



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO

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

**LIBERACIÓN TRANSDÉRMICA DE PIROXICAM
EMPLEANDO MICROAGUJAS**

TESIS

PARA OPTAR POR EL GRADO DE

MAESTRA EN CIENCIAS

PRESENTA

QFB. PERLA GARCÍA GUZMÁN



TUTOR: Dra. Flora Adriana Ganem Rondero

AÑO:2012



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTOS

A la UNAM por brindarme la mejor formación académica que se puede desear.

A la Dra. Adriana GanemRondero por todo su apoyo y comprensión.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada (No. 240051), para la realización de este trabajo.

A los proyectos CONACyT -129320 y PAPIIT- IN209709 por el apoyo económico para la realización del proyecto.

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

Al Sr. Rodolfo Robles del laboratorio de microscopía, de la FES-Cuautitlán, por su colaboración en la microscopía electrónica de barrido.

A los miembros del jurado por sus valiosas aportaciones a esta tesis.

JURADO ASIGNADO

Presidente: Dra. Helgi Jung Cook

Vocal: Dra. María Josefa BernadBernad

Vocal: Dra. Luz María Melgoza Contreras

Vocal: Dr. Julio César Aguilar Cordero

Secretario: Dra. Elizabeth Piñón Segundo

*Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Investigación y Posgrado en
Tecnología Farmacéutica (LIPTF) de la FES-Cuautitlán, UNAM.*

Este trabajo fue presentado en modalidad cartel:

XLIV Congreso Nacional de Ciencias Farmacéuticas

Ixtapa-Zihuatanejo, octubre 2011

“Liberación transdérmica de Piroxicam empleando microagujas”

QuimiUNAM 2011

Ciudad de México, noviembre 2011

“Liberación transdérmica de Piroxicam empleando microagujas”

ÍNDICE GENERAL

Índice de Figuras.....	II
Índice de Tablas.....	II
Índice de Ecuaciones.....	IV
Índice de Gráficas.....	IV
Lista de Abreviaturas.....	V
Resumen.....	VI
1. Introducción.....	1
2. Antecedentes.....	3
3. Objetivos.....	13
3.1 Objetivo General.....	13
3.2 Objetivo Particular.....	13
4. Hipótesis.....	13
5. Metodología.....	14
5.1 Materiales.....	14
5.2 Desarrollo y validación de métodos analíticos.....	14
5.3 Preparación y caracterización de NPs de PX.....	16
5.4 Preparación y caracterización de MEs de PX.....	17
5.5 Cinéticas de Permeación <i>in vitro</i>	17
5.6 Extracción de PX remanente en piel.....	19
6. Resultados y discusión.....	20
6.1 Desarrollo y validación de métodos analíticos.....	20
6.1.1 Método 1: cuantificación de PX encapsulado en NPs.....	20
6.1.2 Método 2: cuantificación de PX permeado en los estudios <i>in vitro</i>	21
6.1.3 Método 3: cuantificación de PX retenido en piel en los estudios <i>in vitro</i>	22
6.2 Preparación y caracterización de NPs de PX.....	23
6.3 Preparación y caracterización de MEs de PX.....	25
6.4 Cinéticas de Permeación <i>in vitro</i>	26
6.5 Extracción de PX remanente en piel.....	33
7. Conclusiones.....	37
8. Perspectivas.....	38
9. Bibliografía.....	39
Anexos.....	41
Anexo I. Validación de métodos analíticos.....	42
Anexo II. Cinéticas de permeación <i>in vitro</i>	50
Anexo III. Extracción de PX remanente en piel.....	54
Anexo IV. Análisis Estadístico.....	55

Índice de Figuras

Figura 1. Estructura química del PX.....	3
Figura 2. Estructura de la piel.....	4
Figura 3. Rutas de permeación a través del SC.....	5
Figura 4. Celda de difusión tipo Franz.....	6
Figura 5. Microemulsiones: w/o y o/w.....	8
Figura 6. Clasificación de Winsor.....	8
Figura 7. Estructura química del Transcutol®.....	9
Figura 8. Estructura química del Miristato de Isopropilo.....	9
Figura 9. Nanopartículas: Nanoesferas y Nanocápsulas.....	10
Figura 10. Diversos tipos de microagujas.....	11
Figura 11. Mecanismos de liberación mediante microagujas.....	12
Figura 12. Microagujas MTS Roller.....	18
Figura 13. Aplicación de microagujas.....	18
Figura 14. Micrografías de NPs (barra=1µm).....	24
Figura 15. Caracterización de NPs por DSC.....	25

Índice de Tablas

Tabla 1. Formulación de MEs.....	17
Tabla 2. PX total permeado para los 3 sistemas.....	27
Tabla 3. Flujo (J) y coeficiente de permeabilidad (Kp) para los 3 sistemas.....	29
Tabla 4. Comparación con y sin microagujas para cada sistema de los parámetros determinados.....	30
Tabla 5. Comparación con y sin microagujas para la cantidad total (µg) de PX encontrada en piel y receptor.....	33
Tabla 6. Curva de calibración del Método 1.....	42
Tabla 7. ANOVA del Método 1.....	42
Tabla 8. Precisión del Método 1.....	43
Tabla 9. Repetibilidad del Método 1.....	43
Tabla 10. Exactitud del Método 1.....	44
Tabla 11. Curva de calibración del Método 2.....	44
Tabla 12. ANOVA del Método 2.....	45
Tabla 13. Precisión del Método 2.....	45
Tabla 14. Repetibilidad del Método 2.....	46
Tabla 15. Exactitud del Método 2.....	46
Tabla 16. Curva de calibración del Método 3.....	47
Tabla 17. ANOVA del Método 3.....	47
Tabla 18. Precisión del Método 3.....	48
Tabla 19. Repetibilidad del Método 3.....	48
Tabla 20. Exactitud del Método 3.....	48
Tabla 21. Permeación de ME1 sin microagujas.....	50
Tabla 22. Permeación de ME1 con microagujas.....	50
Tabla 23. Parámetros de ME1 sin microagujas.....	50
Tabla 24. Parámetros de ME1 con microagujas.....	51
Tabla 25. Permeación de ME2 sin microagujas.....	51
Tabla 26. Permeación de ME2 con microagujas.....	51
Tabla 27. Parámetros de ME2 sin microagujas.....	52
Tabla 28. Parámetros de ME2 con microagujas.....	52

Tabla 29. Permeación de NPs sin microagujas.....	52
Tabla 30. Permeación de NPs con microagujas.....	52
Tabla 31. Parámetros de NPs sin microagujas.....	53
Tabla 32. Parámetros de NPs con microagujas.....	53
Tabla 33. Piroxicam extraído de ME1.....	54
Tabla 34. Piroxicam extraído de ME2.....	54
Tabla 35. Piroxicam extraído de NPs.....	54
Tabla 36. ANOVA inter-sistemas sin microagujas.....	55
Tabla 37. Prueba de Múltiples Rangos inter-sistemas sin microagujas.....	55
Tabla 38. Contrastes inter-sistemas sin microagujas.....	55
Tabla 39. ANOVA inter-sistemas con microagujas.....	55
Tabla 40. Prueba de Múltiples Rangos inter-sistemas con microagujas.....	56
Tabla 41. Contrastes inter-sistemas con microagujas.....	56
Tabla 42. ANOVA intra-sistemas.....	56
Tabla 43. Prueba de Múltiples Rangos intra-sistemas.....	56
Tabla 44. Contrastes intra-sistemas.....	56
Tabla 45. ANOVA de Flujos para ME1.....	59
Tabla 46. Prueba de Múltiples Rangos para Flujos ME1.....	59
Tabla 47. Contrastes para flujos ME1.....	59
Tabla 48. ANOVA de Kp para ME1.....	59
Tabla 49. Prueba de Múltiples Rangos para Kp ME1.....	59
Tabla 50. Contrastes para Kp ME1.....	60
Tabla 51. ANOVA de PX total en receptor y piel para ME1.....	60
Tabla 52. Prueba de Múltiples Rangos para PX total en receptor y piel para ME1.....	60
Tabla 53. Contrastes para PX total en receptor y piel para ME1.....	60
Tabla 54. ANOVA de Flujos para ME2.....	61
Tabla 55. Prueba de Múltiples Rangos para Flujos ME2.....	61
Tabla 56. Contrastes para flujos ME2.....	61
Tabla 57. ANOVA de Kp para ME2.....	61
Tabla 58. Prueba de Múltiples Rangos para Kp ME2.....	62
Tabla 59. Contrastes para Kp ME2.....	62
Tabla 60. ANOVA de PX total en receptor y piel para ME2.....	62
Tabla 61. Prueba de Múltiples Rangos para PX total en receptor y piel para ME2.....	62
Tabla 62. Contrastes para PX total en receptor y piel para ME2.....	62
Tabla 63. ANOVA de Flujos para NPs.....	63
Tabla 64. Prueba de Múltiples Rangos para Flujos NPs.....	63
Tabla 65. Contrastes para flujos NPs.....	63
Tabla 66. ANOVA de Kp para NPs.....	64
Tabla 67. Prueba de Múltiples Rangos para KpNPs.....	64
Tabla 68. Contrastes para KpNPs.....	64
Tabla 69. ANOVA de PX total en receptor y piel para NPs.....	64
Tabla 70. Prueba de Múltiples Rangos para PX total en receptor y piel para NPs.....	64
Tabla 71. Contrastes para PX total en receptor y piel para NPs.....	65
Tabla 72. ANOVA de extracción PX en piel inter-sistemas sin microagujas.....	65
Tabla 73. Prueba de Múltiples Rangos de extracción PX en piel inter-sistemas sin microagujas.....	65

Tabla 74. Contrastes de extracción PX en piel inter-sistemas sin microagujas.....	65
Tabla 75. ANOVA de extracción PX en piel inter-sistemas con microagujas.....	66
Tabla 76. Prueba de Múltiples Rangos de extracción PX en piel inter-sistemas con microagujas.....	66
Tabla 77. Contrastes de extracción PX en piel inter-sistemas con microagujas.....	66

Índice de Ecuaciones

Ecuación 1. Primera ley de Fick.....	5
Ecuación 2. Primera ley de difusión Fick.....	6
Ecuación 3. Coeficiente de permeabilidad (Kp).....	7
Ecuación 4. Límite de cuantificación (LOQ).....	15
Ecuación 5. Límite de cuantificación del método 1.....	44
Ecuación 6. Límite de cuantificación del método 2.....	46
Ecuación 7. Límite de cuantificación del método 3.....	49

Índice de Gráficas

Gráfica 1. Curva de calibración de PX (Método1).....	21
Gráfica 2. Espectro de absorción de PX en matriz biológica (8h).....	22
Gráfica 3. Curva de calibración de PX (Método2).....	23
Gráfica 4. Curva de calibración de PX (Método3).....	24
Gráfica 5. PX total permeado con y sin microagujas.....	28
Gráfica 6. Comparación de medias sin microagujas (inter-sistemas).....	29
Gráfica 7. Comparación de medias con microagujas (intra-sistemas).....	30
Gráfica 8. Perfil de liberación de PX con la ME1.....	32
Gráfica 9. Comparación de medias de J1 ME1 (intra-sistemas).....	32
Gráfica 10. Perfil de liberación de PX con la ME2.....	33
Gráfica 11. Comparación de medias de J ME2 (intra-sistemas).....	33
Gráfica 12. Perfil de liberación de PX con las NPs.....	34
Gráfica 13. Comparación de medias de J NPs (intra-sistema).....	34
Gráfica 14. Comparación de medias de PX retenido en piel sin microagujas(inter-sistema).....	35
Gráfica 15. PX retenido y permeado en los estudios in vitro para la ME1.....	36
Gráfica 16. Comparación de medias de PX en piel y receptor para las NPs (intra-sistema).....	36
Gráfica 17. PX retenido y permeado en los estudios in vitro para la ME2.....	36
Gráfica 18. Comparación de medias de PX en piel y receptor ME2 (intra-sistema).....	36
Gráfica 19. PX retenido y permeado en los estudios in vitro para las NPs.....	37
Gráfica 20. Comparación de medias de PX en piel y receptor NPs (intra-sistema).....	37
Gráfica 21. Modelo Ajustado al Método 1.....	43
Gráfica 22. Modelo Ajustado al Método 2.....	47
Gráfica 23. Modelo Ajustado al Método 3.....	49

Lista de Abreviaturas

AINES	Antinflamatorios no esteroideos	λ_{max}	Longitud de onda de máxima absorción
ANOVA	Análisis de varianza	LOD	Limite de Detección
b	Ordenada al origen	logP	Coefficiente de partición
BCS	Clasificación Biofarmacéutica	LOQ	Limite de Cuantificación
Cexp	Concentración experimental	m	Pendiente
Csm	Solubilidad en la membrana	ME1	Microemulsión 1
Csv	Solubilidad en el vehículo	ME2	Microemulsión 2
Cteo	Concentración teórica	MEs	Microemulsiones
Cv	Concentración en el vehículo	NPs	Nanopartículas
CV	Coefficiente de variación	o/w	Aceite en agua
Dm	Coefficiente de difusión en la membrana	OMS	Organización mundial de la salud
DSC	Calorimetría diferencial de barrido	PBS	Solución amortiguadora de Fosfatos
EMEA	Agencia europea de medicamentos	PVAL	Alcohol Poli vinílico
FDA	Administración de Alimentos y Medicamentos	PX	Piroxicam
GI	Grados de libertad	R ²	Coefficiente de correlación
HLB	Balance Hidrofilico lipofílico	rpm	Revoluciones por minuto
ICH	Conferencia Internacional de Armonización	s	Desviación Estándar de la respuesta
J	Flujo	SC	Estrato Corneo
J1	Flujo inicial	SD	Desviación Estándar
J2	Flujo final	SEM	Microscopia electrónica de barrido
K	Coefficiente de partición entre SC y vehículo	t	Tiempo
Kp	Coefficiente de permeabilidad	TGI	Tracto gastrointestinal
Kp1	Coefficiente de permeabilidad inicial	UV-VIS	Ultravioleta-visible
Kp2	Coefficiente de permeabilidad final	w/o	Agua en aceite
L	Longitud de vía de difusión		

RESUMEN

En los últimos años se han desarrollado diversas tecnologías enfocadas a la liberación de fármacos, capaces de mejorar el desempeño de principios activos al promover su absorción, mejorando su biodisponibilidad y disminuyendo sus efectos adversos. Dichas tecnologías a su vez pueden combinarse para obtener un efecto mayor en casos específicos, tal es el caso del uso de microagujas en conjunto con acarreadores coloidales submicrónicos como las nanopartículas y las microemulsiones en la liberación de fármacos por vía transdérmica.

En el presente trabajo se evaluó el efecto de un pre-tratamiento con microagujas en la liberación transdérmica de Piroxicam, formulado en nanopartículas y dos microemulsiones (o/w y w/o). Los 3 sistemas fueron preparados y caracterizados para su posterior evaluación en estudios de permeación *in vitro* en piel de oreja de cerdo con celdas de difusión tipo Franz.

Los resultados obtenidos en este estudio corroboran lo reportado en la literatura, al observar que el uso de las microagujas promueve de manera significativa la absorción de Piroxicam a través de la piel, además se observaron diferencias significativas entre los sistemas de estudio debido a las propiedades fisicoquímicas de cada formulación.

1. INTRODUCCIÓN (Planteamiento del problema y justificación)

Diversos estudios han revelado los recursos estimados para llevar un nuevo fármaco al mercado. El proceso de descubrimiento y desarrollo de una nueva molécula requiere de aproximadamente \$1200 millones de dólares durante un periodo de 7 a 12 años. Durante este tiempo, de 40000 compuestos diseñados, 5 son probados en fases clínicas y sólo uno de ellos es aprobado para su uso médico; esto representa una enorme inversión en tiempo, dinero y recursos humanos, por lo que la búsqueda de rutas alternas de administración, nuevas tecnologías y formas farmacéuticas cobra una enorme importancia, ya que permite mejorar el desempeño de moléculas ya comercializadas, ampliamente estudiadas y bien establecidas. (1)

Dichas alternativas favorecen a diversos fármacos que se pueden ver limitados en su aplicación por los efectos adversos relacionados a su actividad. Tal es el caso del piroxicam (PX), el cual es un fármaco que pertenece al grupo de los antiinflamatorios no esteroideos (AINES). Durante varios años el PX fue indicado por vía oral como primera línea en el tratamiento de síntomas de una gran variedad de padecimientos como: artritis reumatoide, osteoartritis, dismenorrea, etc., sin embargo, su uso puede conllevar al desarrollo de úlceras y hemorragias en estómago e intestinos. En el año 2007 la Organización Mundial de la Salud (OMS) publicó en su *Pharmaceutical Newsletter* una restricción de su uso propuesta por la Agencia Europea de Medicamentos (EMA) en la que limita el uso de dicho fármaco en cuanto a dosis y tiempo de tratamiento, sin embargo sus formas farmacéuticas de administración tópica se ven exentas de esta restricción, por lo que la vía transdérmica resulta una interesante alternativa para su administración y reducción de dichos efectos. (2)

Por otro lado, la **Nanotecnología** representa una útil herramienta para el desarrollo de nuevas estrategias enfocadas a la administración de fármacos por vía transdérmica, ya que la piel representa una de las barreras más eficaces y complejas del cuerpo humano, en la cual el principal reto consiste en atravesar el estrato córneo (SC). (3)

Es por esto que se han estudiado diversas estrategias para promover el paso de fármacos a través de la piel, tales como el uso de **nanoacarreadores** o acarreadores coloidales submicrónicos como las nanopartículas (NPs) y las microemulsiones (MEs) cuyas propiedades como lipofiliidad y tamaño definen la absorción. Además se ha estudiado el uso de promotores físico-mecánicos como las microagujas las cuales promueven la liberación de fármacos al perforar el SC de una manera mínimamente invasiva e indolora.(3)

En la presente tesis se llevó a cabo la preparación y caracterización de tres sistemas coloidales submicrónicos conteniendo PX: dos microemulsiones (o/w y w/o) y NPs poliméricas, con los cuales se realizaron estudios *in vitro* de liberación del fármaco, empleando microagujas como pre-tratamiento, en celdas de difusión tipo Franz, encontrando un efecto promotor en la permeación de PX. Se demostró que la combinación de acarreadores coloidales y microagujas constituye una excelente alternativa para favorecer el paso de fármacos a través de la piel, evitando los inconvenientes de la vía oral.

2. ANTECEDENTES

El piroxicam (PX) es un potente AINES perteneciente a la familia de los oxicams (*Figura1*), su mecanismo de acción consiste principalmente en la inhibición de la síntesis de prostaglandinas. Dentro de la Clasificación Biofarmacéutica de Fármacos (BCS), el PX se encuentra en la clase II, debido a que presenta una baja solubilidad y una alta permeabilidad. (2, 4,5,6)

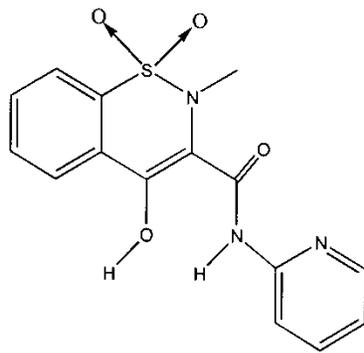


Figura 1. Estructura química del PX (5)

El PX ha sido ampliamente usado en el tratamiento de síntomas de diversos desórdenes inflamatorios y artropatías, como artritis reumatoide y osteoartritis, entre otras. Por vía oral es potente y bien absorbido, pero su uso ha sido asociado a ciertos efectos no deseados en el Tracto Gastrointestinal (TGI), desde náusea y dispepsia, hasta daño severo en las diversas mucosas presentes en el TGI, lo que puede resultar en ulceración y severas hemorragias. (5)

Debido a dichos efectos adversos, el PX se ha visto limitado en su administración por vía oral y se han buscado alternativas de administración, siendo la más factible la vía transdérmica, es decir a través de piel. (2)

La piel es el órgano más grande del cuerpo humano, y constituye una barrera física entre el cuerpo y el medio ambiente, presenta una estructura en capas, las cuales se dividen principalmente en epidermis, dermis y un tejido graso subcutáneo (*Figura 2*). Sin embargo, la principal barrera se encuentra en la zona más externa de la piel que corresponde al Estrato Córneo (SC), el cual consiste en una capa rígida de 15 a 20 µm de

espesor, constituida por células epiteliales conocidas como corneocitos los cuales contienen principalmente queratina, embebidos en una estructura lamelar altamente organizada formada por lípidos intercelulares como ceramidas, colesterol, ácidos grasos y sus ésteres, dando lugar a una capa prácticamente impermeable. (7,8)

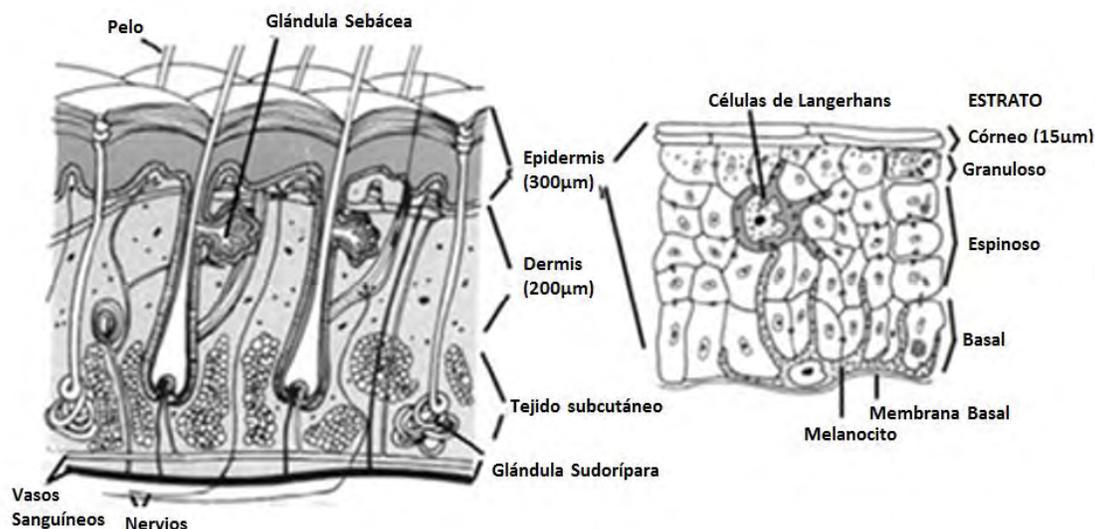


Figura 2. Estructura de la piel(7)

