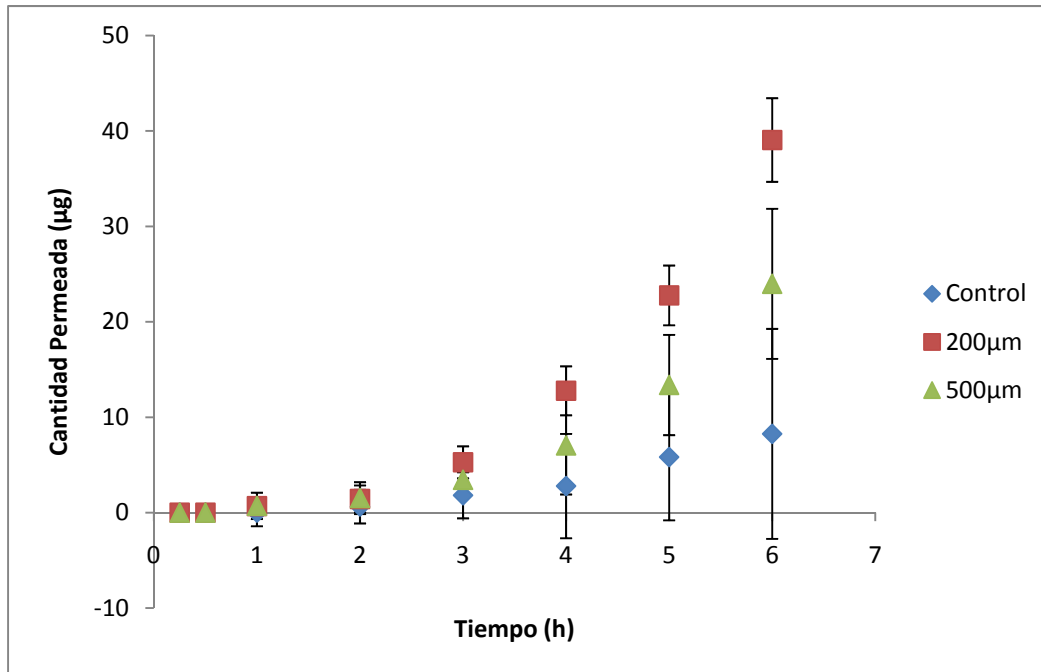


Figura 32. Cinética de permeación de CS en solución.

Con respecto a los tiempos de latencia (t_{lat}), que se muestran en la tabla 26, no existen diferencias significativas entre ellos (Contraste de Kruskal-Wallis, $\alpha= 0.05$), lo que indica que el pretratamiento con microagujas no reduce el tiempo en el que el CS comienza a permear. Esto puede ser atribuido a que en solución, el tiempo de latencia está directamente relacionado a la naturaleza del fármaco.

Tabla 26. Tiempos de latencia para la permeación de CS en solución.

Tratamiento	t_{lat} (h)
500 µm	3.304 ± 0.487
200 µm	3.165 ± 0.622
Control	2.527 ± 0.783

Tabla 27. Flujos obtenidos durante la permeación de CS en solución

Tratamiento	Flujo ($\mu\text{g}/\text{cm}^2\text{h}$)
500 µm	1.703 ± 0.687
200 µm	2.589 ± 0.622
Control	0.369 ± 0.430

De los resultados obtenidos del perfil de la cinética de permeación del CS formulado en NBs (fig. 33), se calcularon y compararon los flujos (tabla 28). El análisis estadístico indica que no existe diferencia significativa entre los valores del flujo para el pretratamiento de la piel con microagujas de 200 μm y de 500 μm (Contraste de Kruskal-Wallis, $\alpha=0.05$), lo que corrobora estudios previos donde se ha reportado el incremento del flujo (*vid.* tabla 6). La diferencia significativa con respecto al control (Bonferroni, $\alpha=0.05$) se atribuye al efecto sinérgico que se tiene cuando ambas técnicas se emplean en conjunto.

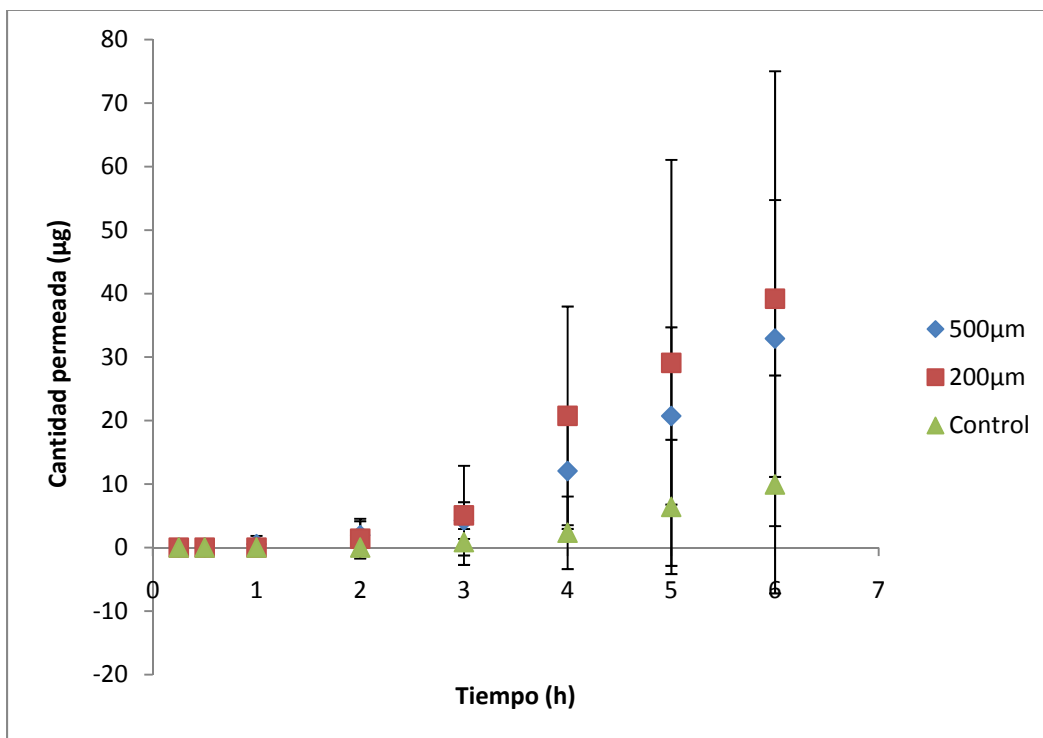


Figura 33. Cinética de permeación de CS en NBs

Como en el caso anterior, el control presenta un flujo muy pobre (incluso en algunas celdas éste fue de cero); véase tabla 28.

Tabla 28. Flujos para la permeación de CS en NBs

Tratamiento	Flujo ($\mu\text{g}/\text{cm}^2\text{h}$)
500 μm	2.006 \pm 1.587
200 μm	2.593 \pm 1.913
Control	0.724 \pm 1.235

Los tiempos de latencia para el CS formulado en NBs se muestran en la tabla 29, como puede verse, el incremento no es tan notorio; sin embargo, es importante recalcar que para el caso del control la $n=2$ (esto debido a que en las cuatro celdas restantes no se observó transporte de NBs), mientras que para 200 y 500 μm la $n=6$, lo que hace suponer que el tiempo de latencia para el control llega a ser mucho más elevado que el reportado.

Lo anterior se le puede atribuir al sistema acarreador en el cual está contenido el CS, ya que el acarreador modifica las propiedades de transporte del CS; además las NBs son capaces de penetrar por folículos pilosos, donde se forman depósitos desde el cual el CS puede difundir para poder alcanzar el medio receptor lo que implica un mayor tiempo de latencia.

Al emplear microagujas, el paso de las nanopartículas estudiadas se facilita, franqueando el estrato córneo (que de otra manera no atravesarían) y llegando a capas de la piel más profundas. No obstante, las pruebas estadísticas no muestran diferencias significativas entre ellos (Contraste de Kruskal-Wallis, $\alpha=0.05$).

Tabla 29. Tiempos de latencia para la permeación de CS en NBs

Tratamiento	t_{lat} (h)
500 μm	2.605 \pm 0.516
200 μm	2.832 \pm 0.357
Control	3.516 \pm 0.613

Los resultados anteriores indican que el pretratamiento de la piel con microagujas incrementa el flujo en dos órdenes aproximadamente, en el caso de ambas formulaciones, y que el tiempo de latencia es independiente del pretratamiento con microagujas, pero dependiente de la formulación.

En la tabla 30 se comparan los tiempos de latencia en función del pretratamiento con microagujas y de la formulación, sin que exista un efecto significativo para el análisis formulación-longitud de aguja figura 34, (Contraste de Kruskal-Wallis, $P < 0.05$), aunque como ya se mencionó, en promedio, el t_{lat} se incrementa en el caso de las nanopartículas a través de piel intacta (control). Véase figura 35.

Tabla 30. Tiempos de latencia en función de los diferentes tratamientos para las dos formulaciones probadas.

Tratamiento	t_{lat} (h)	
	Solución	Nanopartículas
500 μm	3.304 \pm 0.487	2.605 \pm 0.516
200 μm	3.165 \pm 0.622	2.832 \pm 0.357
Control	2.527 \pm 0.783	3.516 \pm 0.613

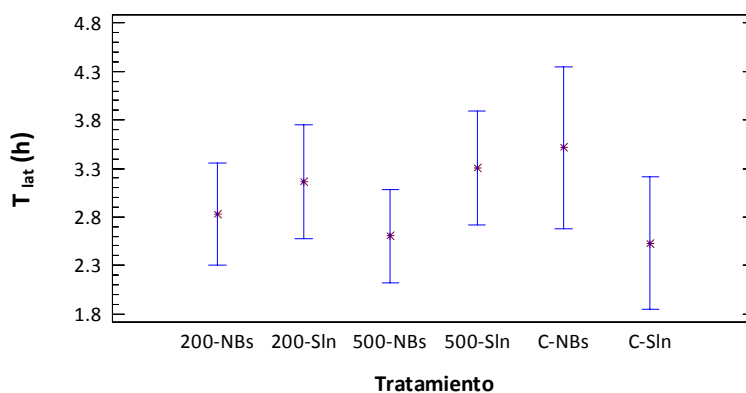


Figura 34. Medias de los tiempos de latencia para los diferentes tratamientos ($\alpha=0.05$, IC de Bonferroni).

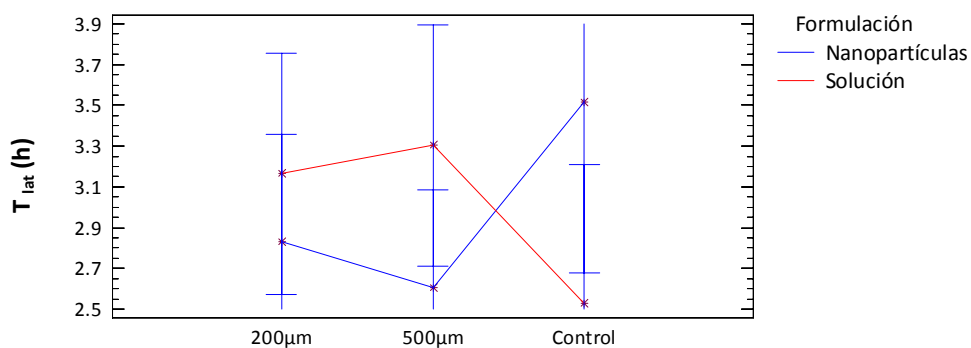


Figura 35. Análisis longitud de la aguja – formulación para el tiempo de latencia ($\alpha=0.05$, IC de Bonferroni).

En la tabla 31 se comparan los valores de flujo para las dos formulaciones y el pretratamiento con microagujas. Las pruebas estadísticas muestran que no hay efecto significativo sobre las medias del flujo para las formulaciones, ni las longitudes (*figs. 36 y 37*, Contraste de Kruskal-Wallis, $\alpha=0.05$, $P < 0.05$); habiendo diferencias significativas entre el control y la piel pretratada.

Tabla 31. Flujos en función de los diferentes tratamientos con diferentes formulaciones.

Tratamiento	Flujo ($\mu\text{g}/\text{cm}^2\text{h}$)	
	Solución	Nanopartículas
500 μm	1.703 +0.687	2.006 +1.587
200 μm	2.589 +0.622	2.593 +1.913
Control	0.369 +0.430	0.724 +1.235

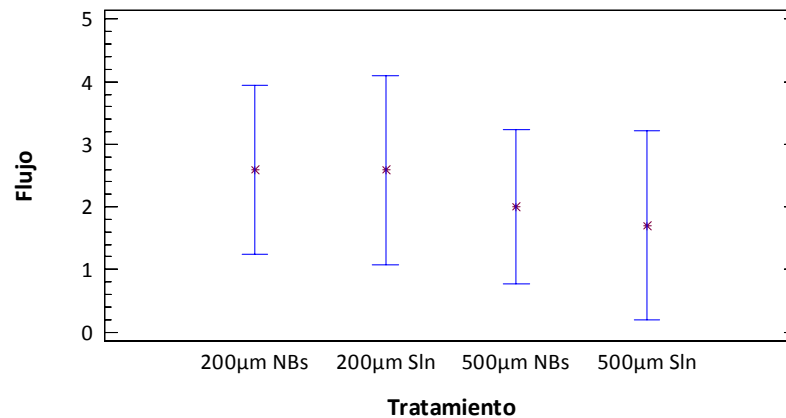


Figura 36. Medias de los flujos para los diferentes tratamientos ($\alpha=0.05$, IC de Bonferroni).