Es bien sabido que cuando un fármaco es transportado a través de la piel, dicha molécula se ve sometida a dos procesos: la penetración del SC y la difusión de la molécula hacia tejidos más profundos. La velocidad y el grado de transporte del fármaco a través del SC depende del tamaño, logP, fuerza iónica, además de las características fisicoquímicas del vehículo. (9)

Se ha sugerido que fármacos con valores de logP alrededor de 2 son buenos candidatos para una liberación transdérmica, por su parte el PX con un logP de 1.8 ha demostrado en diversos estudios una alta concentración plasmática después de una administración tópica. (9)

La permeación de fármacos por vía transdérmica se da mediante la difusión a través de la epidermis y apéndices de la piel como folículos pilosos y glándulas sebáceas, sin embargo la contribución de estos últimos se considera prácticamente despreciable ya que solo representan el 0.1% de la superficie total de la piel. (10)

Por otro lado en el paso a través del SC se han identificado dos rutas: la intercelular, que define el paso en la matriz lipídica que existe entre los corneocitos, y la transcelular que considera que el fármaco atraviesa los corneocitos. (Figura 3) (10)

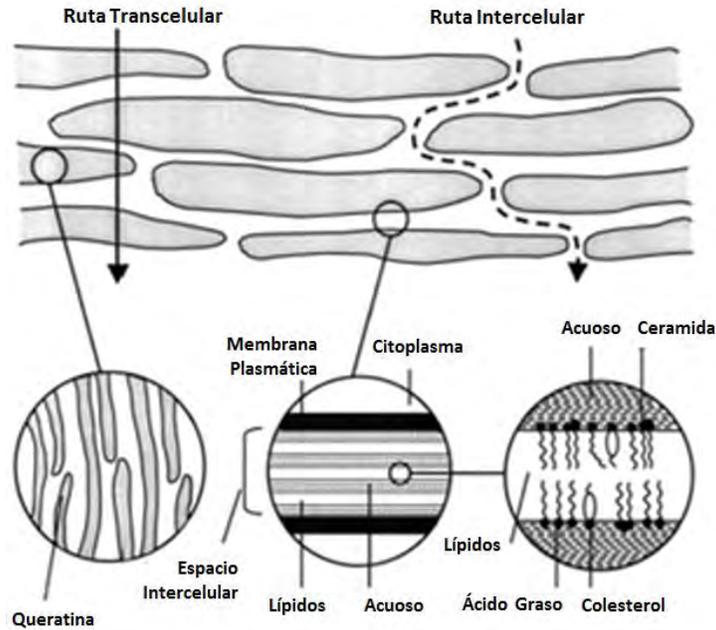


Figura 3. Rutas de permeación a través del SC (10)

El Flujo (J) de un fármaco a través del SC se describe mediante la primera Ley de Fick (Ecuación 1), que involucra el coeficiente de difusión del fármaco en la membrana (D_m), su solubilidad en la membrana ($c_{s,m}$), la longitud de la vía de difusión a través de la membrana (L), la concentración del fármaco disuelta en el vehículo (c_v) y su solubilidad en el vehículo ($c_{s,v}$). (10)

$$J = \frac{D_m c_{s,m}}{L} \cdot \frac{c_v}{c_{s,v}}$$

Ecuación 1. Primera ley de Fick (10)

Existen diversas técnicas *in vitro* para determinar la permeación de fármacos a través de la piel, entre las cuales se encuentra el método de la celda de difusión, en el que una celda clásica consiste en un compartimento donador y uno receptor separados por una membrana, la cual puede ser sintética o natural (Figura 4). (10)

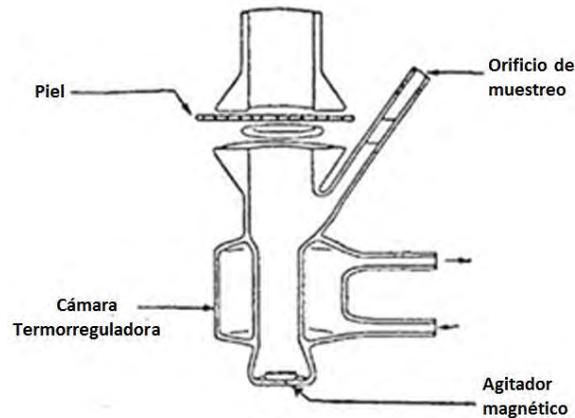


Figura 4. Celda de difusión tipo Franz

Es importante considerar ciertos parámetros que pueden tener un efecto significativo en la permeación, tales como la fuente de piel, siendo la más adecuada la humana, sin embargo por su poca disponibilidad suele recurrirse a fuentes animales, siendo el cerdo el modelo animal más importante, particularmente la piel de oreja del cerdo, ya que diversos estudios han demostrado que posee propiedades histológicas y bioquímicas, similares a la del humano. (10)

Otros factores importantes son la sección de piel utilizada (SC, epidermis, piel completa, etc.) y las propiedades del medio receptor, el cual debe proveer condiciones *sink* y un pH fisiológico. (10)

Con este método y de acuerdo a la primera ley de difusión de Fick (*Ecuación 2*), el J del fármaco desde el donador hacia el receptor se determina gráficamente, midiendo la cantidad de fármaco permeado en función del tiempo (t), en el caso de una solución donadora infinita (concentración muy alta de fármaco en el donador, $c_v = \text{constante}$), la cantidad de fármaco acumulada permeada se grafica en función de t , y la pendiente de la porción lineal de la curva corresponde a J . (*Ecuación 2*) (10)

$$J = \frac{D_m K}{L} c_v$$

Ecuación 2. Primera ley de difusión Fick (10)

Este método involucra el coeficiente de difusión del fármaco en la membrana (D_m), el coeficiente de partición del fármaco entre el SC y el vehículo (K), y la longitud de la vía de difusión a través de la membrana (L), con lo que además es posible obtener el coeficiente de permeabilidad (K_p)(Ecuación 3). (10)

$$K_p = \frac{KD_m}{L}$$

Ecuación 3. Coeficiente de permeabilidad (K_p) (10)

Por otro lado, como ya se explicó, la piel constituye un gran reto como barrera, por lo que la eficacia de los fármacos administrados por la vía transdérmica se puede ver limitada debido a su poca penetración. Debido a ello diversos grupos de trabajo se han enfocado al desarrollo de nuevos métodos para promover la liberación de fármacos a través de la piel.(11)

La promoción del transporte de PX a través de la piel ha sido muy estudiada, mediante diversas técnicas tales como el uso de **nanoacarreadores** sistemas coloidales submicrónicos, los cuales son sistemas particulados con un tamaño por debajo de los 500nm, entre los cuales se encuentran las **microemulsiones** (MEs) y las **nanopartículas** (NPs). (12)

Las MEs se definen como dispersiones coloidales, isotrópicas, que presentan transparencia o muy ligera opalescencia y baja viscosidad, son formulaciones que consisten en un surfactante, un co-surfactante, una fase oleosa y una acuosa. (12)

Es importante remarcar que las MEs son sistemas termodinámicamente estables por lo que su obtención consiste en un proceso exotérmico, es decir no requieren un gasto de energía. Dichos acarreadores pueden presentar diferentes estructuras dependiendo del tipo de surfactante en la formulación, encontrado así sistemas agua en aceite (W/O) y aceite en agua (O/W), como estructuras tipo gota o glóbulo con un tamaño en un rango de 20 a 100nm, embebidos en una mono fase continua externa, separados entre sí por una capa interfacial de surfactante, estabilizada por el co-surfactante.(Figura 5) (12)

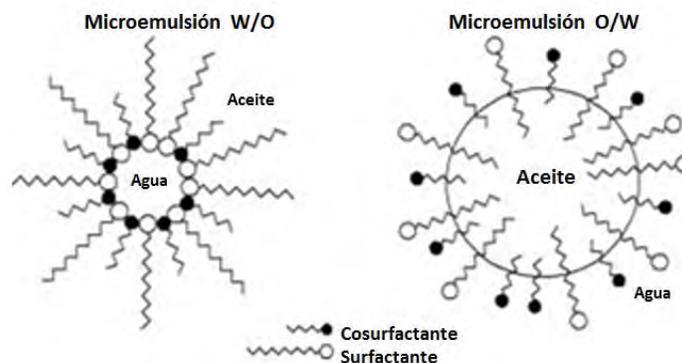


Figura 5. Microemulsiones: w/o y o/w

Considerando una mezcla cuaternaria (agua-surfactante-cosurfactante-aceite), los sistemas formados se pueden describir mediante la clasificación de Winsor (Figura 6), que cuenta con cuatro categorías: una dispersión de aceite en agua (o/w) en contacto con aceite (Winsor I), una dispersión de agua en aceite en contacto con agua (Winsor II), o ambas dispersiones (o/w y w/o) presentes de manera simultánea en dominios separados (Winsor III), y finalmente una dispersión homogénea (o/w o w/o) sin contacto con ninguna otra fase (Winsor IV), las cuales corresponden a los sistemas de nuestro interés. (13)

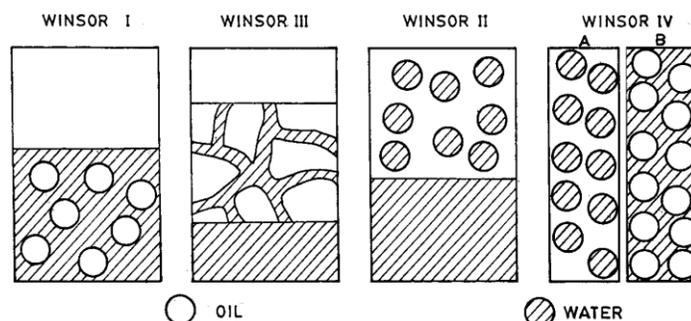


Figura 6. Clasificación de Winsor (19)

Dentro de la formulación el surfactante modifica las propiedades fisicoquímicas de la interface debido a su naturaleza anfifílica, y en MEs se encuentra en una proporción de al menos el 10%, a diferencia de las emulsiones robustas en las que se limita a un 0.1%, debido a que en MEs es necesario un mayor incremento del área de contacto entre fase oleosa y acuosa. Entre los surfactantes más usados en MEs se encuentran

los polisorbatos, como el Tween® 80, el cual presenta un HLB alto (HLB=15) y una baja viscosidad. (8)

El co-surfactante tiene principalmente tres funciones: disminuir al máximo la tensión interfacial a fin de alcanzar estabilidad termodinámica con la consecuente formación de la ME, modificar la curvatura de la interface por efecto de grupos apolares en su estructura y finalmente modificar la fluidez de la película interfacial. Los co-surfactantes usados consisten en moléculas pequeñas, generalmente alcoholes de peso molecular bajo como el Transcutol® (Figura 7), el cual resulta muy atractivo para la vía transdérmica debido a que es inocuo, biocompatible con la piel y miscible con disolventes polares y no polares. (8, 14)



Figura 7. Transcutol®

Por su parte, las fases externas más empleadas consisten en aceites vegetales, triglicéridos compuestos de ácidos grasos de 8 a 10 átomos de carbono, entre los cuales se encuentra el miristato de isopropilo (Figura 8). (8)



Figura 8. Miristato de Isopropilo

Las MEs tienen varias ventajas sobre otros sistemas como: fácil preparación, estabilidad a largo plazo y una alta capacidad de solubilización de fármacos tanto hidrofílicos como lipofílicos. Su principal desventaja consiste en la gran cantidad de surfactantes necesarios para su preparación, lo cual resulta en un reto para los formuladores. (12)

Por otro lado las NPs se definen como partículas sólidas coloidales, en un rango de tamaño de 10 a 1000nm, las cuales pueden prepararse con diversos materiales,

encontrando lipídicas, metálicas y poliméricas. Las NPs poliméricas engloban a las nanoesferas, que corresponden a partículas tipo matriz y nanocápsulas que corresponden a partículas tipo reservorio(Figura 9). (15)

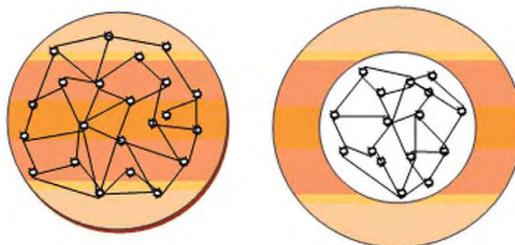


Figura9. Estructura de las nanopartículas: a).Nanoesferas (izquierda) yb). Nanocápsulas (derecha) (16)

En los últimos años se han desarrollado diversos métodos para la obtención de NPs, encontrándose dos tendencias: “*top-down*” en el cual se parte de una estructura grande y se fracciona hasta llegar a una talla submicrónica y “*bottom-up*” que se basa en la fabricación “átomo por átomo” hasta alcanzar la talla deseada. (15)

Entre los diversos métodos reportados se encuentran emulsificación- evaporación, homogenización a alta presión,*salting-out*, emulsión múltiple, nanoprecipitación y emulsificación-difusión, entre otros. (15,16)

El método por emulsificación-difusión consiste en la obtención de una emulsión (o/w) con un solvente orgánico (fase oleosa) que contiene al polímero, el cual es emulsificado con una fase acuosa que contiene un estabilizante siendo el más común Alcohol Poli vinílico (PVAL), en un mezclador de alto corte, seguido por la adición de agua, lo cual induce la difusión del solvente resultando en la formación de nanopartículas por la agregación del polímero. Es importante mencionar que el disolvente orgánico debe ser parcialmente miscible en agua, y ambas fases deben estar saturadas entre sí, además el solvente debe poder ser retirado, usualmente por evaporación a presión reducida. (16)

Finalmente, otra de las estrategias que han despertado un gran interés para la administración de fármacos por vía transdérmica consiste en el uso de promotores

físico-mecánicos como las microagujas, las cuales promueven el paso de fármacos al perforar el SC de una manera indolora y mínimamente invasiva. (Figura 10) (17, 18)

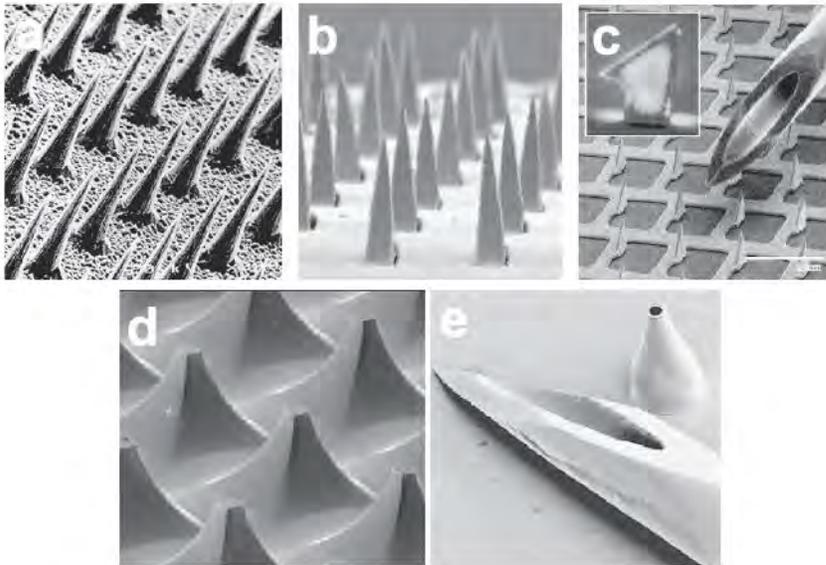


Figura 10. Diversos tipos de microagujas: a-Microagujas sólidas de silicón de 150 μ m, b-microagujas sólidas de acero inoxidable de 1000 μ m, c-microagujas sólidas de titanio recubiertas de 330 μ m, d-microagujas sólidas de silicón de 200 μ m, e-microagujas huecas de 500 μ m (20)

Una de las ventajas de las microagujas es que presentan diversos mecanismos de liberación (figura 11), ya que estas pueden ser aplicadas para generar la formación de poros microscópicos en el SC, por la inserción de las mismas, posteriormente se administra la formulación de interés (a-“poke with patch”), las microagujas usadas son sólidas de metal o diversos polímeros, el efecto promotor consiste en que los agujeros generados son lo suficientemente grandes para permitir el paso de diversas formulaciones hacia capas más profundas de la piel. (17, 18, 19)

Otro mecanismo consiste en recubrir las microagujas con la formulación de interés, e insertarlas en la piel (b-“coat and poke”), en este caso no existe un reservorio sobre la superficie de la piel sino que se encuentra en la superficie del arreglo, una variante de este mecanismo consiste en sumergir las microagujas en la formulación y después raspar la superficie de la piel a fin de favorecer el paso de dicha formulación mediante un efecto de micro abrasión (“dip and scrape”).

Finalmente, las microagujas pueden ser fabricadas con polímeros que encapsulen un principio activo (c), o pueden ser huecas ofreciendo la posibilidad de transportar en

su interior la formulación de interés, liberándolo mediante difusión o mediante el uso de presión (d). (18, 19)

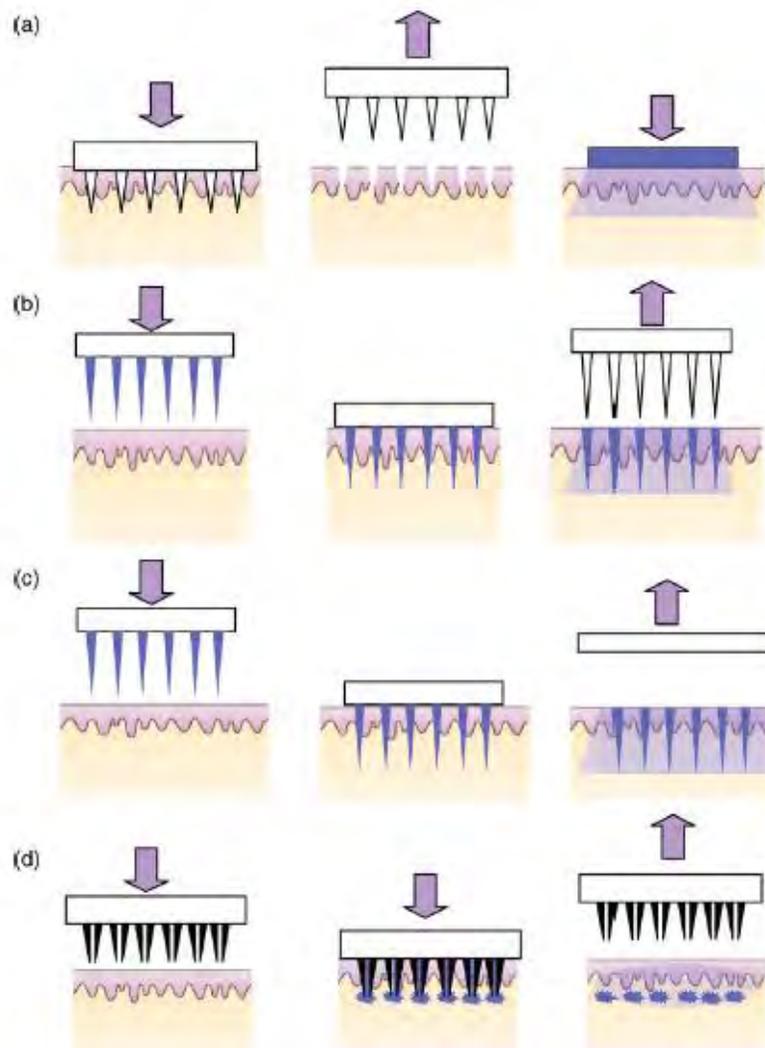


Figura 11. Mecanismos de liberación mediante microagujas: a-poke with patch, b-coat and poke, c-microagujas con fármaco encapsulado, d-microagujas huecas. (19)

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo General

- Evaluar el efecto de un pre-tratamiento con microagujas en la permeación *in vitro* a través de piel, de PX formulado en microemulsiones y nanopartículas.

3.2 Objetivos Particulares

- Preparar y caracterizar un sistema nanoparticulado conteniendo PX.
- Preparar y caracterizar microemulsiones o/w y w/o conteniendo PX.
- Desarrollar y validar métodos por espectrofotometría UV-VIS para la cuantificación de PX en los sistemas de liberación preparados y en los estudios de permeación.
- Realizar estudios de permeación *in vitro* con los sistemas preparados, a través de piel de cerdo intacta y pre- tratada con microagujas.

4. HIPÓTESIS

- El transporte de PX a través de piel *in vitro*, formulado en un sistema acarreador coloidal (microemulsión o dispersión de nanopartículas), se verá favorecido con el uso de un promotor de permeación de tipo físico-mecánico (microagujas).

5. METODOLOGÍA

5.1 Materiales

Reactivos

- Piroxicam (donación de Globe-Chemicals S.A de C.V, México)
- Alcohol poli vinílico (PVAL), Mowiol® (Glomarza, México)
- Eudragit® E100 (donación de Helm, México)
- Miristato de Isopropilo (DrogueríaCosmopolita SA de CV, México)
- Transcutol® (Gattefossé, Francia)
- Tween® 80 (Merck, México)
- Hidróxido de sodio GR (J.T, Baker, México)
- Fosfato monobásico de potasio (Fermont, México)
- Las soluciones Buffer fueron preparadas de acuerdo con la USP31

Material biológico

- Piel de oreja de cerdo (Rastro San Lorenzo, Cuautitlán Izcalli, Edo. de México).

5.2 Desarrollo y validación de Métodos analíticos

Se desarrollaron 3 métodos analíticos mediante espectrofotometría UV-VIS para cuantificar el PX encapsulado en las NPs (Método 1), el PX permeado (Método 2) y el PX retenido en piel (Método 3) en los estudios *in vitro*.

Se determinó la longitud de onda de máxima absorción (λ_{max}), mediante un barrido de 240 a 400nm, para una solución de PX preparada en el medio de disolución correspondiente a cada método.

Para el Método 1 se realizó una validación parcial de acuerdo a la guía de la ICH, Q2 (R1) Validation of analytical Procedures: Text and methodology (ICH Harmonised Tripartite Guideline, 1994), evaluando selectividad, linealidad, rango, exactitud, precisión (inter-día e intra-día), y límite de cuantificación (LOQ).

Los Métodos 2 y 3, en los que el medio de disolución consistió en una matriz biológica, obtenida a partir de una solución amortiguadora en contacto con piel de cerdo, se validaron de forma parcial de acuerdo a la guía de la FDA, Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation (U. S Department of Health Human Services, Food and Drug Administration, 2001), evaluando selectividad, linealidad, rango, exactitud, precisión (inter-día e intra-día), y límite de cuantificación (LOQ).

La selectividad se evaluó obteniendo el espectro de absorción del medio de disolución, que corresponde al blanco, así como de los demás componentes presentes en las muestras a analizar, a fin de verificar la ausencia de interferencias a la longitud de onda de estudio.

Para la determinación de linealidad y rango, se preparó una curva de calibración de PX en el medio de disolución indicado por sextuplicado, a partir de una solución Stock, incluyendo un blanco y 6 diferentes concentraciones.

La exactitud se evaluó mediante el recobro de 3 diferentes concentraciones de PX en el medio de disolución indicado, las cuales se analizaron por quintuplicado. Se determinó la concentración experimental (C_{exp}) mediante interpolación en la curva de calibración, comparando con la concentración teórica (C_{teo}).

A partir de los datos de linealidad, se evaluó la precisión intra-día e inter-día, al determinar el CV, de 6 diferentes concentraciones, por sextuplicado y procesadas durante dos días.

Para evaluar repetibilidad se realizaron 9 determinaciones, preparando tres concentraciones de PX en el medio de disolución indicado con tres replicas cada una.

El Límite de cuantificación (LOQ) se calculó en base a la desviación estándar de la respuesta (σ) y la pendiente de la curva de calibración (m). (Ecuación 4)

$$LOQ = \frac{10\sigma}{m}$$

Ecuación 4. Límite de cuantificación (LOQ)

5.3 Preparación y caracterización de NPs de PX

Se prepararon NPs poliméricas de Eudragit® E100 por el método de emulsificación-difusión (23), para lo cual se pusieron en contacto una solución de PBS pH 7.4 (200mL) y metiletilcetona (200mL), a fin de saturar ambas fases y posteriormente se separaron. Con la fase acuosa obtenida se preparó una solución estabilizante de alcohol poli vinílico (PVAL) al 5% (p/v).

Se disolvieron PX (10mg) y Eudragit® E100 (400mg), en metiletilcetona saturada con PBS pH 7.4 (fase orgánica: 20mL), con agitación magnética constante a temperatura ambiente.

A la solución de PVAL al 5% (40mL), se adicionó lentamente la solución de PX y Eudragit® con agitación constante a 2000rpm, usando un agitador de velocidad variable (RZR-1; Caframo, Alemania) con una propela abatible, durante 10 minutos, a fin de formar una emulsión.

A la emulsión obtenida se le adicionó agua destilada (160mL). Posteriormente se eliminó el disolvente mediante destilación a presión reducida en un rotavapor (Laborota 4000, Heidolph, Alemania) a 40°C y 30rpm. Se centrifugó a 35000rpm durante 2 horas en una ultracentrífuga (Óptima LE-80k, Beckman, USA). Se desechó el sobrenadante y las NPs se resuspendieron con agua destilada (10mL) y agitación magnética constante durante 12 horas, se repitió dicho tratamiento tres veces.

A la dispersión resultante se evaluó por triplicado el tamaño de partícula, índice de polidispersión, Potencial Z en Zetasizer® Malvern Systems (ZEN 3600, USA) a 25°C, con un ángulo de incidencia de 172° y morfología por SEM con un Microscopio Electrónico de Barrido (JSM-25SII, JEOL, Japón), con un previo tratamiento con oro en una campana de recubrimiento (JFC-1100; JEOL, Japón).

La eficiencia de encapsulamiento se evaluó pesando las NPs previamente liofilizadas (0.05g) en una liofilizadora (Labconco, USA) a -40°C y 133×10^{-3} mBar, y disolviéndolas en metiletilcetona (25mL) con agitación magnética constante a temperatura ambiente.

La solución obtenida se filtró y se analizó por UV-VIS en un Espectrofotómetro UV-Vis (Cary IE95031003, Varian, Australia), a la longitud de onda de máxima absorción ($\lambda_{\max}= 354\text{nm}$) para cuantificar con un método previamente validado (Método 1).

Además, se caracterizaron mediante DSC con un Calorímetro Diferencial de Barrido DSC (Q10, TA Instruments, USA) mediante una rampa de 0 a 300°C, a una velocidad de calentamiento de 10°C/min, en celdas de aluminio herméticas, usando indio como patrón de calibración.

5.4 Preparación y caracterización de MEs de PX

Se prepararon dos MEs, una aceite en agua (ME1: o/w) y otra agua en aceite (ME2: w/o), de acuerdo a la composición que se muestra en la *Tabla 1*.

Tabla 1. Formulación de MEs

Orden de adición	Componente	ME1 (o/w)	ME2 (w/o)
		(%w/w)	
1	Miristato de isopropilo	10	40
2	Tween® 80	41	41.65
3	Agua destilada	34.8	9.7
4	Transcutol®	14	8.35
	Piroxicam	0.20	0.20

La mezcla obtenida se agitó en vórtex (M16715, Mixer, USA) durante 5 minutos hasta obtener una apariencia translúcida y de una sola fase.

Las MEs se caracterizaron por triplicado mediante tamaño de glóbulo, índice de polidispersión en Zetasizer® Malvern systems (ZEN 3600, USA) a 25°C, con un ángulo de incidencia de 172° y viscosidad con Viscosímetro (Brookfield LVDVE115, USA) a 25°C, 12 rpm (ME1) y 50 rpm (ME2), con una aguja del #2.

5.5 Cinéticas de Permeación *in vitro*

Se realizaron por sextuplicado estudios *in vitro* de la cinética de permeación de PX en celdas de difusión tipo Franz para cada formulación (NPs, ME1 y ME2), usando como membrana piel de cerdo. Para esto, se extirpó la piel de la cara externa de la oreja de cerdo, posteriormente se limpió retirando exceso de tejido adiposo y muscular. Se almacenó a -5°C hasta su aplicación.

La membrana obtenida se colocó entre los compartimentos donador y receptor de la celda, con un área expuesta para permeación de 5.30cm^2 . El medio receptor consistió en una solución de PBS pH 7.4, mantenida a 37°C y agitación constante durante todo el estudio (8h).

La cara interna de la piel fue hidratada con el medio receptor durante 20 minutos, posteriormente el medio fue renovado y se adicionó la cantidad de formulación de PX a evaluar (equivalente a 2mg de PX) en el compartimento donador, sobre la superficie de la piel. El grupo control para cada formulación consistió en piel íntegra, mientras que en el grupo experimental fue la piel pre-tratada con un arreglo cilíndrico de microagujas de acero inoxidable con una longitud de $500\mu\text{m}$ (MTS-Roller, USA). (Figura 12)



Figura 12. Microagujas MTS Roller

Las microagujas fueron aplicadas manualmente sobre la piel, manteniendo un ángulo y presión constante, siguiendo 4 direcciones diferentes. (Figura 13)

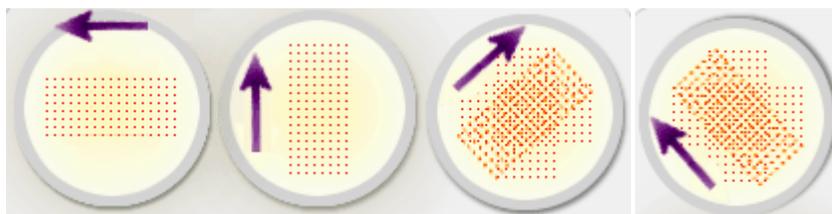


Figura 13. Aplicación de microaguas

Las permeaciones se realizaron en celdas de difusión verticales tipo Franz (Taller de soplado de vidrio FES-Cuautitlán), manteniendo una temperatura constante de 37°C en el receptor, mediante un recirculador de líquidos con termostato (VWR Scientific,

USA), y agitación constante en la solución receptora, empleando un agitador magnético multiplaza 509C (Barnsteadinternational, USA).

La permeación se siguió durante 8 horas continuas, en las cuales se tomaron muestras (4.5mL) del compartimento receptor a diferentes tiempos (0.5, 0.75, 1,2,3,4,5,6,7 y 8h) el volumen retirado fue reemplazado con el mismo volumen de medio fresco.

Durante el estudio se realizaron de manera simultánea permeaciones de las formulaciones con PX y sus respectivos placebos.

Las muestras obtenidas fueron analizadas por UV-VIS a la longitud de onda de máxima absorción (λ_{\max} = 352nm) para cuantificar con un método previamente validado (Método 2).

5.6 Extracción de PX remanente en piel

Al término de las permeaciones la piel se lavó con agua destilada para eliminar el exceso de formulación, se cortó en trozos y se mantuvo bajo agitación magnética constante en una solución de PBS pH 7.4 (10mL) a temperatura ambiente durante 24 horas.

Al término de la extracción el fluido obtenido se filtró por una membrana de 0.45 μ m y se analizó por UV-VIS a la longitud de onda de máxima absorción (λ_{\max} = 360nm) para cuantificar con un método previamente validado (Método 3).

Previamente se determinó el % de recobro del método de extracción, para lo cual se aplicó una cantidad conocida de PX (10 μ g), disuelto en metanol, sobre una membrana de piel de cerdo, montada en las celdas de difusión. Se dejó evaporar el disolvente y se extrajo el PX de acuerdo al método descrito.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Desarrollo y validación de métodos analíticos

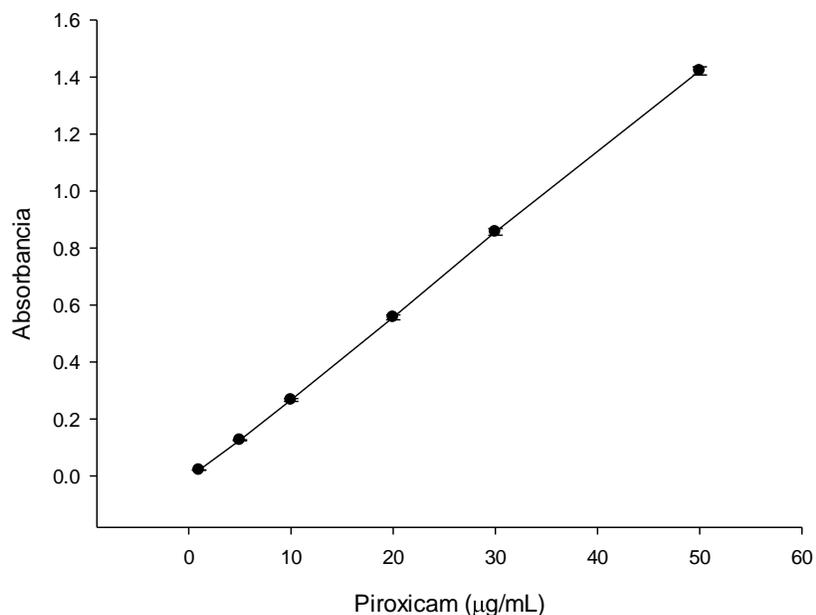
Los métodos se desarrollaron con base en condiciones reportadas en la bibliografía y de acuerdo a las características de las muestras a analizar.

6.1.1 Método 1: Cuantificación de PX encapsulado en NPs

El medio de disolución consistió en metiletilcetona, disolvente capaz de solubilizar tanto al polímero como al PX. Como blanco se utilizó una solución de Eudragit® E100 en dicho disolvente (5mg/mL). La λ_{\max} para el PX en dicho disolvente se encontró a 354nm.

Se realizó un barrido de 240 a 400nm del disolvente, Eudragit® E100 y mezcla de PX y Eudragit® E100 disueltos en metiletilcetona y no se encontraron interferencias entre los componentes a las condiciones del estudio, por lo que se considera que el método es selectivo.

El método demostró ser lineal en un intervalo de 1 a 50 $\mu\text{g/mL}$ ($n=6$) ($CV=1.4181$)($R^2=0.9997$, ANOVA, $\alpha=0.05$)(Gráfica 1). (ANEXO I)



Gráfica 1. Curva de calibración de PX (Método 1)
 $Absorbancia(y)=0.0288*Piroxicam(\mu\text{g/mL})-0.015$

El método cumplió con repetibilidad ($CV=0.8180$), exactitud ($CV=1.6802$) y precisión ($CV_{\text{inter-día}}=1.1466$ y $CV_{\text{intra-día}}=1.0621$) al encontrarse dentro de las especificaciones de acuerdo a la guía ($CV \leq 2$). (ANEXO I)

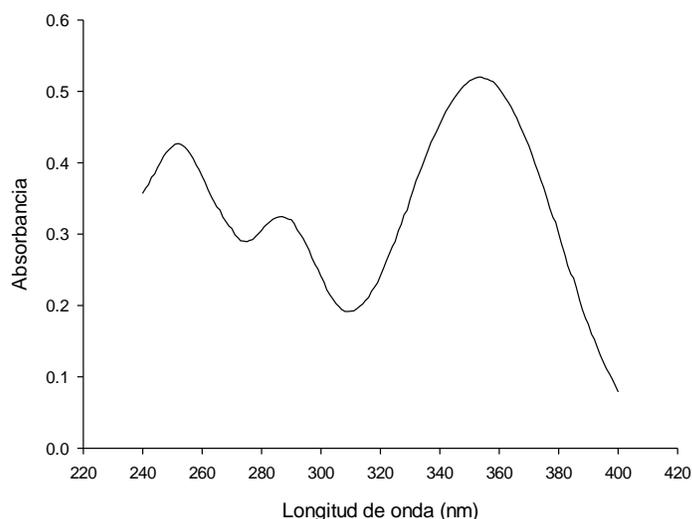
El LOQ fue de $0.7346 \mu\text{g/mL}$ se calculó de manera teórica (de acuerdo a lo expuesto en el apartado 5.2 de la metodología) a partir de los datos obtenidos en la regresión lineal de la curva de calibración. (ANEXO I)

6.1.2 Método 2: Cuantificación de PX permeado en los estudios *in vitro*

El medio de disolución consistió en una matriz biológica, una solución de PBS pH 7.4 en contacto con la cara interna de piel de oreja de cerdo a 37°C , con agitación magnética constante durante 8 horas, que corresponde al tiempo total de estudio de los ensayos *in vitro*, la cual se filtró por una membrana de $0.45 \mu\text{m}$.

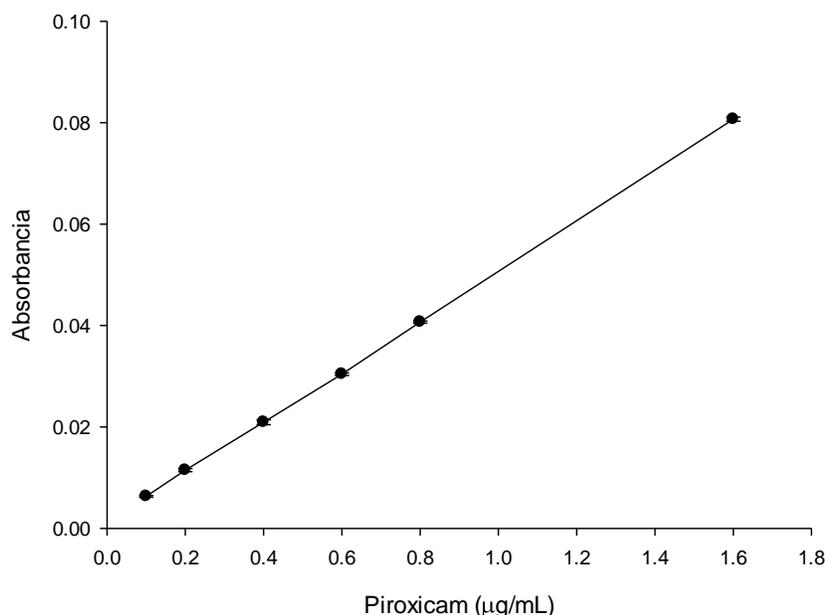
La longitud de onda de estudio, que corresponde a la λ_{max} , fue de 352nm .

El método fue selectivo, lo que se demostró mediante un barrido de 240 a 400nm para el PBS pH 7.4, matriz biológica obtenida a partir de 6 fuentes diferentes, es decir 6 orejas de cerdo diferentes y PX disuelto en la matriz biológica, sin que se encontraran interferencias entre el PX los componentes de la matriz biológica a la λ_{max} . (Gráfica 2).



Gráfica 2. Espectro de absorción de PX en matriz biológica (8h)

El método fue lineal en un intervalo de 0.1 a $1.6 \mu\text{g/mL}$ ($n=6$) ($CV=5.4121$) ($R^2=0.9998$, ANOVA, $\alpha=0.05$). (Gráfica 3)(ANEXO I)



Gráfica 3. Curva de calibración de PX (Método 2)
 $Absorbancia(y)=0.0495*Piroxicam(\mu g/mL)+0.0012$

El método demostró ser repetible ($CV=5.1424$), exacto ($CV=4.1450$) y preciso ($CV_{intra-dia}=5.4332$ y $CV_{inter-dia}=5.4121$) al cumplir con las especificaciones de acuerdo a la guía ($CV<15$). (ANEXO I)

El LOQ fue de $0.0412 \mu g/mL$ se obtuvo de manera teórica a partir de los datos obtenidos en la regresión lineal de la curva de calibración de PX en matriz biológica (de acuerdo a las fórmulas del apartado 5.2 de la Metodología). (ANEXO I)

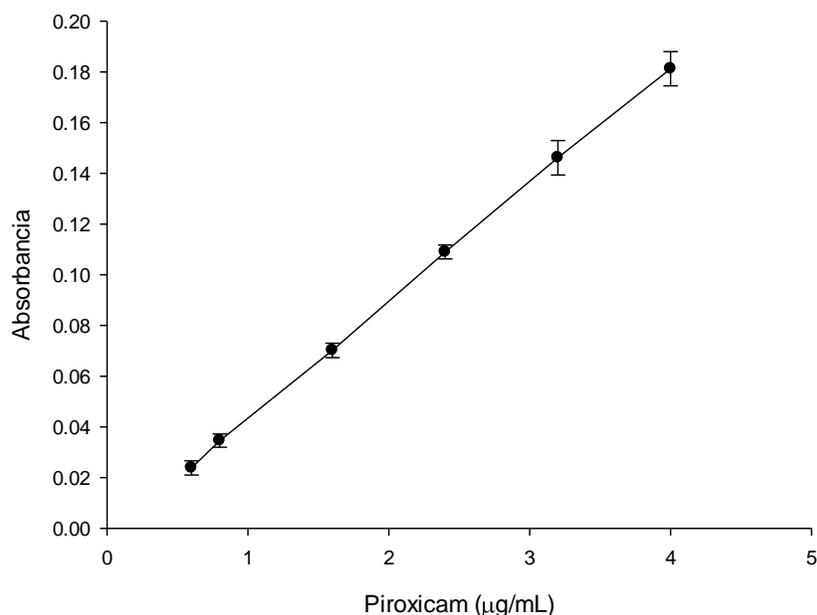
6.1.3 Método 3: cuantificación de PX retenido en piel en los estudios in vitro

La matriz biológica consistió en una solución de PBS pH 7.4 en contacto con piel de oreja de cerdo cortada en trozos pequeños, con agitación magnética constante durante 24 horas a temperatura ambiente, que corresponde a las condiciones de extracción del PX retenido en la piel en los ensayos de permeación *in vitro*. La longitud de onda de estudio, que corresponde a la λ_{max} en esas condiciones fue de 360nm.

Se realizó un barrido de 240 a 400nm para el PBS pH 7.4, matriz biológica obtenida a partir de 6 fuentes (orejas de cerdo) diferentes y PX disuelto en la matriz biológica, al no encontrarse interferencias entre el PX y ningún componente de la matriz biológica a la λ_{max} se dice que el método fue selectivo.

El método de extracción presentó un % de recobro de 102.3588 ± 5.8071 .

El método fue lineal en un intervalo de 0.6 a $4 \mu\text{g/mL}$ ($n=6$) ($\text{CV}=5.7120$) ($R^2=0.997$, ANOVA, $\alpha=0.05$). (Gráfica 4) (ANEXO I)



Gráfica 4. Curva de calibración de PX (Método 3)
 $\text{Absorbancia}(y)=0.0464 \cdot \text{Piroxicam}(\mu\text{g/mL})-0.0032$

El método presentó repetibilidad ($\text{CV}=4.4031$), exactitud ($\text{CV}=4.9996$) y precisión ($\text{CV}_{\text{intra-día}}=4.4363$ y $\text{CV}_{\text{inter-día}}=4.3871$) al cumplir con las especificaciones de acuerdo a la guía ($\text{CV}<15$). (ANEXO I)

El LOQ fue de $0.6814 \mu\text{g/mL}$ se obtuvo de manera teórica a partir de los datos obtenidos en la regresión lineal de la curva de calibración de PX en matriz biológica (de acuerdo a las ecuaciones del apartado 5.2 de la Metodología). (ANEXO I)

6.2 Preparación y caracterización de NPs de PX

Se prepararon NPs poliméricas conteniendo PX, a base de Eudragit® E100, por el método de emulsificación-difusión, el cual se basa en formar una emulsión utilizando metiletilcetona como fase orgánica y agua como fase acuosa, mutuamente saturadas con el fin de lograr un equilibrio entre los medios. Al agregar un volumen de agua no saturada, se rompe el equilibrio termodinámico, con lo que el disolvente difunde desde los glóbulos acarreando moléculas del polímero hacia la fase acuosa, originando

regiones localizadas de supersaturación, desde las cuales son formados nuevos glóbulos por la agregación del polímero, los cuales son estabilizados por el PVAL, que evita la coalescencia, formando una película sobre la superficie de las NPs. (20)

Las NPs se obtuvieron como una dispersión estable de color amarillo, las cuales presentaron un tamaño de partícula de $174.4 \pm 3.8 \text{ nm}$ con un IP de 0.17 ± 0.05 .