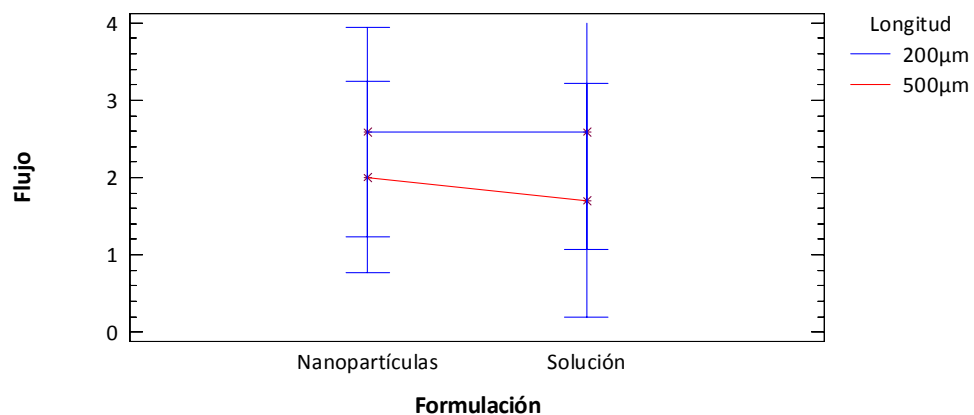


Figura 37. Análisis longitud de la aguja – formulación sobre el flujo de CS ($\alpha=0.05$, IC de Bonferroni)

Trabajos previos han reportado que las nanopartículas son capaces de penetrar la piel ^(159; 160) y además se puede inferir que el incremento de la permeación del CS a través de la piel es debido al pH; el PLGA y sus productos de degradación crean un microambiente ácido favoreciendo el estado iónico del fármaco, incrementando el gradiente de concentración en la dermis; también es importante señalar que el empleo de microagujas facilita la difusión a través de los microcanales en la piel incrementando la permeación.

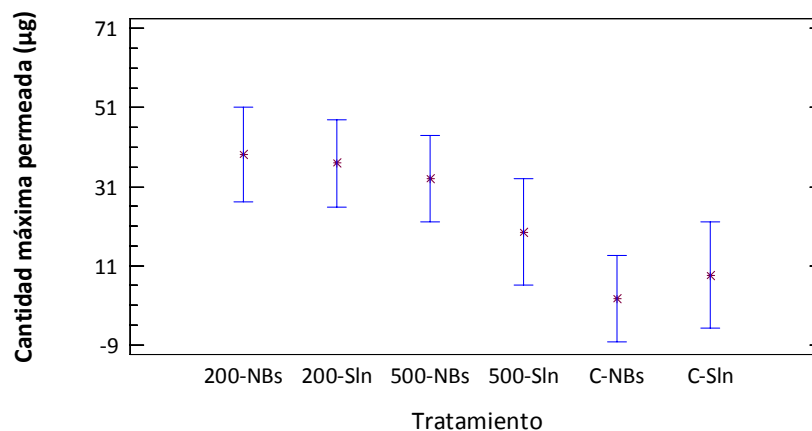


Figura 38. Cantidad máxima permeada (IC, Bonferroni)

Al observar los resultados de la cantidad total permeada (después de las 6 h de permeación), es evidente el incremento cuando la piel es pretratada con las microagujas en relación al control tanto para la solución como para las NBs (*fig. 37; tabla 32*).

Tabla 32. Cantidad máxima permeada (Q max) en 6 h

Tratamiento	Cantidad máxima permeada (µg)	
	Solución	Nanopartículas
200 µm	39.054 +7.865	39.203 +35.818
500 µm	23.983 +11.006	32.932 +21.796
Control	8.868 +4.335	2.721 +5.331

Los Kp evaluados para las dos formulaciones y distintos tratamientos (*fig. 39, tabla 33*) muestran un incremento al tratar la piel con microagujas, sin que exista diferencia entre las dos longitudes ni las dos formulaciones (Contraste de Kruskal-Wallis, $\alpha = 0.05$).

Tabla 33. Coeficientes aparentes de permeación para los diferentes tratamientos con las dos formulaciones probadas

Tratamiento	Kp (nm/h)	
	Solución	Nanopartículas
500 μm	1.419 +0.572	1.672 +1.323
200 μm	2.158 +0.519	2.161 +1.594
Control	0.307 +0.358	0.604 +1.029

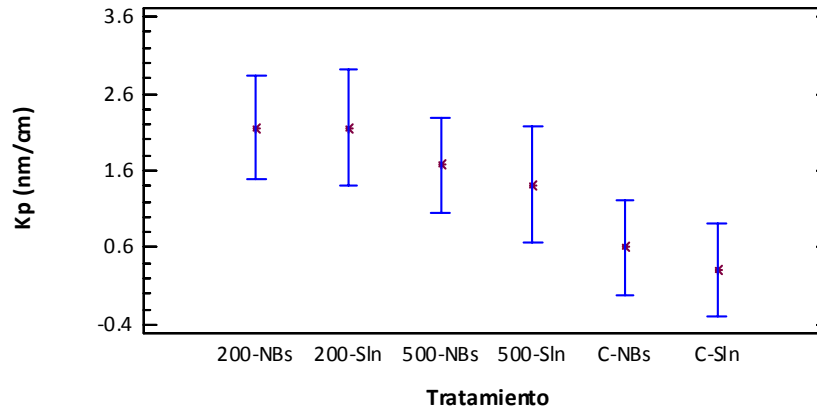


Figura 39. Medias de los coeficientes aparentes de permeación para los diferentes tratamientos ($\alpha=0.05$, IC de Bonferroni).

De igual manera fue calculado el factor de promoción con la ecuación 8 (tabla 34), para determinar el incremento en magnitud.

Tabla 34. Factores de promoción para los sistemas probados

Tratamiento	E (órdenes)		
	Solución	NBs	NBs vs Sln
500 μm	4.619	2.769	5.440
200 μm	7.022	3.580	7.034
Control	-	-	1.964

Es evidente el notable incremento que tiene el uso conjunto de las microagujas con las nanopartículas ya que aumentó hasta siete órdenes la permeación de las nanopartículas en relación a la solución; el uso de las microagujas de 200 μm aumentó la permeación aproximadamente 3.6 ordenes en relación al control en el caso de las NBs y hasta 7 ordenes en el caso de la solución.

Después de haber analizado las cinéticas de permeación en función al flujo, tiempo de latencia, coeficiente de permeación, cantidad máxima permeada y factor de promoción se evaluó la cantidad de CS retenida en la piel después de las 6 h durante las cuales se siguió la permeación (fig. 40).

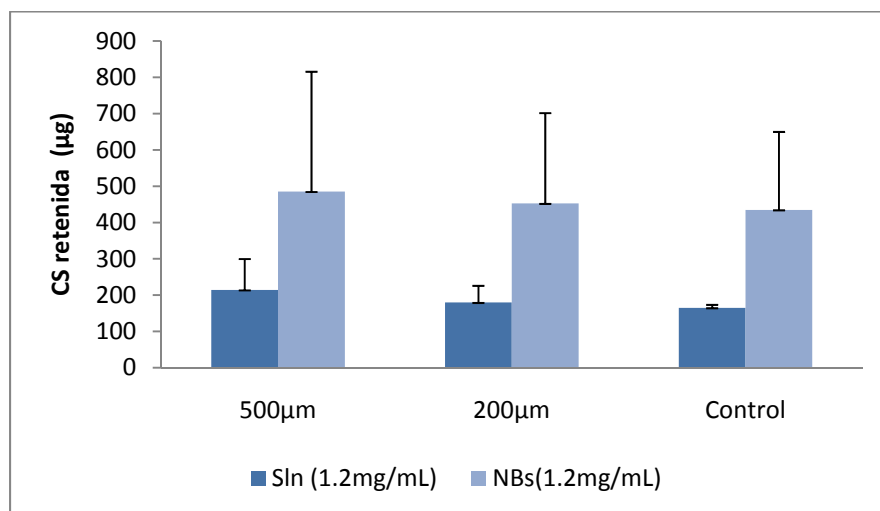


Figura 40. Cantidad de CS retenida en piel después de 6h de permeación.

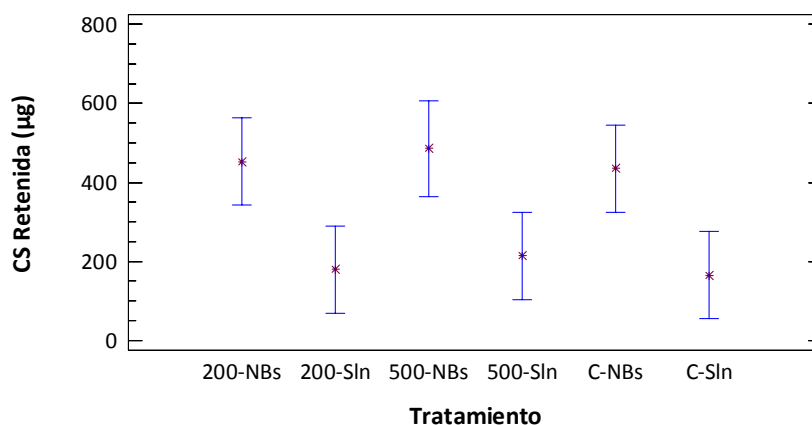
En la tabla 35 y 36 se muestran los resultados de la comparación múltiple para determinar las medias que son significativamente diferentes unas de otras. En la parte superior, se identifican 3 grupos homogéneos según la alineación del signo 'X' en la columna. Dentro de cada columna, los niveles que tienen signo 'X' forman un grupo de medias entre las cuales no hay diferencias estadísticamente significativas. El método utilizado para discernir entre las medias es el procedimiento de Duncan de comparaciones múltiples.

Tabla 35. Contraste múltiple de rango para cantidad retenida (µg) según el tratamiento (Duncan, $\alpha=0.05$)

Tratamiento	Frecuencia	Media	Grupos homogéneos
Control SIn	6	165.077	X
200 µm SIn	6	179.691	X
500 µm SIn	6	214.302	XX
Control NBs	6	434.761	XX
200 µm NBs	6	452.463	X
500 µm NBs	5	485.194	X

Tabla 36. Pares que muestran diferencias estadísticamente significativas; (Duncan $\alpha=0.05$)

Contraste	Diferencias
200 μm NBs – 200 μm SIn	272.772
200 μm NBs – 500 μm SIn	238.161
200 μm NBs – Control SIn	287.386
200 μm SIn – 500 μm NBs	-305.503
200 μm SIn – Control NBs	-255.07
500 μm NBs – 500 μm SIn	270.892
500 μm NBs – Control SIn	320.117
Control NBs – Control SIn	269.684

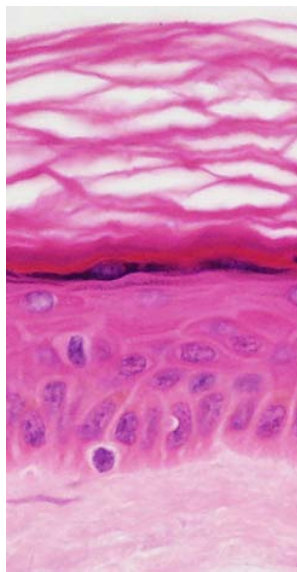
Figura 41. Gráfico de medias de CS retenido en piel (Duncan $\alpha=0.05$).

Los resultados obtenidos son sumamente interesantes, pues muestran que la cantidad retenida de CS en piel fue significativamente mayor en el caso de las nanopartículas (Duncan, $\alpha=0.05$, $P>0.05$), lo que coincide con estudios previos que reportan que las nanopartículas tienden a formar depósitos en piel⁽¹⁶⁰⁾, a partir de los cuales el fármaco puede ser cedido gradualmente. Es muy probable que esta liberación se lleve a cabo de una manera sostenida según estudios previos⁽¹⁶²⁻¹⁶⁴⁾.

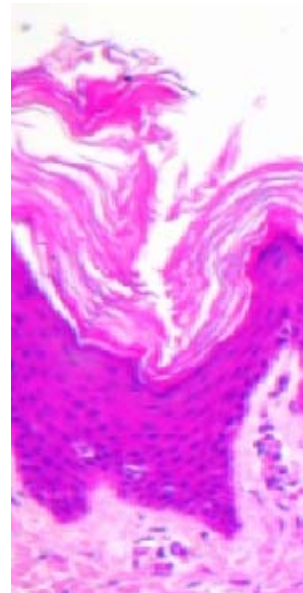
6.5 ESTUDIOS HISTOLÓGICOS Y MICROSCÓPICOS

6.5.1 MICROSCOPIA ÓPTICA DE CAMPO CLARO Y FLUORESCENCIA

Con esta técnica se visualizó la interrupción del estrato córneo (principal barrera de permeabilidad) por efecto de la inserción de las microagujas. Las muestras teñidas con Hematoxilina-Eosina mostraron al microscopio las características tintoriales típicas (el estrato córneo, los citoplasmas celulares, las fibras colágenas, elásticas y sustancia intercelular de color rosa, y los núcleos de color azul-violeta). Véase figura 42.



a⁵



B

Figura 42. Corte histológico de piel; (a) control y (b) pretratada con microagujas de 200µm (Tinción: Hematoxilina-Eosina)

Las muestras tratadas con microagujas destacan al microscopio óptico de campo claro la pérdida de continuidad del estrato córneo (*figs. 42 y 43*), en comparación con el control. Se observa que la perforación atraviesa estrato córneo (10-20 µm).

⁵ Tomada de <http://www.lab.anhb.uwa.edu.au/mb140/CorePages/Integumentary/Integum.htm>

Las invaginaciones de la piel y la suavidad del tejido amortigua la penetración de la aguja evitando que la perforación sea más profunda. El tamaño de las microagujas (200 y 500 μm) no tiene la suficiente longitud como para alcanzar las terminales nerviosas presentes en la dermis, lo que les da la característica de ser indoloras. La disrupción provocada a nivel de estrato córneo es suficiente para promover el paso del soluto o del acarreador pues finalmente permiten franquear la principal barrera.