El Eudragit® E100 se seleccionó como polímero debido a sus propiedades de sensibilidad al pH, dado que es soluble en medios ácidos hasta pH's menores a 5, e hinchable y permeable por arriba de pH 5, por lo que teniendo en cuenta el pH de la piel, se piensa que la liberación de PX desde las NPs es por disolución del polímero y/o difusión a través de la matriz polimérica. (21)

La medición del potencial Z permite hacer una predicción acerca de la estabilidad de las dispersiones coloidales como las NPs. Usualmente la agregación entre partículas se considera menos probable para partículas con potencial Z alto ($>30 \text{ mV}$) debido al efecto de repulsión entre cargas. Las NPs obtenidas presentaron un potencial Z de $42.6 \pm 3.7 \text{ mV}$, por lo que se pueden considerar estables. (22)

Además presentaron una morfología esférica, la cual se observó mediante SEM (Figura 14).

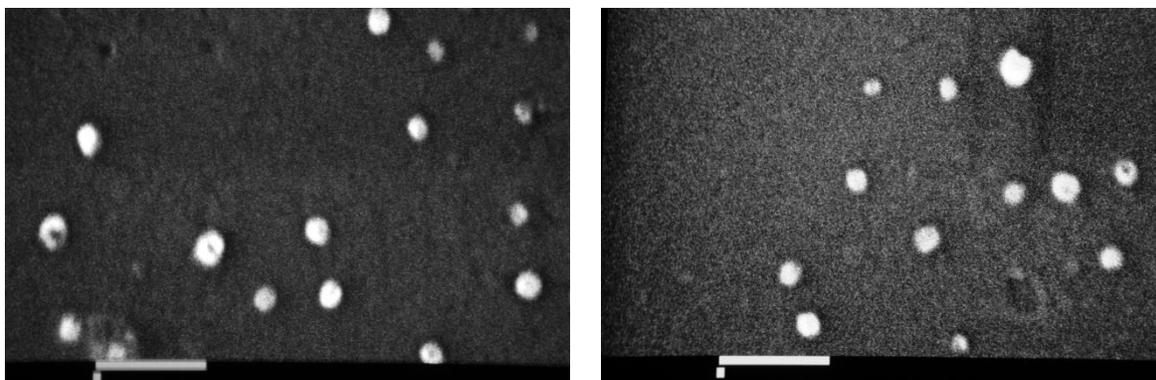


Figura 14. Micrografías de NPs (barra=1 μm)

Se determinó la eficiencia de encapsulamiento con el Método 2, la cual fue $61.8 \pm 6.2\%$, además se evidenció el estado del PX dentro de las NPs de manera indirecta mediante DSC, para lo cual se hizo un análisis de los ingredientes de manera individual

mediante una rampa de 0 a 300°C, a una velocidad de calentamiento de 10°C/min, y muestras de 1-3mg. El PX presentó una endoterma a los 201°C, correspondiente al punto de fusión, mientras que el Eudragit® E100 presentó un ligero cambio en la pendiente a los 52°C, correspondiente a la Tg del polímero (~48°C). También se analizaron las NPs preparadas con y sin PX, donde se observó la desaparición de la endoterma del PX lo que indica que el fármaco se encuentra molecularmente disperso en las NPs (Figura 15).

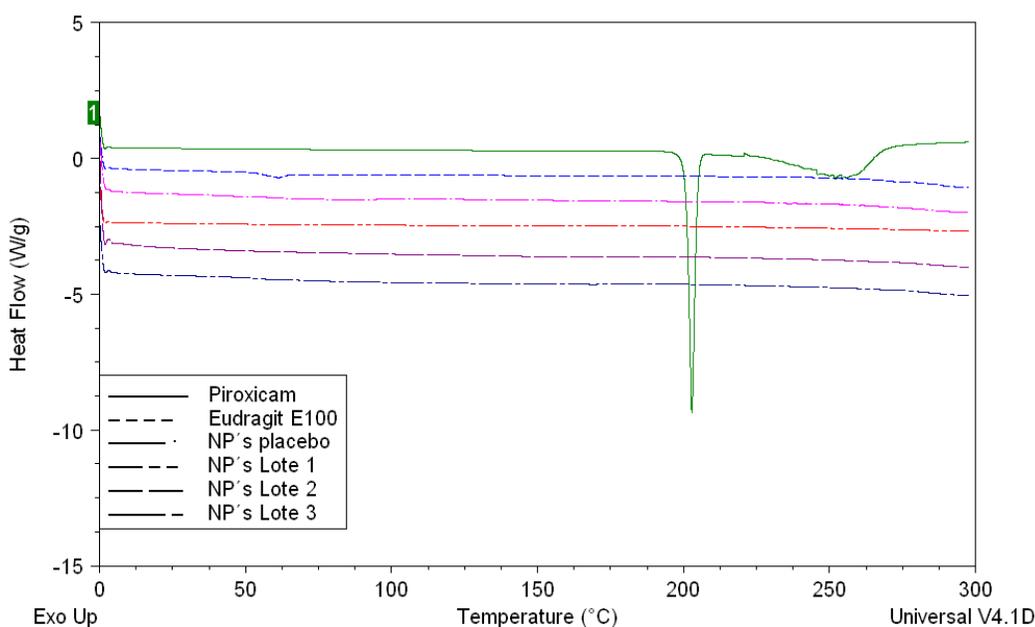


Figura 15. Caracterización de NPs por DSC

6.3 Preparación y caracterización de MEs de PX

Se prepararon 2 tipos de MEs (ME1: o/w y ME2: w/o) conteniendo PX, utilizando miristato de isopropilo como fase oleosa, Tween®80 como surfactante, Transcutol® como co-surfactante y agua.

Se obtuvieron ME estables, transparentes, de una sola fase y color amarillo. La ME1 presentó un tamaño de glóbulo de 20.1 ± 1.9 nm con un IP de 0.23 ± 0.02 y una viscosidad de 120.6 ± 7.0 cP, mientras que la ME2 tuvo un tamaño de glóbulo de 17.8 ± 3.9 nm con un IP de 0.25 ± 0.09 y una viscosidad de 14.9 ± 1.8 cP.

Es importante considerar que en la preparación de ambos sistemas el PX se disolvió en el Transcutol®, el cual es un componente que por su naturaleza anfifílica puede

interaccionar tanto con la fase oleosa como con la acuosa, por lo que se puede esperar una distribución similar del principio activo entre fases.

6.4 Cinéticas de permeación *in vitro*

Las cinéticas de permeación *in vitro* se llevaron a cabo en celdas verticales de difusión tipo Franz, usando como membrana piel de oreja de cerdo. Se sabe que para fármacos de carácter lipofílico como el PX se recomienda usar la epidermis aislada, sin embargo en este caso se deseaba evaluar el efecto del pre-tratamiento con microagujas, por lo que para considerar la perforación del SC fue necesario utilizar piel completa. (10)

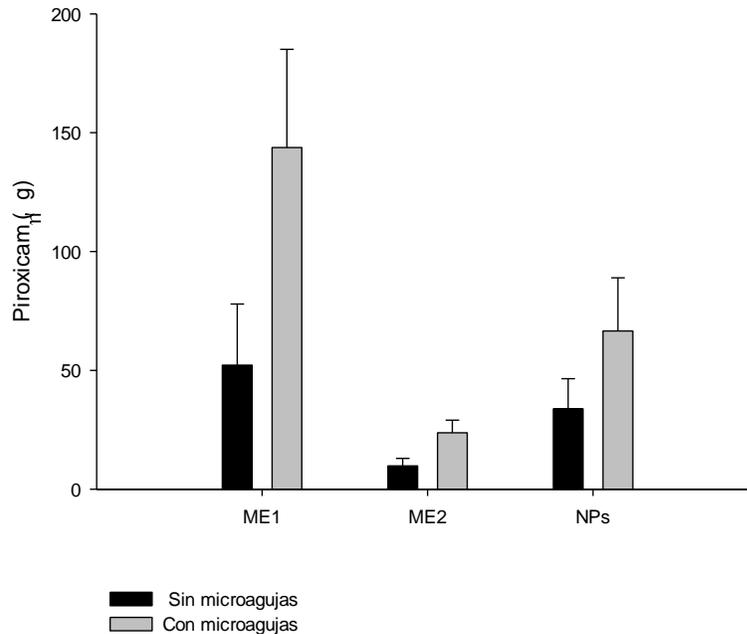
Las microagujas utilizadas en el presente estudio son de acero inoxidable, lo que le brinda una mayor fuerza mecánica y no presentan toxicidad, actualmente el arreglo cilíndrico que se empleó es comercializado para fines cosméticos principalmente. (17)

El medio receptor consistió en una solución de PBS pH 7.4 a 37°C, dado que corresponde a condiciones fisiológicas, además el PX como fármaco de clase II, presenta baja solubilidad en agua, presenta un pKa de 5.3 y estructuralmente el anillo de piridina enlazado al grupo amida le confiere un valor de pKa de 1.86, por lo cual es posible que el PX actúe como un fármaco zwitteriónico a ciertos valores de pH. Como un ácido débil a un pH fisiológico de 7.4 se encuentra ionizado, por lo que al encontrarse el medio receptor a ese pH se favorece la disolución del PX permeado. (9)

En los ensayos realizados se determinó la cantidad total de PX permeada al medio receptor al final de las 8h para los tres sistemas (**ANEXO II**). Se observó que la ME1 fue el sistema que facilitó más el paso del fármaco a través de la membrana, después las NPs y finalmente la ME2. (*Tabla 2, Gráfica 5*). Se observó que el uso de microagujas tuvo un apreciable efecto promotor en la permeación de PX, ya que la cantidad permeada fue mayor con dicho tratamiento, el incremento generado (cantidad total permeada con microagujas / cantidad total permeada sin microagujas) fue muy similar en los tres casos, sin embargo la cantidad permeada fue diferente debido a las propiedades fisicoquímicas exclusivas de cada formulación.

Tabla 2. PX total permeado para los 3 sistemas (n=6)

Sistema	PX total permeado±SD (µg) (n=6)		Incremento
	Sin Microagujas	Con Microagujas	
ME1 (o/w)	52.16±25.75	143.72±41.32	2.75
ME2 (w/o)	9.81±3.13	23.74±5.31	2.41
NPs	33.78±12.70	66.59±22.33	1.97

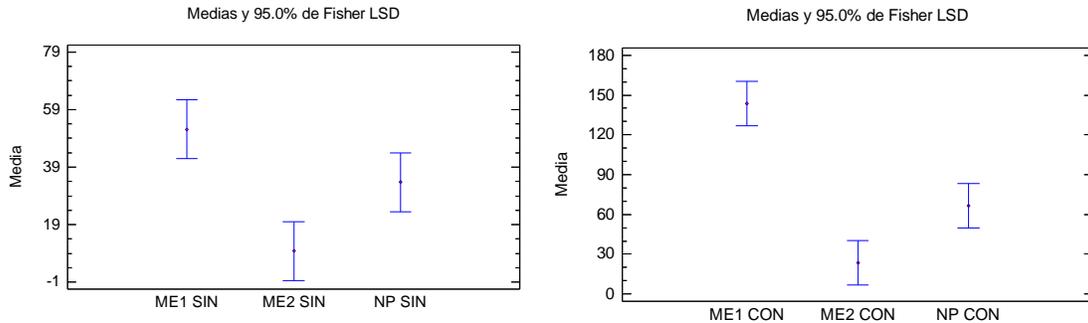


Gráfica 5. PX total permeado con y sin microagujas

Las cantidades de PX total permeado se analizaron mediante una ANOVA (Prueba F, $\alpha=0.05$, *ANEXO IV*) a fin de determinar si existían diferencias significativas intra-sistemas e inter-sistemas, además se realizó una prueba de múltiples rangos para definir entre que muestras existía una diferencia estadísticamente significativa (Prueba LSD-Fisher, $\alpha=0.05$). (*ANEXO IV*)

Para evaluar el efecto de la formulación (inter-sistemas) se comparó la cantidad total permeada con y sin pre-tratamiento con microagujas de los tres sistemas (*ANEXO IV*) (*Gráfica 6*), encontrando que en ambos casos el PX permeado con la ME1 fue mayor y estadísticamente diferente con respecto a la ME2 (*Gráfica 6-derecha*), estos sistemas están formados por los mismos componentes y cuentan con la misma proporción de Tween®80 (~41%), surfactante con la capacidad de alterar el arreglo de los lípidos del SC favoreciendo la permeación, por lo que se esperaba un efecto promotor similar, sin

embargo hubo una diferencia de 5.3 (sin microagujas) y 6.0 (con microagujas) veces en la cantidad de fármaco permeada (ME1/ME2), lo cual se puede atribuir a la cantidad de Transcutol® presente en la ME1, ya que dicho disolvente también ha demostrado poseer un efecto promotor en la absorción de fármacos, esta es una ventaja más de este tipo de sistemas ya que el uso de diversos promotores de absorción en la formulación permite mejorar la liberación.(9,14).



Gráfica 6. Comparación de medias sin (izquierda) y con microagujas (derecha) (inter-sistemas), prueba LSD-Fisher

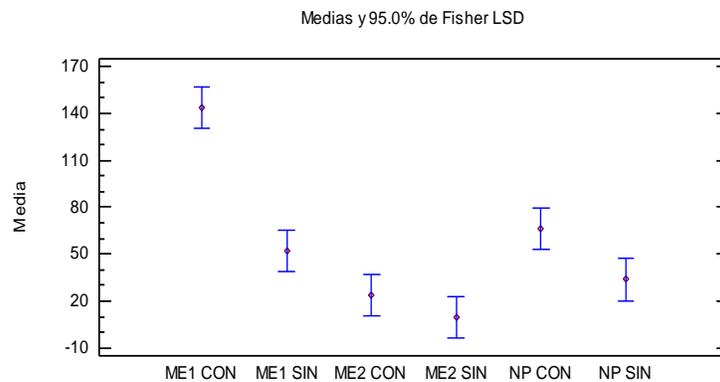
Además en el caso de la ME1 (o/w) en la que la fase externa consiste en agua, al entrar en contacto con la piel se esperaría un incremento en la permeabilidad debido a la hidratación de la superficie, lo que facilitaría el paso de la formulación, finalmente al evaporarse el agua se puede formar una región sobresaturada de PX lo que de igual manera pudo contribuir al desempeño de dicho sistema. (9)

Por otro lado se encontró que sin pre-tratamiento (*Gráfica 6-izquierda*) no existe diferencia entre la cantidad permeada desde las NPs y la ME1, a pesar de haber una diferencia de 1.5 veces en el PX permeado (ME1/NPs), lo cual se puede deber a la gran variabilidad que se tuvo en los datos obtenidos, lo cual resulta prácticamente inevitable al trabajar con muestras biológicas, mientras que con el pre-tratamiento (*Gráfica 6-derecha*) la diferencia fue significativa con un incremento de 2.2 veces (**ANEXO IV**).

Por su parte la ME2 (w/o) en ambos casos fue diferente de los otros dos sistemas (**ANEXO IV**), debido a que la cantidad de PX permeada fue mucho menor, lo cual se puede atribuir a la formación de un depósito tipo reservorio por la acumulación de

dicho sistema en la piel ya que la fase externa (miristato de isopropilo) presenta un carácter lipofílico lo que le brinda una mayor afinidad por la membrana.

Al evaluar el efecto del pre-tratamiento con microagujas (intra-sistemas)(ANEXO IV), se comparó cada sistema con y sin microagujas(Gráfica 7), con lo cual se observó que para los tres sistemas el pre-tratamiento tuvo un efecto promotor estadísticamente significativo en la cantidad total de PX permeada, lo que se debe a la aplicación de las microagujas sobre elSC, ya que al perforar dicha barrera, una mayor cantidad de las formulaciones fue capaz de penetrar a capas más profundas de la piel.



Gráfica 7. Comparación de medias con y sin microagujas (intra-sistemas), prueba LSD-Fisher

Con los datos obtenidos se construyeron gráficas de PX permeado dividido entre el área total expuesta para permear en las celdas($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) en función del tiempo (h), (Gráficos 8, 10 y 12), afin de obtener el flujo (J)de PX desde los tres sistemas(NPs, ME1 y ME2) hacia el medio receptor. Como puede observarse, los perfiles de permeación presentan dos pendientes:la parte lineal inicial de la curva que corresponde al flujo inicial (J_1) del PX y la parte de la curva a partir de donde se observó un cambio en la pendiente, que corresponde al flujo final (J_2). (ANEXO II)

Además se obtuvieron los coeficientes de permeabilidad (Kp) al dividir los flujos obtenidos entre la cantidad total de fármaco aplicada, la cual fue la misma para los tres sistemas (2mg). (ANEXO II)(Tabla 3)

Tabla 3. Flujo (J) y coeficiente de permeabilidad (Kp) para los 3 sistemas (n=6)

Sistema	Microagujas	J \pm SD ($\mu\text{gcm}^{-2}\text{h}^{-1}$)		Kp \pm SD (cmh^{-1}) x 10 ⁻⁴	
		1	2	1	2

ME1 (O/W)	SIN	0.88±0.70	2.06±0.58	4.44±3.51	10.30±2.92
	CON	1.33±0.26	5.57±2.12	6.69±1.32	27.89±1.06
ME2 (W/O)	SIN	0.27±0.08	0.18±0.11	1.35±0.43	0.93±0.55
	CON	0.67±0.28	0.44±0.15	3.36±1.44	2.24±0.77
NPs	SIN	0.68±0.31	0.62±0.21	3.40±1.58	3.11±1.06
	CON	1.33±0.53	1.76±0.71	6.68±2.65	8.84±3.55

En los tres sistemas se encontraron incrementos tanto en el flujo (J) como en la permeabilidad (Kp) con el uso del pre-tratamiento con microagujas. En la parte inicial para la ME1, ME2 y NPs se encontraron incrementos respecto a la piel sin tratar, de 1.5 veces, 2.5 veces y 1.9 veces respectivamente, mientras que en la parte final la ME1 y las NPs presentaron un incremento mayor, de 2.7 y 2.8 veces, sin embargo en el caso de la ME2 el incremento fue muy similar al inicial, de 2.4 veces.

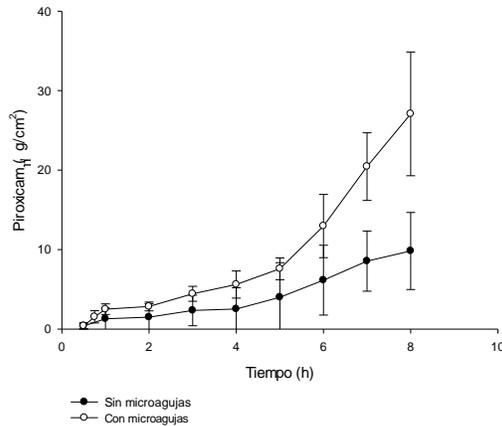
Los resultados de J y Kp se analizaron estadísticamente mediante una ANOVA (Prueba F, $\alpha=0.05$) a fin de determinar si existían diferencias significativas intra-sistemas e inter-sistemas, además se realizó una prueba de rangos múltiples para definir entre que muestras existía una diferencia estadísticamente significativa (Prueba LSD, $\alpha=0.05$). (Tabla 4) (ANEXO IV)

Tabla 4. Comparación con y sin microagujas para cada sistema de los parámetros determinados (= sin diferencia; ≠ diferentes)

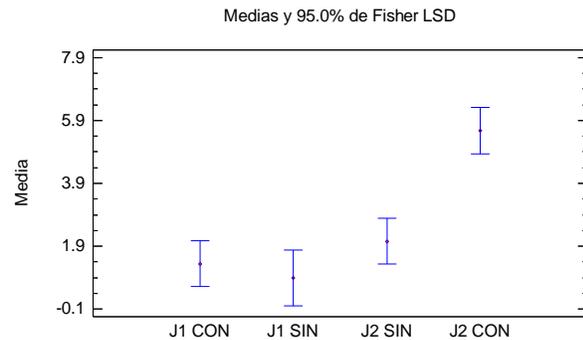
Sistema	J	Kp
ME1(O/W)	J ₁ sin=J ₁ con J ₂ sin ≠J ₂ con	Kp ₁ sin= Kp ₁ con Kp ₂ sin ≠ Kp ₂ con
ME2(W/O)	sin≠con	sin≠con
NPs	sin≠con	sin≠con

Se encontró que para la ME1 el uso de las microagujas fue significativo únicamente en el flujo final (J₂). Sin microagujas el J fue el mismo durante todo el ensayo (J₁=J₂) mientras que con el pre-tratamiento el J aumentó significativamente a partir de las 3h (J₁<J₂), de igual manera con el Kp, debido a que la cantidad de formulación que penetró fue mucho mayor, y con el tiempo hubo una mayor cantidad de PX disponible para permear hacia el medio receptor. Quizás dicho efecto se presentó desde el inicio

del ensayo sin embargo no fue significativo dado que las absorbancias obtenidas en los primeros tiempos fueron muy bajas. (Gráfica 8 y 9)

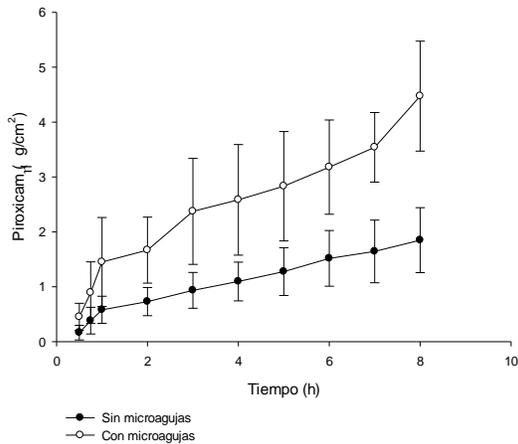


Gráfica 8. Perfil de permeación de PX con la ME1. Círculos abiertos representan el perfil de liberación con microagujas, en el que se observa un cambio en la pendiente que corresponde a un cambio en el flujo ($J_1 < J_2$)



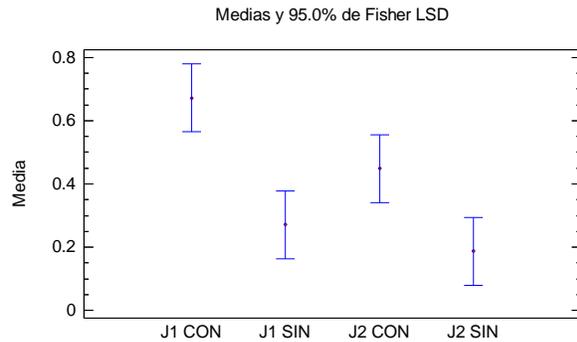
Gráfica 9. Comparación de medias de J para la ME1 (intra-sistema), prueba LSD-Fisher

En el caso de la ME2 el pre-tratamiento tuvo un efecto promotor significativo en J y K_p , además se observó que con microagujas hubo una diferencia entre el flujo a lo largo del ensayo ($J_1 > J_2$), lo cual se puede deber a que conforme avanzaba el tiempo a pesar de haber una mayor cantidad de formulación en la piel, esta fue retenida como ya se mencionó debido al carácter lipofílico de la fase continua, lo que impidió que la liberación del PX en el compartimento receptor. (Gráfica 10 y 11) No obstante, al aplicar el pre-tratamiento con microagujas, se facilita el paso del PX hacia la solución receptora, lo que se refleja en un mayor J.

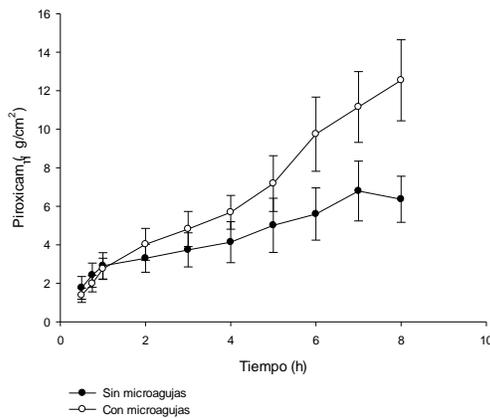


Gráfica 10. Perfil de permeación de PX con la ME2. En ambas curvas se observa un cambio en la pendiente que corresponde a un cambio en el flujo ($J_1 > J_2$)

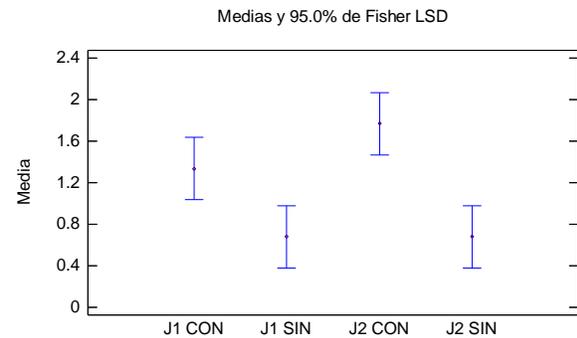
Por su parte con las NPs el J y Kp presentaron un aumento significativo con el pretratamiento, debido a que la cantidad permeada con microagujas fue mayor, lo cual se puede deber a que las NPs tienen un tamaño mucho mayor (~174nm) respecto a las MEs (~20nm), y las perforaciones generadas en el SC permitieron la entrada de más NPs, en ambos casos el flujo se mantuvo constante durante todo el ensayo ($J_1 = J_2$) lo cual se puede deber a que las propiedades fisicoquímicas de las NPs no favorecen su afinidad por los componentes de la membrana. (Gráfica 12 y 13)



Gráfica 11. Comparación de medias de J para la ME2 (intra-sistema), prueba LSD-Fisher



Gráfica 12. Perfil de permeación de PX con las NPs. En ambas curvas no se observa ningún cambio en la pendiente lo que indica que el flujo se mantuvo constante ($J_1 = J_2$)



Gráfica 13. Comparación de medias de J para las NPs (intra-sistema), prueba LSD-Fisher

6.5 Extracción de PX remanente en piel

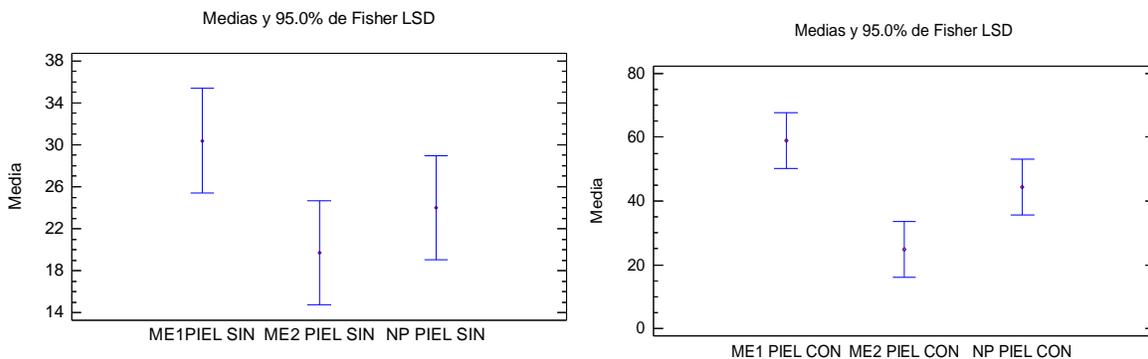
Se extrajo el PX retenido en piel y se cuantificó mediante el método 3(ANEXO III), la cantidad encontrada se correlacionó con la cantidad total permeada al compartimento receptor. (Tabla 5, gráfica 15, 17 y 19)

Tabla 5. Comparación con y sin microagujas para la cantidad total(µg) de PX encontrada en piel y receptor

Sistema	Tratamiento			
	Sin Microagujas		Con Microagujas	
	Piel	Receptor	Piel	Receptor
ME1 (o/w)	30.38±7.58	52.16±25.75	58.94±9.52	143.72±41.32
ME2 (w/o)	19.69±9.66	9.81±3.13	24.85±6.69	23.74±5.31
NPs	23.99±6.69	33.78±12.70	44.43±21.78	66.59±22.33

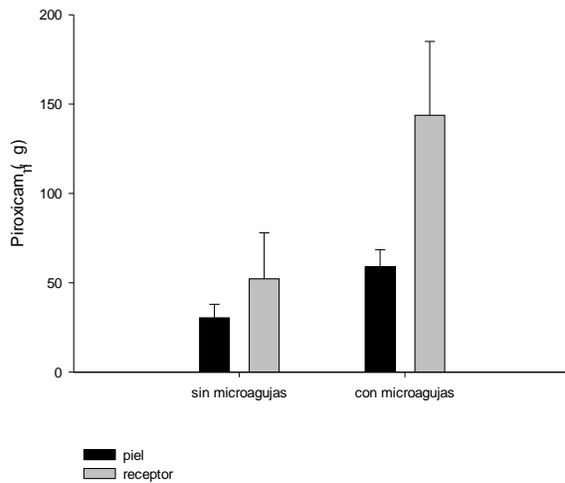
A fin de evaluar el efecto de la formulación (inter-sistemas)(Gráfica 14-izquierda), se comparó la cantidad retenida en piel sin microagujas para los tres sistemas encontrando que la cantidad retenida con la ME1 fue diferente de la ME2, pero sin diferencias respecto a las NPs. Además no se encontraron diferencias entre la ME2 y NPs aunque estos resultados pueden atribuirse a la alta dispersión de los datos.(ANEXO IV)

Con el pre-tratamiento (Gráfica 14-derecha)de igual manera no se encontraron diferencias significativas entre las NPs y la ME1, mientras que la ME2 fue diferente respecto a las otras formulaciones.(ANEXO IV)

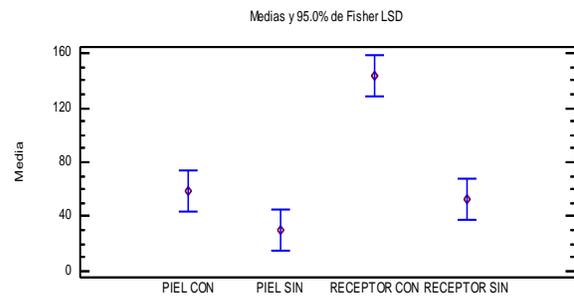


Gráfica 14. Comparación de medias de PX retenido en piel sin (izquierda) y con (derecha) microagujas (inter-sistema), prueba LSD-Fisher

En la ME1 sin el pre-tratamiento se encontró que las cantidades de PX en piel y receptor fueron estadísticamente iguales, lo que indica que dicha formulación presentó la misma afinidad tanto por la membrana como por el medio receptor, mientras que con el uso de microagujas la cantidad del fármaco permeada fue mucho mayor y significativamente diferente, debido a las perforaciones generadas en el SC. (Gráfica 15 y 16)

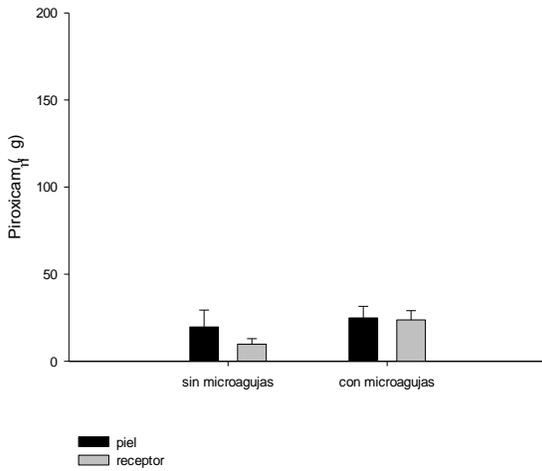


Gráfica 15. PX retenido y permeado en los estudios in vitro para la ME1

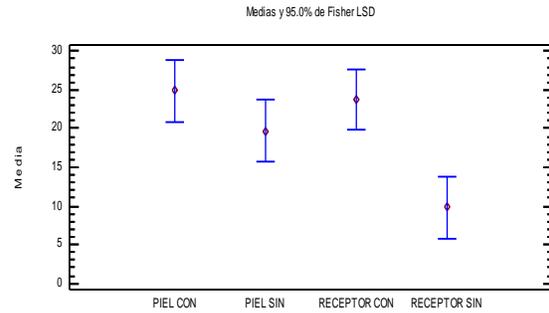


Gráfica 16. Comparación de medias de PX en piel y receptor para la ME1 (intra-sistema), prueba LSD-Fisher

Para el caso de la ME2 se observó que sin microagujas la cantidad del fármaco retenida en piel fue mayor y significativamente diferente con respecto al receptor, lo que confirma la idea de la formación de un reservorio en la piel debido a la fase oleosa externa de dicho sistema, mientras que con el uso de microagujas dicho fenómeno se vio reducido ya que la cantidad de PX en el receptor aumentó, lo que demuestra el efecto promotor del pre-tratamiento, pero no fue significativamente diferente con respecto a la cantidad retenida en la piel. (Gráficas 17 y 18)

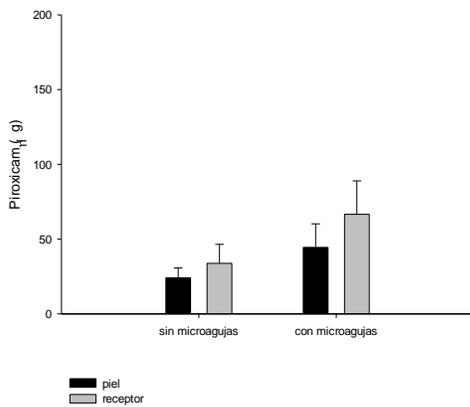


Gráfica 17. PX retenido y permeado en los estudios *in vitro* para la ME2

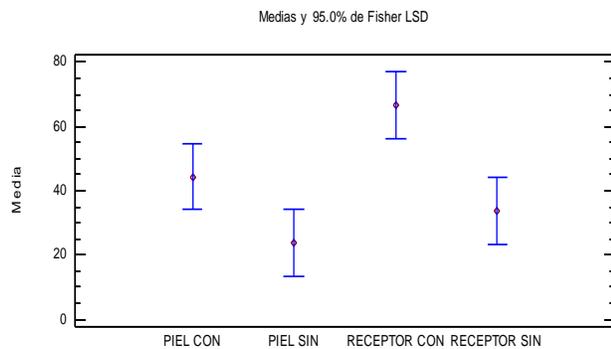


Gráfica 18. Comparación de medias de PX en piel y receptor ME2 (*intra-sistema*), prueba LSD-Fisher

Finalmente, para las NPs se encontró que sin microagujas las cantidades de PX en receptor y piel fueron iguales, mientras que con las microagujas fueron estadísticamente diferentes, encontrándose una mayor cantidad en el receptor. Además se observó que las cantidades encontradas en piel con y sin microagujas fueron iguales, mientras que las de los compartimento receptores fueron diferentes. (Gráficas 19 y 20)



Gráfica 19. PX retenido y permeado en los estudios *in vitro* para las NPs



Gráfica 20. Comparación de medias de PX en piel y receptor NPs (*intra-sistema*), prueba LSD-Fisher

Diversas publicaciones reportan estudios de permeación *in vitro* de PX, en celdas de difusión tipo Franz, desde sistemas convencionales como geles y emulsiones evaluando el efecto de pre-tratamientos con promotores químicos como ácidos grasos

(Ej. laurico, oleico y linoleico) tanto en la cantidad permeada al compartimento receptor, como en la cantidad de PX retenida en la piel, encontrando que el efecto promotor de los ácidos grasos depende en gran manera de su estructura química, lo cual se ve descartado con el uso de las microagujas. (24)

Existen diversas publicaciones que reportan valores de J y K_p para PX mas altos que los obtenidos en el presente estudio, sin embargo es importante resaltar que fueron realizados en piel de rata, cultivos celulares o en membranas sintéticas y no en el modelo animal de primera elección (cerdo), por lo que los resultado pueden no ser muy representativos respecto al humano. (24,25)

7. CONCLUSIONES

- Se lograron obtener tres sistemas de nanoacarreadores, dos tipos de microemulsiones (MEs) y nanopartículas (NPs) conteniendo PX con posibles aplicaciones para la vía transdérmica.
- Los tres métodos analíticos desarrollados mediante espectrofotometría UV-VIS para cuantificación se validaron de acuerdo a guías internacionales demostrando ser selectivos al PX, confiables y adecuados para los objetivos planteados.
- En los estudios de permeación *in vitro* se encontró que el sistema que presentó una mayor cantidad de PX permeado fue la ME1, después las NPs y finalmente la ME2. Las diferencias encontradas se atribuyeron a la composición de las diferentes formulaciones, y a las propiedades fisicoquímicas de los componentes, siendo en el caso de la ME1 una mayor proporción de Transcutol®, lo que le brindó un mayor efecto promotor.
- Se encontró que el uso de microagujas tuvo un efecto promotor al aumentar la cantidad total de PX permeada, el flujo (J) y el coeficiente de permeabilidad (Kp) en los tres sistemas. Con ello se demuestra la utilidad de emplear microagujas para facilitar la administración a través de la piel de este tipo de acarreadores.

8. PERSPECTIVAS

- Realizar las cinéticas de permeación en un modelo *in vitro* por tiempos prolongados y además estudios *in vivo* a fin de hacer una correlación entre métodos.
- Comparar los sistemas obtenidos y el efecto promotor contra una presentación tópica comercial de Piroxicam.
- Usar técnicas como microscopía confocal, que permitan evidenciar la distribución de los sistemas en las diferentes capas de la piel.
- Evaluar el posible uso de microagujas huecas para la administración de nanoacarreadores con Piroxicam en un dispositivo tipo parche.

9. BIBLIOGRAFÍA

1. Kapetanovik I.M, **Computer-aided drug discovery and development (CADD): In silico-chemico-biological approach**, *Chemico-Biological Interactions* 171 (2008) 165–176
2. World Health Organization, *Pharmaceuticals Newsletter*, No.4, 2007
3. Cevc Gregor, Vierl Ulrich, **Nanotechnology and transdermal route Astate of the art review and critical appraisal**, *Journal of Controlled Release* 141 (2010) 277–299
4. Sunil Prabhu , Ortega Maru, Chan Ma,**Novel lipid-based formulations enhancing the in vitro dissolution and permeability characteristics of a poorly water-soluble model drug, Piroxicam**, *International Journal of Pharmaceutics* 301 (2005) 209–216
5. Doliwa A., Santoyo S., et. al., **Sensitive LC determination of Piroxicam after in vitro transdermal permeation studies**, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 26 (2001) 531–537
6. Pascual-Reguera Maria Isabel, Ayora-Cañada MariaJose, et. Al., **Determination of Piroxicam by solid-phase spectrophotometry in a continuous flow system**, *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 15 (2002) 179–183
7. Bal M. Suzanne, Zhi Ding, et al., **Advances in transcutaneous vaccine delivery: Do all ways lead to Rome?**, *Journal of Controlled Release* 148 (2010) 266–282
8. Vandamme Th. F., *Progress in Retinal and Eye Research* 21 (2002)15-34.
9. Abdulkarim F. Muthanna , Ghassan Z Abdullah, et al.,**Topical Piroxicam in vitro release and in vivo anti-inflammatory and analgesic effects from palm oil esters-based nanocream**, *International Journal of Nanomedicine*, (2010),5 915–924
10. Moser Katrin, KriwetKatrin,et. al., **Passive skin penetration enhancement and its quantification in vitro**, *European Journal of pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 52, (2001) 103-112.
11. Kalia N Yogeshvar, Guy H. Richard, **Modeling transdermal drug release**, *Advanced Drug Delivery Reviews* 48 (2001) 159–172
12. Neubert H.H Reinhard., **Potentials of new nanocarriers for dermal and transdermal drug delivery**, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 77 (2011) 1–2
13. Moulik S.P, Paul B.K., **Structure dynamics and transport properties of microemulsions**, *Advances in Colloid and Interface Science*, 78 , (1998),99-195.
14. Mura P., Faucci M.T., et. Al., **Evaluation of transcutol as a clonazepam transdermal permeation enhancer from hydrophilic gel formulation**, *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 9 (2000) 365–372.
15. Rao J. Prasad, Geckeler Kurt E., **Polymer nanoparticles: Preparation techniques and size-control parameters**, *Progress in Polymer Science* 36 (2011) 887–913
16. Mishra B., Patel Bhavesh, et. al., **Colloidal nanocarriers:a review on formulation technology, types and applications toward targeted drug delivery**, *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine* 6 (2010) 9–24
17. Badran M.M., Kuntsche J., et. al., **Skin penetration enhancement by a microneedle device (Dermaroller®) in vitro: Dependency on needle size and applied formulation**, *European Journal of Pharmaceutiocal Sciences* 36, (2009) 511-523 (11)
18. Prausnitz Mark R., **Microneedles for transdermal drug delivery**, *Advanced Drug Delivery Reviews* 56 (2004) 581– 587
19. AroraAnubhav, Prausnitz Mark R, **Micro-scale deices for transdermal drug delivery**, *International Journal of Pharmaceutics* 364 (2008) 227–236
20. Quintanar-Guerrero D., Fessi H., Alleman E. , **A mechanistic study of the formation of polymer nanoparticles by emulsification-diffusion technique**, *Colloid and polymer science*275, (1997) 640-647.
21. Dominguez-Delgado Clara L., Rodriguez-Cruz Isabel M et.al., **Preparation and characterization of triclosan nanoparticles intended to be used for treatment of acne**, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 79 (2011) 102–107

22. Verma V. K. and, Ram A., *Preparation, Characterization and In-vitro release of Piroxicam-loaded solid lipid nanoparticles*, *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Nanotechnology*, 3,(2010) 1136-1146
23. Bazo G. C., et al., *Poly(3-hydroxybutyrate)/chitosan/ketoprofen or piroxicam composite microparticles: Preparation and controlled drug release evaluation*, *Carbohydrate Polymers* 77 (2009) 839-844
24. Santoyo S.,Ygartua P., *Effect of skin pretreatment with fatty acids on percutaneous absorption and skin retention of Piroxicam after its topical application*, *European journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 50 (2000) 245-250.
25. Csóka I., Csányi E., et.al.,*In vitro an in vivo percutaneous absorption of topical dosage forms: case studies*, *International Journal of Pharmaceutics* 291 (2005) 11-19.

ANEXOS

ANEXO I. VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS

Método 1: cuantificación de PX encapsulado en NPs

Selectividad

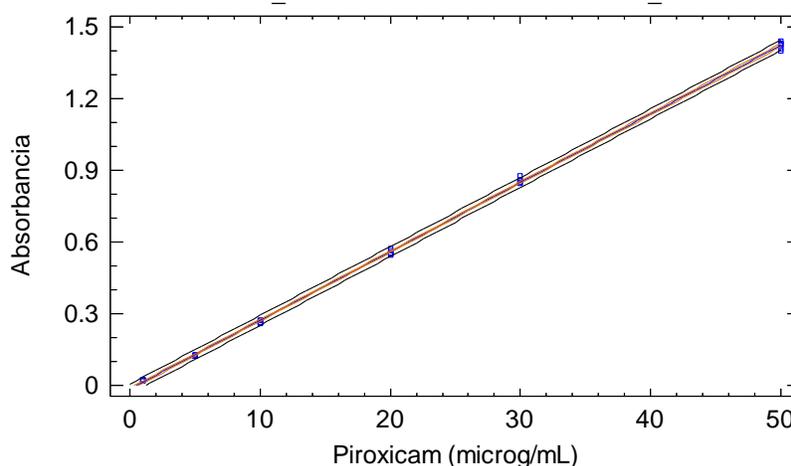
La selectividad se evaluó obteniendo el espectro de absorción del medio de disolución, que corresponde al blanco, así como de los demás componentes presentes en las muestras a analizar, a fin de verificar la ausencia de interferencias a la longitud de onda de estudio.