El uso de agujas con diferentes longitudes permite localizar un soluto en alguna región específica de la piel. En el caso de agujas destinadas a la extracción de fluidos biológicos, estas tienden a ser más largas ($\approx 1\text{ mm}$) para poder alcanzar los microcapilares.

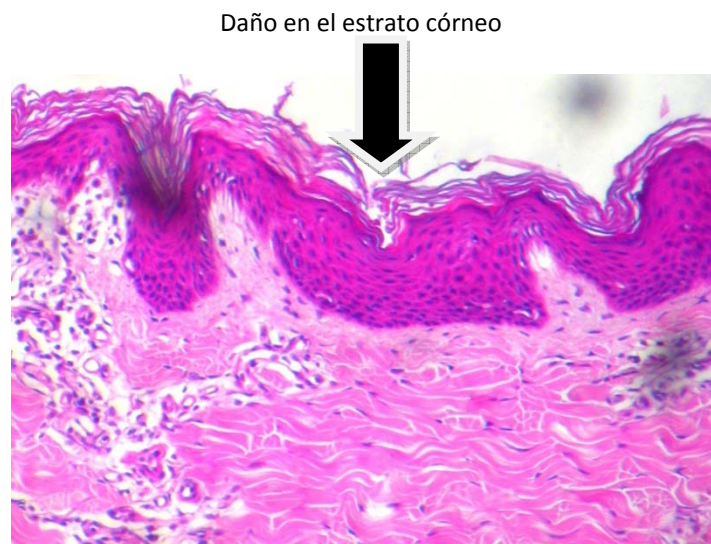


Figura 43. Señalización de daño en el estrato córneo por microagujas de 200 μm .

En las muestras correspondientes al tratamiento con azul Toluidina-Borax (1%) la piel no se tiñó como se esperaba, lo que sugiere que el colorante aplicado con las microagujas pudo haberse perdido al momento de la fijación; sin embargo, el daño al estrato córneo puede ser también visualizado mediante microscopia de contraste de fase (*fig. 44*). Para aseverar que la ruta de penetración fue por los micro-orificios se emplearon técnicas más potentes como microscopía electrónica de barrido y confocal láser.

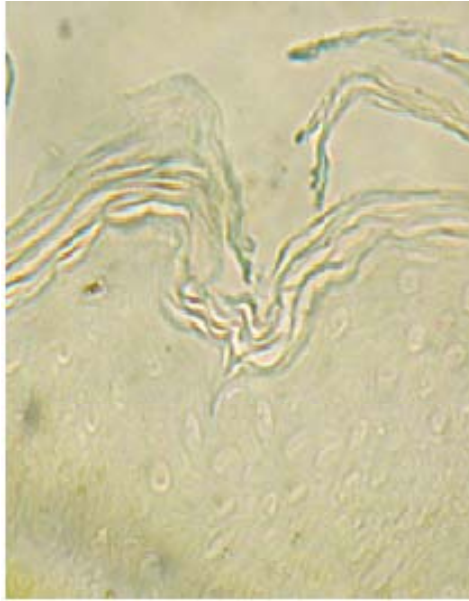


Figura 44. Tinción con azul de Toluidina-Bórax (1%) de piel pretratada con microagujas de 200 μ m.

Para el caso del estudio por microscopía de fluorescencia (*figs.* 45 y 46) se pudieron observar los daños al estrato córneo, en comparación con la imagen control (*fig.* 47).

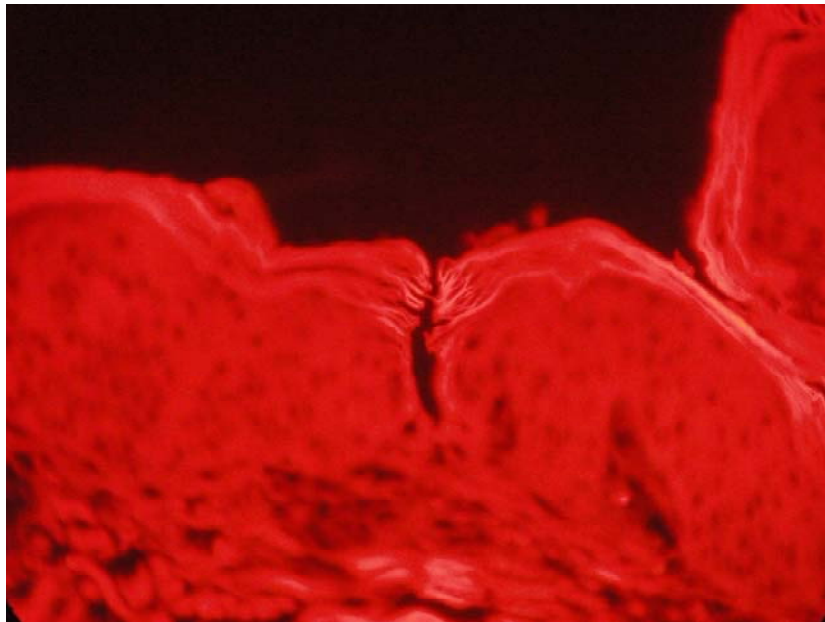


Figura 45 Imagen de micro-orificio por microscopía de fluorescencia, piel pretratada con microagujas de 500 μ m (Tinción: Naranja de Acridina al 1%)

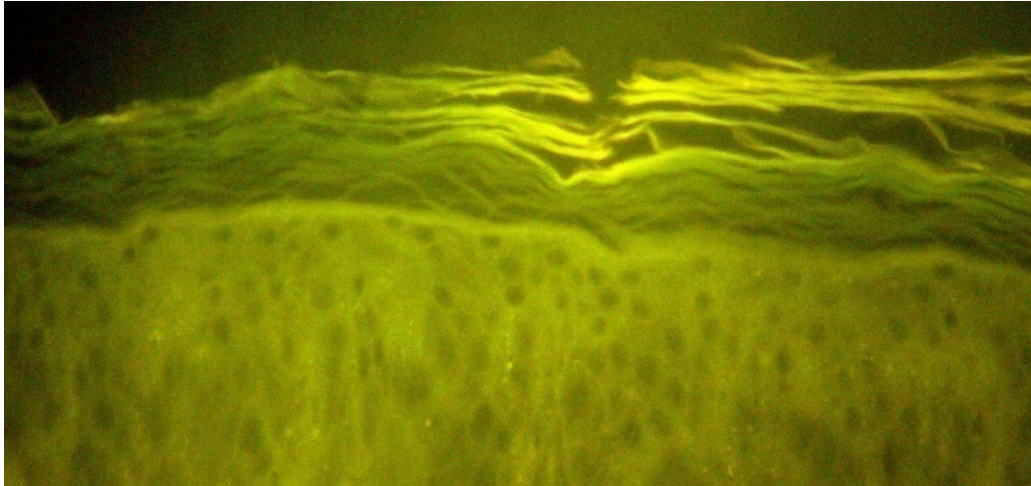


Figura 46. Imagen de micro-orificio por microscopía de fluorescencia, piel pretratada con microagujas de 200 μm (Tinción: Naranja de Acridina al 1%).

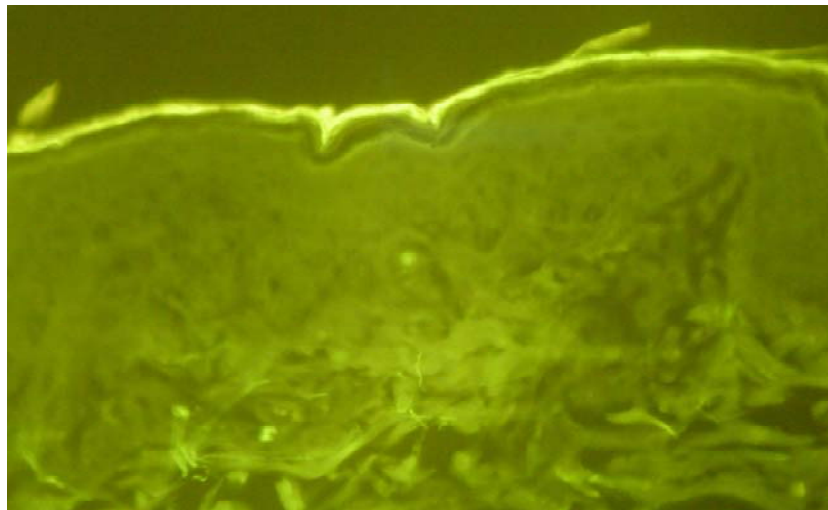


Figura 47. Imagen control (piel intacta) por microscopía de fluorescencia (Tinción: Naranja de Acridina al 1%).

6.5.2 MICROSCOPIA ELCTRÓNICA DE BARRIDO (SEM)

El estudio al microscopio electrónico confirmó la presencia de los orificios generados por las microagujas (*fig. 48*) en la superficie de la piel. Dichos orificios presentan un diámetro de aproximadamente 150 μm , lo que coincide con las especificaciones del fabricante.

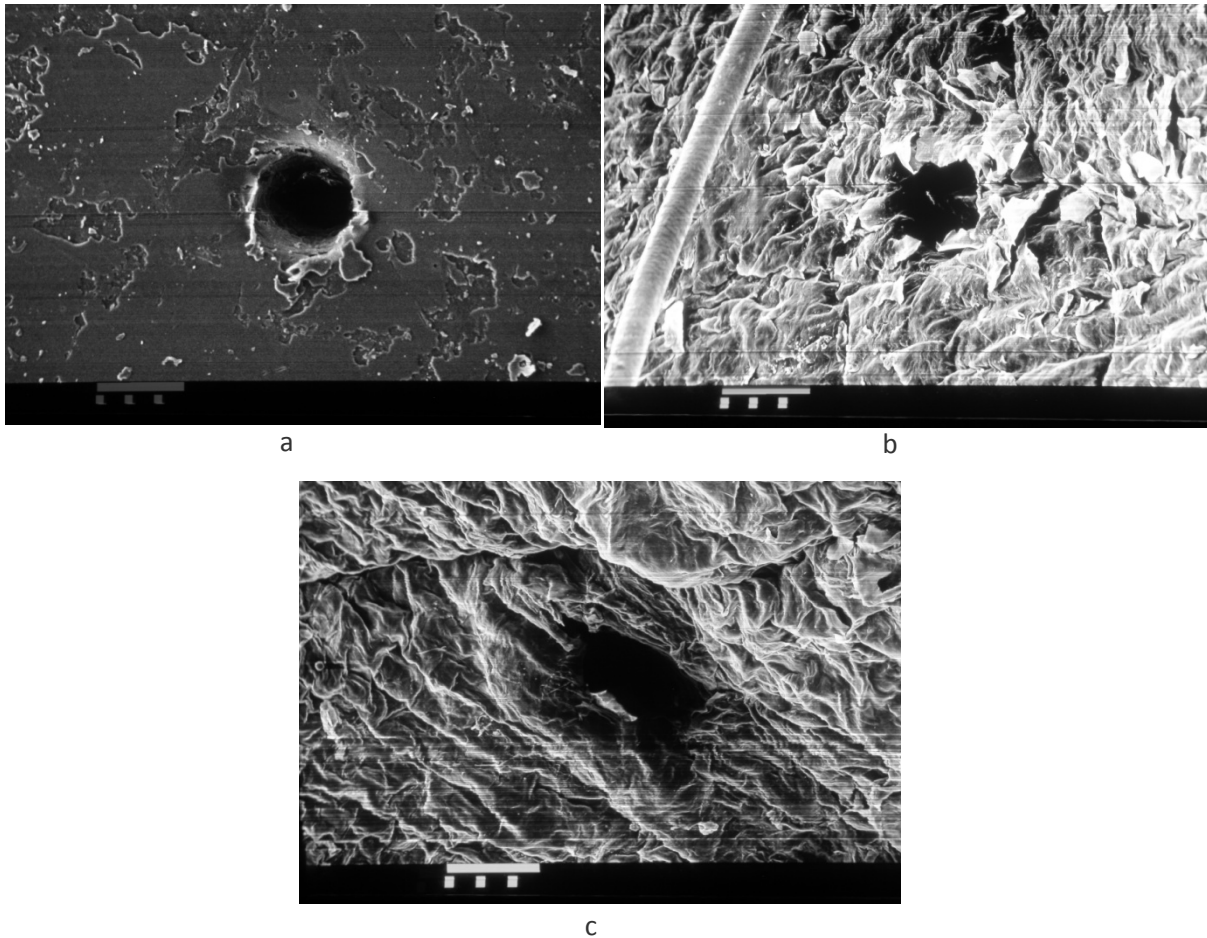
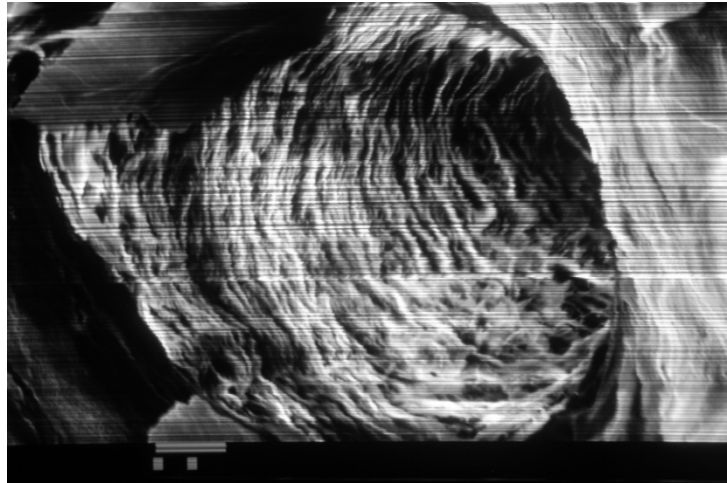


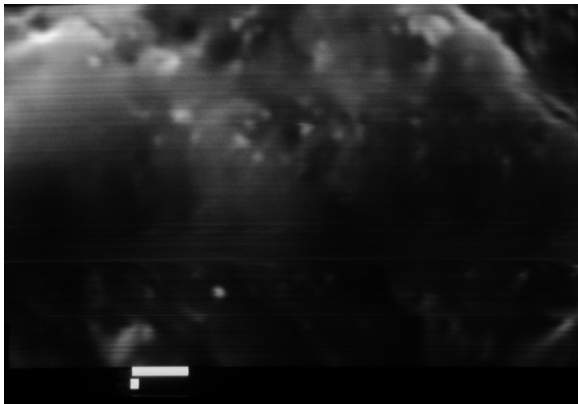
Figura 48. Micrografías del microagujero: (a) en papel carbón; (b) y (c) en piel diferente angulo, 4000x. Barra= 100 μm ⁶

⁶ Imágenes tomada por el Sr. Rodolfo Robles, Laboratorio de Microscopía Electrónica de Barrido, FES-Cuautitlán.

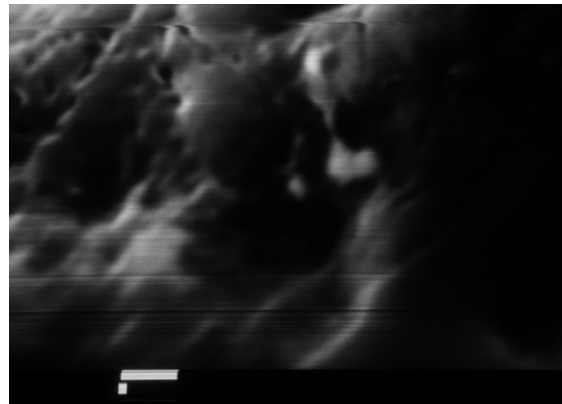
En el caso de los microcanales se decidió hacer un aumento en las paredes para comprobar la existencia de nanopartículas depositadas en estas; no se alcanza a percibir un exceso de nanopartículas debido a que la dispersión empleada estaba muy diluida para evitar que la dispersión de nanopartículas saturara los canales.



(a)



(b)



(c)

Figura 49. (a) micrografía de la cavidad del microagujero; (b) y (c) micrografías de nanopartículas dentro de las paredes de la cavidad. Barra: (a) 10 μ m; (b y c) 1 μ m.⁷

⁷ Imágenes tomadas por el Sr. Rodolfo Robles, Laboratorio de Microscopía Electrónica de Barrido, FES-Cuautitlán.

6.5.3 MICROSCOPIA CONFOCAL LÁSER

Muestras de piel intacta y tratadas con microagujas se observaron al microscopio confocal una vez que se les aplicó en la superficie una dispersión de NBs cargadas con rojo de Nilo (marcador fluorescente). Estas NBs tienen tamaños similares a las empleadas en los estudios de permeación; los tiempos de contacto con las NBs fueron 0.25, 1 y 6 h. Para este estudio una vez transcurrido el tiempo de contacto, se removió el exceso de nanopartículas de rojo de Nilo mediante la técnica de *tape stripping* (aplicando una sola cinta adhesiva), para evitar la acumulación de colorante en la superficie.

Desde los 15 min se observa que cuando hay un tratamiento con microagujas, las nanopartículas llegan por debajo del estrato córneo que tiene un grosor de aproximadamente 20 μm (*fig. 50*), habiendo una mayor cantidad de ellas en una parte intermedia del estrato córneo (6-13 μm) mientras que es casi nula la presencia de nanopartículas en el control (*fig. 52*).

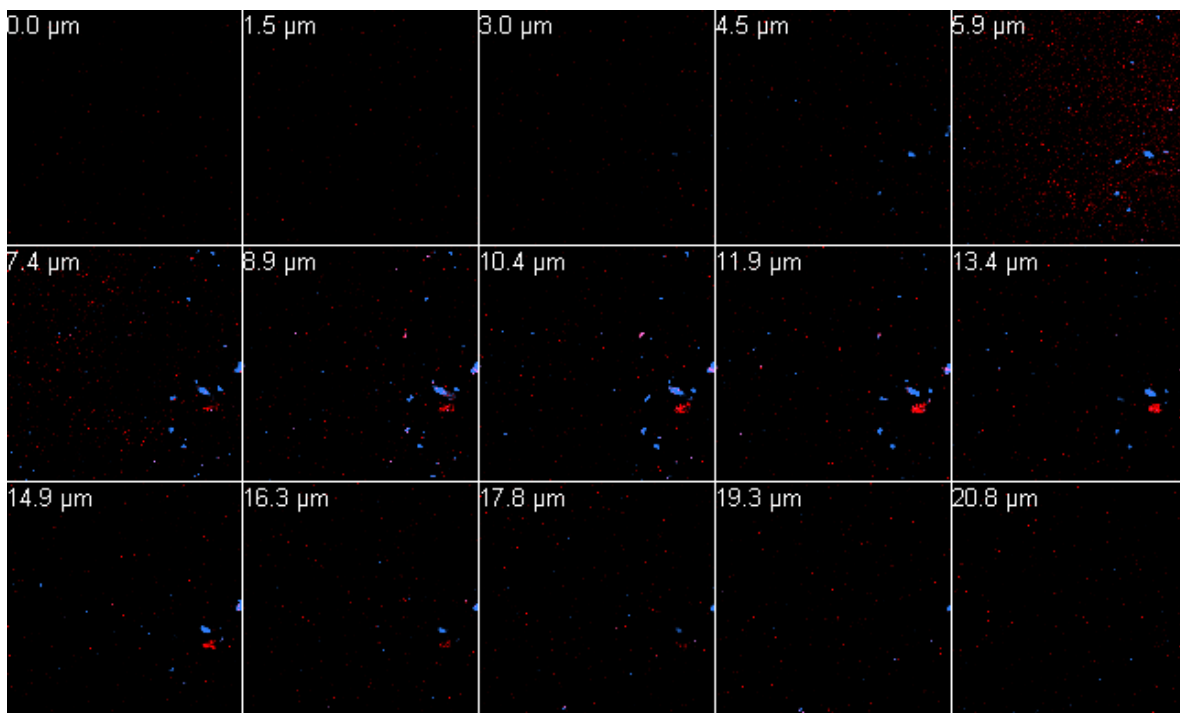


Figura 50. Secuencia de cortes a diferentes profundidades para la permeación de NBs a los 15 min; piel pretratada con microagujas de 500 μm .

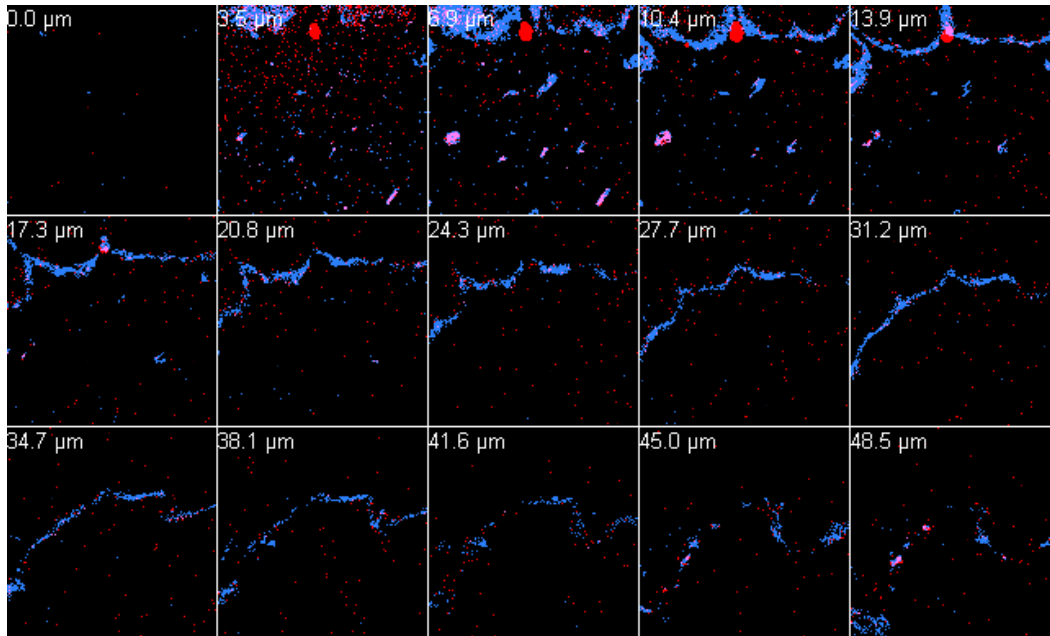


Figura 51. Secuencia de cortes a diferentes profundidades para la permeación de NBs a los 60 min; piel pretratada con microagujas de 500 μm.

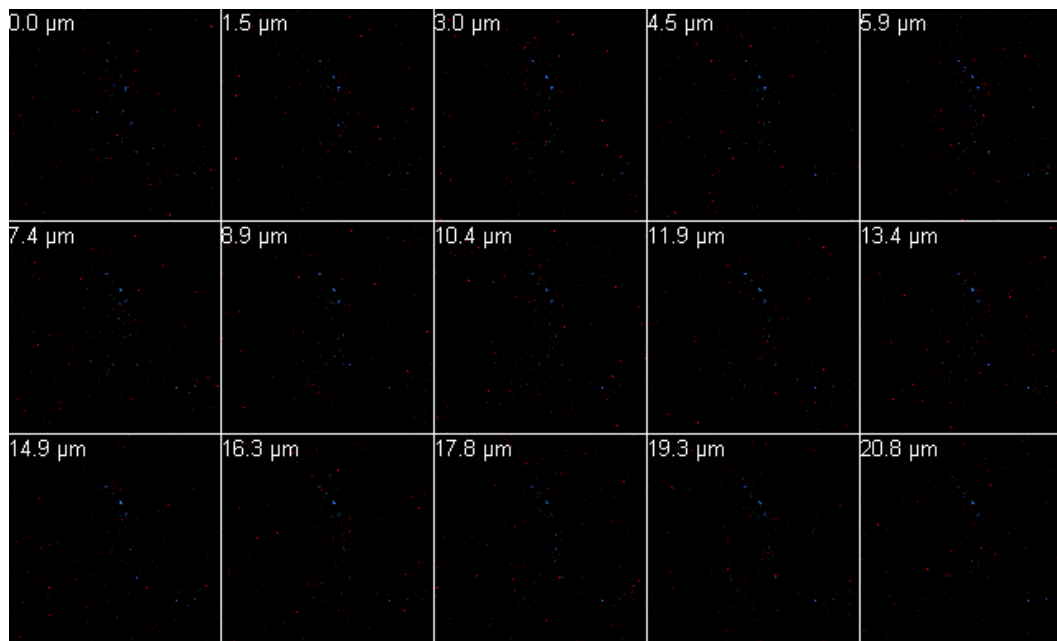


Figura 52. Secuencia de cortes a diferentes profundidades para la permeación de NBs a los 15 min; control.

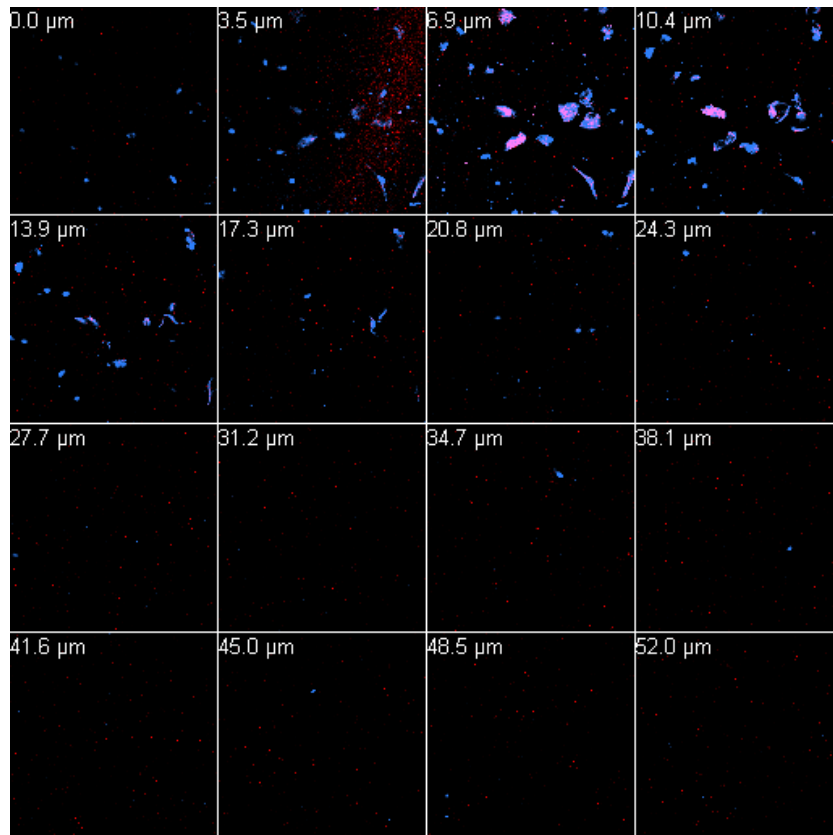


Figura 53. Secuencia de cortes a diferentes profundidades para la permeación de NBs a los 60 min; control.