Linealidad y Rango

Se preparó una curva de calibración de PX en metiletilcetona por sextuplicado, a partir de una solución Stock, incluyendo un blanco y 6 diferentes concentraciones.

Tabla 6. Curva de calibración del Método 1

Concentración (µg/mL)	1	2	3	4	5	6	Media	SD	CV
1	0.0207	0.0209	0.0211	0.0207	0.0204	0.0210	0.0208	0.0002	1.2163
5	0.1281	0.1264	0.1249	0.1236	0.1267	0.1236	0.1256	0.0018	1.4502
10	0.2744	0.2609	0.2714	0.2639	0.2651	0.2647	0.2667	0.0050	1.9073
20	0.5522	0.5530	0.5475	0.5535	0.5626	0.5711	0.5567	0.0086	1.5474
30	0.8451	0.8491	0.8504	0.8572	0.8778	0.8612	0.8568	0.0118	1.3787
50	1.4208	1.4292	1.4108	1.4001	1.4308	1.4391	1.4218	0.0143	1.0085
m	0.0286	0.0289	0.0285	0.0284	0.0291	0.0291	0.0288		
b	0.0131	0.0185	0.0135	0.0137	0.015	0.0166	0.0151		
R ²	0.9999	0.9998	0.9998	0.09996	0.9995	0.9998	0.9997		



Gráfica 21. Modelo Ajustado al Método 1

Tabla 7. ANOVA del Método 1

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Modelo	8.36414	1	8.36414	84319.74	0.0000
Residuo	0.00337265	34	0.0000991955		
Total (Corr.)	8.36751	35			

Coefficiente de Correlación = 0.999798

R-cuadrada = 99.9597 por ciento

R-cuadrado (ajustado para g.l.) = 99.9585 por ciento

Error estándar del est. = 0.00995969

Error absoluto medio = 0.00763942
 Estadístico Durbin-Watson = 1.02408 (P=0.0004)
 Autocorrelación de residuos en retraso 1 = 0.446626

Puesto que el valor-P en la tabla ANOVA es menor que 0.05, existe una relación estadísticamente significativa entre absorbancia y concentración con un nivel de confianza del 95.0%.

El estadístico R-Cuadrada indica que el modelo ajustado explica 99.9597% de la variabilidad en Absorbancia. El coeficiente de correlación es igual a 0.999798, indicando una relación relativamente fuerte entre las variables. El error estándar del estimado indica que la desviación estándar de los residuos es 0.00995969.

El método fue lineal en un rango de 1 a 50 µg/mL (n=6) (CV=1.4181) (R²=0.9997, ANOVA, α=0.05).

Precisión

A partir de los datos de linealidad, se evaluó la precisión intra-día e inter-día, al determinar el CV, de 6 diferentes concentraciones, por sextuplicado y procesadas durante dos días.

Tabla 8. Precisión del Método 1

Día 1						
Concentración (µg/mL)	1	2	3	Media	SD	CV
1	0.0207	0.0209	0.0211	0.0209	0.0002	0.9569
5	0.1281	0.1264	0.1249	0.1265	0.00160104	1.2659
10	0.2744	0.2609	0.2714	0.2689	0.00708872	2.6361
20	0.5522	0.5530	0.5475	0.5509	0.00297153	0.5393
30	0.8451	0.8491	0.8504	0.8482	0.00276225	0.3256
50	1.4208	1.4292	1.4108	1.4203	0.00921159	0.6485
Día 2						
Concentración (µg/mL)	4	5	6	Media	SD	CV
1	0.0207	0.0204	0.0210	0.0207	0.0003	1.4492
5	0.1236	0.1267	0.1236	0.1246	0.00178979	1.4360
10	0.2639	0.2651	0.2647	0.2646	0.00061101	0.230
20	0.5535	0.5626	0.5711	0.5624	0.0088017	1.5650
30	0.8572	0.8778	0.8612	0.8654	0.01092337	1.2622
50	1.4001	1.4308	1.4391	1.4233	0.02054418	1.4433

El método fue preciso al cumplir con CV≤2 de manera intra-día (CV=1.0621, n=3) e inter-días (CV=1.1466, n=6)

Repetibilidad

Se prepararon tres concentraciones de PX en metiletil cetona con tres replicas cada una.

Tabla 9. Repetibilidad del Método 1

Concentración (µg/mL)	1	2	3	Media	SD	CV
5	0.1281	0.1264	0.1249	0.1265	0.0016010	1.2660
20	0.5522	0.5530	0.5475	0.5509	0.0029715	0.5394
50	1.4208	1.4292	1.4108	1.4203	0.0092116	0.6486

El método tiene repetibilidad (CV=0.8180, n=3) al cumplir con CV≤2

Exactitud

La exactitud se evaluó mediante el recobro de 3 diferentes concentraciones de PX en metiletil cetona, las cuales se analizaron por quintuplicado. Se determinó la concentración experimental (C_{exp}) mediante interpolación en la curva de calibración, se comparó con la concentración teórica (C_{teo}) a fin de determinar el % Recuperado.

Tabla 10. Exactitud del Método 1

Concentración ($\mu\text{g/mL}$)	% Recuperado					Media	SD	CV
	1	2	3	4	5			
3	97.9167	101.2731	96.9907	98.4954	96.9097	98.3171	1.7798	1.8102
15	103.8657	102.4537	101.0185	101.4815	100.6481	101.8935	1.2932	1.2692
40	102.7083	104.1667	101.4236	98.8368	100.9635	101.6198	1.9928	1.9611

El método fue exacto ($CV=1.6802$, $n=5$) al cumplir con $CV \leq 2$

Límites

El Límite de cuantificación (LOQ) se calculó en base a la desviación estándar de la respuesta (σ) y la pendiente de la curva de calibración (m). (Ecuación 5)

$$LOQ = \frac{10\sigma}{m} = \frac{10(0.002113)}{0.0288} = 0.7346$$

Ecuación 5. Límite de cuantificación del método 1

Método 2: cuantificación de PX permeado en los estudios in vitro**Selectividad**

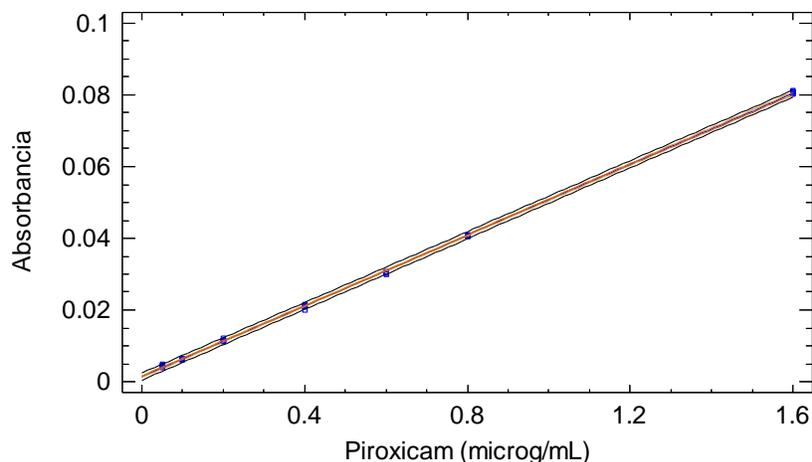
La selectividad se evaluó obteniendo el espectro de absorción del medio de disolución, que corresponde al blanco, así como de los demás componentes presentes en las muestras a analizar, a fin de verificar la ausencia de interferencias a la longitud de onda de estudio.

Linealidad y Rango

Para la determinación de linealidad y rango, se preparó una curva de calibración de PX en la matriz biológica por sextuplicado, a partir de una solución Stock, incluyendo un blanco y 6 diferentes concentraciones.

Tabla 11. Curva de calibración del Método 2

Concentración ($\mu\text{g/mL}$)	1	2	3	4	5	6	Media	SD	CV
0.1	0.0064	0.0065	0.0063	0.0063	0.0060	0.0063	0.0063	0.0001673	6.3000
0.2	0.0112	0.0114	0.0116	0.0112	0.012	0.0115	0.0115	0.0002994	5.7417
0.4	0.0209	0.0215	0.0212	0.0201	0.0208	0.0211	0.0209	0.0004761	5.2333
0.6	0.0306	0.0306	0.0301	0.0301	0.0305	0.0306	0.0304	0.0002483	5.0694
0.8	0.0406	0.0409	0.0405	0.0410	0.0406	0.0405	0.0407	0.0002137	5.0854
1.6	0.0807	0.0802	0.0812	0.0802	0.0810	0.0808	0.0807	0.0004119	5.0427
m	0.0496	0.0491	0.0498	0.0495	0.0497	0.0496	0.0495		
b	0.0012	0.0016	0.0011	0.0010	0.0012	0.0012	0.0012		
R ²	0.9999	0.9999	0.9996	0.9997	0.9996	0.9999	0.9999		



Gráfica 22. Modelo Ajustado al Método 2

Tabla 12. ANOVA del Método 2

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Modelo	0.0257411	1	0.0257411	111714.44	0.0000
Residuo	0.00000921677	40	2.30419E-7		
Total (Corr.)	0.0257504	41			

Coefficiente de Correlación = 0.999821

R-cuadrada = 99.9642 por ciento

R-cuadrado (ajustado para g.l.) = 99.9633 por ciento

Error estándar del est. = 0.00048002

Error absoluto medio = 0.000368412

Estadístico Durbin-Watson = 1.79901 (P=0.2447)

Autocorrelación de residuos en retraso 1 = 0.0617823

Puesto que el valor-P en la tabla ANOVA es menor que 0.05, existe una relación estadísticamente significativa entre Abs y Concentración con un nivel de confianza del 95.0%.

El estadístico R-Cuadrada indica que el modelo ajustado explica 99.9642% de la variabilidad en Absorbancia. El coeficiente de correlación es igual a 0.999821, indicando una relación relativamente fuerte entre las variables. El error estándar del estimado indica que la desviación estándar de los residuos es 0.00048002

El método fue lineal en un rango de 0.1 a 1.6 µg/mL (n=6) (CV=5.4121) (R²=0.9998, ANOVA, α=0.05).

Precisión

A partir de los datos de linealidad, se evaluó la precisión intra-día e inter-día, al determinar el CV, de 6 diferentes concentraciones, por sextuplicado y procesadas durante dos días.

Tabla 13. Precisión del Método 2

Día 1						
Concentración (µg/mL)	1	2	3	Media	SD	CV
0.1	0.0064	0.0065	0.0063	0.0064	1E-04	6.4000
0.2	0.0112	0.0114	0.0116	0.0114	0.0002	5.7000
0.4	0.0209	0.0215	0.0212	0.0212	0.0003	5.3000
0.6	0.0306	0.0306	0.0301	0.0304	0.00028868	5.0722
0.8	0.0406	0.0409	0.0405	0.0407	0.00020817	5.0833
1.6	0.0807	0.0802	0.0812	0.0807	0.0005	5.0438
Día 2						

Concentración (µg/mL)	4	5	6	Media	SD	CV
0.1	0.0063	0.0060	0.0063	0.0062	0.00017321	6.2
0.2	0.0112	0.012	0.0115	0.01156667	0.00040415	5.783
0.4	0.0201	0.0208	0.0211	0.02066667	0.00051316	5.166
0.6	0.0301	0.0305	0.0306	0.0304	0.00026458	5.066
0.8	0.0410	0.0406	0.0405	0.0407	0.00026458	5.087
1.6	0.0802	0.0810	0.0808	0.08066667	0.00041633	5.0416

El método fue preciso al cumplir con CV<15 de manera intra-día (CV=5.4332, n=3) e inter-días (CV=5.4121, n=6)

Repetibilidad

Se prepararon tres concentraciones de PX en matriz biológica, con tres replicas cada una.

Tabla 14. Repetibilidad del Método 2

Concentración (µg/mL)	1	2	3	Media	SD	CV
0.4	0.0209	0.0215	0.0212	0.0212	0.0003000	5.3000
0.8	0.0406	0.0409	0.0405	0.0407	0.0002082	5.0833
1.6	0.0807	0.0802	0.0812	0.0807	0.0005000	5.0438

El método tiene repetibilidad (CV=5.1424, n=3) al cumplir con CV<15

Exactitud

La exactitud se evaluó mediante el recobro de 3 diferentes concentraciones de PX en matriz biológica, las cuales se analizaron por quintuplicado. Se determinó la concentración experimental (C_{exp}) mediante interpolación en la curva de calibración, se comparó con la concentración teórica (C_{teo}) a fin de determinar el % Recuperado.

Tabla 15. Exactitud del Método 2

Concentración (µg/mL)	% Recuperado					Media	SD	CV
	1	2	3	4	5			
0.3	105.7239	103.7037	99.6633	106.3973	103.0303	103.7037	2.6512	2.5564
0.5	98.9899	110.7071	94.5455	103.8384	104.2424	102.4646	6.0781	5.9318
1.2	102.0202	111.6162	110.7744	105.7239	111.4478	108.3165	4.2749	3.9466

El método fue exacto (CV=4.1450, n=5) al cumplir con CV<15

Limites

El Límite de cuantificación (LOQ) se calculó en base a la desviación estándar de la respuesta (σ) y la pendiente de la curva de calibración (m). (Ecuación 6)

$$LOQ = \frac{10\sigma}{m} = \frac{10(0.00020412)}{0.0495} = 0.04123$$

Ecuación 6. Límite de cuantificación del método 2

Método 3: cuantificación de PX retenido en piel en los estudios in vitro

Selectividad

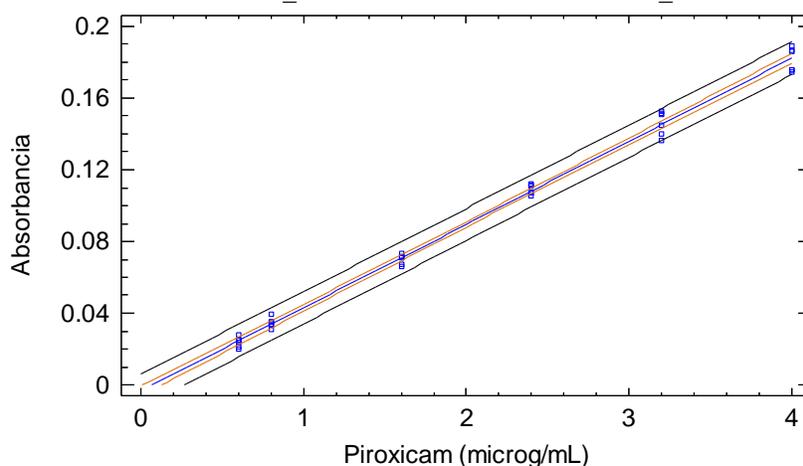
La selectividad se evaluó obteniendo el espectro de absorción del medio de disolución, que corresponde al blanco, así como de los demás componentes presentes en las muestras a analizar, a fin de verificar la ausencia de interferencias a la longitud de onda de estudio.

Linealidad y Rango

Para la determinación de linealidad y rango, se preparó una curva de calibración de PX en la matriz biológica por sextuplicado, a partir de una solución Stock, incluyendo un blanco y 6 diferentes concentraciones.

Tabla 16. Curva de calibración del Método 3

Concentración (µg/mL)	1	2	3	4	5	6	Media	SD	CV
0.6	0.0236	0.0249	0.0279	0.0202	0.0251	0.0213	0.0238	0.0027912	11.7112
0.8	0.0351	0.0391	0.0335	0.0311	0.0349	0.0339	0.0346	0.0026283	7.5962
1.6	0.0674	0.0735	0.0710	0.0660	0.0718	0.0713	0.0702	0.0028556	4.0697
2.4	0.1055	0.1070	0.1116	0.1119	0.1107	0.1072	0.1090	0.0027404	2.5144
3.2	0.1362	0.1451	0.1513	0.1512	0.1529	0.1403	0.1462	0.0068105	4.6593
4	0.1755	0.1743	0.1858	0.1893	0.1868	0.1758	0.1813	0.0067435	3.7205
m	0.044	0.0437	0.0475	0.0501	0.0481	0.0449	0.0464		
b	0.0018	0.0021	0.0028	0.0102	0.0039	0.0027	0.0032		
R ²	0.999	0.998	0.9991	0.999	0.9994	0.9989	0.9998		

**Gráfica 23. Modelo Ajustado al Método 3****Tabla 17. ANOVA del Método 3**

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Modelo	0.11744	1	0.11744	6250.17	0.0000
Residuo	0.000638858	34	0.0000187899		
Total (Corr.)	0.118079	35			

Coefficiente de Correlación = 0.997291

R-cuadrada = 99.459 por ciento

R-cuadrado (ajustado para g.l.) = 99.443 por ciento

Error estándar del est. = 0.00433474

Error absoluto medio = 0.00334151

Estadístico Durbin-Watson = 1.53425 (P=0.0537)

Autocorrelación de residuos en retraso 1 = 0.199177

Puesto que el valor-P en la tabla ANOVA es menor que 0.05, existe una relación estadísticamente significativa entre Absorbancia y Concentración con un nivel de confianza del 95.0%.

El estadístico R-Cuadrada indica que el modelo ajustado explica 99.459% de la variabilidad en Absorbancia. El coeficiente de correlación es igual a 0.997291, indicando una relación relativamente fuerte entre las variables. El error estándar del estimado indica que la desviación estándar de los residuos es 0.00433474.

El método fue lineal en un rango de 0.6 a 4µg/mL (n=6) (CV=5.7120)(R²=0.997, ANOVA, α=0.05).

Precisión

A partir de los datos de linealidad, se evaluó la precisión intra-día e inter-día, al determinar el CV, de 6 diferentes concentraciones, por sextuplicado y procesadas durante dos días.

Tabla 18. Precisión del Método 3

Día 1						
Concentración (µg/mL)	1	2	3	Media	SD	CV
0.6	0.0236	0.0249	0.0279	0.0255	0.0022053	4.2444
0.8	0.0351	0.0391	0.0335	0.0359	0.00288444	4.4875
1.6	0.0674	0.0735	0.0710	0.0706	0.00306649	4.4146
2.4	0.1055	0.1070	0.1116	0.1080	0.00317857	4.5014
3.2	0.1362	0.1451	0.1513	0.1442	0.00759013	4.5063
4	0.1755	0.1743	0.1858	0.1785	0.00632166	4.4633
Día 2						
Concentración (µg/mL)	4	5	6	Media	SD	CV
0.6	0.0202	0.0251	0.0213	0.0222	0.00257099	3.7000
0.8	0.0311	0.0349	0.0339	0.0333	0.00196977	4.1625
1.6	0.0660	0.0718	0.0713	0.0697	0.00321403	4.3563
2.4	0.1119	0.1107	0.1072	0.1099	0.00244199	4.5806
3.2	0.1512	0.1529	0.1403	0.1481	0.00683691	4.6292
4	0.1893	0.1868	0.1758	0.1840	0.00718215	4.5992

El método fue preciso al cumplir con $CV < 15$ de manera intra-día ($CV = 4.4363$, $n = 3$) e inter-días ($CV = 4.3871$, $n = 6$)

Repetibilidad

Se prepararon tres concentraciones de PX en matriz biológica, con tres replicas cada una.

Tabla 19. Repetibilidad del Método 3

Concentración (µg/mL)	1	2	3	Media	SD	CV
0.6	0.0236	0.0249	0.0279	0.0255	0.0022053	4.2444
2.4	0.1055	0.1070	0.1116	0.1080	0.0031786	4.5014
4	0.1755	0.1743	0.1858	0.1785	0.0063217	4.4633

El método tiene repetibilidad ($CV = 4.4031$, $n = 3$) al cumplir con $CV < 15$

Exactitud

La exactitud se evaluó mediante el recobro de 3 diferentes concentraciones de PX en matriz biológica, las cuales se analizaron por quintuplicado. Se determinó la concentración experimental (C_{exp}) mediante interpolación en la curva de calibración, se comparó con la concentración teórica (C_{teo}) a fin de determinar el % Recuperado.

Tabla 20. Exactitud del Método 3

Concentración (µg/mL)	% Recuperado					Media	SD	CV
	1	2	3	4	5			
1.2	100.3951	90.3376	105.4239	97.3420	95.9052	97.8807	5.5747	5.6954
2	104.2026	115.0862	105.3879	104.2996	115.6250	108.9203	5.8961	5.4132
3.6	98.0603	99.2577	100.9339	96.5038	106.6212	100.2754	3.9009	3.8902

El método fue exacto ($CV = 4.9996$, $n = 5$) al cumplir con $CV < 15$

Limites

El Límite de cuantificación (LOQ) se calculó en base a la desviación estándar de la respuesta (σ) y la pendiente de la curva de calibración (m). (Ecuación 7)

$$LOQ = \frac{10\sigma}{m} = \frac{10(0.003161)}{0.0464} = 0.6814$$

Ecuación 7. Límite de cuantificación del método 3

ANEXO II. CINÉTICAS DE PERMEACIÓN IN VITRO

Se realizaron estudios *in vitro* de la cinética de permeación de PX en celdas de difusión tipo Franz, para cada formulación (NPs, ME1 y ME2) por sextuplicado.