Para un tiempo de contacto de 1 h se observa que el pretratamiento con microagujas permite una penetración de NBs hasta 50 μm (*fig. 51*) mientras que con la piel intacta (control) las NBs no logran penetrar.

En la figura 54 esto es más evidente, al observar los cortes transversales para el control y para la piel tratada con microagujas, donde además se nota el efecto del tiempo de contacto en la acumulación de las NBs.

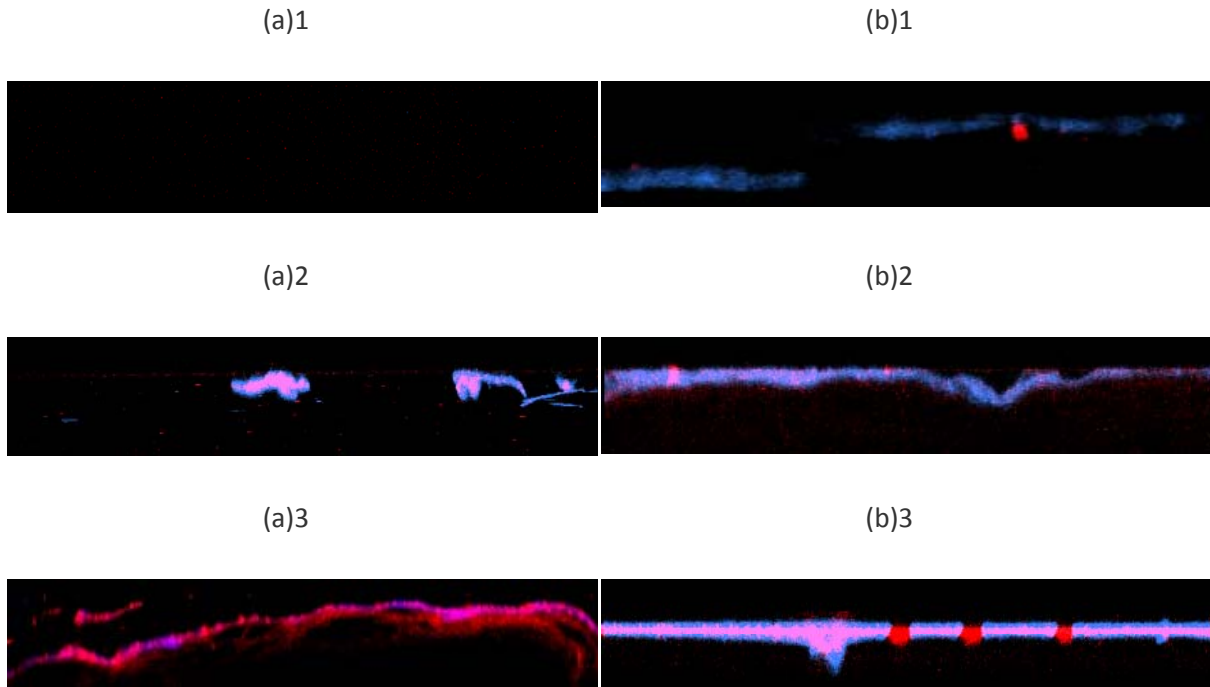


Figura 54. Cortes transversales de la piel con nanopartículas: control (a) y pretratada (b); a diferentes intervalos: (1) 0.25 h, (2) 1 h y (3) 6 h.

Las secciones ortogonales (*fig. 54*) fueron elegidas para mostrar el paso de las nanopartículas por los micro-orificios. En la figura 54 y en la 55 los folículos pilosos alcanzan una mayor profundidad, además de que se observan teñidos de azul por DAPI lo cual no ocurre con los orificios de las microagujas.

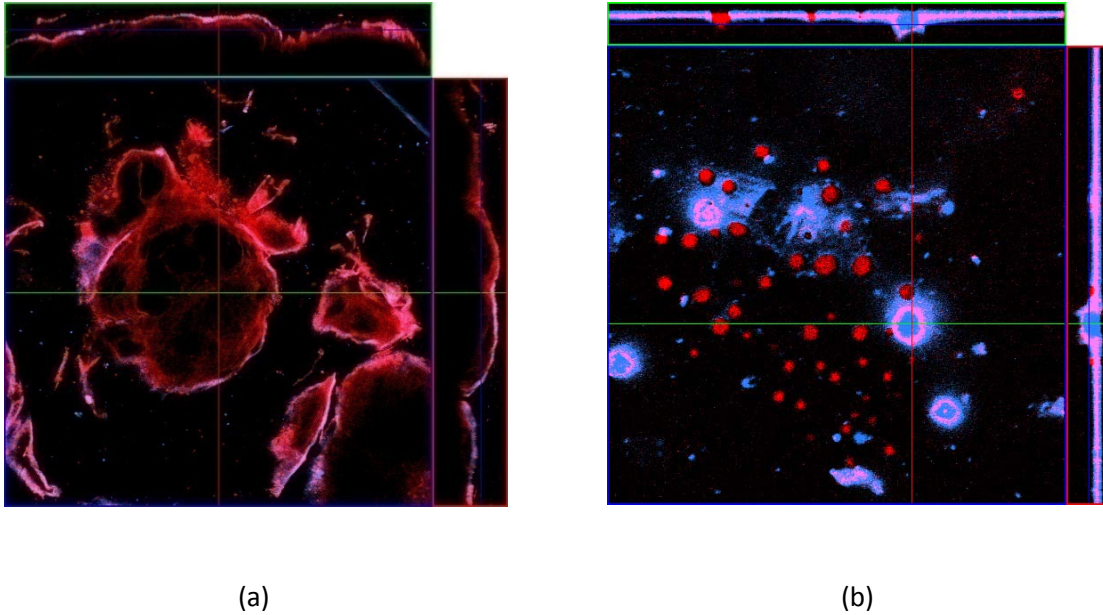


Figura 55. Vistas ortogonales de los diferentes tratamientos; (a) control y (b) microagujas.

Estudios previos ^(159; 160; 163) reportan que las nanopartículas son capaces de alcanzar la epidermis viable, formando depósitos en folículo piloso. Para corroborar esto, se observó piel en contacto con NBs y el contraste fue la autofluorescencia de la piel. Las figuras 56 y 57 muestran que las NBs en efecto se acumulan en folículo piloso, alcanzando incluso los 250 μ m. Dichos depósitos pueden servir como sistema reservorio ^(85; 163; 164).

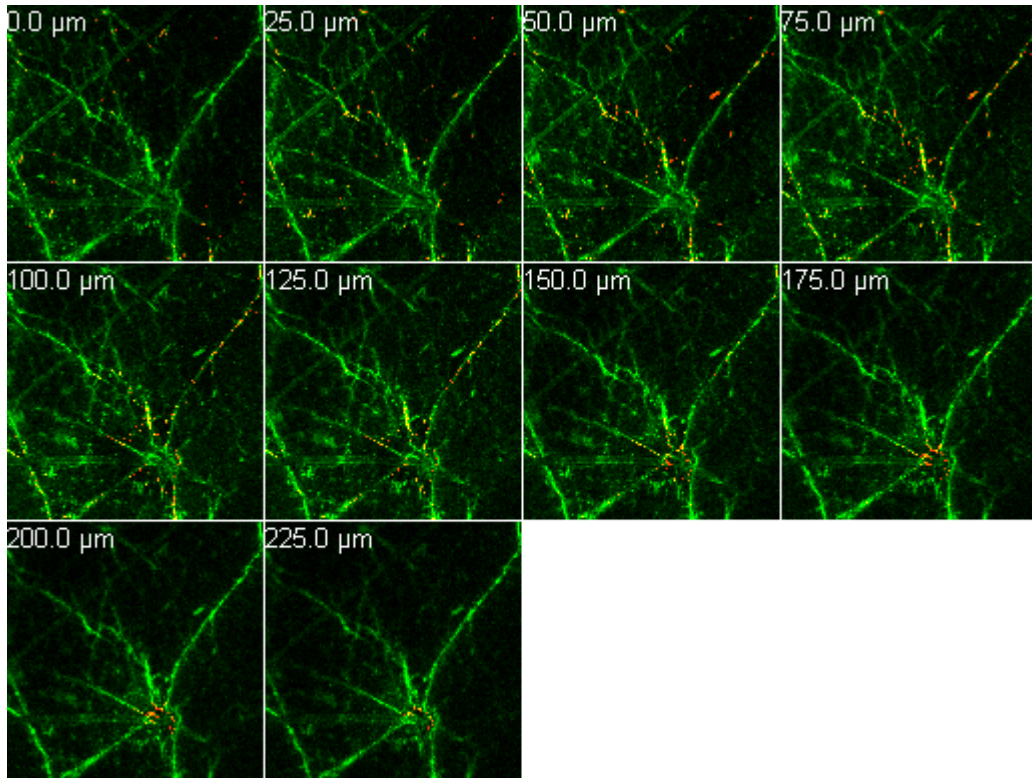


Figura 56. Secuencia de cortes a diferentes profundidades de los depósitos creados con el empleo de NBs.

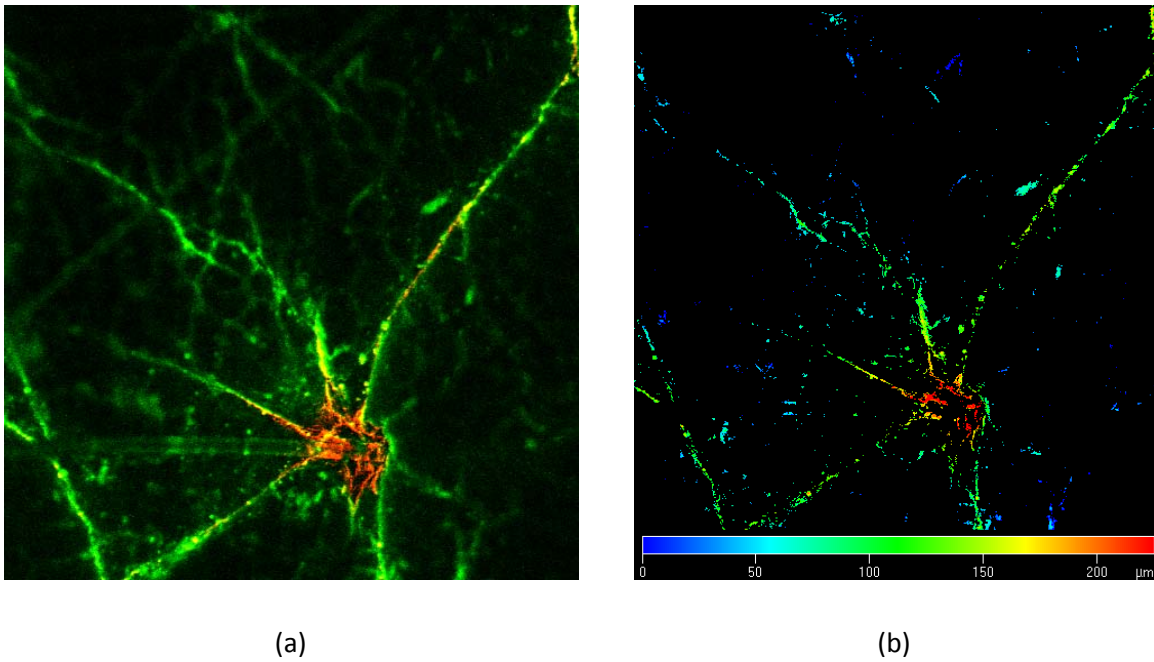


Figura 57. Depósito de NBs: (a) contraste; (b) profundidad.

La figura 58 se empleó para evidenciar la permeación de las nanopartículas (rojo), en la piel (verde) y se observa que la densidad de color rojo es mayor en el caso de la piel tratada con microagujas, lo que es debido a que al momento de romper la barrera externa de la piel (estrato córneo) facilita el paso de las nanopartículas, difundiéndose con mayor facilidad y en mayor cantidad.

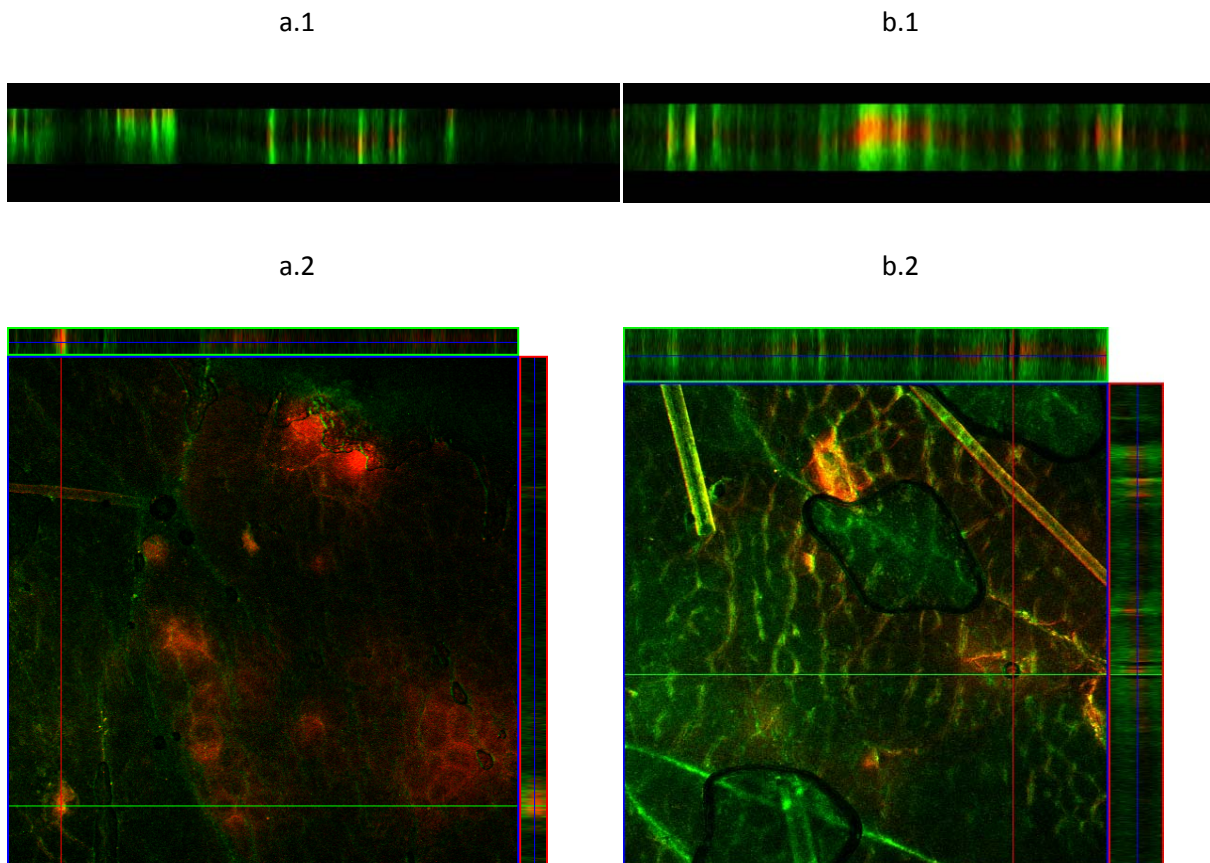


Figura 58. Cortes transversales (1) y secciones ortogonales (2); a) control; b) pretratada.