Microemulsión 1

Tabla 21. Permeación de ME1 sin microagujas

Tiempo (h)	Piroxicam Permeado(μ g) sin Microagujas						Media	SD
	1	2	3	4	5	6		
0.5	-2.7253	0.6970	-4.2990	3.3778	-6.5636	-3.9030		
1	0.5061	14.6333	-1.0566	11.3172	1.0172	-0.7172		
2	0.6566	19.5636	0.0677	19.2646	4.6010	3.5404		
3	1.2040	21.5333	-0.2121	24.8535	6.8949	7.6141		
4	2.3747	19.1848	-0.2081	35.8061	4.6717	4.8859		
5	7.9848	24.9859	3.6869	66.0364	11.4051	13.5152		
6	17.8556	39.5111	10.9384	76.0909	25.7404	25.7879		
7	27.4919	59.9071	22.5717	76.2949	41.5040	44.6071		
8	22.8051	77.0030	37.7919	88.5091	34.5515	52.3030	52.1606	25.7552

Tabla 22. Permeación de ME1 con microagujas

Tiempo (h)	Piroxicam Permeado(μ g) con Microagujas						Media	SD
	1	2	3	4	5	6		
0.5	0.5758	1.2545	3.9152	4.6465	-0.2509	0.0768		
0.75	3.8596	6.1929	14.4768	10.5737	4.4440	9.6141		
1	7.2535	13.7556	16.5667	16.6202	11.2872	14.1333		
2	12.9091	16.1707	15.8303	20.1667	13.0345	12.4818		
3	20.4717	25.2636	31.4808	26.0566	19.9013	18.0283		
4	30.7323	29.9273	33.6525	41.6081	13.7879	28.8303		
5	42.3626	48.2495	38.6152	45.5596	27.4343	39.4162		
6	63.8182	63.2919	53.3131	110.1778	53.7606	68.5737		
7	102.9091	87.8586	82.2121	141.3636	110.3737	126.4444		
8	121.8384	101.0505	108.2626	149.1818	206.5152	175.4747	143.7205	41.3234

Tabla 23. Parámetros de ME1 sin microagujas

Sin microagujas								
Parámetro	1	2	3	4	5	6	Media	SD
Flujo 1 (J1)	0.0657	1.3799	0.2672	1.5591	0.5535	0.8497	0.8896	0.7025
Kp 1 (J1/C)	0.00003285	0.000689	0.000133	0.000779	0.000276	0.000424	0.0004	0.0004
t lag	-0.2602	-0.3005	2.5939	-0.1512	0.5808	1.2629	-0.0328	no hay
Flujo 2 (J2)	1.1370	2.8357	2.1462	2.1785	1.6925	2.3718	2.0603	0.5844
Kp (J2/C)	0.0006	0.0014	0.0011	0.0011	0.0008	0.0012	0.0010	0.0003

Tabla 24. Parámetros de ME1 con microagujas

Con microagujas								
Parámetro	1	2	3	4	5	6	Media	SD
Flujo1 (J1)	1.4156	1.5916	1.5854	1.4097	1.0847	0.9481	1.3392	0.2657
Kp1 (J1/C)	0.000707	0.0007958	0.0007927	0.00070485	0.000542	0.000474	0.0007	0.0001
t latencia	0.2507	-0.0324	-0.5047	-0.6359	-0.4250	-0.7087	-0.3427	no hay
Flujo2 (J2)	4.5723	3.4252	3.6317	5.8567	8.8221	7.1632	5.5785	2.1236
Kp (J2/C)	0.0023	0.0017	0.0018	0.0029	0.0044	0.0036	0.0028	0.0011

Microemulsión 2**Tabla 25. Permeación de ME2 sin microagujas**

Piroxicam Permeado(μ g) sin Microagujas								
Tiempo (h)	1	2	3	4	5	6		
0.5	0.3071	0.7899	0.1919	1.3010	2.0727	0.5758		
0.75	1.3778	1.7808	0.8515	2.3919	4.4444	1.3263		
1	2.0364	3.2455	1.4576	3.2525	5.2737	3.1990		
2	2.6737	4.6152	2.0273	4.1788	5.8253	3.9152		
3	3.7990	6.1343	2.2515	4.9374	7.0859	5.5616		
4	4.8414	7.2253	2.5091	6.6354	7.5121	6.2030		
5	5.4162	8.6899	2.7172	7.3162	8.4313	8.0707		
6	6.5818	11.2212	3.5596	9.0152	9.7535	8.1909		
7	8.6020	11.2485	4.0960	11.8424	10.2859	6.2758	Media	SD
8	9.1737	12.0495	5.0222	13.8202	10.9253	7.9121	9.8172	3.1391

Tabla 26. Permeación de ME2 con microagujas

Piroxicam Permeado(μ g) con Microagujas								
Tiempo (min)	1	2	3	4	5	6		
0.5	2.2768	0.8828	1.9192	3.9960	3.9535	1.3434		
0.75	4.1162	1.9747	3.4101	6.1717	10.0717	2.6980		
1	6.2939	0.5333	5.9586	10.7192	11.0303	11.6949		
2	7.6889	4.7101	7.1566	12.0202	8.3182	13.2303		
3	8.1212	7.7879	7.8869	17.7798	17.1333	16.9030		
4	9.9788	6.3414	11.1323	16.5657	19.8687	18.4172		
5	11.0768	9.2263	10.7556	17.6444	20.4859	21.0192		
6	13.3596	14.0091	11.2212	19.8030	20.7576	22.1384		
7	15.0323	19.1000	14.8869	19.0515	21.4465	23.2636	Media	SD
8	16.3000	20.5808	20.5505	29.0091	27.1283	28.9121	23.7468	5.3198

Tabla 27. Parámetros de ME2 sin microagujas

Sin microagujas								
Parámetro	1	2	3	4	5	6	Media	SD
Flujo1 (J1)	0.2272	0.3762	0.1389	0.2443	0.2949	0.3442	0.2710	0.0861
Kp1 (J1/C)	0.000113	0.000188	0.000069	0.000122	0.000147	0.000172	0.000135	0.000043
t latencia	-0.24031	-0.2086	-0.3887	-1.02660	-1.7049	-0.1452	-0.7951	no hay
Flujo2 (J2)	0.2232	0.2299	0.1206	0.3559	0.1635	0.0306	0.1873	0.1105
Kp2 (J2/C)	0.00011	0.000114	0.000060	0.000177	0.000081	0.000015	0.000093	0.000055

Tabla 28. Parámetros de ME2 con microagujas

Con Microagujas								
Parámetro	1	2	3	4	5	6	Media	SD
Flujo1 (J1)	0.3916	0.5344	0.4060	0.9299	0.6729	1.0972	0.6720	0.2883
Kp1 (J1/C)	0.0001958	0.0002672	0.000203	0.00046495	0.00033645	0.0005486	0.0003	0.000144
t latencia	-1.2913	0.3300	-0.9931	-0.6032	-1.3774	-0.1248	-0.7355	no hay
Flujo2 (J2)	0.3126	0.7224	0.4326	0.4952	0.2916	0.4376	0.4487	0.1553
Kp2 (J2/C)	0.0001563	0.0003612	0.0002163	0.0002476	0.0001458	0.000218	0.0002	0.000077

Nanopartículas**Tabla 29. Permeación de NPs sin microagujas**

Piroxicam Permeado(μ g) sin Microagujas								
Tiempo (h)	1	2	3	4	5	6		
0.5	10.5010	4.1071	11.0929	9.0141	19.6909	1.8586		
0.75	13.2525	6.8838	15.6394	13.8444	23.1646	4.3596		
1	14.7828	9.3838	16.4394	13.6545	29.0626	9.3313		
2	16.2636	10.4121	23.1616	15.1727	29.8737	10.2687		
3	17.1505	11.8828	27.6131	16.6152	34.7475	11.0677		
4	18.1606	14.0818	32.0949	17.2980	39.5081	10.6646		
5	20.9818	16.8303	32.4192	18.9687	54.5556	15.8990		
6	23.0798	19.1414	42.2626	23.2273	52.9293	17.7343		
7	28.6394	21.2485	52.3030	26.4162	61.3434	26.4848	Media	SD
8	30.2707	20.2667	46.4444	26.6566	52.4848	26.5869	33.7850	12.7095958

Tabla 30. Permeación de NPs con microagujas

Piroxicam Permeado(μ g) con Microagujas						
Tiempo (h)	1	2	3	4	5	6
0.5	5.1434	5.7152	13.9394	2.5333	9.2121	7.3879
0.75	9.3172	9.1101	17.0384	3.3253	11.7394	12.6434
1	11.1687	17.4545	22.2222	6.2879	11.9364	18.6394
2	16.6232	23.3212	36.1394	9.7040	22.5960	19.8990
3	22.8404	33.7384	36.2505	8.9677	27.4556	24.2657
4	32.3131	32.8697	43.9556	16.2020	24.3636	31.5232

5	37.9616	47.1091	58.1010	13.7707	28.7970	43.0000		
6	48.1232	62.0808	78.6768	19.6414	40.6838	61.2626		
7	48.7879	76.9899	84.5455	32.8606	48.1919	63.9798	Media	SD
8	46.5051	77.5859	89.6465	33.8404	66.2626	85.7273	66.5946	22.337381

Tabla 31. Parámetros de NPs sin microagujas

Sin Microagujas								
Parámetro	1	2	3	4	5	6	Media	SD
Flujo1 (J1)	0.4215	0.4907	1.1676	0.4249	0.9763	0.6039	0.6808	0.3159
Kp1 (J1/C)	0.000210	0.0002453	0.000583	0.000212	0.000488	0.000301	0.0003	0.000157
t latencia	-4.9803	-1.8257	-1.581	-4.605	-3.8181	-0.8509	-3.807	no hay
Flujo2 (J2)	0.6004	0.3162	0.9151	0.4928	0.6167	0.7992	0.6234	0.2135
Kp2 (J2/C)	0.00030	0.000158	0.00045	0.000246	0.0003083	0.000399	0.0003	0.000106

Tabla 32. Parámetros de NPs con microagujas

Con Microagujas								
Parámetro	1	2	3	4	5	6	Media	SD
Flujo1 (J1)	1.2313	1.9912	1.7913	0.5113	1.4298	1.0644	1.3366	0.5311
Kp1 (J1/C)	0.0006156	0.000995	0.0008956	0.0002556	0.000714	0.000532	0.0007	0.00026
t latencia	-0.5413	-0.2401	-1.1910	-0.8204	-0.7350	-1.4815	-0.5843	no hay
Flujo2 (J2)	0.7385	2.2472	2.2192	1.0240	1.9436	2.4370	1.7683	0.7106
Kp2 (J2/C)	0.00036925	0.0011236	0.0011096	0.000512	0.0009718	0.0012185	0.0009	0.00035

ANEXO III. EXTRACCIÓN DE PIROXICAM REMANENTE EN PIEL**Microemulsión 1****Tabla 33. Piroxicam extraído de ME1**

celda	Piroxicam (μg)	
	Sin Microagujas	Con Microagujas
1	31.8966	70.0431
2	24.3534	50.4310
3	43.9655	47.6293
4	22.6293	54.9569
5	31.0345	61.2069
6	28.4483	69.3966
Media	30.3879	58.9440
SD	7.5818	9.5284

Microemulsión 2**Tabla 34. Piroxicam extraído de ME2**

celda	Piroxicam (μg)	
	Sin Microagujas	Con Microagujas
1	19.4828	20.0431
2	15.2155	21.3362
3	16.4009	17.8879
4	26.9397	23.9224
5	33.9224	34.9138
6	6.2284	31.0345
Media	19.6983	24.8563
SD	9.6666	6.6979

Nanopartículas**Tabla 35. Piroxicam extraído de NPs**

celda	Piroxicam (μg)	
	Sin Microagujas	Con Microagujas
1	19.1810	39.4397
2	20.4741	52.5862
3	17.0259	16.3793
4	23.0603	57.7586
5	34.0517	25.2155
6	30.1724	75.2155
Media	23.9943	44.4325
SD	6.6979	21.7847

ANEXO IV. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Análisis Inter-sistemas: Piroxicam total permeado sin microagujas

Muestra 1: ME1 SIN

Muestra 2: ME2 SIN

Muestra 3: NP SIN

Muestra 1: 6 valores en el rango de 22.8051 a 88.5091

Muestra 2: 6 valores en el rango de 5.02222 a 13.8202

Muestra 3: 6 valores en el rango de 20.2667 a 52.4848

Tabla 36. ANOVA inter-sistemas sin microagujas

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	5410.17	2	2705.09	9.72	0.0020
Intra grupos	4173.61	15	278.24		
Total (Corr.)	9583.78	17			

La razón-F, que en este caso es igual a 9.72212, es el cociente entre el estimado entre-grupos y el estimado dentro-de-grupos. Puesto que el valor-P de la prueba-F es menor que 0.05, existe una diferencia estadísticamente significativa entre las medias de las 3 variables con un nivel del 95.0% de confianza.

Tabla 37. Prueba de Múltiples Rangos inter-sistemas sin microagujas

	Casos	Media	Grupos Homogéneos
ME2 SIN	6	9.81717	X
NP SIN	6	33.785	X
ME1 SIN	6	52.1606	X

Tabla 38. Contrastes inter-sistemas sin microagujas

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
ME1 SIN - ME2 SIN	*	42.3434	20.527
ME1 SIN - NP SIN		18.3756	20.527
ME2 SIN - NP SIN	*	-23.9678	20.527

* indica una diferencia significativa.

El asterisco que se encuentra al lado de los 2 pares indica que estos pares muestran diferencias estadísticamente significativas con un nivel del 95.0% de confianza. No existen diferencias estadísticamente significativas entre aquellos niveles que compartan una misma columna de X's. El método empleado actualmente para discriminar entre las medias es el procedimiento de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher.

Análisis Inter-sistemas: Piroxicam total permeado sin microagujas

Muestra 1: ME1 CON

Muestra 2: ME2 CON

Muestra 3: NP CON

Muestra 1: 6 valores en el rango de 101.051 a 206.515

Muestra 2: 6 valores en el rango de 16.3 a 29.0091

Muestra 3: 6 valores en el rango de 33.8404 a 89.6465

Tabla 39. ANOVA inter-sistemas con microagujas

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	44356.1	2	22178.0	29.77	0.0000
Intra grupos	11174.4	15	744.962		
Total (Corr.)	55530.5	17			

La razón-F, que en este caso es igual a 29.7707, es el cociente entre el estimado entre-grupos y el estimado dentro-de-grupos. Puesto que el valor-P de la prueba-F es menor que 0.05, existe una diferencia estadísticamente significativa entre las medias de las 3 variables con un nivel del 95.0% de confianza.

Tabla 40. Prueba de Múltiples Rangos inter-sistemas sin microagujas

	Casos	Media	Grupos Homogéneos
ME2 CON	6	23.7468	X
NP CON	6	66.5946	X
ME1 CON	6	143.721	X

Tabla 41. Contrastes inter-sistemas con microagujas

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
ME1 CON - ME2 CON	*	119.974	33.5879
ME1 CON - NP CON	*	77.1259	33.5879
ME2 CON - NP CON	*	-42.8478	33.5879

* indica una diferencia significativa.

El asterisco que se encuentra al lado de los 3 pares indica que estos pares muestran diferencias estadísticamente significativas con un nivel del 95.0% de confianza. El método empleado actualmente para discriminar entre las medias es el procedimiento de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher.

Análisis Intra-sistemas: Piroxicam total permeado con y sin microagujas

Muestra 1: ME1 CON

Muestra 2: ME1 SIN

Muestra 3: ME2 CON

Muestra 4: ME2 SIN

Muestra 5: NP CON

Muestra 6: NP SIN

Muestra 1: 6 valores en el rango de 101.051 a 206.515

Muestra 2: 6 valores en el rango de 22.8051 a 88.5091

Muestra 3: 6 valores en el rango de 16.3 a 29.0091

Muestra 4: 6 valores en el rango de 5.02222 a 13.8202

Muestra 5: 6 valores en el rango de 33.8404 a 89.6465

Muestra 6: 6 valores en el rango de 20.2667 a 52.4848

Tabla 42. ANOVA intra-sistemas

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	68892.9	5	13778.6	26.93	0.0000
Intra grupos	15348.0	30	511.601		
Total (Corr.)	84241.0	35			

La razón-F, que en este caso es igual a 26.9323, es el cociente entre el estimado entre-grupos y el estimado dentro-de-grupos. Puesto que el valor-P de la prueba-F es menor que 0.05, existe una diferencia estadísticamente significativa entre las medias de las 6 variables con un nivel del 95.0% de confianza.

Tabla 43. Prueba de Múltiples Rangos intra-sistemas

	Casos	Media	Grupos Homogéneos
ME2 SIN	6	9.81717	X
ME2 CON	6	23.7468	X
NP SIN	6	33.785	XX
ME1 SIN	6	52.1606	XX
NP CON	6	66.5946	X
ME1 CON	6	143.721	X

Tabla 44. Contrastes intra-sistemas

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
ME1 CON - ME1 SIN	*	91.5599	26.6698
ME1 CON - ME2 CON	*	119.974	26.6698
ME1 CON - ME2 SIN	*	133.903	26.6698
ME1 CON - NP CON	*	77.1259	26.6698
ME1 CON - NP SIN	*	109.936	26.6698

ME1 SIN - ME2 CON	*	28.4138	26.6698
ME1 SIN - ME2 SIN	*	42.3434	26.6698
ME1 SIN - NP CON		-14.434	26.6698
ME1 SIN - NP SIN		18.3756	26.6698
ME2 CON - ME2 SIN		13.9296	26.6698
ME2 CON - NP CON	*	-42.8478	26.6698
ME2 CON - NP SIN		-10.0382	26.6698
ME2 SIN - NP CON	*	-56.7774	26.6698
ME2 SIN - NP SIN		-23.9678	26.6698
NP CON - NP SIN	*	32.8096	26.6698

* indica una diferencia significativa.

El asterisco que se encuentra al lado de los 10 pares indica que estos pares muestran diferencias estadísticamente significativas con un nivel del 95.0% de confianza. No existen diferencias estadísticamente significativas entre aquellos niveles que compartan una misma columna de X's. El método empleado actualmente para discriminar entre las medias es el procedimiento de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher.

Análisis Intra-sistema: Microemulsion 1

Muestra 1: ME1 SIN

Muestra 2: ME1 CON

Muestra 1: 6 valores en el rango de 22.8051 a 88.5091

Muestra 2: 6 valores en el rango de 101.051 a 206.515

Comparación de Medias

Intervalos de confianza del 95.0% para la media de ME1 SIN: 52.1606 +/- 27.0286 [25.132, 79.1892]

Intervalos de confianza del 95.0% para la media de ME1 CON: 143.721 +/- 43.3664 [100.354, 187.087]

Intervalos de confianza del 95.0% intervalo de confianza para la diferencia de medias
suponiendo varianzas iguales: -91.5599 +/- 44.2925 [-135.852, -47.2675]

Prueba t para comparar medias

Hipótesis nula: media1 = media2

Hipótesis Alt.: media1 <> media2

suponiendo varianzas iguales: t = -4.60595 valor-P = 0.000971239

Se rechaza la hipótesis nula para alfa = 0.05.

Puesto que el intervalo no contiene el valor 0, existe una diferencia estadísticamente significativa entre las medias de las dos muestras, con un nivel de confianza del 95.0%.

Puesto que el valor-P calculado es menor que 0.05, se puede rechazar la hipótesis nula en favor de la alterna.

Análisis Intra-sistema: Microemulsion 2

Muestra 1: ME2 CON

Muestra 2: ME2 SIN

Muestra 1: 6 valores en el rango de 16.3 a 29.0091

Muestra 2: 6 valores en el rango de 5.02222 a 13.8202

Comparación de Medias

Intervalos de confianza del 95.0% para la media de ME2 CON: 23.7468 +/- 5.5828 [18.164, 29.3296]

Intervalos de confianza del 95.0% para la media de ME2 SIN: 9.81717 +/- 3.29431 [6.52287, 13.1115]

Intervalos de confianza del 95.0% intervalo de confianza para la diferencia de medias
suponiendo varianzas iguales: 13.9296 +/- 5.61874 [8.31088, 19.5484]

Prueba t para comparar medias

Hipótesis nula: media1 = media2

Hipótesis Alt.: media1 <> media2

suponiendo varianzas iguales: $t = 5.52387$ valor-P = 0.000253178
Se rechaza la hipótesis nula para $\alpha = 0.05$.

Puesto que el intervalo no contiene el valor 0, existe una diferencia estadísticamente significativa entre las medias de las dos muestras, con un nivel de confianza del 95.0%.

Puesto que el valor-P calculado es menor que 0.05, se puede rechazar la hipótesis nula en favor de la alterna.

Comparación de Medianas
Mediana de muestra 1: 23.8545
Mediana de muestra 2: 10.0495

Prueba W de Mann-Whitney (Wilcoxon) para comparar medianas
Hipótesis Nula: mediana1 = mediana2
Hipótesis Alt.: mediana1 \neq mediana2

Rango Promedio de muestra 1: 9.5
Rango Promedio de muestra 2: 3.5

$W = -18.0$ valor-P = 0.00507498
Se rechaza la hipótesis nula para $\alpha = 0.05$.

Debido a que el valor-P es menor que 0.05, existe una diferencia estadísticamente significativa entre las medianas con un nivel de confianza del 95.0%.

Análisis Intra-sistema: Nanoparticulas

Muestra 1: NP CON
Muestra 2: NP SIN
Muestra 1: 6 valores en el rango de 33.8404 a 89.6465
Muestra 2: 6 valores en el rango de 20.2667 a 52.4848

Comparación de Medias
Intervalos de confianza del 95.0% para la media de NP CON: 66.5946 +/- 23.4417 [43.1529, 90.0363]
Intervalos de confianza del 95.0% para la media de NP SIN: 33.785 +/- 13.3379 [20.4471, 47.123]
Intervalos de confianza del 95.0% intervalo de confianza para la diferencia de medias
suponiendo varianzas iguales: 32.8096 +/- 23.3777 [9.43191, 56.1873]

Prueba t para comparar medias

Hipótesis nula: media1 = media2
Hipótesis Alt.: media1 \neq media2
suponiendo varianzas iguales: $t = 3.12711$ valor-P = 0.0107433
Se rechaza la hipótesis nula para $\alpha = 0.05$.

Puesto que el intervalo no contiene el valor 0, existe una diferencia estadísticamente significativa entre las medias de las dos muestras, con un nivel de confianza del 95.0%.

Puesto que el valor-P calculado es menor que 0.05, se puede rechazar la hipótesis nula en favor de la alterna.