7 CONCLUSIONES

- ✓ Se logró preparar y caracterizar un sistema nanoparticulado biodegradable, el cual podría ser empleado en un sistema de administración transdérmica.
- ✓ Se optimizaron y validaron métodos analíticos por HPLC para la cuantificación del clorhidrato de sibutramina en las muestras de solución receptora, extractos de piel y para determinar el porcentaje de carga de principio activo en las nanopartículas.
- ✓ El uso de las microagujas incrementó tanto la cantidad de clorhidrato de sibutramina total permeada a través de la piel, como el flujo, tanto para la solución como para las nanopartículas, en relación al control, el cual muestra un flujo muy pobre, sin que hubiera diferencias significativas entre las dos longitudes de microagujas probadas (200 y 500 μm). Tampoco se observan diferencias entre la solución y las nanopartículas.
- ✓ El uso de microagujas no afectó el tiempo de latencia, no obstante, este fue mayor para las nanopartículas en relación a la solución.
- ✓ Aunque el cálculo de los factores de promoción reveló incrementos importantes, sobre todo para la piel pretratada con las microagujas de 200 μm , en general no hubo diferencias entre las dos longitudes probadas.
- ✓ Las cantidades retenidas en piel fueron mayores para las nanopartículas que para la solución, sin diferencias entre piel tratada con microagujas y piel intacta.
- ✓ Los estudios de microscopía permitieron visualizar la disrupción en estrato córneo provocada por las microagujas, notándose una mayor distancia de penetración para las microagujas de 500 μm .
- ✓ La penetración de las nanopartículas por los orificios generados fue evidenciada por microscopía confocal y electrónica de barrido. La microscopía confocal reveló una mayor densidad de nanopartículas en la piel pretratada con microagujas.

- ✓ Las microagujas constituyen un medio eficaz para lograr la penetración de sistemas particulados a través de la piel. Por su parte, los acarreadores coloidales como las nanopartículas ofrecen protección al activo y la posibilidad de controlar y prolongar su liberación.

- ✓ Las microagujas tienen un efecto sinérgico en el paso de las nanopartículas a través de la piel, donde la longitud de las agujas no es un factor determinante; ambas longitudes franquean el estrato córneo y la difusión a través de la piel es propia de la molécula y/o acarreador.

8 PERSPECTIVAS

- ✓ Utilizar técnicas más potentes, como la microscopía electrónica de transmisión, para evidenciar la presencia de nanopartículas en capas más profundas de la piel.
- ✓ Realizar las cinéticas de permeación, en un modelo *in vitro* por tiempos prolongados, y hacer los mismos estudios para un modelo *in vivo* analizando la relación que se guarda entre ambos modelos.
- ✓ Hacer estudios de biodisponibilidad de los metabolitos del fármaco modelo y evaluar el sitio en el que se lleva a cabo dicho metabolismo.
- ✓ Proponer una matriz que contenga el sistema nanoparticulado y las microagujas, evaluando las interacciones que existan entre la matriz, el material de la matriz y la geometría del arreglo.
- ✓ Probar arreglos con un mayor número de microagujas.
- ✓ Incorporar un segundo fármaco en el sistema nanoparticulado.
- ✓ Estudiar otras moléculas de interés terapéutico que por sus propiedades fisicoquímicas no son viables para la vía transdérmica.

9 REFERENCIAS

1. **World Health Organization.** Obesity and overweight. [En línea] septiembre de 2006. [Citado el: 15 de septiembre de 2009.] <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/index.html>.
2. **Larsson, B., et al.** *The health consequences of moderate obesity.* 1981, *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.*, págs. 97-106.
3. **Guy, R. H., et al.** *Transdermal Drug Delivery.* New York : Marcel Dekker, 2003.
4. **William, A.** *Transdermal and Topical Drug Delivery.* London : Pharmaceutical Press, 2003.
5. **Prausnitz, M. R., et al.** *Current status and future potential of transdermal drug delivery.* 2004, *Nat. Rev. Drug Discov.*, Vol. 3, págs. 114-124.
6. **Bronaugh, R. L., et al.** *Percutaneous Absorption.* New York : Marcel Dekker, 2005.
7. **Prausnitz, M. R., et al.** *Transdermal drug delivery.* 2008, *Nature Biotechnology*, Vol. 26, págs. 1261-1268.
8. **World Health Organization.** World Health Organization. *World Health Organization.* [En línea] Octubre de 2006. [Citado el: 21 de Septiembre de 2009.] [who.int/mediacentre/factsheets/fs231/en/](http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs231/en/).
9. **Glenn, G. M., et al.** *Mass vaccination: solutions in the skin.* 2006, *Curr. Top Microbiol. Immunol.*, Vol. 304, págs. 247-268.
10. **Foldvari, M., et al.** *DNA delivery for vaccination and therapeutics through the skin.* 2006, *Curr. Drug Deliv.*, Vol. 3, págs. 17-28.
11. **Mayers, S., et al.** *Fentanyl HCl patient-controlled iontophoretic transdermal system for the management of acute postoperative pain.* 2006, *Ann. Pharmacother.*, Vol. 40, págs. 2178-2186.
12. **Sieg, A., et al.** *Noninvasive and minimally invasive methods for transdermal glucose monitoring.* 2005, *Diabetes Technol. Ther.*, Vol. 7, págs. 174-197.
13. **Kogan, A., et al.** *Microemulsions as transdermal drug delivery vehicles.* 2006, *Adv. Colloid Interface Sci.*, Vols. 123-126, págs. 369-385.
14. **Touitou, E., et al.** *Vesicular carriers for enhanced delivery through the skin.* [ed.] E. Touitou y B. Barry. Boca Raton : CRC Press, 2007, págs. 255-278.
15. **Arora, A., et al.** *Micro-scale devices for transdermal drug delivery.* 2008, *Int. J. Pharm.*, Vol. 364, págs. 227-236.
16. **Barry, B.W.** *Novel mechanisms and devices to enable successful transdermal drug delivery.* 2001, *Eur. J. Pharm. Sci.*, Vol. 14, págs. 101-114.
17. **Guzek, D. B., et al.** *Transdermal drug transport and metabolism. Comparison of in vitro and in vivo results.* 1989, *Pharm. Res.*, Vol. 6, págs. 33-39.
18. **Tortora, G. J., et al.** *Principios de anatomía y fisiología.* México : Panamericana, 2006. págs. 143-161.

19. **Aiba, S., et al.** *Phenotypic and functional characteristics of in vivo activated Langerhans cells*. 1990, J. Immunol., Vol. 145, págs. 2791-2796.
20. **Ross, J. S., et al.** *Foundations of anatomy and physiology*. 3ra. Edinburgh, London : E. & S. Livingstone Ltd., 1969. pág. 474.
21. **Huidkanker**. Basocellulair carcinoom. [En línea] 13 de Septiembre de 2009. [Citado el: 25 de Septiembre de 2009.] <http://www.huidkanker.be/basocellulaircarcinoom.php>.
22. **Van De Graaf, K.M., et al.** *Concepts of Human Anatomy and Physiology*. 6ta. Dubuque, IA : Wm. C. Brown Publishers, 2002.
23. **Sherwood, L.** *Human Physiology: From Cells to Systems*. 3ra. s.l. : Wadsworth Publishing Company, 1997.
24. **Roskos, K. V., et al.** *Assessment of skin barrier function using transepidermal water loss: effect of age* . 1989, Pharm. Res., Vol. 6, págs. 949–953.
25. **Alberty, W.J., et al.** *Percutaneous absorption: in vivo experiments*. 1979, J. Pharm. Pharmacol., Vol. 31, págs. 140-147.
26. **Kneep, V. et al.** *Transdermal drug delivery: Problems and possibilities*. 1987, Crit. Rev. Ther. Drug, Vol. 4, págs. 13-37.
27. **Higuchi, T.** *Physical chemical analysis of percutaneous absorption process*. 1960, J. Soc. Cosmet. Chem., Vol. 11, págs. 85-97.
28. **Berenson, G. S., et al.** *Studies of Diffusion of Water Through Dead Human Skin: The Effect of Different Environmental States and of Chemical Alterations of the Epidermis*. Am. J. Trop. Med. Hyg., Vols. s1-31, págs. 842 - 853.
29. **Domenech Berrozpe, Jose.** *Biofarmacia y Farmacocinética: Biofarmacia*. s.l. : Sintesis, 1998. pág. 591.
30. **Karande, P., et al.,** *Design principles of chemical penetration enhancers for transdermal drug delivery*. 2005, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 102, págs. 4688–4693.
31. **Barry, B. W.** *Mode of action of penetration enhancers in human skin*. 1987, J. Control. Release, Vol. 6, págs. 85-97.
32. **Barry, B.W.** *Lipid-Protein-Partitioning theory of skin penetration enhancement*. 1991, Journal of Controlled Release, Vol. 15, págs. 237-248.
33. **Williams, A. C., et al.** *Penetration enhancers*. 2004, Adv. Drug Deliv. Rev., Vol. 56, págs. 603-618.
34. **Barry, B.W.** *Breaching the skin's barrier to drugs*. 2004, Nature Biotechnology, Vol. 22, págs. 165-167.
35. **R., Daniels.** Skin Care Forum. [En línea] Agosto de 2004. [Citado el: 30 de Septiembre de 2009.] http://www.scf-online.com/english/37_e/skinpenetration37_e.htm.
36. **Kumetrix.** Kumetrix. [En línea] [Citado el: 5 de octubre de 2009.] <http://www.kumetrix.com/http/kumetrix.com/technology.html>.

37. **Prausnitz, M. R.** *Microneedles for transdermal drug delivery*. 2003, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, Vol. 56, pp. 581-587.
38. **Reaumé, S. E.** *The Use of Hydrofluoric Acid in Making Glass Microneedles*. 3023, 1952, *Science*, Vol. 116, pág. 641.
39. **Garoutte, B., et al.** *Tungsten microneedles: a simple method of production*. 1972, *Electroen. Clin. Neuro.*, Vol. 33, págs. 425-426.
40. **Gerstel, M. S., et al.** *Drug delivery device*. Patente 3964482 US, 1976.
41. **Henry, S., et al.** *Microfabricated Microneedles: A Novel Approach to Transdermal Drug Delivery*. 1998, *J. Pharm. Sci.*, Vol. 87, págs. 922-925.
42. **Georgia Institute Technology.** *Georgia Research Tech News*. [En línea] Noviembre de 17 de 2003. [Citado el: 21 de Septiembre de 2009.] <http://www.gtresearchnews.gatech.edu/newsrelease/needlespnas.htm>.
43. **Wilke, N., et al.** *Process optimization and characterization of silicon microneedles fabricated by wet etch technology*. 7, 2005, *Microelectr. J.*, Vol. 36, págs. 650-656.
44. **Hashmi, S., et al.** *Genetic transformation of nematodes using arrays of micromechanical piercing structures*. 1995, *BioTechniques*, Vol. 19, págs. 766-770.
45. **Park, J. H., et al.** *Biodegradable polymer microneedles: Fabrication, mechanics and transdermal drug delivery*. 1, 2005, *J. Control. Release*, Vol. 104, págs. 51-66.
46. **Sivamani, R.K., et al.** *Clinical microneedle injection of methyl nicotinate: stratum corneum penetration*. 2005, *Skin. Res. Technol.*, Vol. 11, págs. 152-156.
47. **Xie, Y., et al.** *Controlled transdermal delivery of model drug compounds by MEMS microneedle array*. 2005, *Nanomedicine: NBM*, Vol. 1, págs. 184-190.
48. **Oh, J.H., et al.** *Influence of the delivery systems using a microneedle array on the permeation of a hydrophilic molecule, calcein*. 2008, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, Vol. 69, págs. 1040-1045.
49. **Cormier, M., et al.** *Transdermal delivery of desmopressin using a coated microneedle array patch system*, 2004, *J. Control. Release*, Vol. 97, págs. 503-511.
50. **Widera, G., et al.** *Effect of delivery parameters on immunization to ovalbumin following intracutaneous administration by a coated microneedle array patch system*. 2006, *Vaccine*, Vol. 24, pág. 16.
51. **Wu, X.M., et al.** *Echographic measurement of skin thickness in adults by high frequency ultrasound to assess the appropriate microneedle length for intradermal delivery of vaccines*. 2006, *Int. J. Pharm.*, Vol. 316, págs. 102-108.
52. **Ito, Y., et al.** *Feasibility of microneedles for percutaneous absorption of insulin*. 2006, *Eur. J. Pharm. Sci.*, Vol. 29, págs. 82-88.
53. **Verbaan, F.J., et al.** *Assembled microneedle arrays enhance the transport of compounds varying over a large range of molecular weight across human dermatomed skin*. 2007, *J. Control. Release*, Vol. 117, págs. 238-245.

54. **Gill, H.S., et al.** *Coated microneedles for transdermal delivery.* 2007, *J. Control. Release*, Vol. 117, págs. 227-237.
55. **Lee, J.W., et al.** *Dissolving microneedles for transdermal drug delivery.* 2008, *Biomaterials*, Vol. 29, págs. 2113-2124.
56. **Verbaan, F.J., et al.** *Improved piercing of microneedle arrays in dermatomed human skin by an impact insertion method.* 2008, *J. Control. Release*, Vol. 128, págs. 80-88.
57. **Donnelly, R.F., et al.** *Microneedle-mediated intradermal delivery of 5-aminolevulinic acid: Potential for enhanced topical photodynamic therapy.* 2008, *J. Control. Release*, Vol. 129, págs. 154-162.
58. **Guohua, L., et al.** *In vitro transdermal delivery of therapeutic antibodies using maltose microneedles.* 2009, *Int. J. Pharm.*, Vol. 388, págs. 109-115.
59. **Han, M., et al.** *Improvement in antigen-delivery using fabrication of a grooves-embedded microneedle array.* 2009, *Sens. Actuators, B.*, Vol. 137, págs. 274-280.
60. **Ding, Z., et al.** *Microneedle arrays for the transcutaneous immunization of diphtheria and influenza in BALB/c mice.* 2009, *J. Control. Release*, Vol. 136, págs. 71-78.
61. **Chen, X., et al.** *Dry-coated microprojection array patches for targeted delivery of immunotherapeutics to the skin.* 2009, *J. Control. Release*, Vol. 139, págs. 212-220 .
62. **Kim, Y.C., et al.** *Improved influenza vaccination in the skin using vaccine coated microneedles.* 2009, *Vaccine*, Vol. 27, págs. 6932-6938.
63. **Vemulapalli, V., et al.** *Synergistic effect of iontophoresis and soluble microneedles for transdermal delivery of methotrexate.* 2008, *J. Pharm. Pharmacol.*, Vol. 60, págs. 27-33.
64. **Wu, X. M., et al.** *Enhancement of skin permeation of high molecular compounds by a combination of microneedle pretreatment and iontophoresis.* 2007, *J. Control. Release*, Vol. 118, págs. 189-195.
65. **Lin, W.Q., et al.** *Transdermal Delivery of Antisense Oligonucleotides with Microprojection Patch (Macroflux®) Technology.* 2001, *Pharm. Res.*, Vol. 18, págs. 1789-1793.
66. **Katikaneni, S., et al.** *Molecular charge mediated transport of a 13 kD protein across microporated skin.* 2009, *Int. J. Pharm.*, Vol. 378, págs. 93-100.
67. **Vemulapalli, V., y otros.** AAPS 2007 Abstracts. [En línea] 2007. [Citado el: 1 de octubre de 2009.] <http://www.transportpharma.com/pdf/abstracts/aaps-2007-peptide-microneedles-mercer-banga.pdf>.
68. **Lanke, S.S.S. , et al.** *Enhanced transdermal delivery of low molecular weight heparin by barrier perturbation.* 2009, *Int. J. Pharm.*, Vol. 365, págs. 26-33.
69. **Chen, H., et al.** *Iontophoresis-driven penetration of nanovesicles through microneedle-induced skin microchannels for enhancing transdermal delivery of insulin.* 2009, *J. Control. Release*, Vol. 139, págs. 63-72.
70. **Wilke, N., et al.** *Silicon microneedle electrode array with temperature monitoring for electroporation.* 2005, *Sensors and Actuators A: Physical*, págs. 319-325.

71. **Hooper, J.W., et al.** *Smallpox DNA vaccine delivered by novel skin electroporation device protects mice against intranasal poxvirus challenge.* 2007, *Vaccine*, Vol. 25, págs. 1814–1820.
72. **Qiu, Y., et al.** *Enhancement of skin permeation of docetaxel: A novel approach combining microneedle and elastic liposomes.* 2008, *J. Control. Release*, Vol. 129, págs. 144-150.
73. **Badran, M.M., et al.** *Skin penetration enhancement by a microneedle device (Dermaroller®) in vitro: Dependency on needle size and applied formulation.* 2009, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, Vol. 36, págs. 511-523.
74. **McAllister, D.V., et al.** *Microfabricated needles for transdermal delivery of macromolecules and nanoparticles- Fabrication methods and transport studies.* 2003, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, Vol. 100, págs. 13755–13760.
75. **Chabri, F., et al.** *Microfabricated silicon microneedles for nonviral cutaneous gene delivery.* 2004, *Brit. J. Dermatol.*, Vol. 150, págs. 869-877.
76. **Coulman, S.A., et al.** *Minimally invasive cutaneous delivery of macromolecules and plasmid DNA via microneedles.* 2006, *Curr. Drug Deliv.*, Vol. 2, págs. 65-75.
77. **Pearton, M., et al.** *Gene delivery to the epidermal cells of human skin explants using microfabricated microneedles and hydrogel formulations.* 2007, *Pharm. Res.* 2007, Vol. 25, pág. 407.
78. **Jiang, J., et al.** *Intrascleral Drug Delivery to the Eye Using Hollow Microneedles.* 2009, *Pharm. Res.*, Vol. 26, págs. 395-403.
79. **Park, J.H., et al.** *Polymer microneedles for controlled-release drug delivery.* 2006, *Pharm. Res.*, Vol. 23, págs. 1008-1019.
80. **Moussaoui, N., et al.** *Marinosomes, marine lipid-based liposomes: physical characterization and potential applicatio in cosmetics.* 2002, *Int. J. Pharm*, Vol. 242, págs. 361-385.
81. **Barry, B. W.** *Novel mechanisms and devices to enable successful transdermal drug delivery.* 2001, *Eur. J. Pharm Sci.*, Vol. 14, págs. 101-114.
82. **Barry, B.W.** *Is trandermal drug delivery research still important today?* 2001, *Drug Discovery Today*, Vol. 6, págs. 967-971.
83. **zur Muhlen, A., et al.** *Drug release and release mechanism of prednisolone loaded Solid Lipid Nanoparticles.* 1998, *Pharmazie*, Vol. 53, págs. 552-555.
84. **zur Muhlen, A., et al.** *Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery - drug release and release mechanism.* 1998, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, Vol. 45, págs. 149-155.
85. **de Jalón, E. G., et al.** *Topical application of acyclovir-loaded microparticles: quantification of the drug in porcine skin layers.* 2001, *J. Control. Release*, Vol. 75, págs. 191-197.
86. **Vollmer, U., et al.** *Hydroxypropyl -cyclodextrin in transdermal absorption in vivo rats.* [ed.] Hedges AR. Paris : Santé, 1992. 6th International Symposium on Cyclodextrins.
87. **Carlotti, M.E., et al.** *Vitamin A palmitate photostability and stability over time.* 2004, *J. Cosmet. Sci.*, Vol. 55, págs. 233-252.

88. **Dingler, A., et al.** *Solid lipid nanoparticles (SLN/Lipopearls) as a pharmaceutical and cosmetic carrier for the application of vitamin E in dermal products.* 1999, J. Microencapsul., Vol. 16, págs. 751-767.
89. **Perugini, P., et al.** *Study of glycolic acid delivery by liposomes and microspheres.*,2000, Int. J. Pharm., Vol. 196, págs. 51-61.
90. **Wissing, S.A., et al.** *The influence of solid lipid nanoparticles on skin hydration and viscoelasticity- in vivo study.* 2003, Eur. J. Pharm. Biopharm., Vol. 56, págs. 67-72.
91. **Jenning, V., et al.** *Vitamin A loaded solid lipid nanoparticles for topical use: occlusive properties and drug targeting to the upper skin.* 2000, Eur. J Pharm. Biopharm., Vol. 49, págs. 211-218.
92. **Wissing, S. A., et al.** *Solid lipid nanoparticles (SLN): a novel carrier for UV blockers.* 2001, Pharmazie, Vol. 56, págs. 783-786.
93. **Bagham, A. D., et al.** *The action of steroids and streptolysin S on the permeability of phospholipic structures to cations.* 1965, J. Mol. Biol., Vol. 13, pág. 138.
94. **Magdassi, S., et al.** *Liposomes.* [aut. libro] K. Stanzl. *Novel cosmetic delivery systems.* New York : Marcel Dekker Inc., 1999, págs. 233-265.
95. **Yarosh, D., et al.** *Localization of liposomas containing a DNA repair enzyme in murine skin.* 1994, J. Invest. Dermatol., Vol. 103, págs. 461-469.
96. **Yarosh, D., et al.** *Enhancement of DNA repair of UV damage in mouse and human skin by liposomes containing a DNA repair enzyme.* 1990, J. Soc. Cosmet. Chem., Vol. 41, págs. 85-92.
97. **Kadir, R. , et al.** *α -bisabolol, a safe penetration enhancer for dermal and transdermal therapeutics.* 1991, Int. J. Pharm., Vol. 70, págs. 87-94.
98. **Imbertz, D., et al.** *Influence of liposomal encapsulation on the penetration of retinoic acid through human skin in vitro.* 1994, J. Soc. Cosmet. Chem., Vol. 45, págs. 119-134.
99. **Reimer, J., et al.** *An innovative topical drug formulation for wound healing and infection treatment: in vitro and in vivo, investigations of a povidone-iodine liposome hydrogel.* 2000, Dermatology, Vol. 201, págs. 235-241.
100. **Morreale, M., et al.** *Synergistic effect of glycolic acid on the antioxidant activity of alpha-tocopherol and melatonin in lipid bilayers and in human skin homogenates.* 1997, Biochem. Mol. Biol. Int., Vol. 42, págs. 1093-1102.
101. **Villiers, A.** *Sur La Fermentation De La Fecule Par L'action Du Ferment Butyrique.* 1891, C R Hebd. Seances Acad. Sci., Vol. 112, págs. 536-538.
102. **Magdassi, S., et al.** *Cyclodextrins in cosmetics.* [aut. libro] D. Duchêne, D. Wouessidjewe y M. C. Poelman. *Novel cosmetic delivery systems.* New York : Marcel Dekker Inc., 1999, págs. 275-294.
103. **Lin, H. S. , et al.** *2-hydroxypropyl-beta-cyclodextrin increases aqueous solubility and photostability of all-trans-retinoic acid.* 2002, J. Clin. Pharm. Ther., Vol. 25, págs. 265-269.

104. **Anadolu, R. Y., et al.** *Improved efficacy and tolerability of retinoic acid in acne vulgaris: a new topical formulation with cyclodextrin complex psi.* 2004, J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol., Vol. 18, págs. 416-421.
105. **Felton, L. A., et al.** *Influence of hydroxypropyl-beta-cyclodextrin on the transdermal permeation and skin accumulation of oxybenzone.* 2002, Drug Dev. Ind. Pharm., Vol. 28, págs. 1117-1124.
106. **Citernes, U., et al.** *Cyclodextrins in functional dermocosmetics.* 1995, Cosmet. Toiletries, Vol. 3, págs. 110.
107. **Greenberg-Ofrath, N., et al.** *Cyclodextrins as carriers of cholesterol and fatty acids in cultivation of mycoplasmas.* 1993, Appl. Environ. Microbiol., Vol. 59, págs. 547-551.
108. **Gilles, E. R., et al.** *Dendrimers and dendritic polymers in drug delivery.* 2005, Drug Discov. Today, Vol. 10, págs. 35-43.
109. **Gupta, U., et al.** *A review of in vitro-vivo investigations on dendrimers: the novel nanoscopic drug carriers.* 2006, Nanomedicine: NBM, Vol. 2, págs. 66-73.
110. **Cloninger, M. J., et al.** *Biological applications of dendrimers.* 2002, Curr. Opin. Chem. Biol., Vol. 6, págs. 742-748.
111. **Wolinsky, J. B., et al.** *Therapeutic and diagnostic applications of dendrimers for cancer treatment.* 2008, Adv. Drug Deliv., Vol. 60, págs. 1037-1055.
112. **Najlah, M., et al.** *In vitro evaluation of dendrimer prodrug for oral drug delivery.* 2007, Int. J. Pharm., Vol. 336, págs. 183-190.
113. **Najlah, M., et al.** *Crossing cellular barriers using dendrimer nanotechnologies.* 2006, Curr. Opin. Pharm., Vol. 6, págs. 522-527.
114. **Freiberg, S., et al.** *Polymer microspheres for controlled drug release.* 2004, Int. J. Pharm., Vol. 282, págs. 1-18.
115. **Wester, R. C., et al.** *Controlled release of benzoyl peroxide from a porous microsphere polymeric system can reduce topical irritancy.* 1991, J. Am. Acad. Dermatol., Vol. 24, págs. 720-726.
116. **Rolland, A., et al.** *Site-specific drug delivery to pilosebaceous structures using polymeric microspheres.* 1993, Pharm. Res., Vol. 10, págs. 1738-1744.
117. **Rosler, B., et al.** *Effect of collagen microparticles on the stability of retinol and its absorption into hairless mouse skin in vitro.* 1994, Pharmazie, Vol. 49, págs. 175-179.
118. **Swatschek, D., et al.** *Microparticles derived from marine sponge collagen (SCMPs): preparation, characterization and suitability for dermal delivery of all-trans retinol.* s.l. : 54, 2002, Eur. J. Pharm. Biopharm., Vol. 2, págs. 125-133.
119. **V., Parison.** *Delivery by Nylon Particles.* [aut. libro] E. Touitou. Magdassi. *Novel Cosmetic Delivery Systems.* New York : Marcel Dekker Inc., 1999, págs. 333-351.
120. **Jimenez, M. M., et al.** *Influence of encapsulation on the in vitro percutaneous absorption of octyl methoxycinnamate.* 2004, Int J Pharm., Vol. 272, págs. 45-55.

121. **Boelcke, U., et al.** *Gemna*. Patente 1940105 Germany, 1971.
122. **Norbury, R. J., et al.** Patente 5013473 U.S, 1991.
123. **Westesen, K., et al.** *Novel colloidal drug delivery systems*. 2001, *J. Pharm. Sci. Technol.*, Vol. 55, págs. 240-247.
124. **Brigger, I., et al.** *Nanoparticles in cancer therapy and diagnosis*. 2002, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, Vol. 54, págs. 631-651.
125. **Chorny, M., et al.** *Lipophilic drug loaded nanospheres prepared by nanoprecipitation: effect of formulation variables on size, drug recovery and release kinetics*. 2002, *J. Control. Rel.*, Vol. 83, pp. 389-400.
126. **Rios, M.** *Albumin-bound nanoparticle drug nabs FDA approval*. 2005, *Pharm. Technol.*, Vol. 29, pág. 17.
127. **BioAlliance Pharma S.A.** *BioAlliance Pharma présente les résultats de sa nouvelle formulation orale de nanoparticules d'irinotecan dans le cancer colorectal à l'occasion du 100ème Congrès annuel de l'American Association for Cancer Research (AACR)*. Paris : s.n., 2009. pág. 1, Communiqués de Presse.
128. **Labhsetwar, V.** *Nanoparticles for drug delivery*. 1997, *Pharm. News*, Vol. 4, págs. 28-31.
129. **Gupta, R.B.** *Nanoparticle Technology for Drug Delivery*. [ed.] R. B. Gupta y B. U. Kompella. s.l. : Taylor & Francis Group, 2006. págs. 1-18. Vol. 159.
130. **Hans, L. M., et al.** *Biodegradable nanoparticles for drug delivery and targeting*. 2002, *Curr. Opin. Solid State Matter Sci.*, Vol. 6, págs. 319-327.
131. **Astete, C. E., et al.** *Synthesis and characterization of PLGA nanoparticles*. 2006, *J. Biomater. Sci. Polymer Edn*, Vol. 17, págs. 247-289.
132. **Anderson, et al.** *Biodegradation and biocompatibility of PLA and PLGA microspheres*. 1997, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, Vol. 28, pp. 5-24.
133. **Müller, R., et al.** *Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery - a review of the state of the art*. 2000, *Eur. J Pharm. Biopharm.*, Vol. 50, págs. 161-177.
134. **Müller, M. H., et al.** *The next generation after the liposomes: solid lipid nanoparticles (SLNTM, LipopearlTM) as dermal carrier in cosmetics*. 1998, *Eurocosmetics*, Vol. 7, págs. 19-26.
135. **Wissing, S.A., et al.**, *A novel sunscreen system based on tocopherol acetate incorporated into solid lipid nanoparticles (SLN)*. 2001, *Int. J. Cosm. Sci.*, Vol. 23, págs. 233-243.
136. **Fessi, H., y otros.** *Procédé de préparation de systèmes colloïdaux d'une substance sous forme de nanoparticules*. 140 245 1987.
137. **Sjostrom, B., et al.** *Preparation of submicron drug particles in lecithin-stabilized o/w emulsions I. Model studies of the precipitation of cholesteryl acetate*. 1992, *Int. J. Pharm.*, Vol. 88, págs. 53-62.
138. **Siekman, B., et al.** *Submicron-sized parenteral carrier systems based on solid lipids*. 1992, *Pharm. Pharmacol. Lett.*, Vol. 1, págs. 123-126.

139. **Schwarz, C., et al.** *Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery I. Production, characterization and sterilization 1994.* 1994, J. Cont. Rel., Vol. 30, págs. 83-96.
140. **Gasco, M. R.** *Method for producing solid lipid microspheres having a narrow size distribution.* 5 250 236 U.S., 1993.
141. **Cavalli, R., et al.** *Sterilisation and freeze-drying of drug-free and drugloaded solid lipid nanoparticles.* 1997, Int. J. Pharm., Vol. 148, págs. 47-54.
142. **Cavalli, R., et al.** *Preparation and characterisation of solid lipid nanospheres containing paclitaxel.* 2000, Eur. J. Pharm. Biopharm., Vol. 10, págs. 305-309.
143. **Hu, F. Q., et al.** *Preparation of solid lipid nanoparticles with clobetasol propionate by a novel solvent diffusion method in aqueous system and physicochemical characterization.* 2002, Int. J. Pharm. 2002, Vol. 239, págs. 121-128.
144. **Heiati, H., et al.** *Solid lipid nanocarriers as drug carriers II. Plasma stability and biodistribution of solid lipid nanoparticles containing the lipophilic prodrug 3'-azido-3'-deoxythymidine palmitate in mice.* 1998, Int. J. Pharm., Vol. 174, págs. 71-80.
145. **Charcosset, C., et al.** *Preparation of Solid lipid nanoparticles using a membrane contractor.* 2005, J. Control. Release, Vol. 108, págs. 112-120.
146. **U.S Department of Health and Human Services, FDA, CDER, CVM.** *Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation.* 2001. p. 25.
147. **Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos.** *Guía de Validación de Métodos Analíticos.* 2da. México : s.n., 2002.
148. **García, A. M., et al.** *Guía de validación de métodos analíticos.* Colegio Nacional de Químicos Farmacobiólogos, A.C. 2002. pág. 33.
149. **Zetasizer nanoserries.** Z potential theoretic. *Usual Manual Malvern Instrument* . 2003, Vol. 15.4.
150. **Brancroft, J. D., et al.** *Theory and practice of histological Techniques.* Churchill-Livingstone : s.n., 1990.
151. **Huber, L.** *Good Laboratory Practice.* 1993 págs. 45-62.
152. Nanobiotechnology center. [En línea]
<http://www.nbtc.cornell.edu/facilities/downloads/Zetasizer%20chapter%2016.pdf>.
153. **Oliveira, P. R., et al.** *Sibutramine hydrochloride monohydrate.* [En línea] 28 de agosto de 2009. [Citado el: 11 de octubre de 2010.]
<http://www.springerlink.com.pbidi.unam.mx:8080/content/cm8474047j070jlt/?p=ad77eecb31545799fe51a7ad4875b62&pi=3>. 10.1007/s10973-009-0200-7.
154. **O'Neil MJ, et al.** *Sibutramine hydrochloride monohydrate.* s.l. : Merck & Co., Inc, 2001. pág. 1522. Vol. 13th.
155. **Cev, G.,** *Drug delivery across the skin.* 1997, Expert. Opin. Investig. Drugs, Vol. 6, pág. 1887.

156. **Bustad, L. K.**, *Pigs in the laboratory*. 1966, *Sci. Am.*, Vol. 214, pág. 94.
157. **Lavker, R. M., et al.** *Hairless micropig skin. A novel model for studies of cutaneous biology*. 1991, *Am. J. Pathol.*, Vol. 138, pág. 687.
158. **Dick, P. I.**, *Pig ear skin as an in-vitro model for human skin permeability* ., 1992, *J. Pharm. Pharmacol.*, Vol. 44, págs. 640-664.
159. **Alvarez-Román, R., et al.** *Enhancement of topical delivery from biodegradable nanoparticles*. 2004, *Pharmaceut. Res.*, Vol. 21, págs. 1818-1825.
160. **Alvarez-Román, R., et al.** *Skin penetration and distribution of polymeric nanoparticles*. 2004, *J. Control. Release*, Vol. 99, pp. 53-62.
161. **Panyam, J., et al.** *Biodegradable nanoparticles for drug and gene delivery to cells and tissue*. 2003, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, Vol. 55, págs. 329-347.
162. **Yoo, H. S., et al.** *Biodegradable Nanoparticles Containing Doxorubicin-PLGA Conjugate for Sustained Release*. *Pharmaceut. Res.*, Vol. 16, págs. 1114-1118.
163. **de Jalón, E. G., et al.** *PLGA microparticles: possible vehicles for topical drug delivery*. 2001, *Int. J. Pharm.*, Vol. 226, págs. 181-184.
164. **Lademann, J., et al.** *Nanoparticles – An efficient carrier for drug delivery into the hair follicles*. 2007, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, Vol. 66, págs. 159-164.
165. **Segall, A. I., et al.** *Reversed-phase HPLC determination of sibutramine hydrochloride in the presence of its oxidatively-induced degradation products*. 2003, *J. Liq. Chromatogr. Related Technol.*, Vol. 26, págs. 977-986.
- 166 **Ding, L. , et al.** *Simultaneous determination of sibutramine and its N-desmethyl metabolites in human plasma by liquid chromatography-electrospray ionization-mass spectrometry Method and clinical applications*. 2003, *Anal. Chim. Acta*, Vol. 492, págs. 241-248.

10 ANEXOS

10.1 ANEXO I

10.1.1 PROPIEDADES DEL CS

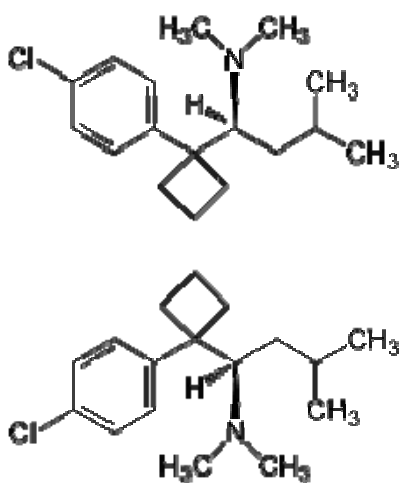


Figura 59 Estructura química del CS

Nombre (IUPAC)	±)-dimetil-1-[1-(4- chlorofenil) ciclobutil]-N,N,3-trimetilbutan- 1-amina
Número CAS	106650-56-0
PubChem	5210
Datos Químicos	
Fórmula	C₁₇H₂₆ClN
Peso Molecular	279.85 g/mol
Farmacocinética	
Biodisponibilidad	Absorción 77%
Metabolismo	Hepático (CYP3A4)
Vida media	CS: 1 h; metabolito 1: 14 h; metabolito 2:16
Excreción	Biliar (CS y metabolitos);renal (metabolitos inactivos)

10.1.2 MECANISMO DE ACCIÓN DEL CS

El clorhidrato de sibutramina (CS), es un fármaco que inhibe la recaptación de noradrenalina, serotonina y dopamina, a través de sus metabolitos activos primarios (M1) y secundarios (M2).

Estos no producen la liberación de monoaminas ni inhiben la monoaminoxidasa (MAO); no presentan efecto anticolinérgico ni antihistamínico y tienen baja afinidad por los receptores de serotonina (5-HT), de noradrenalina y de dopamina. Se considera que la sibutramina posee un doble mecanismo de acción: reducción de la ingesta calórica mediante el aumento de la saciedad y aumento del gasto energético por aumento de la termogénesis.

En experimentos en animales se ha demostrado que estas acciones se deben a la inhibición de la recaptación de serotonina (5-HT) y noradrenalina.

10.1.3 FORMAS FARMACEÚTICAS PARA CS

Forma farmacéutica: cápsulas

Nombre comercial: Raductil, Meridia y Sibutrex

10.2 ANEXO II

10.2.1 DETERMINACIÓN DE LAS CONDICIONES ÓPTIMAS PARA CUANTIFICAR CS

El ensayo se llevo a cabo primeramente en metanol como medio de disolución, esto para optimizar el tiempo de retención de la molécula como se resume en la tabla 37, previamente se ha reportado la determinación de CS en MeOH ^(165; 166) y a partir de éstas se selecciono una fase móvil (MeOH:TEA [1%] pH 4.5) en proporciones 80:20 respectivamente.

Tabla 37 Diferentes tipos de fases estacionarias para la optimización del método analítico

Fase estacionaria	T _R	Simetría del pico
Microsorb® C18 (4.6x250 mm)	4.2	Ancho y coleado
Microsorb® C8 (4.6x250 mm)	3.7	Estrecho y coleado
Microsorb® CN (4.6x250 mm)	3.8	Estrecho y ligeramente coleo

Habiendo determinado la fase estacionaria la fase móvil fue modificada debido a que los componentes de la matriz biológica (piel) se traslapan el uno con el otro para esto se varió la proporción de metanol: solución TEA pH 4.5 y se resumen en la siguiente tabla 38.

Tabla 38 Diferentes fases móviles para la optimización del método analítico

Fase móvil	T _R
MeOH:TEA (80:20)	3.8
MeOH:TEA (70:30)	4.2
MeOH:TEA (65:35)	4.7

Los parámetros evaluados para determinar una buena separación fueron resolución (R) y número de platos teóricos (N).

Tabla 39 Parámetros de resolución para la optimización del método analítico

Fase estacionaria	R	N
Microsorb® C18 (4.6x250 mm)	4.2	1739
Microsorb® C8 (4.6x250 mm)	2.1	2361
Microsorb® CN (4.6x250 mm)	2.8	12350