Análisis de de Flujos y Kp: Microemulsion 1

Muestra 1: J1 CON
Muestra 2: J1 SIN
Muestra 3: J2 SIN
Muestra 4: J2 CON
Muestra 1: 6 valores en el rango de 0.9481 a 1.5916
Muestra 2: 4 valores en el rango de 0.0657 a 1.5591
Muestra 3: 6 valores en el rango de 1.137 a 2.8357
Muestra 4: 6 valores en el rango de 3.4252 a 8.8221

Tabla 45. ANOVA de Flujos para ME1

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	76.2159	3	25.4053	17.53	0.0000
Intra grupos	26.0894	18	1.44941		
Total (Corr.)	102.305	21			

Puesto que el valor-P de la prueba-F es menor que 0.05, existe una diferencia estadísticamente significativa entre las medias de las 4 variables con un nivel del 95.0% de confianza.

Tabla 46. Prueba de Múltiples Rangos para Flujos ME1

	Casos	Media	Grupos Homogéneos
J1 SIN	4	0.88955	X
J1 CON	6	1.33918	X
J2 SIN	6	2.06028	X
J2 CON	6	5.57853	X

Tabla 47. Contrastes para flujos ME1

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
J1 CON - J1 SIN		0.449633	1.63268
J1 CON - J2 SIN		-0.7211	1.46031
J1 CON - J2 CON	*	-4.23935	1.46031
J1 SIN - J2 SIN		-1.17073	1.63268
J1 SIN - J2 CON	*	-4.68898	1.63268
J2 SIN - J2 CON	*	-3.51825	1.46031

* indica una diferencia significativa.

El asterisco que se encuentra al lado de los 3 pares indica que estos pares muestran diferencias estadísticamente significativas con un nivel del 95.0% de confianza. No existen diferencias estadísticamente significativas entre aquellos niveles que compartan una misma columna de X's. El método empleado actualmente para discriminar entre las medias es el procedimiento de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher.

Muestra 1: kp1

Muestra 2: kp1 con

Muestra 3: kp2

Muestra 4: kp2 con

Muestra 1: 4 valores en el rango de 0.00003285 a 0.00077955

Muestra 2: 6 valores en el rango de 0.00047405 a 0.0007958

Muestra 3: 6 valores en el rango de 0.0005685 a 0.00141785

Muestra 4: 6 valores en el rango de 0.0017 a 0.0044

Tabla 48. ANOVA de Kp para ME1

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	0.0000189485	3	0.00000631615	17.35	0.0000
Intra grupos	0.00000655349	18	3.64083E-7		
Total (Corr.)	0.000025502	21			

La razón-F, que en este caso es igual a 17.3481, es el cociente entre el estimado entre-grupos y el estimado dentro-de-grupos. Puesto que el valor-P de la prueba-F es menor que 0.05, existe una diferencia estadísticamente significativa entre las medias de las 4 variables con un nivel del 95.0% de confianza.

Tabla 49. Prueba de Múltiples Rangos para Kp ME1

	Casos	Media	Grupos Homogéneos
kp1	4	0.000444775	X
kp1 con	6	0.000669592	X
kp2	6	0.00103014	X
kp2 con	6	0.00278333	X

Tabla 50. Contrastes para Kp ME1

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
kp1 - kp1 con		-0.000224817	0.000818287
kp1 - kp2		-0.000585367	0.000818287
kp1 - kp2 con	*	-0.00233856	0.000818287
kp1 con - kp2		-0.00036055	0.000731898
kp1 con - kp2 con	*	-0.00211374	0.000731898
kp2 - kp2 con	*	-0.00175319	0.000731898

* indica una diferencia significativa.

Esta tabla aplica un procedimiento de comparación múltiple para determinar cuáles medias son significativamente diferentes de otras. El asterisco que se encuentra al lado de los 3 pares indica que estos pares muestran diferencias estadísticamente significativas con un nivel del 95.0% de confianza. No existen diferencias estadísticamente significativas entre aquellos niveles que compartan una misma columna de X's. El método empleado actualmente para discriminar entre las medias es el procedimiento de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher.

Muestra 1: PIEL CON

Muestra 2: PIEL SIN

Muestra 3: RECEPTOR CON

Muestra 4: RECEPTOR SIN

Muestra 1: 6 valores en el rango de 47.6293 a 70.0431

Muestra 2: 6 valores en el rango de 22.6293 a 43.9655

Muestra 3: 6 valores en el rango de 101.051 a 206.515

Muestra 4: 6 valores en el rango de 22.8051 a 88.5091

Tabla 51. ANOVA de PX total en receptor y piel para ME1

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	44625.1	3	14875.0	23.62	0.0000
Intra grupos	12596.2	20	629.809		
Total (Corr.)	57221.3	23			

La razón-F, que en este caso es igual a 23.6183, es el cociente entre el estimado entre-grupos y el estimado dentro-de-grupos. Puesto que el valor-P de la prueba-F es menor que 0.05, existe una diferencia estadísticamente significativa entre las medias de las 4 variables con un nivel del 95.0% de confianza.

Tabla 52. Prueba de Múltiples Rangos para PX total en receptor y piel para ME1

	Casos	Media	Grupos Homogéneos
PIEL SIN	6	30.3879	X
RECEPTOR SIN	6	52.1606	X
PIEL CON	6	58.944	X
RECEPTOR CON	6	143.721	X

Tabla 53. Contrastes para PX total en receptor y piel para ME1

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
PIEL CON - PIEL SIN		28.556	30.224
PIEL CON - RECEPTOR CON	*	-84.7766	30.224
PIEL CON - RECEPTOR SIN		6.78336	30.224
PIEL SIN - RECEPTOR CON	*	-113.333	30.224
PIEL SIN - RECEPTOR SIN		-21.7727	30.224
RECEPTOR CON - RECEPTOR SIN	*	91.5599	30.224

* indica una diferencia significativa.

El asterisco que se encuentra al lado de los 3 pares indica que estos pares muestran diferencias estadísticamente significativas con un nivel del 95.0% de confianza. No existen diferencias estadísticamente significativas entre aquellos niveles que compartan una misma columna de X's. El método empleado actualmente para discriminar entre las medias es el procedimiento de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher.

Microemulsion 2

Muestra 1: J1 CON

Muestra 2: J1 SIN

Muestra 3: J2 CON

Muestra 4: J2 SIN

Muestra 1: 6 valores en el rango de 0.3916 a 1.0972

Muestra 2: 6 valores en el rango de 0.1389 a 0.3762

Muestra 3: 6 valores en el rango de 0.2916 a 0.7224

Muestra 4: 6 valores en el rango de 0.0306 a 0.3559

Tabla 54. ANOVA de Flujos para ME2

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	0.828861	3	0.276287	8.71	0.0007
Intra grupos	0.63446	20	0.031723		
Total (Corr.)	1.46332	23			

La razón-F, que en este caso es igual a 8.70935, es el cociente entre el estimado entre-grupos y el estimado dentro-de-grupos. Puesto que el valor-P de la prueba-F es menor que 0.05, existe una diferencia estadísticamente significativa entre las medias de las 4 variables con un nivel del 95.0% de confianza.

Tabla 55. Prueba de Múltiples Rangos para Flujos ME2

	Casos	Media	Grupos Homogéneos
J2 SIN	6	0.187283	X
J1 SIN	6	0.27095	XX
J2 CON	6	0.448667	X
J1 CON	6	0.672	X

Tabla 56. Contrastes para flujos ME2

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
J1 CON - J1 SIN	*	0.40105	0.214503
J1 CON - J2 CON	*	0.223333	0.214503
J1 CON - J2 SIN	*	0.484717	0.214503
J1 SIN - J2 CON		-0.177717	0.214503
J1 SIN - J2 SIN		0.0836667	0.214503
J2 CON - J2 SIN	*	0.261383	0.214503

* indica una diferencia significativa.

El asterisco que se encuentra al lado de los 4 pares indica que estos pares muestran diferencias estadísticamente significativas con un nivel del 95.0% de confianza. No existen diferencias estadísticamente significativas entre aquellos niveles que compartan una misma columna de X's. El método empleado actualmente para discriminar entre las medias es el procedimiento de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher.

Muestra 1: Kp1 CON

Muestra 2: Kp1 SIN

Muestra 3: Kp2 CON

Muestra 4: Kp2 SIN

Muestra 1: 6 valores en el rango de 0.0001958 a 0.0005486

Muestra 2: 6 valores en el rango de 0.00006945 a 0.0001881

Muestra 3: 6 valores en el rango de 0.0001458 a 0.0003612

Muestra 4: 6 valores en el rango de 0.0000153 a 0.00017795

Tabla 57. ANOVA de Kp para ME2

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	2.07215E-7	3	6.90717E-8	8.71	0.0007
Intra grupos	1.58615E-7	20	7.93075E-9		
Total (Corr.)	3.6583E-7	23			

La razón-F, que en este caso es igual a 8.70935, es el cociente entre el estimado entre-grupos y el estimado dentro-de-grupos. Puesto que el valor-P de la prueba-F es menor que 0.05, existe una diferencia estadísticamente significativa entre las medias de las 4 variables con un nivel del 95.0% de confianza.

Tabla 58. Prueba de Múltiples Rangos para Kp ME2

	Casos	Media	Grupos Homogéneos
Kp2 SIN	6	0.0000936417	X
Kp1 SIN	6	0.000135475	XX
Kp2 CON	6	0.000224333	X
Kp1 CON	6	0.000336	X

Tabla 59. Contrastes para Kp ME2

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
Kp1 CON - Kp1 SIN	*	0.000200525	0.000107252
Kp1 CON - Kp2 CON	*	0.000111667	0.000107252
Kp1 CON - Kp2 SIN	*	0.000242358	0.000107252
Kp1 SIN - Kp2 CON		-0.0000888583	0.000107252
Kp1 SIN - Kp2 SIN		0.0000418333	0.000107252
Kp2 CON - Kp2 SIN	*	0.000130692	0.000107252

* indica una diferencia significativa.

El asterisco que se encuentra al lado de los 4 pares indica que estos pares muestran diferencias estadísticamente significativas con un nivel del 95.0% de confianza. No existen diferencias estadísticamente significativas entre aquellos niveles que compartan una misma columna de X's. El método empleado actualmente para discriminar entre las medias es el procedimiento de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher.

Muestra 1: PIEL CON

Muestra 2: PIEL SIN

Muestra 3: RECEPTOR CON

Muestra 4: RECEPTOR SIN

Muestra 1: 6 valores en el rango de 17.8879 a 34.9138

Muestra 2: 6 valores en el rango de 6.2284 a 33.9224

Muestra 3: 6 valores en el rango de 16.3 a 29.0091

Muestra 4: 6 valores en el rango de 5.02222 a 13.8202

Tabla 60. ANOVA de PX total en receptor y piel para ME2

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	843.111	3	281.037	6.37	0.0033
Intra grupos	882.299	20	44.1149		
Total (Corr.)	1725.41	23			

La razón-F, que en este caso es igual a 6.37056, es el cociente entre el estimado entre-grupos y el estimado dentro-de-grupos. Puesto que el valor-P de la prueba-F es menor que 0.05, existe una diferencia estadísticamente significativa entre las medias de las 4 variables con un nivel del 95.0% de confianza.

Tabla 61. Prueba de Múltiples Rangos para PX total en receptor y piel para ME2

	Casos	Media	Grupos Homogéneos
RECEPTOR SIN	6	9.81717	X
PIEL SIN	6	19.6983	X
RECEPTOR CON	6	23.7468	X
PIEL CON	6	24.8563	X

Tabla 62. Contrastes para PX total en receptor y piel para ME2

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
PIEL CON - PIEL SIN		5.15804	7.99908
PIEL CON - RECEPTOR CON		1.10952	7.99908
PIEL CON - RECEPTOR SIN	*	15.0392	7.99908
PIEL SIN - RECEPTOR CON		-4.04852	7.99908
PIEL SIN - RECEPTOR SIN	*	9.88111	7.99908

RECEPTOR CON - RECEPTOR SIN	*	13.9296	7.99908
-----------------------------	---	---------	---------

* indica una diferencia significativa.

El asterisco que se encuentra al lado de los 3 pares indica que estos pares muestran diferencias estadísticamente significativas con un nivel del 95.0% de confianza. No existen diferencias estadísticamente significativas entre aquellos niveles que compartan una misma columna de X's. El método empleado actualmente para discriminar entre las medias es el procedimiento de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher.

Nanoparticulas

Muestra 1: J1 CON

Muestra 2: J1 SIN

Muestra 3: J2 CON

Muestra 4: J2 SIN

Muestra 1: 6 valores en el rango de 0.5113 a 1.9912

Muestra 2: 6 valores en el rango de 0.4215 a 1.1676

Muestra 3: 6 valores en el rango de 0.7385 a 2.437

Muestra 4: 6 valores en el rango de 0.4215 a 1.1676

Tabla 63. ANOVA de Flujos para NPs

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	5.11704	3	1.70568	6.91	0.0022
Intra grupos	4.93339	20	0.24667		
Total (Corr.)	10.0504	23			

La razón-F, que en este caso es igual a 6.91484, es el cociente entre el estimado entre-grupos y el estimado dentro-de-grupos. Puesto que el valor-P de la prueba-F es menor que 0.05, existe una diferencia estadísticamente significativa entre las medias de las 4 variables con un nivel del 95.0% de confianza.

Tabla 64. Prueba de Múltiples Rangos para Flujos NPs

	Casos	Media	Grupos Homogéneos
J1 SIN	6	0.680817	X
J2 SIN	6	0.680817	X
J1 CON	6	1.33655	X
J2 CON	6	1.76825	X

Tabla 65. Contrastes para flujos NPs

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
J1 CON - J1 SIN	*	0.655733	0.598143
J1 CON - J2 CON		-0.4317	0.598143
J1 CON - J2 SIN	*	0.655733	0.598143
J1 SIN - J2 CON	*	-1.08743	0.598143
J1 SIN - J2 SIN		0.0	0.598143
J2 CON - J2 SIN	*	1.08743	0.598143

* indica una diferencia significativa.

El asterisco que se encuentra al lado de los 4 pares indica que estos pares muestran diferencias estadísticamente significativas con un nivel del 95.0% de confianza. No existen diferencias estadísticamente significativas entre aquellos niveles que compartan una misma columna de X's. El método empleado actualmente para discriminar entre las medias es el procedimiento de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher.

Muestra 1: Kp 1 SIN

Muestra 2: Kp1 CON

Muestra 3: Kp2 CON

Muestra 4: Kp2 SIN

Muestra 1: 6 valores en el rango de 0.0002 a 0.0006

Muestra 2: 6 valores en el rango de 0.0003 a 0.001

Muestra 3: 6 valores en el rango de 0.0004 a 0.0012

Muestra 4: 6 valores en el rango de 0.0002 a 0.0006

Tabla 66. ANOVA de Kp para NPs

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	0.00000130666	3	4.35555E-7	7.16	0.0019
Intra grupos	0.00000121593	20	6.07964E-8		
Total (Corr.)	0.00000252259	23			

La razón-F, que en este caso es igual a 7.16415, es el cociente entre el estimado entre-grupos y el estimado dentro-de-grupos. Puesto que el valor-P de la prueba-F es menor que 0.05, existe una diferencia estadísticamente significativa entre las medias de las 4 variables con un nivel del 95.0% de confianza.

Tabla 67. Prueba de Múltiples Rangos para Kp NPs

	Casos	Media	Grupos Homogéneos
Kp2 SIN	6	0.000331358	X
Kp 1 SIN	6	0.000331358	X
Kp1 CON	6	0.00066915	X
Kp2 CON	6	0.000878633	X

Tabla 68. Contrastes para Kp NPs

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
Kp 1 SIN - Kp1 CON	*	-0.000337792	0.000296952
Kp 1 SIN - Kp2 CON	*	-0.000547275	0.000296952
Kp 1 SIN - Kp2 SIN		0.0	0.000296952
Kp1 CON - Kp2 CON		-0.000209483	0.000296952
Kp1 CON - Kp2 SIN	*	0.000337792	0.000296952
Kp2 CON - Kp2 SIN	*	0.000547275	0.000296952

* indica una diferencia significativa.

El asterisco que se encuentra al lado de los 4 pares indica que estos pares muestran diferencias estadísticamente significativas con un nivel del 95.0% de confianza. No existen diferencias estadísticamente significativas entre aquellos niveles que compartan una misma columna de X's. El método empleado actualmente para discriminar entre las medias es el procedimiento de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher.

Muestra 1: PIEL CON

Muestra 2: PIEL SIN

Muestra 3: RECEPTOR CON

Muestra 4: RECEPTOR SIN

Muestra 1: 6 valores en el rango de 16.3793 a 75.2155

Muestra 2: 6 valores en el rango de 17.0259 a 34.0517

Muestra 3: 6 valores en el rango de 33.8404 a 89.6465

Muestra 4: 6 valores en el rango de 20.2667 a 52.4848

Tabla 69. ANOVA de PX total en receptor y piel para NPs

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	6014.05	3	2004.68	6.80	0.0024
Intra grupos	5899.64	20	294.982		
Total (Corr.)	11913.7	23			

La razón-F, que en este caso es igual a 6.79596, es el cociente entre el estimado entre-grupos y el estimado dentro-de-grupos. Puesto que el valor-P de la prueba-F es menor que 0.05, existe una diferencia estadísticamente significativa entre las medias de las 4 variables con un nivel del 95.0% de confianza.

Tabla 70. Prueba de Múltiples Rangos para PX total en receptor y piel para NPs

	Casos	Media	Grupos Homogéneos
PIEL SIN	6	23.9943	X
RECEPTOR SIN	6	33.785	X
PIEL CON	6	44.4325	X
RECEPTOR CON	6	66.5946	X

Tabla 71. Contrastes para PX total en receptor y piel para NPs

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
PIEL CON - PIEL SIN		20.4382	20.6845
PIEL CON - RECEPTOR CON	*	-22.1621	20.6845
PIEL CON - RECEPTOR SIN		10.6475	20.6845
PIEL SIN - RECEPTOR CON	*	-42.6004	20.6845
PIEL SIN - RECEPTOR SIN		-9.79076	20.6845
RECEPTOR CON - RECEPTOR SIN	*	32.8096	20.6845

* indica una diferencia significativa.

El asterisco que se encuentra al lado de los 3 pares indica que estos pares muestran diferencias estadísticamente significativas con un nivel del 95.0% de confianza. No existen diferencias estadísticamente significativas entre aquellos niveles que compartan una misma columna de X's. El método empleado actualmente para discriminar entre las medias es el procedimiento de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher.

Extracción de PX remanente en piel inter-sistemas sin microagujas

Muestra 1: ME1PIEL SIN

Muestra 2: ME2 PIEL SIN

Muestra 3: NP PIEL SIN

Muestra 1: 6 valores en el rango de 22.6293 a 43.9655

Muestra 2: 6 valores en el rango de 6.2284 a 33.9224

Muestra 3: 6 valores en el rango de 17.0259 a 34.0517

Tabla 72. ANOVA de extracción PX en piel inter-sistemas sin microagujas

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	347.206	2	173.603	2.66	0.1026
Intra grupos	978.945	15	65.263		
Total (Corr.)	1326.15	17			

Puesto que el valor-P de la razón-F es mayor o igual que 0.05, no existe una diferencia estadísticamente significativa entre las medias de las 3 variables con un nivel del 95.0% de confianza.

Tabla 73. Prueba de Múltiples Rangos de extracción PX en piel inter-sistemas sin microagujas

	Casos	Media	Grupos Homogéneos
ME2 PIEL SIN	6	19.6983	X
NP PIEL SIN	6	23.9942	XX
ME1PIEL SIN	6	30.3879	X

Tabla 74. Contrastes de extracción PX en piel inter-sistemas sin microagujas

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
ME1PIEL SIN - ME2 PIEL SIN	*	10.6897	9.94143
ME1PIEL SIN - NP PIEL SIN		6.3937	9.94143
ME2 PIEL SIN - NP PIEL SIN		-4.29595	9.94143

* indica una diferencia significativa.

Se ha colocado un asterisco junto a 1 par, indicando que este par muestra diferencias estadísticamente significativas con un nivel del 95.0% de confianza. No existen diferencias estadísticamente significativas entre aquellos niveles que compartan una misma columna de X's. El método empleado actualmente para discriminar entre las medias es el procedimiento de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher.

Extracción de PX remanente en piel inter-sistemas sin microagujas

Muestra 1: ME1 PIEL CON

Muestra 2: ME2 PIEL CON

Muestra 3: NP PIEL CON

Muestra 1: 6 valores en el rango de 47.6293 a 70.0431

Muestra 2: 6 valores en el rango de 17.8879 a 34.9138

Muestra 3: 6 valores en el rango de 16.3793 a 75.2155

Tabla 75. ANOVA de extracción PX en piel inter-sistemas con microagujas

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	3511.55	2	1755.78	8.63	0.0032
Intra grupos	3051.13	15	203.409		
Total (Corr.)	6562.69	17			

La razón-F, que en este caso es igual a 8.63176, es el cociente entre el estimado entre-grupos y el estimado dentro-de-grupos. Puesto que el valor-P de la prueba-F es menor que 0.05, existe una diferencia estadísticamente significativa entre las medias de las 3 variables con un nivel del 95.0% de confianza.

Tabla 76. Contrastes de extracción PX en piel inter-sistemas con microagujas

	Casos	Media	Grupos Homogéneos
ME2 PIEL CON	6	24.8563	X
NP PIEL CON	6	44.4325	X
ME1 PIEL CON	6	58.944	X

Tabla 77. Contrastes de extracción PX en piel inter-sistemas con microagujas

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
ME1 PIEL CON - ME2 PIEL CON	*	34.0877	17.5509
ME1 PIEL CON - NP PIEL CON		14.5115	17.5509
ME2 PIEL CON - NP PIEL CON	*	-19.5762	17.5509

* indica una diferencia significativa.

El asterisco que se encuentra al lado de los 2 pares indica que estos pares muestran diferencias estadísticamente significativas con un nivel del 95.0% de confianza. No existen diferencias estadísticamente significativas entre aquellos niveles que compartan una misma columna de X's. El método empleado actualmente para discriminar entre las medias es el procedimiento de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher.