



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO

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

**“Elaboración de microagujas biodegradables de quitosán mediante técnicas de
moldeo para aplicación transdérmica”**

TESIS
PARA OPTAR POR EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA

Q.F.B. MARCO ANTONIO ESPINOSA OLIVARES



TUTOR: 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 Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Química y Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, porque me permitieron formarme profesionalmente.

Gracias al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada para la realización de este proyecto de investigación, con número de becario 245491. Y por el apoyo brindado a través de los proyectos CONACyT (129320) y PAPIIT (1N209709).

Esta tesis de Maestría es el resultado del esfuerzo y colaboración de numerosas personas. Aunque estas líneas no puedan compensar todo lo que cada una de ellas ha aportado en esta etapa de mi vida, espero sirvan para expresar mi más sincero agradecimiento.

En primer lugar quisiera agradecer a la Dra. Adriana Ganem por la oportunidad y confianza que me ha brindado para realizar este proyecto. Con su atención y sus buenos consejos a pesar de sus muchas ocupaciones, ha sido para mí el estímulo necesario para finalizar este trabajo y aprender de él.

A mis padres, porque ellos siempre están ahí, que sientan como propios cada uno de mis logros personales. Y por supuesto al resto de mi familia, mis hermanas y sobrinos por su cariño.

A mis compañeros del laboratorio de investigación de tecnología farmacéutica L-223, profesores, maestros y doctores, con los que tantas horas he compartido, quiero que sepan que gracias a ustedes he aprendido y adquirido herramientas que favorecen mi desempeño personal y profesional. A todos mis profesores de la universidad, no puedo mencionarlos a todos, se agradece por compartir sus conocimientos.

Al T.A. Rodolfo Robles, Dr. Rafael Villalobos, Dra. Beatriz Casas, Q.F.B. Brígida Camacho y Dra. María Elena Vargas por su colaboración en el presente trabajo.

A todos mis amigos de la universidad, por sus consejos y apoyo incondicional, no hubiera sido capaz de soportar dificultades y descontentos sin ellos, no estaría escribiendo estas líneas.

A todos mis amigos de siempre, Daniel Ruiz, Joel Arenas, Marcos Montalvo, Jhonatan, Miguel, Lilian Islas, Carlos, Nevero, Rubiel, Alvarito, Alejandro, Mónica Erazo, Bertha, Julissa, Miriam San Pablo, Leticia Macín, Gabriel Pérez, Daniel Gutiérrez y todos aquellos que han estado presentes durante el trayecto de mi vida. Muchas gracias.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MEXICO

JURADO ASIGNADO

Presidente: Dr. Andrés Navarrete Castro

Primer vocal: Dra. Helgi Jung Cook

Segundo vocal: Dra. María Josefa Bernad Bernad

Tercer vocal: Dr. Carlos Tomás Quirino Barrera

Secretario: Dr. Francisco Hernández Luis

“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”

LUGAR DONDE SE REALIZÓ EL TRABAJO

Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán

Laboratorio de Investigación y Posgrado en Tecnología Farmacéutica

L-223

Este trabajo fue presentado en modalidad cartel:

XLIV Congreso Nacional de Ciencias Farmacéuticas

Ciudad de Ixtapa Zihuatanejo, Guerrero, Octubre 2011

QuimiUNAM

Ciudad de México, Noviembre 2011

Foro Internacional sobre Avances en tecnología Farmacéutica- CISDEM

Ciudad de México, Noviembre 2011

“Elaboración de microagujas biodegradables de quitosán mediante técnicas de moldeo para aplicación transdérmica”

Este trabajo fue presentado en modalidad de ponencia:

Simposio de Tecnología Farmacéutica 2011

Ciudad de México, Noviembre 2011

“Microagujas Transdérmicas”

CONTENIDO

1.	INTRODUCCIÓN	1
2.	MARCO TEÓRICO	3
2.1.	Vía transdérmica	3
2.1.1.	Primera generación	4
2.1.2.	Segunda generación	5
2.1.3.	Tercera generación	6
2.2.	Generalidades de la piel	7
2.2.1.	Características y estructura de la piel	10
2.2.2.	Epidermis	10
2.2.3.	Dermis	13
2.3.	Vías de transporte	14
2.3.1.	Vía transcelular	15
2.3.2.	Vía intercelular	15
2.3.3.	Vía transfolicular	17
2.4.	Ventajas y desventajas de la administración transdérmica	19
2.4.1.	Ventajas de la administración transdérmica	19
2.4.2.	Desventajas de la administración transdérmica	19
2.5.	Promotores de absorción transdérmica	20
2.5.1.	Promotores químicos	20
2.5.2.	Promotores físicos	21
2.6.	Qitosán	24
2.6.1.	Qitosán-quitina	24
2.6.2.	Propiedades fisicoquímicas	25
2.6.3.	Métodos de obtención	28
2.6.4.	Aplicaciones del qitosán en el área farmacéutica	31
2.7.	Microagujas	35
2.7.1.	Definición e historia	36
2.7.2.	Ventajas y desventajas de las microagujas	38
2.7.2.1.	Ventajas de las microagujas	38
2.7.2.2.	Desventajas de las microagujas	39
2.7.3.	Tipos de microagujas	40
2.7.4.	Geometría de microagujas	41
2.7.5.	Fármacos que se han administrado con microagujas	43
2.7.6.	Materiales utilizados en la fabricación de microagujas	45
2.7.7.	Métodos de preparación de microagujas	45

CONTENIDO

2.7.8. Métodos de caracterización de microagujas	51
3. HIPÓTESIS DEL TRABAJO	52
4. OBJETIVOS	53
4.1. Objetivo general	53
4.2. Objetivos particulares	53
5. METODOLOGÍA	54
5.1. Materiales	54
5.2. Métodos	56
5.2.1. Determinaciones previas	56
5.2.1.1. Elección del tipo de quitosán	56
5.2.1.2. Elección del material para fabricar los moldes	56
5.2.1.3. Elaboración del molde macho de microagujas	57
5.2.1.4. Elaboración del molde hembra de microagujas	58
5.2.2. Estudio para determinar la concentración de ácido acético	59
5.2.3. Estudio para determinar la concentración de quitosán	59
5.2.4. Fabricación de las microagujas	59
5.2.5. Estudios de microscopía	61
5.2.5.1. Microscopía estereoscópica	61
5.2.5.2. Microscopía electrónica de Barrido	61
5.2.6. Estudio de resistencia mecánica	61
5.2.7. Estudio del efecto de un medio de disolución sobre las dimensiones de las microagujas	62
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	63
6.1. Concentración de ácido acético	63
6.2. Concentración de quitosán	65
6.3. Fabricación de microagujas	67
6.4. Estudio de fuerza mecánica	70
6.5. Estudio del efecto de un medio de disolución sobre las dimensiones de las microagujas	75
7. CONCLUSIONES	78
8. PERSPECTIVAS	79
9. REFERENCIAS	80

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura de la piel y procesos de absorción percutánea y liberación transdérmica.	9
Figura 2. Representación esquemática de las vías que contribuyen a la permeabilidad de un soluto a través de la piel hacia la circulación sanguínea o el tejido subcutáneo.	14
Figura 3. Representación esquemática de la estructura del SC.	17
Figura 4. Dominio sugerido del transporte transfolicular durante etapas tempranas de penetración percutánea.	18
Figura 5. Técnicas para aumentar la absorción de fármacos a través de la piel.	23
Figura 6. Estructura química de: a) quitina b) quitosán.	24
Figura 7. Método de obtención de quitosán.	30
Figura 8. Administración de fármacos utilizando diferentes diseños de microagujas.	37
Figura 9. Diagrama de flujo del proceso de fabricación del molde macho.	57
Figura 10. Diagrama de flujo del proceso de fabricación del molde hembra.	58
Figura 11. Diagrama de flujo de las condiciones óptimas del método para elaborar microagujas de quitosán.	60
Figura 12. Estudio del efecto de un medio de disolución sobre las microagujas.	62
Figura 13. Efecto del pH sobre la viscosidad de soluciones de quitosán.	65
Figura 14. Efecto de la concentración de quitosán sobre la viscosidad de soluciones acuosas con una concentración de ácido acético 0.2 M.	67
Figura 15. Imágenes de microscopía estereoscópica (100X) obtenidas durante la fase de optimización del proceso de fabricación de las microagujas.	69
Figura 16. Imágenes microscopía electrónica de barrido para microagujas biodegradables de quitosán.	70
Figura 17. Resistencia mecánica (gramos fuerza) para las microagujas obtenidas bajo diferentes condiciones de preparación.	71
Figura 18. Imágenes al microscopio estereoscópico (40X) de las microagujas obtenidas bajo las condiciones de preparación 2, 8 y 10, antes y después someterse al texturómetro para medir su resistencia mecánica.	72
Figura 19. Variaciones en la longitud, el diámetro de la base y el área de las microagujas durante 3 h de contacto con solución amortiguadora de Biftalato de Potasio pH 5.	77

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Ejemplos de sistemas de liberación de fármacos en los que se ha usado el quitosán.	32
Tabla 2. Resumen de algunos estudios <i>in vivo</i> realizados con microagujas.	44
Tabla 3. Recopilación de algunos materiales y métodos de fabricación de microagujas.	47
Tabla 4. Ejemplos de métodos para la caracterización de microagujas y los resultados obtenidos.	51
Tabla 5. Variables estudiadas para desarrollar un método para la fabricación de microagujas.	60
Tabla 6. Efecto de la concentración de ácido acético.	64
Tabla 7. Efecto de la concentración de quitosán sobre la viscosidad.	66
Tabla 8. Resultados correspondientes a las diferentes condiciones de preparación de microagujas.	68
Tabla 9. Análisis de varianza de un factor para los gramos fuerza requeridos para doblar las microagujas obtenidas bajo diferentes condiciones de preparación.	73
Tabla 10. Prueba de comparaciones múltiples de Duncan para los resultados de resistencia mecánica a las tres condiciones de preparación de microagujas.	74
Tabla 11. Valores promedio \pm desviación estándar para la longitud, diámetro de la base y área de las microagujas en contacto con solución amortiguadora de Bifalato de Potasio pH 5 al tiempo 0 y después de 3 h (n=4) y valores de P al hacer la comparación de medias de dos muestras pareadas.	76

SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

PLGA	Ácido poliláctico-co-glicólico
FDA	Food and Drug Administration (Administración de fármacos y alimentos)
SC	Estrato córneo
PM	Peso molecular
DT	Toxide diftérico
PLL	Poli- <i>l</i> -lisina
TEWL	Pérdida de agua transepidérmica
ALA	Ácido 5-aminolevulínico
MEMS	Métodos electromecánicos
LIGA	Es la abreviación de las palabras alemanas " <i>Lithographie</i> ", " <i>Galvanik</i> ", y " <i>Abformung</i> "; método de micromoldeo.
ATP	Trifosfato de adenosina

1. INTRODUCCIÓN

La investigación sobre el desarrollo de nuevos sistemas promotores de absorción (e.g., iontoforesis, electroporación, sonoforesis, magnetoforesis, microagujas, entre otros) ha demostrado ser una importante alternativa para la vía transdérmica. Aun así, debido a las características que presenta la piel como barrera de permeabilidad, los fármacos que pueden ser administrados por esta vía se ven limitados por sus propiedades fisicoquímicas. El uso de promotores de absorción químicos y físico-mecánicos facilita el paso de estos fármacos.

Entre los sistemas físico-mecánicos que han resultado más prometedores se encuentran las microagujas. Las microagujas son dispositivos híbridos entre las agujas hipodérmicas y los parches transdérmicos. Estas tienen la ventaja de ser lo suficientemente largas como para penetrar el estrato córneo, pero tan delgadas y cortas como para evitar la estimulación de los nervios dérmicos, por lo que no provocan dolor durante la inserción. Como dispositivos mecánicos, incrementan la permeabilidad de la piel al perforarla, generando canales por los que se facilita el paso de los fármacos.

Los reportes que hasta ahora se tienen con microagujas las exponen como uno de los promotores físico-mecánicos con más posibilidades en cuanto a sus aplicaciones y múltiples ventajas. Los factores responsables del buen desempeño de estos dispositivos están relacionados con el tipo de material empleado en su fabricación, su geometría, resistencia mecánica y flexibilidad, entre otras. Como todos los microdispositivos, su fabricación requiere frecuentemente de equipo altamente especializado y exacto.

Las microagujas se han clasificado de acuerdo al material que las conforma (e.g., metálicas, poliméricas) o a su estructura (huecas, sólidas). Lo interesante es que pueden actuar, como ya se mencionó, simplemente como un promotor físico-mecánico, i.e., generando canales por los que pueda permear un fármaco; o bien, servir como acarreadores, i.e., contener un fármaco en su estructura y liberarlo una vez generados los canales. Esto último se busca con las agujas biodegradables o solubles, las cuales al contener al fármaco funcionan como una matriz de liberación inmediata o bien sostenida (dependiendo del material que las constituye). Entre los materiales que se han empleado para la fabricación de este tipo de

agujas se encuentran polímeros biodegradables como el ácido poliláctico-co-glicólico (PLGA) o bien sustancias solubles como la maltosa o la dextrina.

En el presente trabajo, se propone el uso del quitosán para la fabricación de microagujas solubles. Se eligió el quitosán, debido a su biocompatibilidad y a sus propiedades antibacterianas, mucoadhesivas, baja toxicidad y que tiene excelentes propiedades de barrera al oxígeno. En soluciones ácidas puede formar capas o películas semipermeables que pueden modificar la atmósfera interna y por lo consiguiente, disminuir las velocidades de transpiración, pero como inconveniente los puentes de hidrógeno presentes en la molécula lo hacen sensible al agua por lo que es necesario mantener sus propiedades sin perder su biodegradabilidad.

Entre las razones más importantes de esta investigación, está la posibilidad de elaborar un dispositivo de absorción físico-mecánico biodegradable, como una alternativa para la administración transdérmica de fármacos poco permeables (e.g., hidrofílicos, de alto peso molecular), que sean susceptibles de degradarse en el tracto gastrointestinal o por efecto del primer paso hepático. La administración por microagujas elimina además las molestias de una inyección intravenosa. La novedad de este trabajo radica además en que, si bien hasta ahora se ha reportado la fabricación de microagujas solubles a base de dextrosa y maltosa, no existe ningún reporte con quitosán.

2. MARCO TEÓRICO

2.1. Vía transdérmica

La vía transdérmica representa una atractiva alternativa en relación a la vía oral para la administración de fármacos, además de que ha sido propuesta como una ruta capaz de sustituir las dolorosas inyecciones hipodérmicas (Bronauhg and Maibach 2005). Por miles de años el ser humano ha utilizado cientos de sustancias en la piel para fines terapéuticos. En la actualidad, la vía oral y parenteral siguen siendo las más difundidas, pero la vía transdérmica tiene una gran variedad de ventajas en relación a ellas. En particular, se recomienda para fármacos susceptibles de ser degradados en el tracto gastrointestinal, ya sea por efecto enzimático o del pH, o bien porque sufren un importante efecto del primer paso hepático, siendo metabolizados en hígado antes de alcanzar su sitio de acción. Los sistemas transdérmicos no son invasivos y pueden ser auto-administrados por el mismo paciente sin mayor intervención médica, permitiendo la liberación de fármacos por periodos de tiempo prolongados (hasta una semana), además de que existe la posibilidad de conseguir un efecto local o sistémico.

Probablemente el mayor desafío para la administración transdérmica es que sólo un número limitado de fármacos son susceptibles a la administración por esta vía. Actualmente, los métodos de liberación transdérmica tradicionales están disponibles para moléculas de bajo peso molecular, que exhiban un coeficiente de partición intermedio octanol-agua ($\log P = 2 - 3$) y que posean una cierta potencia (hasta 20 mg/día). Otro reto de la vía transdérmica es lograr la penetración de las moléculas hidrofílicas, péptidos y macromoléculas, incluyendo los tratamientos genómicos que emplean ADN o ARN.

Otra área de interés para la vía transdérmica está en el suministro de vacunas, evitando el uso de agujas hipodérmicas. Este método de vacunación puede mejorar la respuesta inmune y es posible una vectorización en las células inmunogénicas de la piel, las células de Langerhans. Por último, existe la posibilidad no sólo de la administración de fármacos, sino también la extracción de sustratos biológicos a través de la piel (Sieg A., et al. 2005). Esto ya se ha logrado para el monitoreo de glucosa mediante la extracción del líquido

intersticial utilizando medios eléctricos y en los ensayos clínicos con otros enfoques, como la ecografía.

Desde una perspectiva general, se propone que los avances en los sistemas de liberación transdérmica se pueden clasificar en tres generaciones: la primera, en la cual los fármacos empleados generalmente son de bajo peso molecular, donde estos no presentan problema alguno para penetrar la piel; la segunda, emplea promotores de permeación para facilitar el transporte a través de la piel, teniendo un éxito moderado en lo que se refiere a la permeación de bajas cantidades de moléculas pequeñas; por último, la tercera generación implica la posibilidad de facilitar el transporte de macromoléculas (incluyendo las proteínas y ADN) y vacunas basadas en virus.

2.1.1. Primera generación

La primera generación de sistemas de administración transdérmica es responsable de la mayoría de los parches transdérmicos que se encuentran en uso clínico. Los avances tecnológicos en este tipo de dispositivos y la aceptación de los pacientes han permitido que lleguen al mercado, sin embargo, el mayor inconveniente es que solo los fármacos que presentan propiedades adecuadas como bajo peso molecular, lipofílicos y una eficacia con bajas dosis son susceptibles de permear.

Esta primera generación de administración transdérmica está limitada principalmente por la barrera de la capa externa de la piel, llamada estrato córneo, con un grosor de 10 a 20 μm . Debajo de esta capa se encuentra la epidermis viable que tiene un grosor de 50 a 100 μm , la cual es avascular y no es sino hasta la dermis con un grosor de 1 a 2 mm que contiene una rica red capilar donde se concentra una alta vascularización, misma que favorece la absorción sistémica de fármacos.

El estrato córneo presenta una estructura de ladrillo y cemento, donde los ladrillos representan las células muertas o corneocitos que están compuestos principalmente por queratina entrecruzada, y el cemento es una mezcla de lípidos organizados en bicapas.

El transporte del fármaco a través del estrato córneo involucra un proceso de difusión vía lípidos intercelulares, los cuales están rodeando a los corneocitos. Las moléculas

hidrofílicas viajan por la cabeza de la capa lipídica mientras que las moléculas lipofílicas pasan por las cadenas hidrocarbonadas de la bicapa.

Las moléculas al atravesar la membrana se disuelven en el material lipídico del estrato córneo de acuerdo a su liposolubilidad y a su coeficiente de partición, posteriormente las moléculas de principio activo dejan la membrana lipídica, disolviéndose nuevamente en el medio acuoso de las capas más profundas de la epidermis de acuerdo a un gradiente de concentración.

También se encuentran en esta primera generación los aerosoles, geles y otras formulaciones tópicas para la piel, incluyendo aquellas que involucran la formación de sistemas sobresaturados por evaporación de algún componente de la formulación.

2.1.2. Segunda generación

La segunda generación de sistemas de administración transdérmica reconoce que para mejorar la permeabilidad de la piel es necesario el empleo de promotores de absorción para ampliar el rango de los fármacos transdérmicos. El promotor deberá tener las siguientes características: (1) incrementar la permeabilidad de la piel por medio de la disrupción reversible de la estructura del estrato córneo, (2) suministrar una fuerza adicional al transporte de las sustancias en el interior de la piel y (3) evitar daños en tejidos más profundos.

Por otro lado los promotores se pueden clasificar de forma general en químicos y físicos. Los promotores químicos son excipientes o aditivos que se incluyen en la formulación para facilitar la entrada a la piel. Su mecanismo de acción es básicamente la interacción con los componentes de la piel (e.g., lípidos y proteínas) alterándolos de manera reversible.

Muchos de los promotores químicos alteran las estructuras de la bicapa de los lípidos intercelulares que se encuentran en el estrato córneo mediante la inserción de moléculas anfífilas, fluidizando los lípidos y de esta forma generando regiones de desorden donde la difusión de los fármacos se ve facilitada; además estos promotores pueden también incrementar el coeficiente de partición en el estrato córneo.

Por otro lado, los promotores de tipo físico incluyen técnicas como la iontoforesis, ultrasonido, magnetoforesis, láser, microagujas, entre otras. Este tipo de promotores incrementan el paso del fármaco a través de la piel, reduciendo el daño de tejidos profundos, como resultado, ésta segunda generación, permitió un avance clínico mejorando la liberación de moléculas pequeñas y con una efectividad moderada para macromoléculas (Guy and Hadgraft 2003, Bronauhg and Maibach 2005).

Cabe mencionar que en esta generación quedan incluidos aquellos acarreadores o vectores destinados al transporte de activos a través del estrato córneo y hacia los tejidos más profundos de la piel. Estos acarreadores tienen como finalidad facilitar el transporte, protegerlos del medio biológico, dirigir su liberación hacia ciertos sitios o receptores, o bien lograr una liberación controlada. Entre los acarreadores más empleados por vía transdérmica se encuentran los liposomas, dendrímeros, nanopartículas, complejos con ciclodextrinas, entre otros (Kogan and Garti 2006, Touitou and Godin 2007).

Finalmente, la segunda generación también incluye el uso de profármacos, los cuales son sistemas sin actividad farmacológica. Se basan en alterar la estructura de los fármacos, de modo que se incremente su coeficiente de partición logrando penetrar al medio biológico y gracias a la acción química o enzimática, se transforman en la entidad química farmacológicamente activa. Sin embargo, el avance en este tipo de sistemas se ha visto limitado por la complejidad del diseño de profármacos, además de que requieren contar con la aprobación de la FDA o de las autoridades regulatorias del país que las propone.

2.1.3. Tercera generación

La tercera generación de sistemas de administración transdérmica incluye estrategias tecnológicas para lograr un mayor impacto en la vía transdérmica, logrando la permeación de macromoléculas e incluso partículas. Su primordial objetivo es generar una alteración reversible de la estructura del estrato córneo logrando la liberación del fármaco de manera más eficaz evitando dañar los tejidos más profundos.

En esta generación se incluyen técnicas como la combinación de promotores de absorción químicos y el uso de los dispositivos tecnológicos como la electroporación, abrasión térmica, microabrasión y microagujas, entre otras. Así pues, esta generación se caracteriza por la combinación tanto de promotores de absorción químicos y físicos.

2.2. Generalidades de la piel

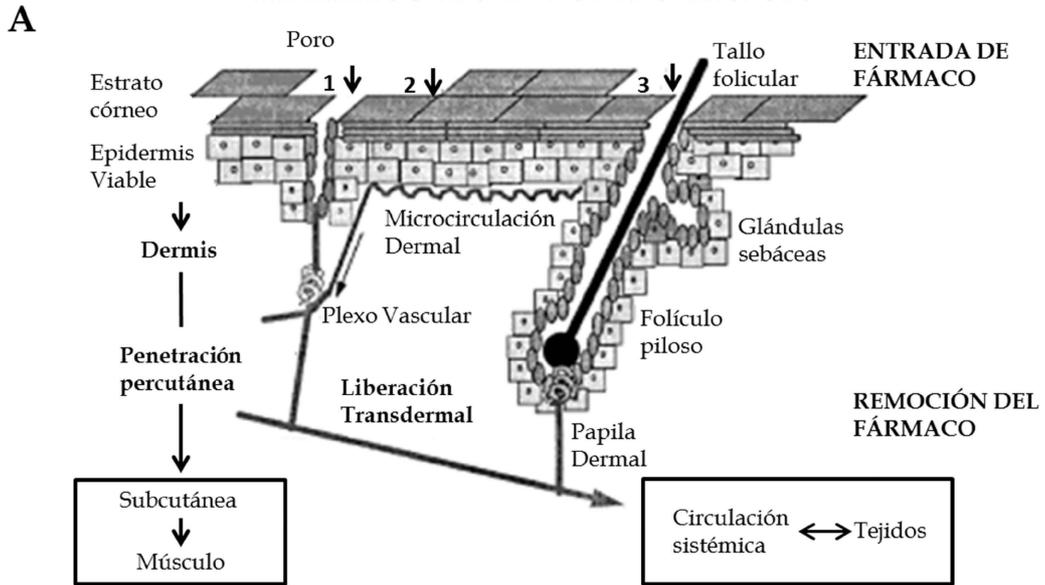
La dermatología es la rama de la medicina que se especializa en la estructura, evaluación, funcionamiento, diagnóstico, tratamiento, así como enfermedades que afectan a la piel. Se cree que la función primaria de la piel es la de fungir como una barrera entre el medio interior bien regulado y el medio ambiente exterior. Esto puede dar la impresión de que la estructura de la piel es simple, centrándonos exclusivamente en sus propiedades de barrera. Sin embargo, la piel es un sistema complejo, integrado y dinámico que tiene muchas funciones, que van mucho más allá de su papel como una barrera para el medio ambiente (e.g., mantenimiento de la homeostasis, propiedades sensoriales, reparación, regeneración y biotransformación de fármacos), es el mayor órgano del cuerpo lo que representa más del 10% de la masa corporal, y la que permite al cuerpo interactuar más íntimamente con su entorno y esta se compone de dos principales capas: epidermis que es la capa más externa, y la dermis subyacente. Muchas de las funciones de la piel pueden ser clasificadas como esenciales para la supervivencia de la mayor parte de los mamíferos y los seres humanos en un ambiente relativamente hostil.

Por otro lado, la piel debe ser resistente, robusta y flexible, con una comunicación efectiva entre cada uno de sus componentes intrínsecos. Muchos agentes se aplican a la piel, ya sea deliberada o accidentalmente, con resultados benéficos o perjudiciales. El uso de productos tópicos se hizo evidente desde tiempos antiguos, y hay informes de beneficios logrados con la administración tópica de agentes anti-infecciosos y fármacos hormonales en la década de 1940. La tecnología moderna del parche transdérmico se introdujo a finales de 1970.

Los principales intereses que guían la evaluación de la absorción dérmica de compuestos en la piel son los siguientes: (a) evaluación de los efectos locales en dermatología (e.g., los corticoides para la dermatitis); (b) estudio del transporte de sustancias a través de la piel; (c) efectos de superficie producidos por ciertas formulaciones (e.g., protectores solares, cosméticos, y anti-infecciosos); (d) efecto en tejidos más profundos (e.g., agentes antiinflamatorios no esteroideos [AINE] para la inflamación muscular) y (e) la absorción no deseada (e.g., los disolventes en el lugar de trabajo, productos químicos agrícolas, o alérgenos). La Figura 1 resume estos procesos y los sitios de efecto de los compuestos

aplicados en la piel. La piel se hizo popular como un sitio potencial para la administración de fármacos sistémicos. Aunque la entrega controlada de los solutos a través de la piel sigue siendo un reto, el desarrollo de tecnologías como el uso de promotores químicos, físicos (e.g., sonoforesis, iontoforesis, y electroporación) y uso de acarreadores (e.g., vesículas lipídicas flexibles, nanopartículas) han hecho de la administración transdérmica una realidad. La medida en que éstos vayan introduciéndose en la vida práctica la definirá el tiempo.

FÁRMACO EN LA FORMULACIÓN



B

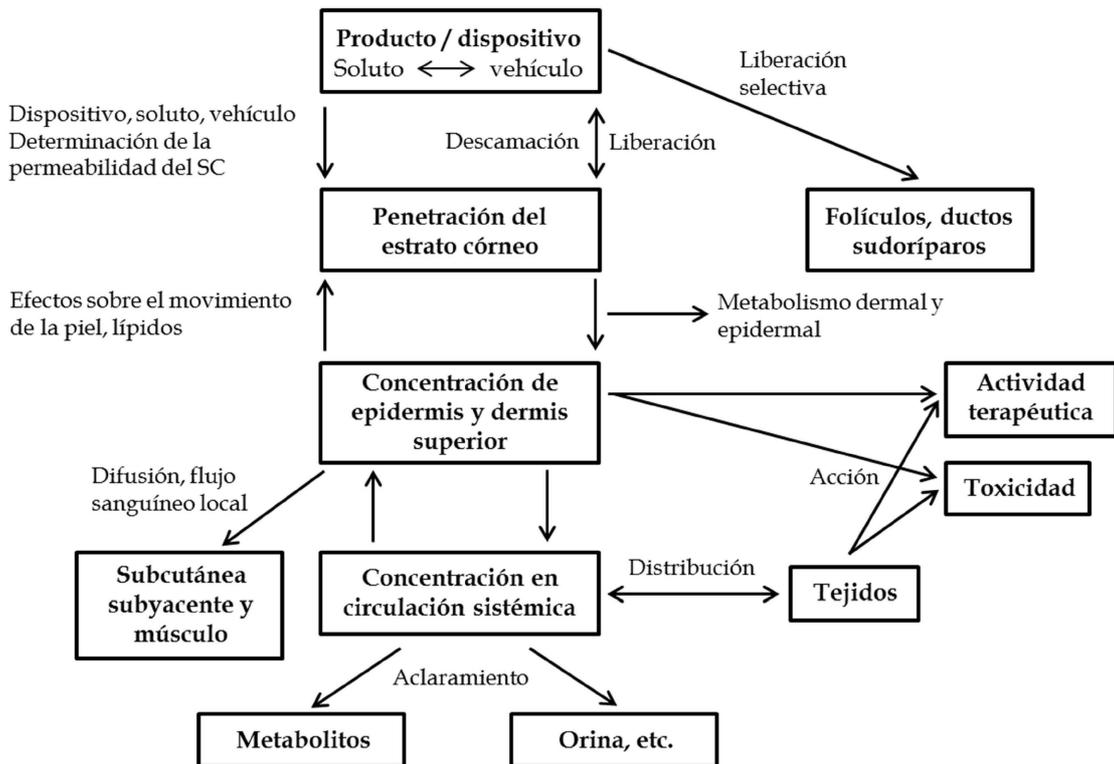


Figura 1. (A) Estructura de la piel y procesos de absorción percutánea y liberación transdérmica. La absorción puede ocurrir a través de: los poros (1), las regiones intercelulares del estrato córneo (2), y a través de los folículos pilosos (3). (B) Absorción dermal, sitios de acción y toxicidad (Walters and Roberts 2002).

2.2.1. Características y estructura de la piel

La piel está constituida por diferentes tejidos integrados para realizar sus funciones específicas, posee un área superficial de casi 2 m² y pesa de 4.5 a 5 Kg, lo que representa del 10 al 16% del peso corporal. Su grosor varía desde 0.5 mm en los párpados hasta 4 mm en los talones, sin embargo, en gran parte del cuerpo es de 1 a 2 mm.

La estructura de la piel consta de dos grandes capas. La superficial y más delgada, la epidermis, compuesta de tejido epitelial y la más profunda y gruesa, la dermis, constituida por tejido conectivo. Debajo de esta se encuentra el tejido subcutáneo, también denominado hipodermis, la cual consiste en tejido areolar y adiposo.

2.2.2. Epidermis

Se compone de un epitelio escamoso estratificado queratinizado derivado del ectodermo, en el cual el 80 por ciento de las células son los queratinocitos. Otros tipos de células, como los melanocitos (formación de pigmento), las células de Langerhans (función inmunológica), y las células de Merkel (la percepción sensorial), representan las células no queratinocíticas.

La epidermis se somete a un patrón ordenado de la proliferación, diferenciación y queratinización, puede especializarse para formar apéndices tales como los folículos pilosos, glándulas sebáceas y sudoríparas, plumas, cuernos, garras y uñas.

❖ *La Epidermis Humana*

Se compone de cuatro a cinco capas de células en función de la parte del cuerpo. La primera capa basal, consta de células cuboidales a columnares que se unen lateralmente a las células adyacentes mediante desmosomas y la membrana basal irregular por hemidesmosomas. La población de células basales es heterogénea en la que hay dos tipos morfológicamente distintos: (a) las células madre, que tienen la capacidad de dividirse y producir células nuevas; y (b) las células que sirven para fijar la epidermis a la membrana basal.

La segunda capa exterior es el estrato espinoso, el cual se compone de varias capas de células irregulares poliédricas. Estas células se conectan a las células del estrato basal por debajo y a las células adyacentes espinosas por desmosomas. La característica más destacada en esta capa son los tonofilamentos que junto con los desmosomas pueden conectar entre sí las células.

La tercera capa es el estrato granuloso, que consiste de varias capas de células aplanadas, en las que abundan los gránulos. Se ha especulado que estos gránulos están involucrados en queratización y la formación de la función barrera de la piel.

Los cuerpos lamelares o gránulos de recubrimiento de membrana (cuerpos de Odland) contienen diversos lípidos organizados en forma de lamelas. Al transcurrir la diferenciación epidérmica éstos gránulos migran a la superficie de la célula y se fusionan con la membrana para liberar su contenido de lípidos por exocitosis en el espacio intercelular entre el estrato granuloso y la capa del estrato córneo. Los lípidos extruidos se organizan en forma de lamelas alrededor de los corneocitos del estrato córneo, formando una densa matriz lipídica, la cual contribuye a formar la barrera de permeación.

La extracción de los lípidos de la piel ha demostrado que reduce radicalmente la barrera de permeabilidad. La composición de los lípidos de la epidermis consiste fundamentalmente de fosfolípidos, glucosilceramidas, ceramidas, colesterol, ácidos grasos libres, triglicéridos y esfingosina.

La cuarta capa se ubica en regiones sometidas a estrés mecánico, tales como la superficie palmar y plantar, donde la piel es más gruesa y desprovista de pelo, se encuentra presente una delgada capa conocida como estrato lúcido, que consiste de una densa capa de células que carecen de núcleo y orgánulos citoplasmáticos. Esta área contiene una translúcida sustancia semilíquida conocida como eleiden, que es similar a la queratina, pero tiene un patrón de coloración diferente. La capa más externa y la final es el estrato córneo, que se compone de varias capas de células muertas queratinizadas, desprovistas de núcleo y organelos citoplásmicos, que están constantemente siendo eliminadas.

La capa más superficial de la región córnea se conoce como el estrato disyuntivo. El espesor de la capa córnea y el número de capas de células que lo compone varía

dependiendo del sitio y las especies (Monteiro-Riviere, et al. 2001). Esta es la capa que proporciona una barrera eficaz contra la pérdida de agua transcutánea.

Está ampliamente demostrado que la barrera que limita la absorción de sustancias a través de la piel es el estrato córneo. Los factores anatómicos que se han discutido, como el número de capas de células epidérmicas y el espesor de la capa córnea, pueden ser parámetros que modulan la absorción. Sin embargo, sabiendo que la vía intercelular a través del estrato córneo representa la verdadera resistencia, la capacidad de absorción debe relacionarse con la longitud de esta vía. Como ya se mencionó, la extracción de los lípidos intercelulares utilizando disolventes orgánicos, reduce la función de barrera. La longitud es una función de la geometría del empaquetamiento de las células en el estrato córneo. La principal vía de un compuesto es a través de los canales intercelulares lipídicos, por lo que la absorción de un compuesto está en función de la trayectoria de difusión seguida. Algunos autores han descrito la organización espacial de las células del estrato córneo interdigitales comparándolas con un tetradecágono. Esta estructura poligonal de 14 lados proporciona un mínimo de superficie-volumen que permite que el espacio sea llenado por el embalaje sin intersticios. Por lo tanto, la longitud es una función del número de capas de células, espesor total, el tamaño de la celda y la tortuosidad de esta vía.

La membrana basal es sintetizada por las células basales y separa el epitelio del tejido conectivo subyacente. Se trata de una matriz extracelular que es una estructura delgada, compleja y altamente organizada de grandes macromoléculas (Briggaman and Wheeler 1975).

Además de esta caracterización ultraestructural, nuevos componentes bioquímicos de la unión epidermis-dermis constantemente se identifican y caracterizan. Ejemplos representativos de los más comunes son el colágeno tipo IV, laminina, entactina/nidogen, el antígeno penfigoide ampollar, proteoglicanos de sulfato de heparina, fibronectina, GB3 (Nicein, BM-600, epiligrin), L3D (TypeVII), 19-DEJ-1 (Uncein), la epidermólisis bullosa adquirida, y la lista sigue creciendo (Timpl, et al. 1983, Briggaman 1990).

Muchas funciones han sido atribuidas a la membrana basal incluyendo un papel en el mantenimiento de la unión epidermis-dermis y actuando como una barrera selectiva entre la epidermis y la dermis, que restringe el paso de algunas moléculas.

2.2.3. Dermis

La dermis está debajo de la membrana basal y consiste principalmente de tejido conectivo denso irregular dentro de una matriz de colágeno, fibras elásticas y reticulares, embebidas en una sustancia fundamental amorfa compuesta por varios tipos de proteoglicanos. Los tipos de células de la dermis que predominan son los fibroblastos, mastocitos y los macrófagos. Además, las células plasmáticas, células de grasa, cromatóforos, y los leucocitos extravasales se encuentran a menudo. Los vasos sanguíneos, linfáticos, y nervios recorren la dermis, junto con las estructuras glandulares como las glándulas sebáceas, glándulas sudoríparas y folículos pilosos. Hay dos tipos de glándulas sudoríparas en los seres humanos: ecrinas y apocrinas.

Las glándulas ecrinas se encuentran en todo el cuerpo, con excepción de algunas áreas en las que las glándulas apocrinas pueden dominar (e.g., la axila, la aureola, pubis, perianal, el párpado y conducto auditivo externo). Por el contrario, las glándulas apocrinas se encuentran sobre la superficie del cuerpo en los mamíferos peludos y la mayoría de los carnívoros. La capa papilar, la capa más superficial de la dermis, se ajusta a la capa de estrato basal y se compone de tejido conectivo laxo que se mezcla en la capa reticular más profunda que consiste en tejido conectivo denso. La hipodermis o capa subcutánea está por debajo de la dermis y los anclajes de la dermis al músculo subyacente o el hueso (Monteiro-Riviere, et al. 2001).

2.3. Vías de transporte

El transporte de las sustancias a través de las membranas biológicas puede clasificarse conforme a dos criterios: (1) su movimiento es mediado o no; (2) es activo o pasivo. En el transporte mediado, los materiales pasan a través de la membrana con ayuda de una proteína transportadora, mientras que en el transporte pasivo, una sustancia se mueve cuesta abajo y cruza la membrana gracias a su gradiente de concentración y solo utiliza la energía cinética, en tanto que la energía celular de transporte activo, por lo regular en forma de ATP, se emplea para llevar el material en sentido opuesto a su gradiente de concentración. De acuerdo a los procesos mencionados nos enfocaremos al transporte a través del SC que es en gran parte un proceso pasivo.

Generalmente se considera que hay tres vías por las cuales los compuestos difunden a través del SC: intercelular, transcelular, y transfolicular (Figura 2). Una vez que ha penetrado a través de la epidermis, un compuesto puede ser arrastrado por el flujo sanguíneo cutáneo o ser transportado a los tejidos más profundos (Figura 2).

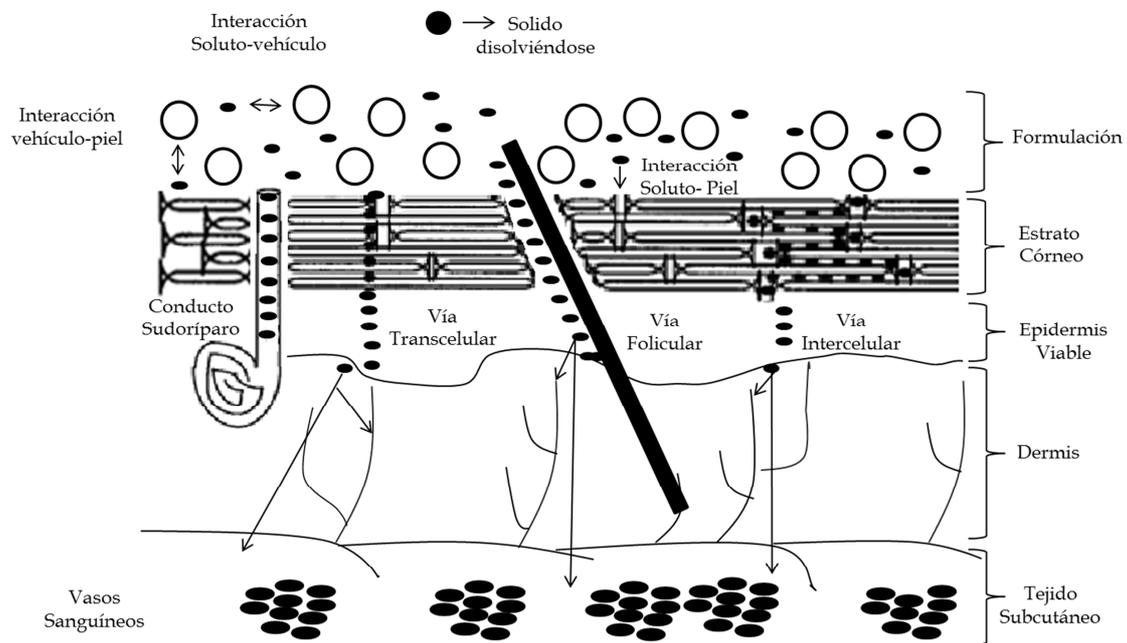


Figura 2. Representación esquemática de las vías que contribuyen a la permeabilidad de un soluto a través de la piel hacia la circulación sanguínea o el tejido subcutáneo (Roberts, Cross and Pelett 2002).

2.3.1. Vía transcelular

Originalmente se creía que los mecanismos de difusión transcelular dominaban a las rutas intercelular y transfolicular durante el paso de solutos a través del SC (Scheuplein, 1965). Sin embargo, el transporte por la vía transcelular implicaría el reparto repetido de la molécula entre los compartimentos lipofílicos e hidrofílicos, incluyendo la casi impenetrable matriz de corneocitos compuesta por queratina y queratohialina. Scheuplein (1965) sugirió además que los solutos polares y no polares impregnan el SC por diferentes mecanismos. Se pensaba que los solutos polares difundían a través de una vía de alta energía relacionada con el agua inmovilizada cerca de la superficie exterior de los filamentos de queratina. Por el contrario, se propone que los solutos liposolubles difunden a través de una vía de lípidos no polares (intersticial) (Scheuplein and Blank, 1971). No obstante, existe suficiente evidencia (Teunissen 1992, Nakamura, et al. 1999), para asegurar que todos los solutos se transportan a través de una vía lipídica intercelular.

2.3.2. Vía intercelular

Los espacios intercelulares del SC fueron descartados inicialmente como una vía de difusión potencialmente significativa por el pequeño volumen que ocupan en relación a la superficie total de la piel (Scheuplein and Blank, 1971). Diversos estudios han demostrado (Squier 1973, Elias and Friend, 1975) que los lípidos intercelulares, y no las proteínas de los corneocitos, constituyen la principal barrera de permeabilidad epidérmica. La evidencia teórica (Albery and Hadgraft 1979), sugiere que la tortuosa vía intercelular de difusión en torno a los corneocitos es la ruta preferida de penetración a través del SC. La mayoría de pruebas de la existencia de la vía lipídica intercelular para el transporte proviene de la estructura microscópica de la organización de la bicapa lipídica, la localización de las sustancias aplicadas en estas bicapas tras la aplicación tópica, y los efectos de deslipidización de las bicapas con disolventes adecuados.

Boddé y colaboradores (1991) visualizan la difusión de cloruro de mercurio a través de muestras de piel humana mediante el uso de vapor de sulfuro de amonio para precipitar el compuesto dentro de la muestra y posterior observación con microscopía electrónica de transmisión. Sus resultados indicaron que la ruta de transporte intercelular a través del SC

predominó, aunque después de cierto tiempo de transporte, los corneocitos tienden a tomar el compuesto, dando lugar a una distribución bimodal aparente. Hubo mercurio, tanto dentro como fuera de las células en la región apical del SC, mientras que en la región media y proximal el mercurio se encuentra intercelularmente. Esto llevó a la sugerencia de la presencia de dos tipos de células: células córneas apicales que tendían a adquirir los iones de mercurio con relativa facilidad, y corneocitos mediales y proximales, que eran menos capaces de hacerlo. Se ha sugerido que, en los corneocitos, los desmosomas pueden servir para canalizar el material en la célula, especialmente en la región escamosa de los desmosomas que están empezando a desintegrarse.

Elias y colaboradores (1981) examinaron la penetración de ácido salicílico marcado con ^{14}C a través de muestras de tejido epidérmico y trataron de relacionar la difusión con el espesor, la cantidad de capas celulares, y la composición lipídica de la pierna y la piel abdominal. Ellos encontraron que las diferencias en el grosor y la cantidad de capas celulares en el SC fueron insuficientes para darse cuenta de las diferencias observadas en el transporte percutáneo a través de la pierna y el abdomen, y que la concentración de lípidos totales puede ser el factor fundamental que rige la permeabilidad de la piel. Las láminas de lípidos en el SC desempeñan un papel clave en la función barrera de la piel. Los lípidos más importantes son las ceramidas, colesterol y ácidos grasos libres (Bouwstra, et al. 1999, Elias, et al. 1999). La Figura 3 muestra una representación esquemática de las láminas, dimensiones de la disposición de lípidos en una lámina individual, y los tipos de lípidos en una bicapa lipídica intercelular. En realidad, la composición de los lípidos y la disposición es mucho más compleja. Por ejemplo, los lípidos presentes en la epidermis pueden ser clasificados como los fosfolípidos, monohexosilceramidas, ceramidas, colesterol, ésteres de colesterol, sulfato de colesterol, triglicéridos y ácidos grasos (Wertz 1992). Bouwstra y colaboradores (1997) en un resumen del análisis de rayos-X del SC y sus lípidos, llegó a la conclusión de que la estructura lipídica es la estructura fundamental en los dominios intercelulares. Una lámina individual es de unos 13 nm (130 Å) de ancho y consta de dos o tres bicapas lipídicas (Figura 3).

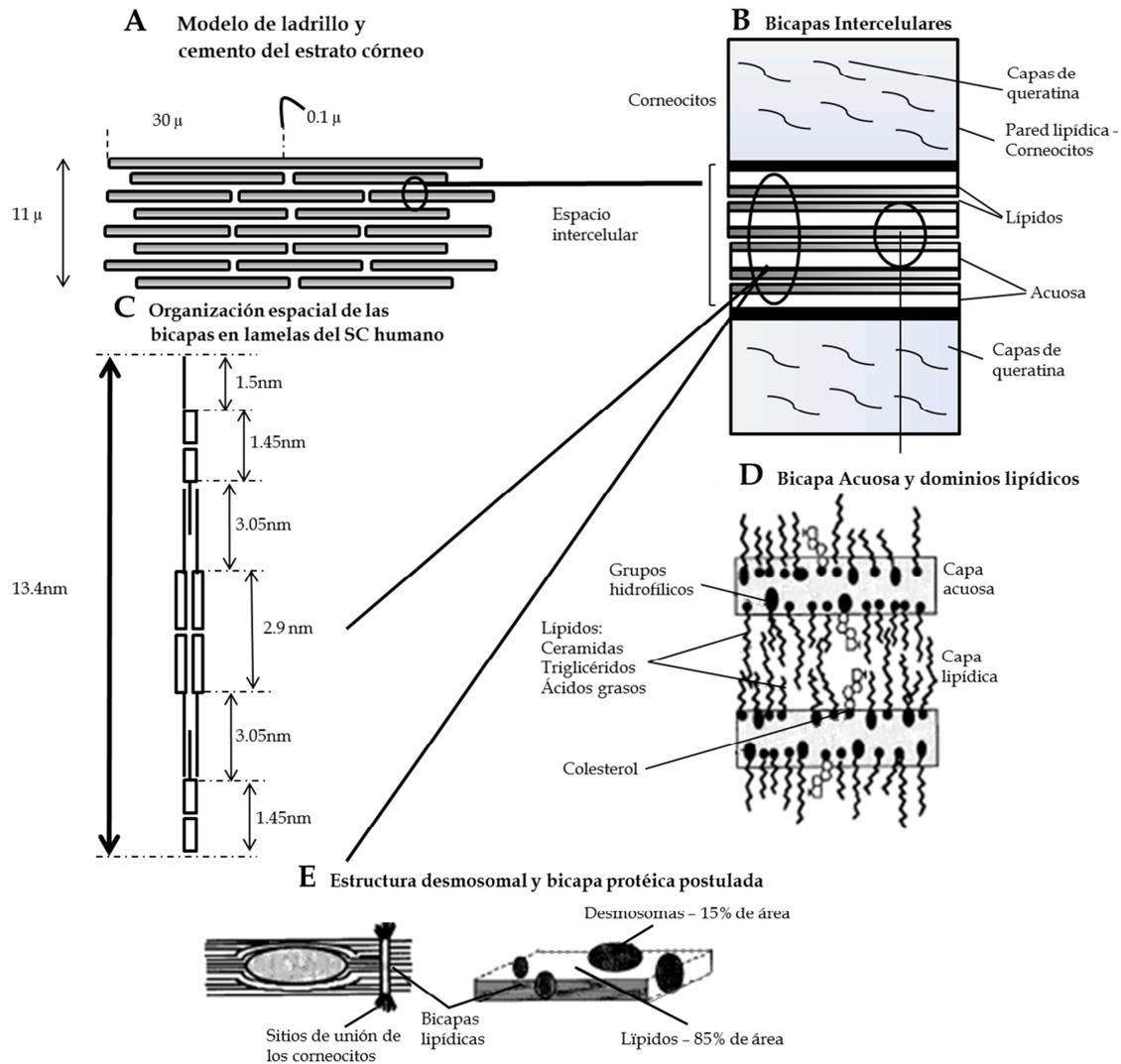


Figura 3. Representación esquemática de la estructura del SC mostrando: (A) modelo de ladrillos y cemento de su estructura gruesa; (B) bicapas intercelulares; (C) organización espacial de lípidos dentro de las bicapas; (D) localización de dominios polares y lípidos; (E) presencia de estructuras proteicas y desmosomales dentro de las bicapas lipídicas (Roberts, Cross and Pelett 2002).

2.3.3. Vía transfolicular

El papel de los apéndices en el transporte a través de la piel ha sido controvertido y lo sigue siendo. Las primeras pruebas que respaldan la existencia de la ruta transfolicular datan de la década de 1940, y consistieron en estudios histológicos en gran parte cualitativos basados en la localización de las manchas y tintes en los apéndices. Roberts y colaboradores (2002) consideraron los estudios de Scheuplein (1972) de que la ruta folicular domina el transporte en etapas tempranas, mientras transcurre el tiempo de latencia para que se establezca un flujo intercelular. Sin embargo, en tiempos más largos,

el transporte intercelular domina (Figura 4). Aunque sigue siendo generalmente aceptado que la vía intercelular puede llegar a dominar durante la penetración en estado estable de los compuestos, se ha argumentado que los anexos cutáneos (folículos pilosos, las glándulas ecrinas y pilosebácea) pueden ofrecer una vía alternativa para la difusión de una molécula.

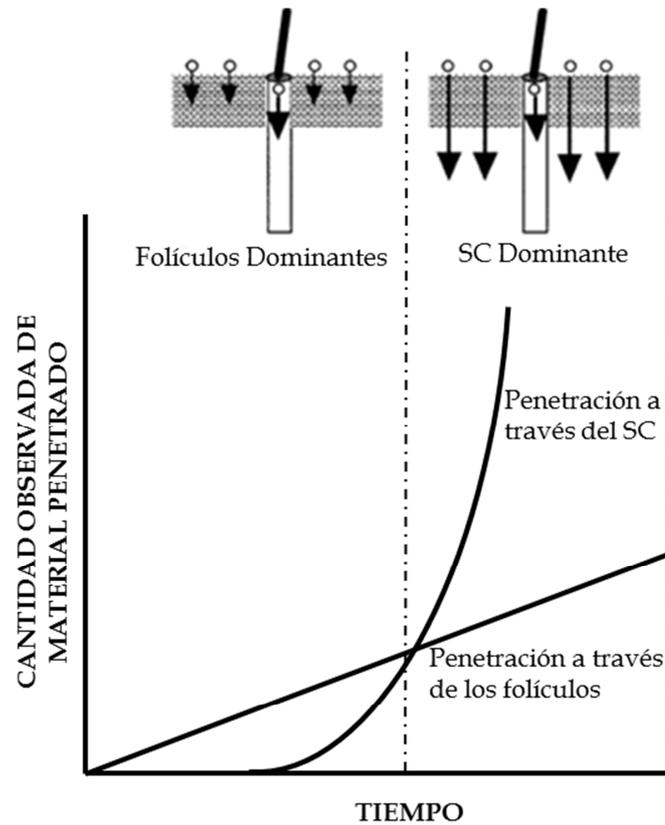


Figura 4. Dominio sugerido del transporte transfolicular durante etapas tempranas de penetración percutánea (Roberts, Cross and Pelett 2002).

2.4. Ventajas y desventajas de la administración transdérmica

2.4.1. Ventajas de la administración transdérmica (Barry 2001)

- a. Puede sustituir la vía oral.
- b. Disminución del efecto metabólico del primer paso hepático.
- c. Evita hemorragias o irritación en el tracto gastrointestinal.
- d. Ayuda a los fármacos a que no se degraden en el ambiente ácido del estómago.
- e. Reduce la variabilidad en concentración plasmática por la mezcla de medicamentos con los alimentos en el estómago.
- f. Permite una administración no invasiva.
- g. En caso necesario el sistema puede retirarse fácilmente.
- h. Aumenta el tiempo en circulación sistémica de los fármacos que tienen un tiempo de vida media corto (e.g., parche transdérmico).
- i. Evita el trauma asociado con la vía parenteral.

2.4.2. Desventajas de la administración transdérmica (Barry 2001)

- a. Limitado a una serie fármacos con propiedades fisicoquímicas particulares (e.g., peso molecular, coeficiente de partición y potencia elevada).
- b. Variación interindividual (e.g., raza, edad, entre otras).
- c. La piel dañada afecta la tasa de penetración.
- d. Metabolización de ciertos fármacos por enzimas de la piel antes de llegar a la vascularización cutánea (efecto del primer paso cutáneo).
- e. Los fármacos pueden degradarse antes de la penetración a través del SC por las bacterias que se alojan en la superficie de la piel.
- f. Problemas de alergias, enrojecimiento, irritación al momento y después de la administración.
- g. Tecnologías complejas.
- h. Altos costos.

2.5. Promotores de absorción transdérmica

Una de las principales funciones de la piel es evitar que el cuerpo pierda agua hacia el medio ambiente y bloquear la entrada de agentes exógenos, como ya se ha mencionado en capítulos anteriores. Aunque la piel y en particular el estrato córneo forma una barrera efectiva a la permeación de fármacos, incluso si el estrato córneo está perturbado, hay importantes obstáculos en otras capas de la piel que dificultan la penetración de los fármacos (Barry 2001).

Es por ello que en la mayoría de las formulaciones transdérmicas se incorporan sustancias exógenas o dispositivos que promuevan la absorción del fármaco. A todas aquellas sustancias o técnicas cuya función sea mejorar o favorecer el paso de solutos a través de la piel, ya sea por interrupción temporal o franqueo del estrato córneo, se les conoce como promotores de absorción.

Estos promotores se clasifican según su mecanismo de acción de la siguiente manera:

2.5.1. Promotores químicos

Estos interactúan de manera reversible con los componentes membranales de la siguiente manera:

- a. Fluidización de los lípidos intercelulares del estrato córneo. Esto se refiere al incremento en el desorden de las cadenas hidrocarbonadas de los lípidos, lo que genera espacios por donde es factible que penetren los fármacos. Este tipo de interacción la presentan promotores con características anfífilas (e.g., surfactantes) que poseen una cadena hidrocarbonada capaz de insertarse entre las cadenas de los lípidos del estrato córneo.
- b. Extracción de lípidos. Algunos surfactantes y disolventes son capaces de disolver y extraer los lípidos.
- c. Desnaturalización de las proteínas del estrato córneo. Este tipo de efecto lo presentan algunos disolventes y otros compuestos como la urea.
- d. Incremento del coeficiente de partición estrato córneo/vehículo. Se observa con algunos vehículos como el propilenglicol o el Transcutol®, capaces de penetrar,

sustituir al agua presente en el estrato córneo y con ello favorecer la afinidad del fármaco por la membrana.

- e. Arrastre del fármaco por efecto del flujo del promotor. Esto ocurre con disolventes como el Transcutol® capaces de penetrar y arrastrar junto consigo el fármaco.

La acción de los promotores químicos se traduce en alteraciones del espectro infrarrojo característico del estrato córneo, en los termogramas obtenidos por calorimetría diferencial de barrido, así como en un incremento en los valores de pérdida de agua transepidermal.

Los promotores de permeación químicos, farmacológicamente son inactivos, con propiedades fisicoquímicas que permiten modificar reversiblemente la resistencia del SC, ayudando a los fármacos a penetrar en los tejidos para actuar de manera local o sistémica, interactuando a nivel intercelular e indirectamente modificando la actividad termodinámica del fármaco o solubilizando al fármaco, esta clase de compuestos han sido probados por su acción: agua, hidrocarburos (alcanos y alquenos); sulfóxidos (especialmente dimetilsulfóxido) y sus análogos, pirrolidonas ácidos grasos, ésteres, ésteres de alquilo amino; amidas; ureas; aminas y bases; terpenos, esteroides; dioxolanos pirrolidona; y derivados de imidazol; laurocaprama (Azone) y sus derivados. Otros enfoques para la mejora incluyen el uso de enzimas, aceites naturales, micelas de fosfolípidos, liposomas, polímeros y surfactantes (Asbill and Michniak 2000).

Se propone que las propiedades fisicoquímicas del promotor seleccionado deben ser comparadas con las del fármaco. Por ejemplo, el parámetro de solubilidad del potenciador debe ser similar al de la piel, que ha sido reportado aproximadamente de $10 \text{ (cal/cm}^3\text{)}^{1/2}$. La velocidad de permeación de un fármaco hidrófilo, por ejemplo, se puede aumentar por el uso de un intensificador lipófilo.

2.5.2. Promotores físicos.

Los promotores de permeación físicos se describen como mínimamente invasivos y la mayoría actúan por remoción del estrato córneo o franqueo, puede ser por medio de una fuerza eléctrica (e.g., iontoforesis) sonoforesis (e.g., uso de ultrasonido), o ya sea mecánicamente como en el caso de las microagujas. Estos promotores se pueden combinar con los químicos y aumentar la permeabilidad.

La Figura 5 muestra de manera esquemática los tipos de promotores que se han empleado.

Las propiedades generales para estos promotores químicos o físicos son las siguientes:

- a. Aumentar la difusividad del fármaco en la piel.
- b. Efecto reversible.
- c. Sin efecto farmacológico dentro del organismo.
- d. Compatible con excipientes y fármacos en diferentes formulaciones.
- e. No tóxico, no alergénico.
- f. Rápida acción con actividad y duración del efecto predecible y reproducible.

Técnicas para aumentar la absorción de fármacos a través de la piel

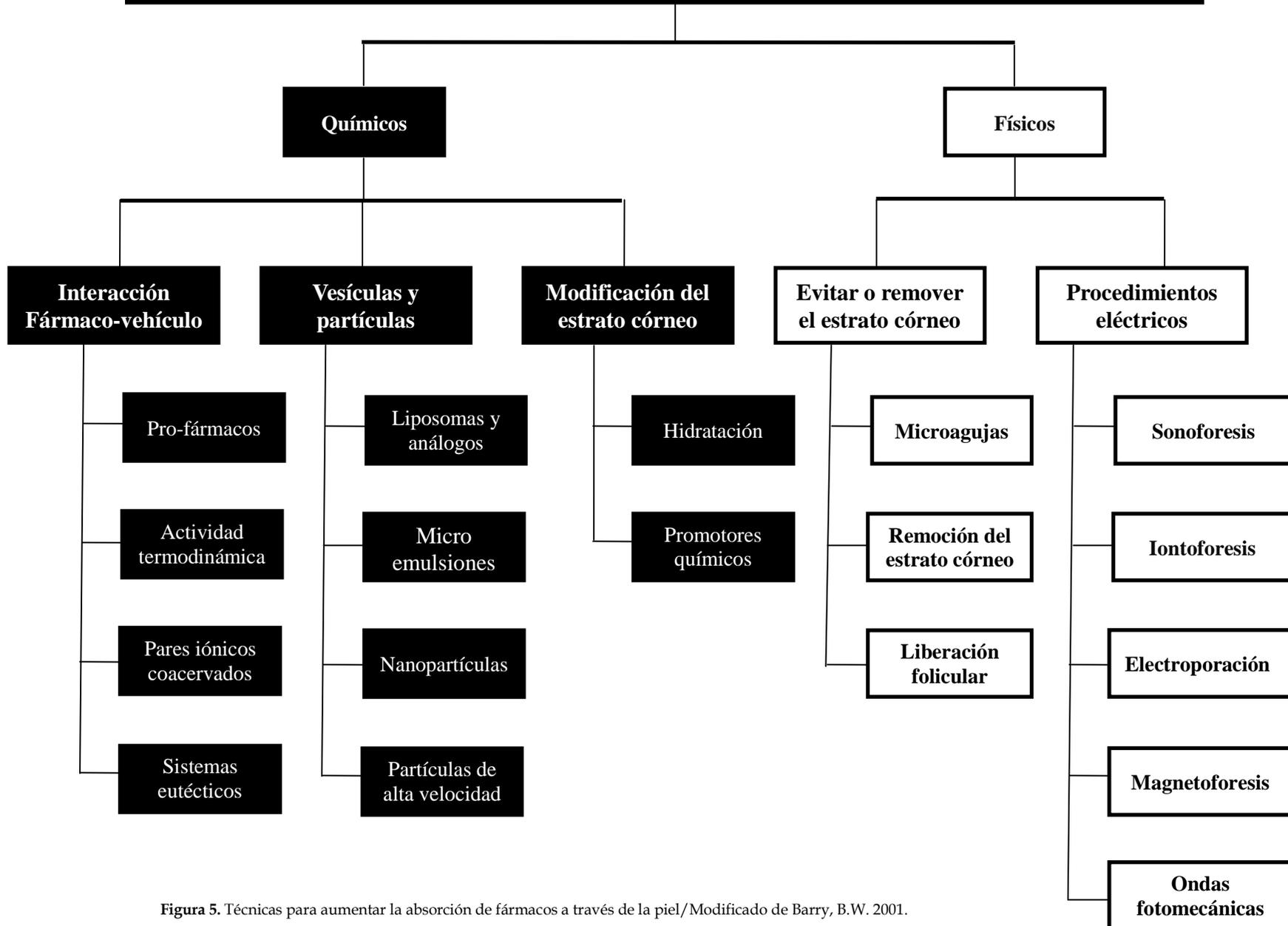


Figura 5. Técnicas para aumentar la absorción de fármacos a través de la piel/Modificado de Barry, B.W. 2001.

2.6. Quitosán

2.6.1. Quitosán-quitina

En la naturaleza existen varios polímeros muy importantes ya sea por su abundancia, variedad de usos o fácil acceso. En ella se puede encontrar tanto a la celulosa como la quitina.

El origen del quitosán se remonta a 1811 cuando la “quitina”, del cual se deriva, fue descubierta por Braconnot, pero el nombre se lo otorga Lassaingne en 1843 (Badawy, et al. 2011). Posteriormente el término quitosán fue determinado por Hoppe-Seyler en 1894, basándose en los estudios de Rouget en 1859 quien encontró que si la quitina es tratada con un álcali caliente genera un producto soluble en ácidos orgánicos, pero no fue sino hasta 1950 que fue claramente identificado como un polímero constituido por glucosamina (Soro Guevara 2007). El quitosán es un biopolímero natural de gran interés, debido a sus características fisicoquímicas y actividad biológica únicas (Rabea, et al. 2003), así como por sus excelentes propiedades de adsorción, no toxicidad, biocompatibilidad, alta biodegradabilidad y propiedades antimicrobianas, que puede ser procesado en varios productos, incluyendo copos, polvos finos, granos, esponjas, algodón, fibras y geles. En consecuencia, es considerado en diversas aplicaciones industriales (Rabea, et al. 2003, Hirano 1996, Shahidi, et al. 1999), es el segundo polisacárido más abundante después de la celulosa y se estima que se produce anualmente casi tanto como ésta (Kumar 2000).

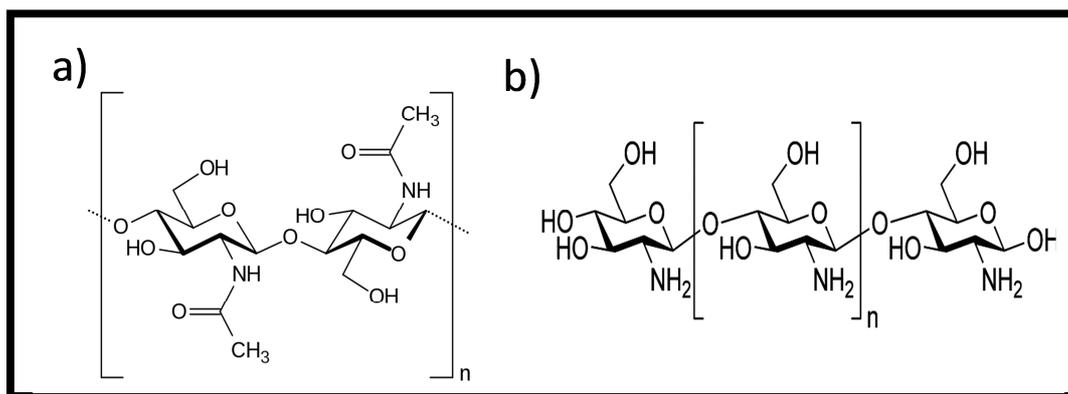


Figura 6. Estructura química de: a) quitina b) quitosán.

El quitosán se obtiene por desacetilación parcial de la quitina que proviene del exoesqueleto de los invertebrados. Su fórmula es beta (1-4)-2-amino-2-desoxi-D-glucosa

(Figura 6). Se considera quitosán una vez que la quitina es desacetilada por encima del 65 %, mientras que el rango de desacetilación, para considerarlo quitina, es alrededor del 5-15% (Shuang 2004). Los dos términos, quitina y quitosán se confunden a menudo, aunque la quitina es totalmente insoluble y no puede ser utilizada como tal en una formulación (Garcia 1998).

2.6.2. Propiedades fisicoquímicas

Las propiedades de la quitina y del quitosán dependen principalmente de la fuente de obtención, estructura lineal no ramificada, método de preparación y composición. Estos polímeros difieren entre sí por su solubilidad, cristalinidad, peso molecular, viscosidad, reactividad química, grado de acetilación entre otras (Ogawa and Yui 1993).

❖ *Estructura cristalina*

La estructura cristalina difiere de la quitina al quitosán; esto se puede verificar mediante dos procesos: a) desacetilación parcial de la quitina, b) la desacetilación total de la quitina (quitosán puro), observando que el material reacetilado es menos cristalino que el quitosán puro. Sin embargo, también depende del tratamiento secundario (reprecipitación, secado y liofilización). Además, el origen puede afectar la cristalinidad residual del quitosán, que a su vez, controla el acceso a los sitios de absorción internos y las propiedades de difusión (rehidratación y el transporte de solutos, respectivamente) así también, el procedimiento de desacetilación puede afectar la estructura del estado sólido del quitosán (Harish, et al. 2002, Rout, et al. 1993).

❖ *Grado de acetilación*

Químicamente, la quitina es una poliglucosamina. Un parámetro importante para diferenciar entre quitina y quitosán es el grado de acetilación. Para definir esta relación, se han probado varios métodos analíticos que incluyen IR, UV, espectroscopía RMN y análisis térmico. En su forma natural, la quitina se presenta parcialmente desacetilada, la diferencia entre quitina y quitosán es de hecho arbitraria ya que las formas completamente acetiladas o desacetiladas no existen en la naturaleza ni como productos finales de un proceso, por lo que en la práctica al polímero que presenta mayor acetilación se le

denomina quitina y al más desacetilado quitosán. Por otra parte, en el caso de la quitina, el grado de acetilación determina las condiciones adecuadas de desacetilación, un proceso complejo que aún requiere de investigación con el fin de evaluar la viabilidad de la preparación más rápida de quitosán. Por lo tanto, la búsqueda de un método rápido, de bajo costo y preciso para determinar el grado de acetilación ha sido una de las principales preocupaciones durante muchas décadas. La quitina típica tiene generalmente un grado de acetilación entre 70-95%, mientras que el quitosán tiene comúnmente un grado de acetilación entre 15-25. El grado de acetilación es probablemente el parámetro más importante de estos polisacáridos y determina grandemente sus características funcionales y fisiológicas.

❖ *Peso molecular y viscosidad*

El quitosán se refiere generalmente a una familia de polímeros que se caracterizan por el número de unidades de azúcar por molécula de polímero, que define su peso molecular. Las propiedades físicoquímicas, que incluyen la viscosidad, la solubilidad, la adsorción en sólidos, elasticidad y resistencia al desgarro, dependen del peso molecular del polímero.

El PM del quitosán depende de su origen y condiciones de desacetilación (tiempo, temperatura y concentración de álcali). Como el quitosán es obtenido de la quitina por desacetilación alcalina, el peso molecular tiene un promedio más bajo al extenderse generalmente entre 1×10^5 - 3×10^5 Da. El quitosán exhibe una amplia gama de viscosidades en los medios ácidos diluidos que dependen principalmente de su PM.

La viscosidad de la solución de quitosán depende de su tamaño molecular y concentración, así como el pH y la fuerza iónica del disolvente (Rinaudo 2006). La viscosidad es un factor importante en la determinación convencional del PM del quitosán y en la determinación de sus aplicaciones comerciales, soluciones con alta viscosidad pueden no ser convenientes para el manejo de la industria. Una baja viscosidad puede facilitar su manejo.

El quitosán es un producto altamente viscoso similar a las gomas naturales. La viscosidad puede variar de 10 a 5000 cP. En solución, debido a su comportamiento polielectrolítico

dependiente de la fuerza iónica del medio, se comporta de manera diferente, lo cual influye notablemente en la viscosidad de la disolución. Debido a la alta viscosidad del quitosán en sistemas de $\text{pH} < 5.5$, puede emplearse como espesante, estabilizante o agente de dispersión.

❖ *Solubilidad*

La solubilidad del quitosán se encuentra relacionada a la cantidad de grupos amino protonados de la cadena polimérica; en cuanto mayor sea la cantidad de estos grupos mayor es la solubilidad del polímero; aspecto que se encuentra relacionado al grado de desacetilación del quitosán. Las soluciones acuosas de algunos ácidos como el fosfórico, ácido sulfúrico y ácido cítrico no son buenos disolventes (Gross, et al. 1983). La densidad de carga del quitosán, que es el grado de protonación de los grupos amino, está determinada por la composición química, peso molecular y las variables externas tales como el pH y fuerza iónica. La constante de disociación (pK_a) para el quitosán está en un intervalo de 6.2 a 7, dependiendo del tipo de quitosán y las condiciones de medida (Badawy and Rabea 2011). En general, la solubilidad disminuye con un aumento en PM. Por otra parte, muchos intentos se han hecho para mejorar su solubilidad en agua. Una razón importante es que la mayoría de las aplicaciones biológicas de esta sustancia requieren que el material sea procesable y funcional a un pH neutro. Por lo tanto, la obtención de un derivado soluble en agua del quitosán es un paso importante hacia una mayor aplicación como material biofuncional (Badawy, et al. 2011).

El quitosán es insoluble en solventes comunes y en medio acuoso a $\text{pH} > 6.0$ y es soluble en ácidos minerales y orgánicos diluidos, siendo una propiedad relevante para diversas industrias. Debido a la alta densidad de cargas positivas el quitosán se comporta en soluciones ácidas como una molécula policationica.

❖ *Reactividad química*

El quitosán tiene tres tipos de grupos funcionales: un grupo amino, un grupo hidroxilo primario y un grupo hidroxilo secundario en las posiciones C-2, C-6 y C-3, respectivamente. Estos grupos reactivos son fácilmente sujetos a modificaciones químicas para alterar las propiedades mecánicas y físicas del quitosán. Las reacciones típicas en las que participen los grupos hidroxilo son eterificación y esterificación, la sustitución selectiva se puede lograr mediante la protección de los grupos amino durante la reacción. La presencia de un grupo amino nucleofílico permite la sustitución *N*-selectiva, como la *N*-alquilación y *N*-acilación mediante la reacción de quitosán con halogenuros de alquilo y cloruros de ácido, respectivamente. El método alternativo para la *N*-alquilación es una alquilación reductiva, donde se convierte en el grupo amino de una imina con un aldehído o cetona, y posteriormente se reduce a un derivado de *N*-alquilación (Furusaki, et al. 1996).

2.6.3. Métodos de obtención

En los últimos años se han desarrollado y propuesto una gran variedad de procedimientos para la preparación de quitosán. Varios de estos son la base de procesos para la producción industrial de quitosán a partir de cáscaras de crustáceos. Para la producción de quitina, la materia prima más abundante disponible son las conchas de cangrejos, camarones y langostas (entre 69 y 70%). Debido a que la quitina se asocia con otros componentes es necesario retirarlos para obtener quitosán y quitina a gran escala y consiste en tres pasos fundamentales (Torres B. 2009):

- a. Desproteización: remoción del material proteico, que se puede hacer mediante tratamiento de hidróxido de sodio o digestión por enzimas como la pepsina, tripsina, pronasa, etc.
- b. Desmineralización: eliminación de las sales minerales como carbonato de calcio y fosfato de calcio, extrayéndolos con ácido clorhídrico; los pigmentos y carotenos son eliminados con permanganato de potasio o peróxido de hidrógeno a 60 °C.
- c. Desacetilación de quitina para obtener quitosán.

Los recientes avances en las tecnologías de fermentación sugieren que el cultivo de hongos seleccionados pueden proporcionar una fuente alternativa para la obtención de quitina y quitosán. La cantidad de estos polisacáridos depende de la especie de hongo y las condiciones de cultivo (Badawy, et al. 2011).

Como se expuso anteriormente, la extracción de la quitina consiste básicamente en emplear ácidos diluidos para la desmineralización, así como, un tratamiento álcali a altas temperaturas para que las proteínas asociadas se solubilizan (García 1998). La Figura 7 describe en general la producción de quitina y quitosán.



Figura 7. Método de obtención de quitosán (Torres B. 2009).

2.6.4. Aplicaciones del quitosán en el área farmacéutica

La importancia fisiológica del quitosán ha sido estudiada por varios investigadores y tiene un gran interés en la industria farmacéutica por sus aplicaciones biomédicas, principalmente como acarreadores de fármaco, esto debido a que el quitosán puede mezclarse fácilmente con algún otro material o disolvente, propiciando la formación de diversas estructuras como geles, polvos, películas, etc. El quitosán ha mostrado ser biodegradable cuando ha sido implantado en animales debido a la enzima lisozima presente en todas las heridas. También participa en funciones de la desintoxicación del hígado y de los riñones y posee actividades anti-inflamatorias, hepatoprotectoras, anti-reativas, anti-hipóxicas (Torres B. 2009). La toxicidad reportada por vía oral, $DL_{50} = 16,000$ mg/Kg (Shaji, et al. 2010).

El quitosán se emplea como protector y secante, tiene actividad bioestimulante en procesos reparativos y es capaz de reconstruir tejidos. Es un cicatrizante por su acción en la superficie y sustituto de la queratina por su carácter catiónico. De acuerdo a las propiedades terapéuticas, ya ha sido probado con éxito en tratamientos de úlceras y pie diabético y se utiliza también como componente en tabletas de acción prolongada para bajar de peso o controlar el colesterol, atrapando la grasa y contribuyendo al crecimiento de bifidobacterias intestinales benéficas, así como un excelente cardioprotector cuando se consume en pequeñas dosis diarias (Torres B. 2009).

Debido a la limitada solubilidad de la quitina en soluciones acuosas, el quitosán es más adecuado para aplicaciones industriales. Mientras que la quitina es un polímero de acetilamino-D unidades de glucosa, el quitosán es más difícil de definir en términos de su composición química exacta. Por lo general, se refiere a una familia de polímeros que se caracterizan por el número de unidades de azúcar por cada molécula de polímero, que define el peso molecular y el grado de desacetilación. A pesar de que el grado de desacetilación afecta a la solubilidad del quitosán en solución acuosa, el polímero es soluble en soluciones ácidas y ligeramente soluble en soluciones alcalinas débiles (Dodane and Vilivalam 1998).

Además, el quitosán tiene una variedad de prometedores usos farmacéuticos y actualmente es considerado como un material de soporte novedoso en sistemas de administración de fármacos, como lo indica el gran número de estudios publicados en los últimos años (Tabla 1).

Tabla 1. Ejemplos de sistemas de liberación de fármacos en los que se ha usado el quitosán (Dodane and Vilivalam 1998).

Vía de administración	Sistema de entrega
Oral	Micropartículas
	Liposomas
	Disco bucal
	Solución
	Vesícula
	Recubrimiento de película
	Tabletas
	Secado por aspersión de partículas
	Cápsulas
Parenteral	Microesferas
	Solución
Nasal	Solución
Ocular	Suspensión

❖ *La administración de fármacos por vía oral*

La biodisponibilidad de los medicamentos ha sido mejorada por el uso de formas de dosificación mucoadhesivas. Al prolongar el tiempo de residencia de los portadores de fármacos en el sitio de absorción, es más factible tener una liberación sostenida y una mejora de la biodisponibilidad de los fármacos. Se reconoce que el quitosán posee buenas propiedades mucoadhesivas, como se ha demostrado *in vitro* (Lehr, et al. 1992). Remuñán-López y colaboradores (1997) propusieron sistemas de micropartículas con quitosán como soporte localizable en los sitios específicos de administración oral. Uno de los sistemas de distribución incluye la amoxicilina incluida en microesferas de quitosán para su localización selectiva en la cavidad gástrica. Los autores proponen que las microesferas de quitosán se adhieren a la mucosa del estómago para liberar el fármaco para el tratamiento de la úlcera gástrica causada por *Helicobacter pylori* (Dodane and Vilivalam 1998).

❖ *Entrega de fármacos por vía parenteral*

En la tecnología de liberación controlada, los polímeros biodegradables empleados como portadores ofrecen ventajas potenciales para la liberación prolongada de fármacos de bajo peso molecular, e incluso fármacos compuestos por macromoléculas. La susceptibilidad del quitosán a la lisozima hace que sea biodegradable y un soporte ideal para los fármacos. Moléculas tales como la albúmina de suero bovino, toxoide diftérico (DT) y los bifosfonatos se han incorporado con éxito a las microesferas de quitosán (Jameela, et al. 1994).

❖ *Administración de fármacos por vía ocular*

La baja biodisponibilidad de los medicamentos oftálmicos de aplicación tópica implica una necesidad de instilación frecuente para lograr el efecto terapéutico. Este inconveniente puede ser superado con una liberación prolongada del fármaco en el área de la córnea. El uso del quitosán en suspensiones coloidales *in vivo*, mostró un aumento significativo en la biodisponibilidad de fármacos oculares. Calvo et al (1996) combinan las características de nanocápsulas de poli-ε-caprolactona como portadores oculares con las ventajas del quitosán y de la poli-l-lisina (PLL) como polímeros catiónicos mucoadhesivos y de recubrimiento. A pesar de que la PLL y el quitosán muestran una carga superficial positiva, sólo nanocápsulas recubiertas con quitosán mejoran la penetración ocular de la indometacina en relación con nanocápsulas sin recubrimiento (Dodane and Vilivalam 1998).

❖ *Entrega de genes*

El desarrollo de sistemas de soporte para la nueva entrega de genes representa una tecnología que permite el tratamiento de muchos trastornos genéticos. Sin embargo, una barrera crítica para la terapia génica, sigue siendo la formulación de un vehículo de transporte eficiente y seguro. Algunos métodos emplean complejos de ADN que contienen lípidos, proteínas, péptidos o portadores poliméricos, así como ligandos capaces de elegir los complejos de ADN a los receptores de superficie celular en las células diana y los ligandos capaces de dirigir el tráfico intracelular de ADN en el núcleo (Dodane and Vilivalam 1998).

❖ Administración nasal de fármacos

Hay un creciente interés en el desarrollo de sistemas de administración nasal para muchos fármacos, incluyendo péptidos y proteínas. Para aumentar la biodisponibilidad de estos compuestos, diversos potenciadores de absorción han sido investigados, incluyendo surfactantes, las sales biliares y las ciclodextrinas. Sin embargo, la mayoría de ellos están asociados con efectos secundarios, tales como cambios irreversibles en la mucosa nasal. Se ha demostrado que el hidroxipropil- β -ciclodextrina de quitosán puede mejorar el transporte de la insulina a través de la mucosa nasal de ratas (Shaoyun, et al. 2004).

2.7. Microagujas

Muchas de las aplicaciones y manipulaciones en los campos biológicos, farmacéuticos y médicos se caracterizan por los protocolos que necesitan tanto para el muestreo de fluidos biológicos, como para la administración de fármacos, con mínima invasión en los tejidos. Sin embargo, los métodos convencionales de suministro de fármacos o toma de muestras de fluidos corporales tienen varias limitaciones. La administración oral no puede ser utilizada eficientemente para la entrega de todos los fármacos a causa de la degradación que pueden sufrir en el tracto gastrointestinal o por su metabolismo en hígado. La alternativa habitual para la administración oral es la parenteral, ya sea directamente en el torrente sanguíneo o en tejido. Aunque la inyección es efectiva en la liberación de grandes cantidades de fármaco, tiene limitaciones importantes, como el dolor y el trauma de los tejidos causado por la aguja, además, en ciertos casos existe fracaso para proporcionar una liberación controlada o sostenida conveniente, así como el inconveniente de que se necesitan conocimientos para realizar una inyección. En el caso de las microagujas, éstas tienen la capacidad de insertarse de manera precisa para inyectar cualquier fármaco por debajo del SC, además tienen la posibilidad de que funcionen como un sistema de liberación matricial (Aggarwal and Johnston 2004).

Distintas estrategias, como se describe en la tercera generación de sistemas transdérmicos incluyendo potenciadores químicos y físicos han demostrado, en muchos casos, un impacto limitado para superar esta desventaja. Pero solo las microagujas han logrado vencer la barrera de permeación de la piel y lograr una liberación sostenida (si así se requiere), ya que son sistemas híbridos entre parches transdérmicos y agujas hipodérmicas. Las microagujas son agujas con dimensiones de micras, capaces de perforar la piel de una manera indolora, permitiendo la liberación efectiva de fármacos.

Numerosos trabajos reportan un aumento en el transporte de fármacos a través de la piel con el empleo de microagujas. Las microagujas han demostrado gran eficacia para facilitar el paso de macromoléculas, sustancias hidrofílicas, y diferentes acarreadores, tales como vesículas lipídicas y nanopartículas (Nava-Arzaluz, et al. 2011).

Las microagujas han sido fabricadas con diferentes materiales como: metales, silicón, dióxido de silicón, polímeros (biocompatibles y biodegradables), carbohidratos, entre otros, descritos más adelante (Tabla 3).

2.7.1. Definición e historia

Aunque el concepto de microagujas se remonta a 1976 cuando Alza Corporation lo patentó describiéndolo como un reservorio de fármaco (50-100 μ m de longitud) (Gesrtel, M; Place, V.A.), no fue demostrado experimentalmente hasta la década de los 90 cuando la industria de la microelectrónica proporcionó las herramientas necesarias para hacer microfabricación como pequeñas estructuras. Desde los primeros estudios de administración transdérmica en 1998, ha habido cada vez mayor interés en el campo con creciente actividad en la comunidad de microfabricación para desarrollar nuevas tecnologías de fabricación de agujas, así también, la industria de administración de fármacos ha estado interesada para desarrollar microagujas con aplicaciones farmacéuticas.

Las microagujas pueden ser consideradas como sistemas terapéuticos transdérmicos híbridos, entre agujas hipodérmicas y los parches transdérmicos, que son capaces de perforar la piel de una manera indolora pasando a través del SC. Dependiendo de su estructura las microagujas pueden actuar como canales para dirigir el fármaco en la piel (ejemplo microagujas huecas) o pueden ser sistemas poliméricos de entrega que contienen el fármaco (microagujas sólidas) (Nava-Arzaluz, et al. 2011).

Las microagujas pueden permear la piel de las siguientes maneras (Figura 8):

- a. Por la perforación de la piel, permitiendo el paso de un fármaco contenido en un sistema de distribución adecuado o formulación (marcado de vías para penetración de fármaco).
- b. Microagujas recubiertas con el fármaco (“capa e inserción”).
- c. Microagujas con el fármaco encapsulado.
- d. Inyección del fármaco a través de microagujas huecas.

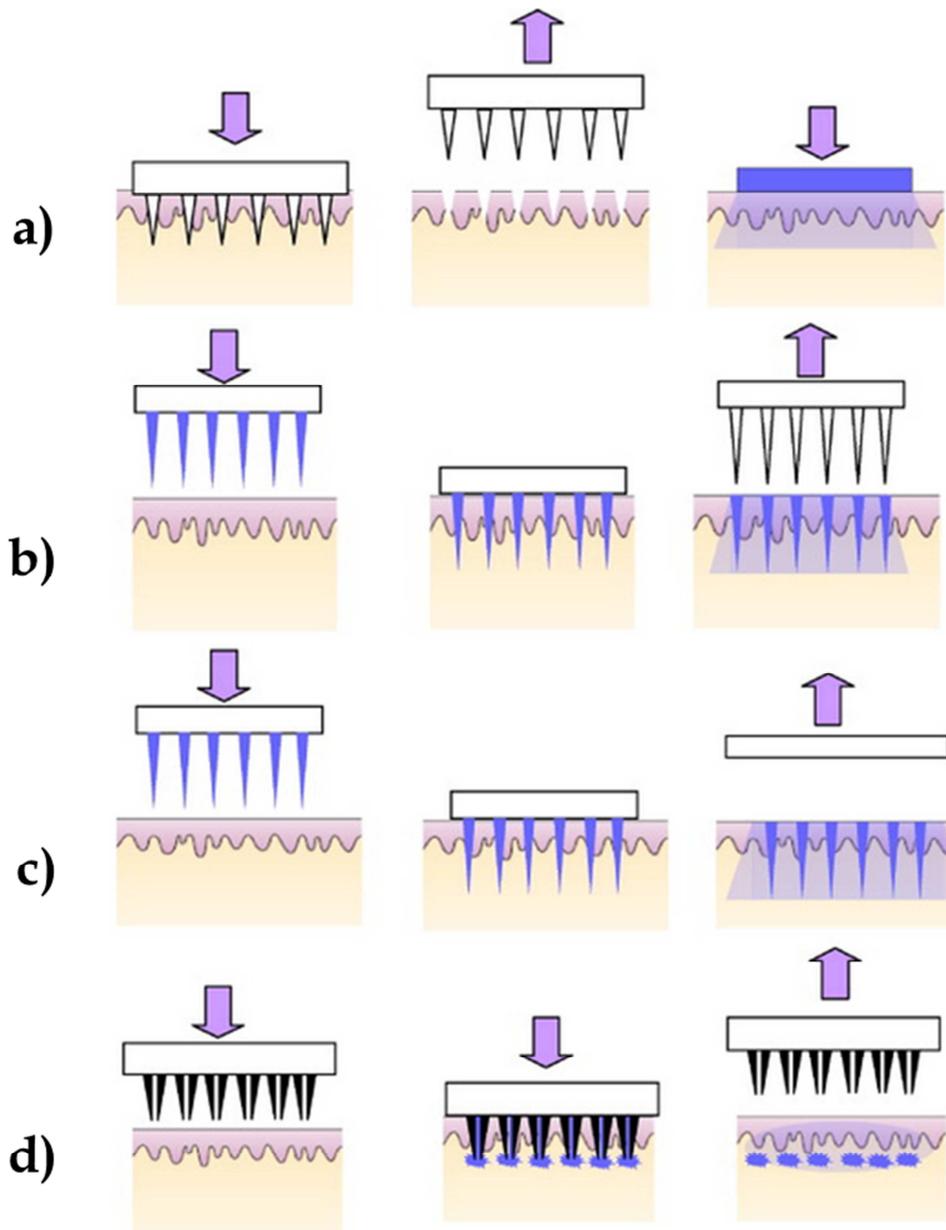


Figura 8. Administración de fármacos utilizando diferentes diseños de microagujas: (a) Marcado de vías con un parche, (b) microagujas recubiertas, (c) microagujas que contienen fármaco (agujas solubles o biodegradables) y (d) microagujas huecas (Arora A., et al. 2008).

2.7.2. Ventajas y desventajas de las microagujas

2.7.2.1. Ventajas de las microagujas (Nava-Arzaluz, et al. 2011)

La mayor ventaja de las microagujas radica en su longitud, (que puede variar de 100-1000 μm) ya que esta longitud garantiza la disrupción del SC. Enseguida se mencionan otras ventajas importantes:

- a. Reducción o eliminación del dolor y trauma de tejidos durante la inserción.
- b. Mínimamente invasiva.
- c. Disminución de la probabilidad de infección en el lugar de inserción.
- d. Aumento considerable del transporte de fármacos a través de la piel.

Particularmente útiles para compuestos de alto peso molecular e hidrófilos.
- e. Posibilidad de auto-administración.
- f. Control de la administración de diferentes formulaciones, si la matriz de microagujas posee varios puertos de salida.
- g. Las microagujas son dispositivos de administración de fármacos, pero también son un medio para el muestreo de los fluidos biológicos.
- h. Al igual que otros sistemas transdérmicos, evitan la degradación en el tracto gastrointestinal y el metabolismo del hígado.
- i. Aumento del confort del paciente.

2.7.2.2. Desventajas de las microagujas (Barry 2001)

La principal desventaja que reportan las empresas o grupos de investigación para la fabricación de microagujas radica por un lado, en sus dimensiones, material de fabricación y tecnologías disponibles, así como en el impacto que tienen estos dispositivos como materiales de desecho sobre el medio ambiente (e.g., aditivos, plastificantes, estabilizantes, etc.); por otro lado, los costos y procesos requeridos en su preparación son sustantivamente altos comparados con las formulaciones estándar.

Algunas otras desventajas que presentan las microagujas son las siguientes:

- a. Son costosas como dispositivos de un solo uso.
- b. Las microagujas huecas pueden llegar a obstruirse por tejidos o fluidos biológicos.
- c. Microagujas sólidas pueden romperse y quedar insertadas en la piel, lo cual representa un problema en el caso de las metálicas o aquellas elaboradas a base de materiales no solubles o biodegradables.
- d. Las microagujas a base de maltosa, no son aptas para péptidos y proteínas, ya que requieren de altas temperaturas (superiores a 100 °C) para formarse.
- e. Las elaboradas de metal galvanizado tienden a deformarse.
- f. En general, se requieren altos tiempos de fabricación y tecnología compleja.

2.7.3. Tipos de microagujas

Una serie de estrategias específicas han sido empleadas para el uso de microagujas para la administración transdérmica. La mayoría del trabajo se ha centrado en hacer agujeros microscópicos en la piel mediante la inserción de microagujas huecas, con liberación del fármaco a partir de un parche, otro método utiliza a las microagujas para hacer los orificios y luego aplicar un fármaco, o bien el diseño de microagujas sólidas, que pueden contener al fármaco impregnado en su superficie o bien incluido en el material que las constituye, el cual puede degradarse o disolverse una vez insertadas. Aunque son más complicadas de fabricar, las microagujas huecas facilitan el flujo del fármaco a través del orificio de la aguja y en la piel, lo que puede conducir a un ritmo mucho más rápido de entrega que puede ser modulada a través del tiempo. Hay dos tipos de microagujas, sólidas y huecas.

❖ *Microagujas Sólidas*

Las microagujas sólidas se utilizan para crear orificios en una escala de micras en la piel a través de la cual las moléculas tienen una mayor facilidad de transporte. El primer trabajo sobre la fabricación de matrices de microagujas grabadas en una oblea de silicio y desarrollado para la administración intracelular *in vitro* lo reportan Hashmi y colaboradores en el año 1995. Estas agujas se insertaron en células para aumentar la absorción molecular y de transferencia de genes. En lo subsecuente las microagujas sólidas han sido desarrolladas para aplicaciones de administración transdérmica, demostrando su utilidad para la penetración de fármacos, lo que brinda la posibilidad de incrementar la variedad de principios activos que pueden ser administrados por esta vía (Prausnitz 2004).

Por ejemplo los primeros estudios de administración por microagujas sólidas para determinar si éstas podrían utilizarse para aumentar el suministro de fármacos transdérmicos fue una matriz de microagujas sólidas que se incrustó en la piel *ex vivo*, lo que incrementó la permeabilidad en piel de calceína. Se interpretó que el aumento en el transporte era producido por la liberación a través de los canales generados por las agujas. Después de retirar las agujas, los canales que se crearon permitían que la piel también aumentara la permeabilidad en otro orden de magnitud.

❖ *Microagujas huecas*

En contraste con las microagujas sólidas, las microagujas huecas ofrecen la posibilidad de transportar al fármaco a través del interior de éstas, facilitando una rápida entrega por la presión generada por el flujo. Una variedad de microagujas huecas se han fabricado, pero sólo un trabajo limitado se ha publicado sobre su posible uso para entregar compuestos en piel. Recientemente, McAllister y colaboradores utilizaron microagujas de vidrio insertadas en la piel de ratas diabéticas sin pelo *in vivo* para la liberación de insulina durante una infusión de 30 min. Este estudio demostró hasta una caída del 70% en el nivel de glucosa en sangre durante un periodo de 5 h después de la administración de insulina. Estas agujas se fabrican utilizando un extractor de micropipeta y biselador con un radio de punta de 60 micras y se insertan en la piel a una profundidad de 500 a 800 micras. En estudios relacionados (Prausnitz 2004), Stoeber y Liepmann demostraron la inyección en el muslo de pollo *in vitro* utilizando arreglos de microagujas; Chen y Wise utilizaron microagujas para generar estímulos químicos en el tejido cerebral *in vivo*, Smart y Subramanian utilizaron microagujas solo para extraer cantidades de nanolitros de sangre de la piel para medir los niveles de glucosa.

2.7.4. Geometría de microagujas

Una de las opciones emergentes para la administración de fármacos, es el uso de microagujas, integrado como un sistema completo de liberación, pudiendo eliminar la mayor parte de las limitaciones de la vía oral o la vía intramuscular.

Estas son unas de las motivaciones principales para el desarrollo de microagujas, así como es la necesidad de fabricar microagujas económicas y que sean lo suficientemente pequeñas para reducir el dolor. La disminución de los daños en los tejidos también reduce la probabilidad de infección que ocurre en el sitio de inserción.

Hoy en día, las agujas más pequeñas disponibles en el mercado para la administración de insulina, tienen un calibre de 30 a 31 y un diámetro exterior de 305 y 254 μm , respectivamente. No obstante, los métodos tradicionales de mecanizado, limitan el diámetro de las agujas fabricadas para aliviar los efectos invasivos de las aguja convencionales. Además, es muy difícil de diseñar y fabricar estructuras complejas dentro

de una aguja convencional. Tanto las microagujas huecas y sólidas han sido investigadas en los últimos años y su capacidad para atravesar el SC depende tanto de su diseño como de su geometría (Aggarwal and Johnston 2004).

En la literatura existen investigaciones sobre la fuerza confiable para penetrar la piel, así como el diseño óptimo en cuestión de métodos electromecánicos (MEMS) relacionados con la geometría rectangular, cuadrada y circular de las microagujas. La geometría es uno de los factores que afectan más la capacidad de las microagujas para atravesar la piel (se requiere una presión de 3.183×10^6 Pa para agujerar la piel humana). Algunos autores han comparado el efecto de la geometría sobre las propiedades mecánicas de microagujas de silicón y se ha encontrado que las microagujas circulares soportan mayor presión seguidas por las microagujas rectangulares y cuadradas. Se han probado una amplia variedad de geometrías. Algunas microagujas se pueden insertar en la piel manualmente, mientras que otras requieren rápidas velocidades de inserción. Las microagujas huecas son generalmente más débiles que las sólidas y pueden obstruirse por el tejido una vez que se han insertado en la piel. Sin embargo, son útiles para inyectar la formulación de algún fármaco o para retirar fluidos biológicos (Nava-Arzaluz, et al. 2011).

Tomando en consideración la influencia de las fuerzas mecánicas o los modos de carga (como la fuerza de compresión, fuerza de pandeo, fuerza de flexión libre, fuerza de flexión limitada, fuerza de corte y resistencia de la piel) que actúan sobre la microaguja durante la inserción en la piel humana, así como el hecho de que la piel es resistente a fuerzas que actúan sobre la microaguja (que depende directamente del área de sección transversal de las microagujas), se concluye que el mantenimiento de la relación entre la fuerza y el área son una constante. La inserción de la microaguja en el cuerpo está determinada por la proporción restante de la parte exterior de la microaguja y fuerza que experimenta durante la inyección, así como fuerzas de cambio con la profundidad de microagujas, ángulo de inserción, y la capa de tejido penetrado. Como se comentó anteriormente, la presión teórica necesaria para perforar la piel humana se ha dado como 3.183×10^6 Pa, sin embargo, esta presión se reduce drásticamente una vez que la piel está perforada. La longitud óptima para extraer muestras de sangre se ha fijado en 600 micras, donde se encuentran los capilares en la capa de la dermis que están a una distancia de 500 a 2000

µm bajo la superficie de la piel. Esta longitud permite que sean lo suficientemente largas para extraer fluidos corporales de la capa de la dermis y, sin embargo, lo suficientemente pequeñas para no pinchar los nervios que causan dolor en los tejidos más profundos. El enfoque general del diseño y geometría de las microagujas se debe considerar ya que es un factor importante en la decisión de las dimensiones de las microagujas.

2.7.5. Fármacos que se han administrado con microagujas

Como se mencionó anteriormente, las microagujas están a la cabeza para la mejora de la administración transdérmica de medicamentos, debido a su mínima invasión en la piel, así como a su gran efecto en la facilitación de la difusión del fármaco por esta vía. Ya se mencionó cómo las características de microagujas, como forma geométrica (por ejemplo, circular, rectangular o cuadrada), dimensiones (es decir, longitud y diámetro), la profundidad del recubrimiento de fármaco, etc., pueden influir, en la capacidad de perforar la piel tomando en cuenta sus propiedades mecánicas (Nava-Arzaluz, et al. 2011).

Se han realizado estudios *in vivo* para demostrar la viabilidad de microcanales como una vía no natural para el paso de un gran número de moléculas, desde compuestos de bajo peso molecular hasta algunos fármacos biotecnológicos de alto peso molecular (cuya administración se lleva a cabo casi exclusivamente por vía parenteral), e incluso nano y micropartículas.

Han sido propuestas diferentes microagujas y, en consecuencia, una variedad de formas de incluir el fármaco o incluso nanopartículas y micropartículas, en función del perfil de liberación deseado, i.e., bolo o liberación sostenida.

Las microagujas pueden contener al fármaco si se fabrica con materiales biocompatibles tales como carboximetilcelulosa o amilopectina, que además se disuelvan en la piel para liberar una única dosis (si el fármaco está contenido en el eje de las microagujas) o de liberación sostenida (si el fármaco está incluido en la parte posterior de las microagujas, por ejemplo un parche), como lo describen Lee et al. (2008) para sulforodamina B, albúmina sérica bovina y lisozima. Ito et al. (2006) utilizan la dextrina para preparar microagujas solubles cargadas con insulina. La Tabla 2 resume algunos de los resultados de estudios *in vivo* realizados con entrega de microagujas.

Tabla 2. Resumen de algunos estudios *in vivo* realizados con microagujas.

Tipo de Microaguja	Fármaco	Modelo	Resultado
Acero inoxidable recubierto con el fármaco	Calceína, Vitamina B, albúmina, plásmido de ADN, vacuna viral, micropartículas	Humanos	Liberación instantánea de solutos en la piel sin pérdida de la formulación durante la inserción (Gill and Prausnitz 2007).
Sólidas y huecas	Insulina	Ratas diabéticas	No son efectivas (Teo, et al. 2006).
Titanio recubiertas con película seca del fármaco	Ovoalbúmina Antígeno-proteína	Puercos de Guinea sin pelo	Respuesta de anticuerpos similar a las inyecciones hipodérmicas y 50 veces más que la vía subcutánea e intramuscular (Matriano, et al. 2002)
Recubiertas, sin punta	ADN	Piel de ratones	Mayor respuesta que con agujas hipodérmicas (Mikszta, et al. 2002)
Recubiertas de dextrina	Insulina	Piel de ratones	Disponibilidad similar a soluciones en vía intramuscular (Ito Y., et al. 2006)
Matriz de microagujas de silicón	Ácido 5-amino levulínico (ALA) (Como precursor en terapia fotodinámica)	Ratones desnudos	Reducción en el tiempo de aplicación y en la dosis de ALA (Donnelly, et al. 2008).
Arreglo de microagujas ranuradas- embebidas de ácido poli- <i>l</i> -láctico	Ovoalbúmina	Ratones	Microagujas recubiertas con ovoalbúmina rindieron alta respuesta de anticuerpos así como el incremento en el número y la profundidad de las ranuras (Han, et al. 2009).
Microflux® (Cubiertas con el fármaco)	Desmopresina	Puercos de Guinea sin pelo	Biodisponibilidad de 85% y T _{max} de 60 min. (Cormier, et al. 2004).

2.7.6. Materiales utilizados en la fabricación de microagujas

En los últimos 30 años, el interés de numerosos grupos de investigación y empresas se ha enfocado en el desarrollo de microagujas y sus aplicaciones, debido al hecho de que se espera que estas estructuras aumenten la permeabilidad de la piel y así se facilite considerablemente el transporte de fármacos a través de esta vía. Las microagujas pueden ser fabricadas con distintos materiales, dependiendo de la aplicación y función buscada. Se han empleado mucho los metales, como el acero inoxidable, el titanio, níquel y hierro, aunque también es común el uso de silicio, dióxido de silicio y vidrio. Otros materiales biodegradables o solubles comúnmente utilizados son el policarbonato, el ácido poliláctico-glicólico, carboximetilcelulosa, polivinilpirrolidona, amilopectina, dextrina, galactosa y maltosa. Con estos materiales pueden fabricarse microagujas sólidas o huecas. En el caso de los metales, estos son el material de elección para agujas huecas, debido a su resistencia estructural y al hecho de que la mayoría de ellos son baratos y biocompatibles; las microagujas poliméricas biodegradables han demostrado facilitar la penetración del fármaco incorporado en la misma microaguja. La incorporación del fármaco en la microaguja puede ser problemático debido a las altas temperaturas de procesamiento que pueden requerirse para el material polimérico. En el caso de la maltosa hay problemas con la absorción de agua y resulta difícil la flexión en la parte superior de la microaguja, lo que dificulta la inserción, además, debido a su punto de fusión (103°C), se requieren de altas temperaturas para formar las microagujas, limitando la incorporación de péptidos y proteínas debido a la desnaturalización de que pueden ser objeto (Nava-Arzaluz, et al. 2011). En la actualidad se le ha dado gran énfasis a las microagujas huecas de metal ya que suelen ser útiles tanto para la extracción de fluidos biológicos, como para la administración de fármacos en piel. La selección de los materiales depende del método de fabricación y de la tecnología disponible, así como de la aplicación que se vaya a dar. La Tabla 3 muestra algunos materiales empleados en la fabricación de microagujas.

2.7.7. Métodos de preparación de microagujas

El uso de circuitos integrados y microelectrónica han revolucionado nuestro mundo durante las últimas tres décadas. Este rápido ritmo de crecimiento ha impulsado el desarrollo de la microtecnología. Métodos de microfabricación como circuitos integrados

que se utilizan en la actualidad han dado como resultado tecnologías de fabricación, tales como fotolitografía, el crecimiento de película fina, deposición y el grabado. Los métodos utilizados en microfabricación se han aplicado ya sea mejorando significativamente los dispositivos en relación con su homólogo convencional o diversificando las aplicaciones de los dispositivos en una amplia gama de campos (Hilt and Peppas 2005).

Las microagujas se fabrican generalmente mediante procesos de litografía, con la participación del grabado químico y físico, así como la deposición química y física. El grabado seco puede ser isotrópico o anisotrópico, y se ha aplicado también grabado húmedo anisotrópico (Nava-Arzaluz, et al. 2011).

Entre otros métodos de fabricación, los que más se utilizan son los microelectromecánicos (MEMS), los cuales se han empleado para crear dispositivos mecánicos o eléctricos, incluso con escalas de la misma longitud de las células. A estos procesos se les conoce también como bioMEMS cuando se aplica al área biomédica. También es posible producir matrices de microagujas por medio del proceso láser LIGA. En este proceso, un vidrio (sustrato) se ha perforado previamente por ablación con láser. El sustrato se utiliza como un micromolde llenándolo con metales (por ejemplo, Au, Co, Cr, Cu, Pd, Pt, Ti, W) por electroformación. También se puede llenar con resinas poliméricas (mezclas de resinas epóxicas y endurecedor) por deposición. A continuación el micromolde se retira de manera química o mecánica (Nava-Arzaluz, et al. 2011). Por otra parte los métodos de microfabricación se pueden clasificar en micromecanizado superficial o a granel. Micromecanizado superficial es un proceso aditivo que consiste en la fabricación de estructuras micromecánicas a partir de películas delgadas depositadas, tales como el nitruro de silicio, silicio policristalino y otros materiales. Micromecanizado a granel es un proceso sustractivo que utiliza la eliminación selectiva de cantidades significativas de silicón u otro material, a partir de un sustrato para formar microestructuras. Estas técnicas de fabricación se han utilizado para la fabricación de una amplia gama de sensores, actuadores y microdispositivos, incluyendo sensores de presión, acelerómetros, sensores de flujo, cabezales de impresora de inyección de tinta, así como microespejos para proyección (Hilt and Peppas 2005). En la Tabla 3 se mencionan algunos de los métodos empleados para la obtención de microagujas.

Tabla 3. Recopilación de algunos materiales y métodos de fabricación de microagujas (Nava-Arzaluz, et al. 2011).

Tipo	Material	Método	Resultado
Sólido	Silicón	Grabado húmedo	Alta precisión, buena reproducibilidad, alternativa al grabado en seco.
Hueco, sólido	Dióxido de silicón	Silicón poroso	Obtención de microcapilares/ microagujas. Matrices de fácil fabricación≈millones de agujas / películas 2 o 3 pulgadas de diámetro.
Hueco	Dióxido de silicón	Grabado electroquímico	Obtención de microagujas, matrices de diferentes geometrías y dimensiones.
Hueco	Dióxido de silicón	Litográfico	Microagujas de diferentes geometrías con sensores piezoeléctricos para medir la resistencia de la piel. Agujas circulares son más fuertes que las rectangulares y las cuadradas.
Sólido	Metálico o polimérico	Extirpación por láser	Las microagujas son obtenidas por electro planteado o por hecho de resinas poliméricos sobre un sustrato de vidrio.
Sólido	Polímeros biodegradables (ácido poliláctico, acidopoliglicólico y sus copolímeros)	Moldeo	Manufactura de aguja biselada con punta, cincel y microagujas cónicas. Microagujas mostraron la fuerza suficiente para ser insertadas en la piel.
Hueco	Silicón	Grabado húmedo y seco	Microagujas de silicón con electrodo para controlar la temperatura y un sistema de fluidos para la administración de fármacos.

Con forma de bolígrafo		Combinación de Grabado húmedo anisotrópico y tecnología de corte en cubos.	Posibilidad de cambiar el diámetro de la aguja fácilmente alternando el perfil de la ranura formado con el proceso de los dados de sierra.
Sólido recubierto	Acero inoxidable	Corte por láser de infrarrojos	Recubrimiento con micropartículas, virus, vitamina B, calcio, ADN albúmina sérica bovina y plásmido. Rápida disolución de los recubrimientos. Protección durante la inserción, sin limpiar en la superficie de la piel.
Sólido con bolsillos	Acero inoxidable	Cortar las hojas de acero inoxidable con láser infrarrojo. Bolsillos llenos por recubrimiento por inmersión.	Microagujas con bolsillos a lo largo de sus ejes, llenos con el fármaco. Uno o varios bolsillos de diferentes tamaños y formas. Posibilidad de incluir diferentes fármacos.
Sólido	Maltosa	Suministrados por Texmac Inc.	Microagujas de maltosa para la entrega de IgG y anticuerpos. Microagujas se disuelven inmediatamente. Los canales permanecieron abiertos 24 horas.
Sólido		Modelado en 3D empleando FEMLAB (comsol)	Efecto de los parámetros geométricos de microagujas recubiertas en la permeabilidad de la piel. La insulina se usa como fármaco modelo.
Hueco, sólido	Silicón	Técnicas de grabado estándar	Microagujas para administración de insulina.
Sólido	CMC, amilopectina, albúmina sérica bovina.	Fundición de una solución en un micromolde con centrifugación.	Microagujas piramidales fuertes. Encapsulación de sulfurodamina B, albúmina sérica bovina y lisozima. Bolo de liberación sostenida o de entrega inmediata.
Sólido	Dextrina	Formación con puntas de polipropileno.	Autodisolución de las microagujas para la administración de insulina. No son mejores que las microagujas de maltosa.

Sólido	Acero inoxidable	Láser infrarrojo y la inmersión en el recubrimiento	Microagujas recubiertas con medicamentos o partículas para una entrega rápida en la piel.
Sólido(con bolsillos)	Acero inoxidable	Láser infrarrojo	Microagujas con los bolsillos llenos de fármaco.
Hueco	Titanio	Proceso LIGA	Evaluación mecánica de diferentes geometrías, la inserción y la ruptura de las fuerzas en la piel.
Hueco, sólido	Acero inoxidable/Silicón	Hueco, metálico: a partir de agujas hipodérmicas 30G. Sólido, metálico: alambre de acero inoxidable. Hueco, silicón: micromecanizado de silicón y grabado.	Aplicador de microagujas eléctrico. Mejora de la inserción (velocidad 1-3 m/s).
Sólido	Acero inoxidable	Disponibles en el mercado a partir de las agujas hipodérmica 30G.	Longitudes de 550, 700 y 900 μm , traspasan la piel humana. Una longitud de 300 μm no perfora la piel.
Hueco, sólido	Acero inoxidable	Comprado	Evaluación de la longitud y la forma de la punta sobre el eritema y la TEWL. Una longitud de hasta 550 μm supera la función de barrera con una irritación mínima. Irritación de corta duración para todas las matrices.
Sólido	Maltosa	Comprado de Texmac, Inc.	Aumento de la permeabilidad de la piel de LMWH.
Sólido	Policarbonato	Litografía UV y galvanoplastia	Microagujas de policarbonato para la entrega de calceína.
Hueco	Silicón	Grabado profundo de iones reactivos (DRIE)	Microagujas con un microchip para la determinación de glucosa.

Ranuras profundas	Poli- <i>l</i> -ácido láctico	Litografía UV. Galvanoplastia con níquel. replicación y estampado en caliente	Microagujas con ranuras embebidas de vacunas. Un largo número de ranuras profundas dan como resultado una respuesta de anticuerpos más altos.
Sólido	Zeolita		Excelente resistencia mecánica. Liberación controlada de fármacos.
Hueco	Silicón		Microelectrodos para medir ECG.
Hueco, sólido	Silicón	DRIE y revestimiento en seco	Microagujas recubiertas para administración de la vacuna.
Sólido	Titanio	Grabado fotoquímico	Microagujas recubiertas de desmopresina.
Sólido	Acero inoxidable/ titanio	Proceso grabado	Microproyección de arreglos con oligonucleótidos.
Sólido	Acero inoxidable	Corte láser	Matrices de microagujas con insulina.
Hueco	Vidrio	Manufacturado por pulido a fuego con pipetas de vidrio de borosilicato.	Evaluación de la inserción de microagujas y la distancia de retracción, la presión de perfusión, geometría de la punta, hialuronidasa en el líquido de la infusión y el tiempo. Retracción parcial aumenta la tasa de flujo.
Sólido, recubierto	Titanio	Grabado con ácido. De película seca de revestimiento de antígeno.	Respuestas similares a la inyección intradérmica.
Sólido	Silicón	Litografía y grabado con KOH.	La piel mejora la entrega de ácido 5-aminolevulínico en la terapia fotodinámica.
Hueco, sólido		PIEL-CAD software	Optimización de los parámetros geométricos (radio, área de superficie).

2.7.8. Métodos de caracterización de microagujas

Aunque son muy variados los diseños de microagujas que se han propuesto, no todos son capaces de insertarse en la piel. En la literatura se describen diversas pruebas para caracterizar las microagujas, la mayoría enfocadas a determinar su capacidad de inserción en piel y de liberación del principio activo. Entre estas medidas, las más comunes son: forma geométrica, longitud, diámetro, características superficiales, resistencia mecánica a la inserción, disolución, etc. Algunas de estas determinaciones se han realizado *in vitro* y otras, como fuerza necesaria para la inserción o liberación del principio activo, se han llevado a cabo incluso *in vivo*. Todas estas pruebas en conjunto, permiten definir la utilidad del sistema de liberación (Wilke N., et al. 2005).

Los métodos de caracterización que se mencionan en la Tabla 4, han sido reportados por diversos investigadores para poder evaluar estos dispositivos. No obstante, cabe mencionar que hasta ahora no hay especificaciones oficiales reportadas que deban cumplir estos sistemas.

Tabla 4. Ejemplos de métodos para la caracterización de microagujas y los resultados obtenidos.

Año	Tipo	Longitud	Método	Resultado
2004	Sólidas, titanio	500-720 μm	Fuerzas mecánicas (modelo 921A, Sistemas TricorElgin, II). En piel humana <i>ex vivo</i>	Caracterización de la geometría, fuerza de fractura y de inserción (Davis S.P., et al. 2004)
2006	Sólidas, dextrina	550-234 μm	HPLC para determinar la cantidad de insulina	Estudio de estabilidad a tres diferentes temperaturas durante 30 días (Ito, et al. 2006).
2010	Sólidas, silicio	75-80 μm	Tinción con marcadores y colorantes	Evaluación <i>in vivo</i> de la perforación en piel humana (Wei-Ze, et al. 2010).
2011	Sólidas, sulfato de condroitina	500 μm	Disolución <i>in vitro</i> , aparato rotor RT-50 (Taitec, Saitama, Japón)	Tiempos de disolución (Ito, et al. 2011).
2005	Sólidas, poli-láctico-co-glicólico (PLGA)	700, 1000 y 1500 μm	Microscopía electrónica de barrido (Hitachi H 3500, Tokio, Japón)	Evaluación de la agudeza de la punta y el aumento de la permeabilidad por colorante (Park, et al. 2005).

3. HIPÓTESIS DEL TRABAJO

Las microagujas han resultado ser una excelente alternativa para la administración transdérmica de fármacos. Aunque las microagujas metálicas son una buena opción, el uso de microagujas de materiales biodegradables o solubles, evita algunos de los inconvenientes que derivan del uso de las microagujas a base de metal. Si se logra la fabricación de microagujas de quitosán y estas presentan buenas características mecánicas, podrían ser empleadas como sistemas acarreadores/promotores para la permeación transcutánea de fármacos.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo general

Elaborar microagujas de quitosán mediante técnicas de moldeo para aplicación transdérmica.

4.2. Objetivos particulares

Proponer y optimizar un método para la preparación de microagujas de quitosán.

Preparar microagujas de quitosán empleando el método propuesto.

Caracterizar las microagujas preparadas por sus dimensiones, forma, características superficiales, resistencia mecánica y el efecto de un medio de disolución.

5. METODOLOGÍA

5.1. Materiales

❖ *Reactivos*

Ácido Acético Glacial GA (J.T. Baker, México)

Hidróxido de Sodio GR (Fermont, México)

Biftalato de Potasio ACS (Fermont, México)

Catalizador TP® (Poliformas, México)

Agua destilada de calidad Mili-Q (Millipore Inc., Bedford, USA)

❖ *Polímeros*

Quitosán grado de desacetilación 75-85 %Mv 110 000-150 000 (Aldrich, México)

Caucho de Silicón P-85 (Poliformas, México)

❖ *Equipos e Instrumentos*

Microscopio Estereoscópico VE-S1 (VELAB Microscopes, USA)

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

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

Centrífuga EBA 12 (Hettich, Zentrifugen, D-78532, Tuttlingen, Alemania)

Ultracentrífuga Óptima LE-80K (Beckman, USA)

Viscosímetro CAP 2000L (BROOKFIELD, Inc., USA)

Texturómetro TA-XT2i (Texture Analyser Godalming, England)

Estufa de vacío 5851 VACUUM OVEN (NAPCO, USA)

Balanza analítica (BBC 32, Boeco, Alemania)

pHmetro (HANNA Instruments 8521N, Singapur)

Escala milimétrica 0 a 4000 (CARL ZEISS 473390-9901, West Germany)

Cámara Digital DNC-LS80 8.1 (Panasonic AVC Networks, China)

❖ *Otros Insumos*

Arreglos de microagujas cilíndricos de 500µm de longitud (Rodillos CR5, MTS-Roller, USA)

Agujas de acupuntura, diámetro 0.25 mm y 40 mm de longitud (HBW SilverSTAR y SHARP, China)

Soporte cilíndrico de plástico (diámetro 2.0 cm y longitud de 2 cm)

PARAFILM PM-992 (Bemis®, USA)

5.2. Métodos

5.2.1. Determinaciones previas

5.2.1.1. Elección del tipo de quitosán

El quitosán elegido fue el de peso molecular mediano (110 000-150 000), con un porcentaje de desacetilación de 75% a 85% y una viscosidad de 200 a 800 cP.

5.2.1.2. Elección del material para fabricar los moldes

Para la fabricación de las microagujas, se elaboraron moldes macho y hembra. Para ello se realizaron pruebas con diferentes materiales como: plastilina epóxica (Plastiloka®), caucho de silicón P-53 (empleado para la fabricación de moldes donde se requiera excelente reproducción del material), caucho de silicón molduflex (utilizado para la fabricación de moldes flexibles para vaciado de resinas), P-85 (reproducción de piezas con mucho detalle) y resina de poliéster h834ug (para fabricación de vaciados sin color). De acuerdo a las pruebas realizadas, el material que dió los mejores resultados fue el caucho de silicón P-85, este hidrocarburo elástico puede ser una cadena de poliisoprenos (IR), butadieno-estireno (SBR) o polibutadieno (BR) o sintéticos como el policloropreno (CR), butadieno-acrilonitrilo, etc. La mezcla con siliconas imparte buenas propiedades al caucho (flexibilidad, baja viscosidad, baja deformación, aumenta el grado de polimerización, gran capacidad de elongación, aumento de entrecruzamiento, antiadherencia, resistencia al desgarre y resistencia a altas temperaturas hasta 250 °C), es catalizado a temperatura ambiente con una mezcla de alcoxisilanos y catalizadores que son omitidos en la ficha técnica del proveedor por razones de patente. Todos estos silicones y resinas fueron obtenidos en Poliformas Plásticas, México (www.poliformasplasticas.com.mx).

5.2.1.3. Elaboración del molde macho de microagujas

Una vez seleccionado el material para el molde macho (caucho de silicón P-85), este se preparó de acuerdo al marbete: por cada 100 g de caucho de silicón P-85 se agregan 12.5 ml de catalizador. El caucho de silicón ya preparado se vertió en un recipiente cilíndrico de plástico con dimensiones de 2.0 cm de diámetro y 2.0 cm de altura y se dejó secar durante 24 horas a temperatura ambiente. Una vez transcurrido este tiempo se desmontó el caucho de silicón del recipiente y se dejó madurar por 48 horas, utilizándose como soporte para las agujas de acupuntura, diámetro 0.25 mm y 40 mm de longitud (HBW SilverSTAR y SHARP, China), colocándolas a una distancia de 500 μm que fue medida con un microscopio estereoscópico modelo VE-S1 (VELAB Microscopes, USA) con un aumento de 40X. La Figura 9 muestra el proceso seguido para la obtención del molde macho.

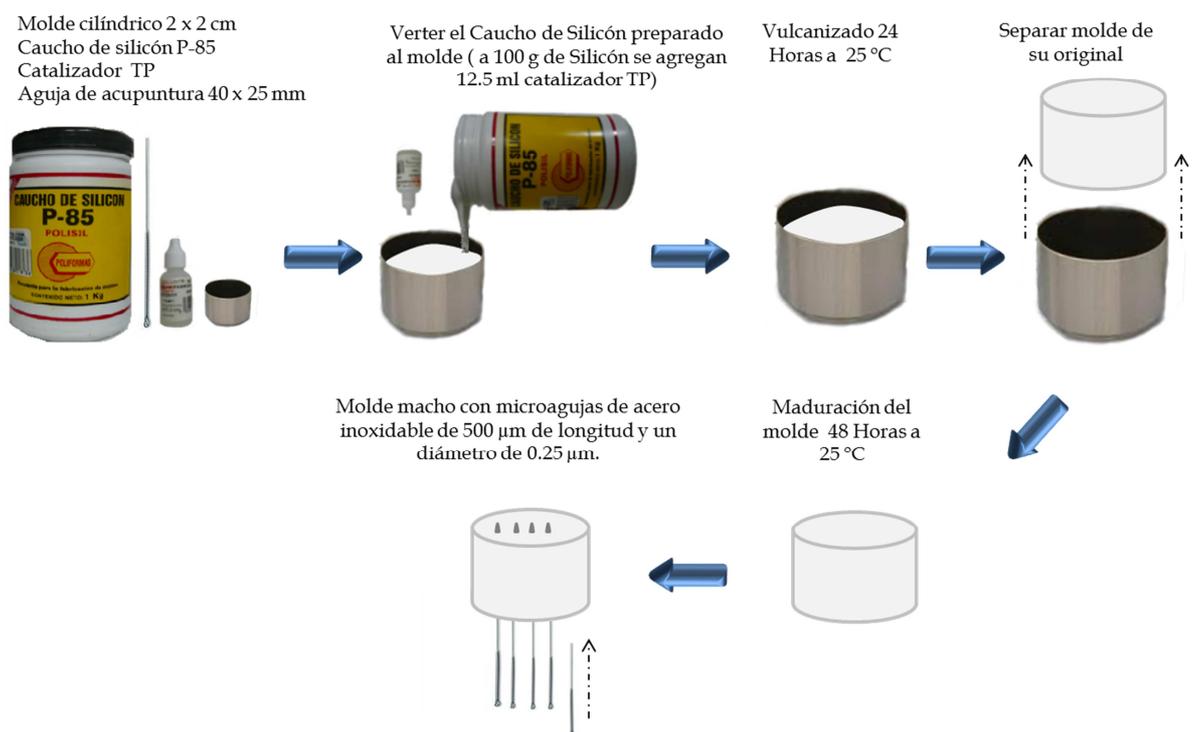


Figura 9. Diagrama de flujo del proceso de fabricación del molde macho.

5.2.1.4. Elaboración del molde hembra de microagujas

Para la elaboración de molde hembra se recurrió a utilizar el mismo tipo de recipiente cilíndrico, el molde macho y el caucho de silicón P-85. El caucho de silicón se preparó agregando 7 ml de catalizador por cada 100 g de caucho de silicón P-85 y se vertió en el molde cilíndrico de 2.0 cm de altura y 2.0 cm de diámetro. El molde macho (con las agujas de acupuntura ya fijadas a una longitud de $500\ \mu\text{m}$) se colocó sobre el nuevo recipiente lleno con caucho de silicón, separando ambas superficies con cinta de PARAFILM (DEMIS®, USA), para evitar que se adhieran uno al otro, ya que están fabricados con el mismo material, y se dejó secar durante 24 horas a temperatura ambiente. Una vez transcurrido este tiempo se desmontó el molde macho, obteniendo el molde hembra, el cual posteriormente se utilizó como molde para fabricar las microagujas. La Figura 10 esquematiza el proceso de obtención del molde hembra.

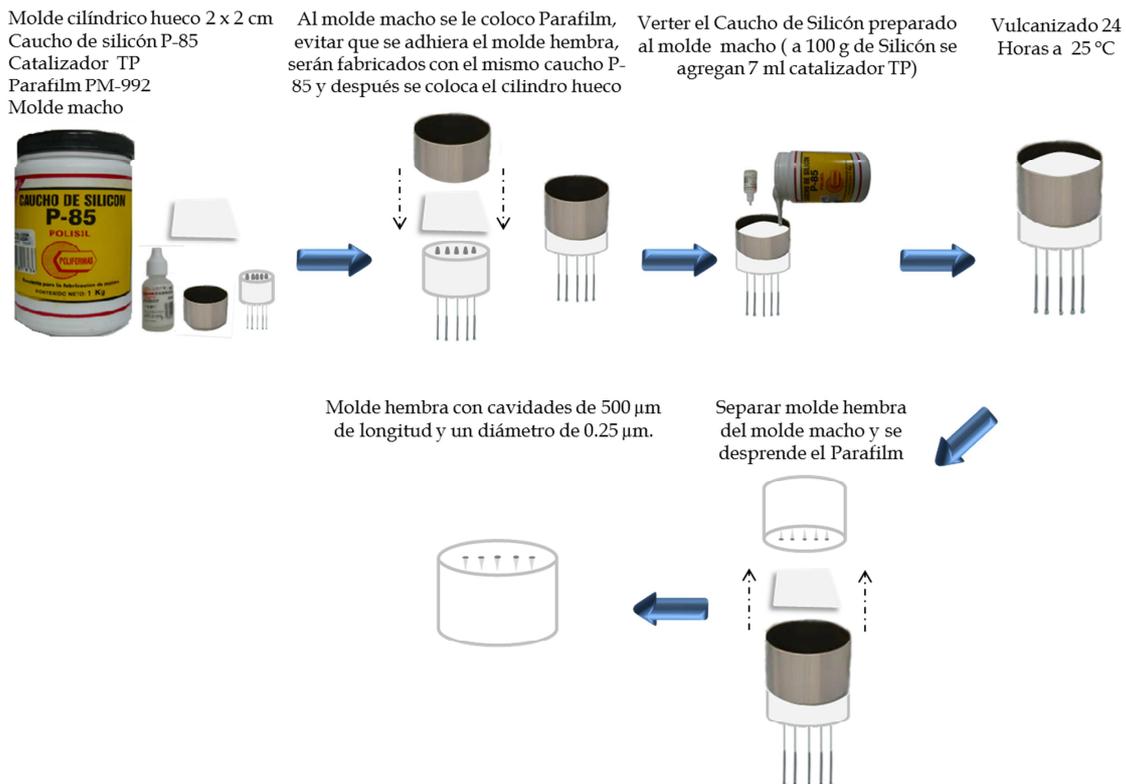


Figura 10. Diagrama de flujo del proceso de fabricación del molde hembra.

5.2.2. Estudio para determinar la concentración de ácido acético

Se midió la viscosidad de soluciones de quitosán a diferentes pH's. Para ello, se emplearon tres concentraciones diferentes de ácido acético, 0.2, 0.8 y 1.5 M, manteniendo una concentración de quitosán constante de 25 mg/ml y un tiempo de agitación de 10 minutos, posteriormente las muestras fueron evaluadas con un viscosímetro CAP 2000L, aguja # 1 a 50 rpm. a 25 °C (BROOKFIELD, Inc., USA) y pH metro (HANNA Instruments 8521N, Singapore).

5.2.3. Estudio para determinar la concentración de quitosán

Se prepararon cuatro muestras conteniendo 20, 30, 40 y 50 mg/ml de quitosán manteniendo constantes el tiempo de agitación de 10 minutos y concentración de ácido acético de 0.2 M, posteriormente las muestras fueron evaluadas con un viscosímetro CAP 2000L, aguja # 1 a 50 rpm., a 25 °C (BROOKFIELD, Inc., USA).

5.2.4. Fabricación de las microagujas

Para elaborar las microagujas se estudiaron diferentes variables (Tabla 5), pero el método optimizado de fabricación es el siguiente, mismo que se esquematiza en la Figura 11:

Se utilizó el molde hembra de caucho de silicón y mismo tipo de recipiente, se disolvió 1.0 g de quitosán en 25 ml de ácido acético a una concentración 0.2 M, agitando por 10 minutos a temperatura ambiente, para obtener una concentración de 40 mg/ml. Después se vertió la solución de quitosán al molde hembra el cual ya se encontraba en la centrifuga. Con el fin de facilitar el llenado del molde, se centrifugo a 6000 rpm durante 60 minutos y posteriormente se dejaron secar las microagujas en un intervalo de 48 a 72 horas a temperatura ambiente en una base de vidrio. Transcurrido ese tiempo se desmoldaron las microagujas con unas pinzas y se analizaron con el microscopio estereoscópico y microscopio electrónico de barrido.

Tabla 5. Variables estudiadas para desarrollar un método para la fabricación de microagujas.

VARIABLES ESTUDIADAS	NIVELES
Concentración de quitosán	20, 30, 40 y 50 mg / ml
Concentración de ácido acético	0.2, 0.8 y 1.5 M
Tiempo de centrifugado	10, 15, 20 y 60 minutos
Tiempo de secado a 90° C	10, 15 y 20 minutos
No. de repeticiones de centrifugado	3, 4 y 5
No. de repeticiones de secado a 90° C	2, 3 y 4

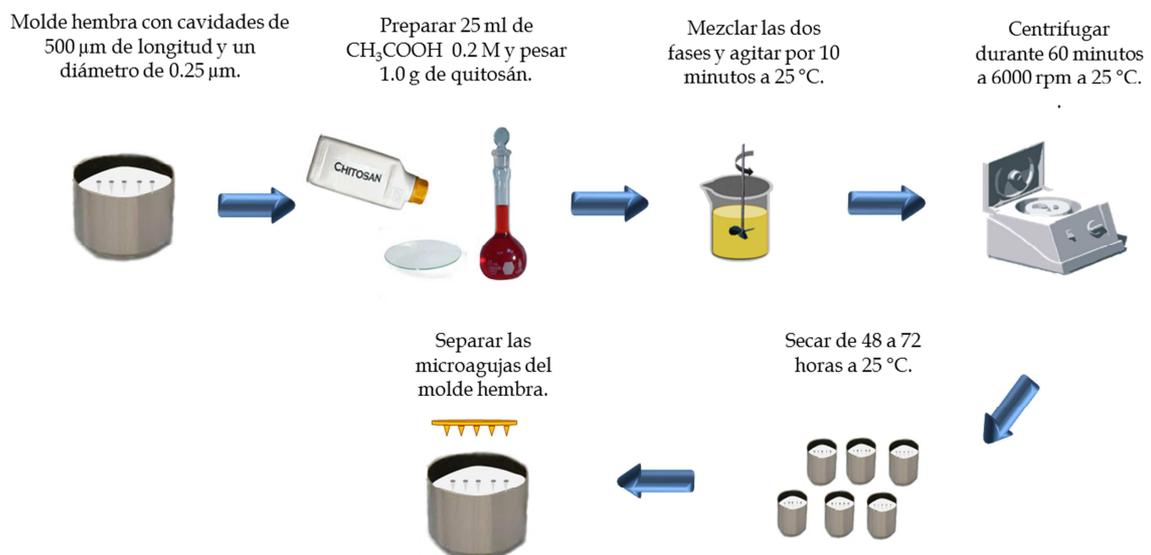


Figura 11. Diagrama de flujo de las condiciones óptimas del método para elaborar microagujas de quitosán.

5.2.5. Estudios de microscopía

5.2.5.1. Microscopía estereoscópica

Una vez desmoldadas, las microagujas se observaron con un microscopio estereoscópico (VE-S1, VELAB Microscopes, USA). La observación con este microscopio (40X y 100X) permitió determinar si se habían formado, sus dimensiones, color y estructura. Con esta microscopía se definieron las condiciones óptimas para la obtención de las microagujas.

5.2.5.2. Microscopía electrónica de Barrido

El tamaño y el tipo de microaguja se observó con esta técnica microscópica. Así mismo, se observaron sus características superficiales. Para el estudio de microscopía electrónica de barrido las muestras de microagujas fueron fijadas a un portamuestras con una cinta adhesiva de doble cara y fueron recubiertas con oro durante 8 minutos. Las muestras se observaron en un microscopio electrónico de barrido JSM-25SSII (JEOL, Japón), bajo la asesoría del Sr. Rodolfo Robles (Técnico Auxiliar “B” del Laboratorio de Microscopía Electrónica de Barrido, FES-Cuautitlán).

5.2.6. Estudio de resistencia mecánica

Para determinar la resistencia mecánica de las microagujas se recurrió al uso de un texturómetro (TA-XT2i, Texture Analyser Godalming, England).

Estas medidas se realizaron utilizando un arreglo de 5 microagujas (longitud de 500µm) por molde de quitosán, a una velocidad de desplazamiento de 1.7 mm/s, distancia de compresión de 0.4 mm, celda de carga de 5 Kg a temperatura ambiente, bajo la asesoría de la Dra. Norma Beatriz Casas Alencáster (Laboratorio de Propiedades Reológicas y Funcionales en Alimentos, FES-Cuautitlán). Midiendo la fuerza necesaria para doblar o fracturar las microagujas

5.2.7. Estudio del efecto de un medio de disolución sobre las dimensiones de las microagujas

Un arreglo de microagujas con longitud de aproximadamente 200 μm se fijó a un soporte y se introdujo en un cristalizador conteniendo 85 ml de buffer de Bifalato de Potasio ($\text{KHC}_6\text{H}_4(\text{COO})_2$) 0.2 M, pH= 5 a 25°C (con el fin de simular el pH de la superficie cutánea). El cambio en las dimensiones de las microagujas se siguió por microscopía estereoscópica (VE-S1, VELAB Microscopes, USA), tomando fotografías con un aumento de 40X a diferentes intervalos de tiempo, utilizando como referencia una escala milimétrica de 0 a 4000 (CARL ZEISS 473390-9901, West Germany). Ver Figura 12. Las imágenes obtenidas fueron analizadas con el programa imagenJ, bajo la asesoría de la Dra. María Elena Vargas Ugalde (Laboratorio de Estudios Multidisciplinarios V, FES-Cuautitlán) midiendo la longitud, el diámetro de la base y el área para cada tiempo.

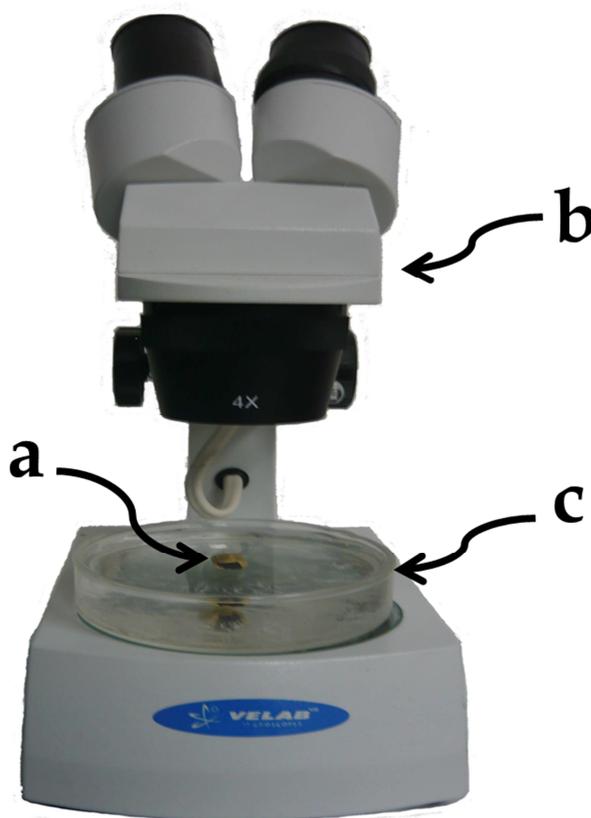


Figura 12. Estudio del efecto de un medio de disolución sobre las microagujas. a) arreglo de microagujas; b) microscopio estereoscópico 40X; c) recipiente con 85 ml de buffer de Bifalato de Potasio ($\text{KHC}_6\text{H}_4(\text{COO})_2$) 0.2 M a pH= 5.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. Concentración de ácido acético

El objetivo de este trabajo fue preparar microagujas de quitosán, tomando como antecedente los artículos ya publicados donde preparan microagujas a base de maltosa (Li, et al. 2009) y de dextrina (Ito, et al. 2006). Las características de biocompatibilidad, biodegradabilidad y bactericidas del quitosán, lo convierten en una opción interesante para emplearlo en este tipo de sistemas (Cartaya, et al. 2009). La capacidad del quitosán de formar películas o soportes con buenas propiedades mecánicas, ha permitido que se emplee en diversos sistemas de liberación de fármacos, e.g., en tabletas de liberación controlada (Torres B. 2009); micropartículas; nanocápsulas; (Dodane and Vilivalam 1998), destinados a diferentes vías de administración como la oral, nasal, bucal, ocular y transdérmica, entre otras. La fabricación de fibras de quitosán fue patentada en 1980 por Mitsubishi, quienes partieron de una disolución de quitosán en ácido acético al 0.5 y al 1 % (Gacen and Gacen 1996).

El quitosán elegido en este trabajo de investigación, posee un grado de desacetilación del 75-85 % y un peso molecular mediano (110 000 - 150 000). El grado de desacetilación influye directamente en la viscosidad, pues a mayor desacetilación, ocurre la repulsión de cargas del polielectrolito, observándose una viscosidad mayor que para un quitosán con mayor grado de acetilación. En cuanto al peso molecular, se sabe que entre más alto, mayor es la rigidez, por lo que se decidió optar por un quitosán con peso molecular medio que le confiriera cierta flexibilidad (Gartner and López 2010). Es importante mencionar que es complicado hacer una comparación precisa con lo reportado por otros autores, debido a la diversidad en la distribución de grupos acetilo (que ocurre de manera aleatoria) y pesos moleculares, además de que muchas de sus características dependen de su fuente de origen.

❖ Efecto de la concentración de ácido acético

Al ser el quitosán un material insoluble en agua, se recurre a medios ácidos, frecuentemente ácido acético, para solubilizarlo. La solubilidad del quitosán se encuentra relacionada con la cantidad de grupos amino protonados: A mayor cantidad de estos grupos, mayor es la solubilidad del polímero (Sánchez B., et al. 2007). Además, la concentración de ácido acético empleada para disolverlo y por tanto el pH, afectan la viscosidad de la solución obtenida (Lu, et al. 2004), de modo que en el presente trabajo se probaron tres concentraciones de ácido acético: 0.2, 0.8 y 1.5 M, para una solución que contenía 20 mg/ml de quitosán. Se midió el pH y se determinó la viscosidad, bajo las condiciones ya descritas en el apartado de metodología. Los valores de pH y de viscosidad se muestran en la Tabla 6.

Tabla 6. Efecto de la concentración de ácido acético A) 1.5 M, B) 0.8 M y C) 0.2 M. sobre la viscosidad de soluciones de quitosán (20 mg/ml).

Etiqueta de experimento	Concentración de ácido acético (M)	Viscosidad (cP) n=3	pH
A	1.5	500 ± 4	3.10
B	0.8	450 ± 5	3.40
C	0.2	1070 ± 137	4.00

Como puede observarse en la Figura 13, la viscosidad se reduce al emplear soluciones de ácido acético más concentradas (menor pH). Lu, y colaboradores (2004) reportan un incremento en la viscosidad al aumentar la concentración de ácido acético, cuando la concentración del ácido es baja; los autores registran un máximo en la viscosidad para una concentración de ácido acético entre 0.2 y 0.3 M, después de la cual la viscosidad de la solución de quitosán tiende a ir disminuyendo conforme el pH se reduce. Los autores atribuyen este comportamiento a que al ir aumentando la concentración de iones hidrógeno, los grupos amino del quitosán se protonan, con lo que tienden a repelerse,

provocando que la cadena de quitosán se extienda, adopte una forma lineal y la viscosidad de la solución aumente. Conforme la concentración de protones se incrementa más, los iones acetato se disponen alrededor de los grupos $-\text{NH}_3^+$, reduciendo la repelencia, haciendo que la cadena se pliegue y por tanto, la viscosidad disminuya. Los resultados obtenidos en el presente trabajo coinciden con lo reportado por estos autores, pues se obtiene la máxima viscosidad con una concentración 0.2 M de ácido acético y precisamente al incrementarla, la viscosidad se ve abatida de manera importante. Para este trabajo la viscosidad de la solución de quitosán es importante pues se busca tener una viscosidad que permita un llenado adecuado de los moldes por centrifugación. La concentración de ácido acético que se eligió para la fabricación de las microagujas fue la de 0.2 M, en donde se tiene la viscosidad más elevada.

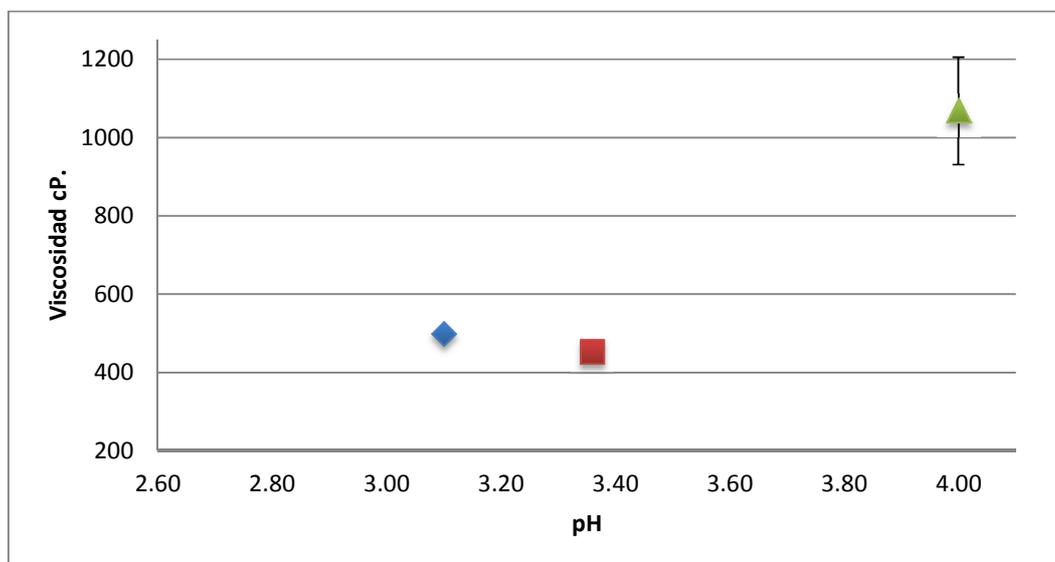


Figura 13. Efecto del pH sobre la viscosidad de soluciones de quitosán (20 mg/ml), empleando diferentes concentraciones de ácido acético: \blacklozenge 1.5M, \blacksquare 0.8M y \blacktriangle 0.2M. En aquellos casos donde las barras de error no son visibles es porque son más pequeñas que los símbolos.

6.2. Concentración de quitosán

Es evidente que la concentración de polímero influye directamente en la viscosidad de la solución de quitosán. Como ya se mencionó en el apartado anterior, se buscó tener una solución con la máxima concentración de quitosán, pero con una viscosidad tal que permitiera el llenado del molde hembra utilizado en la fabricación de las microagujas.

Debido a su estructura (alto peso molecular y estructura lineal no ramificada) el quitosán es un buen agente viscosante en medio ácido. Su viscosidad aumenta al incrementarse su concentración, pero disminuye al elevar la temperatura y el grado de desacetilación (Sánchez, et al. 2007). Se probaron cuatro concentraciones de quitosán: 20, 30, 40 y 50 mg/ml, manteniendo una concentración constante de ácido acético 0.2M. Como ya se describió en la sección de metodología, se midió la viscosidad de estas soluciones. Los resultados se muestran en la Figura 14. Simultáneamente, se probó llenar el molde hembra por centrifugación, de acuerdo a las ya condiciones descritas. De acuerdo a la Tabla 7, la solución de 40 mg/ml con una viscosidad de 2500 cP, permitió el llenado y la obtención de microagujas con características adecuadas. Concentraciones superiores a 40 mg/ml dificultaban el llenado del molde debido a su alta viscosidad.

Tabla 7. Efecto de la concentración de quitosán sobre la viscosidad, manteniendo una concentración de ácido acético constante (0.2 M).

Volumen de ácido acético 0.2 M	Cantidad de quitosán	Concentración de quitosán	Viscosidad (cP, n=3)
50 ml	1.0000 g	20 mg/ml	800 ± 121
50 ml	1.5006 g	30 mg/ml	1210 ± 80
50 ml	2.0001 g	40 mg/ml	2500 ± 68
50 ml	2.5 g	50 mg/ml	El FSR < 15 %

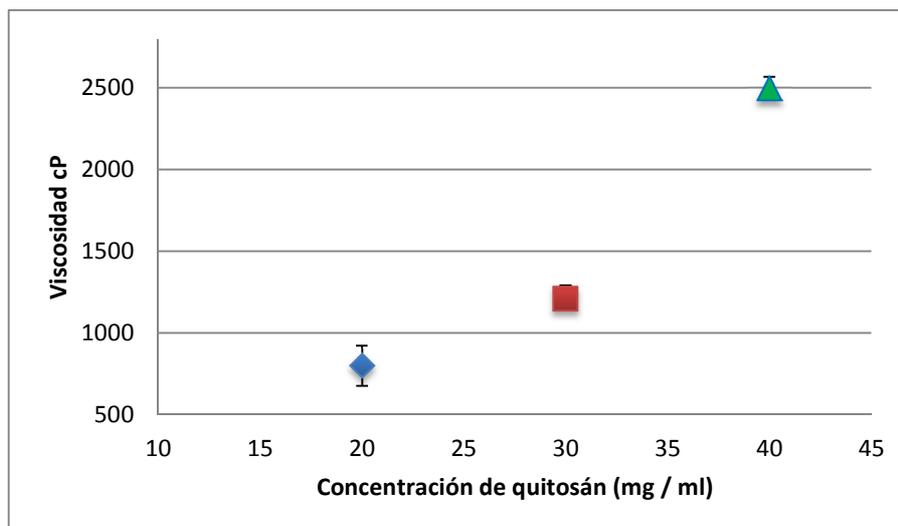


Figura 14. Efecto de la concentración de quitosán sobre la viscosidad de soluciones acuosas con una concentración de ácido acético 0.2 M: ◆ 20m g/ml, ■ 30 mg/ml, ▲ 40 mg/ml. En aquellos casos donde las barras de error no son visibles es porque son más pequeñas que los símbolos.

6.3. Fabricación de microagujas

Una vez seleccionadas las concentraciones de ácido acético y de quitosán a emplear, se procedió a optimizar las condiciones de fabricación de las microagujas. La fabricación de las microagujas se llevó a cabo por moldeo asistido por centrifugación. Como ya se explicó, se colocó la solución de quitosán en un tubo con el molde hembra fabricado y se centrifugó para permitir el llenado del mismo, procediendo a secar las microagujas en una estufa de vacío, para posteriormente observarlas al microscopio estereoscópico. La Tabla 8 muestra las condiciones estudiadas y los resultados obtenidos. Bajo todas las condiciones se obtuvieron microagujas, pero no en todos los casos las microagujas poseían la forma, tamaño y el número (el molde hembra estaba diseñado para un arreglo de 5 microagujas) esperados, por ejemplo se obtenían microagujas chatas o sin punta, punta en forma de gancho o microagujas de longitudes variables. La Figura 15 presenta imágenes representativas de las agujas obtenidas bajo las diferentes condiciones. La Figura 15(A) es una microaguja laminada que se obtuvo con una concentración de quitosán de 20 mg/ml, por lo que se procedió a incrementar la concentración de quitosán hasta 40 mg/ml; la imagen mostrada en (B) es la de una microaguja hueca, por lo que para obtener estructuras sólidas se decidió alternar el proceso de centrifugado con el de secado a vacío a 90 °C; en (C) y (D) se obtienen microagujas sólidas, pero poco resistentes que como puede verse se

deforman con facilidad. Se procedió entonces a incrementar el tiempo de centrifugado y de secado.

Tabla 8. Resultados correspondientes a las diferentes condiciones de preparación de microagujas, con distintos intervalos de tiempos de centrifugado y secado.

Condiciones de preparación n=6	Tiempo de centrifugado (min) a 6000 rpm	Número de veces de centrifugado	Tiempo de secado (min) Estufa de vacío 90°C	Número de veces de secado	Formación de microagujas
1	10	4	10	3	No óptima
2	10	4	15	3	Si
3	10	4	20	3	No óptima
4	15	4	10	3	No óptima
5	15	4	15	3	No óptima
6	15	4	20	3	No óptima
7	20	4	10	3	No óptima
8	20	4	15	3	Si
9	20	4	20	3	No óptima
10	60	1			Si

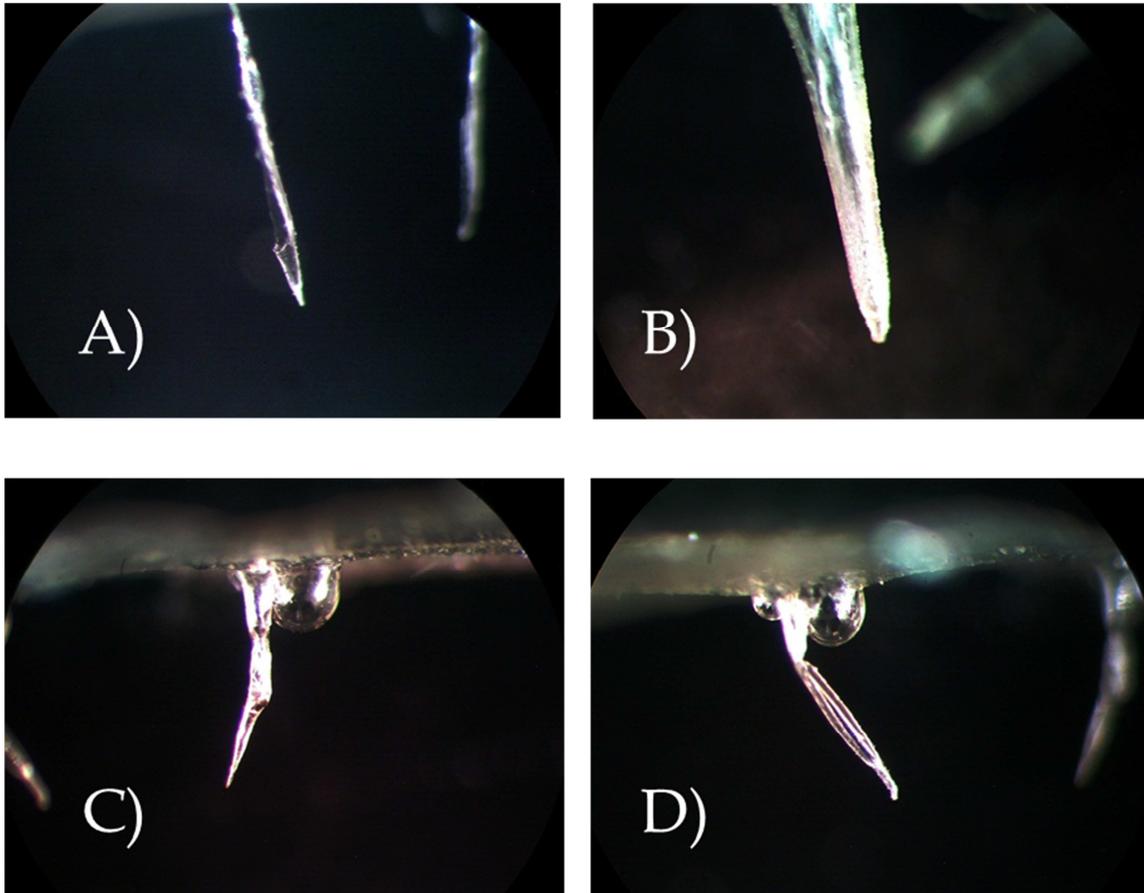


Figura 15. Imágenes de microscopía estereoscópica (100X) obtenidas durante la fase de optimización del proceso de fabricación de las microagujas. (A) Microaguja laminada; (B) Microaguja hueca; (C) y (D) Microagujas frágiles, fácilmente deformables.

La Figura 16 presenta micrografías electrónicas de barrido para microagujas obtenidas bajo condiciones de preparación óptimas. Las agujas muestran una estructura sólida, forma cónica, y superficie homogénea y lisa de baja porosidad. La presencia de los poros puede atribuirse a defectos en el molde o presencia de aire en la solución que dé origen a los poros al momento del secado.

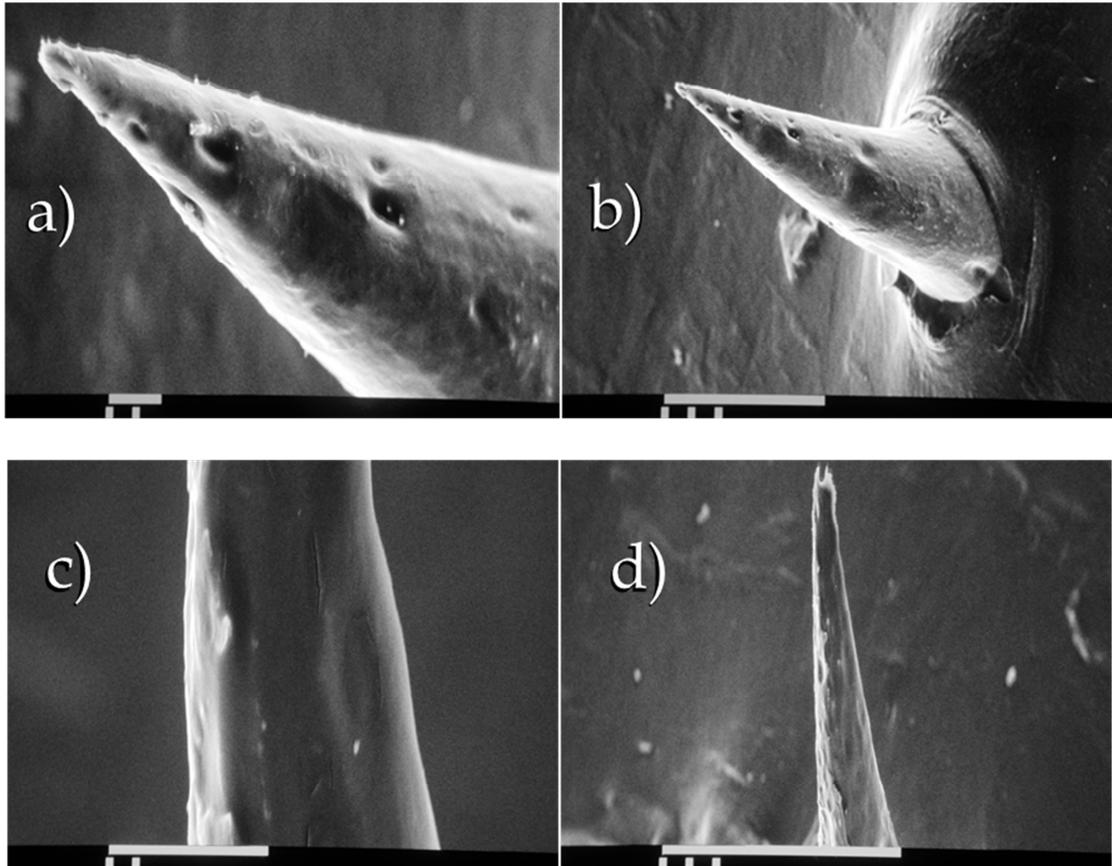


Figura 16. Imágenes microscopía electrónica de barrido para microagujas biodegradables de quitosán. La barra representa: 10 μm para (a) y (c), y 100 μm para (b) y (d).

6.4 Estudio de fuerza mecánica

De acuerdo a la Tabla 8 hubo tres condiciones (2, 8 y 10) que permitieron obtener microagujas que al microscopio presentaban características adecuadas en cuanto a forma y tamaño. A los arreglos de microagujas obtenidas bajo estas condiciones se les midió la fuerza necesaria para doblarlas o romperlas, empleando un texturómetro (TA-XT2i, Texture Analyser Godalming, Inglaterra).

Los resultados obtenidos se muestran en las Figura 18 en donde se constata que las microagujas con la mayor resistencia fueron las obtenidas al centrifugar durante 60 minutos y sin necesidad de someterlas a un proceso de secado en estufa.

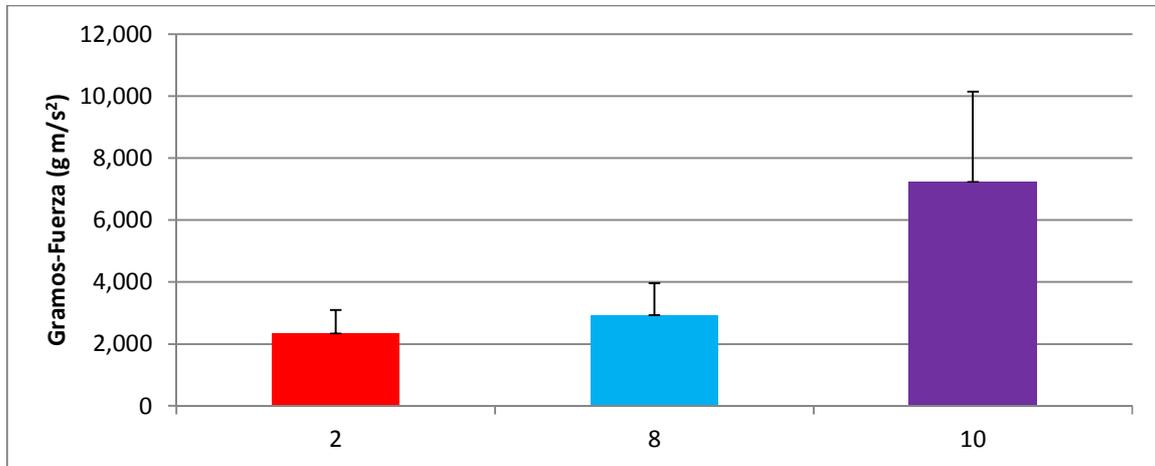


Figura 17. Resistencia mecánica (gramos fuerza) para las microagujas obtenidas bajo diferentes condiciones de preparación: ■ condición 2, ■ condición 8 y ■ condición 10. Estas medidas se realizaron con arreglos de 5 microagujas con longitud de 500 μm ($n = 3$).

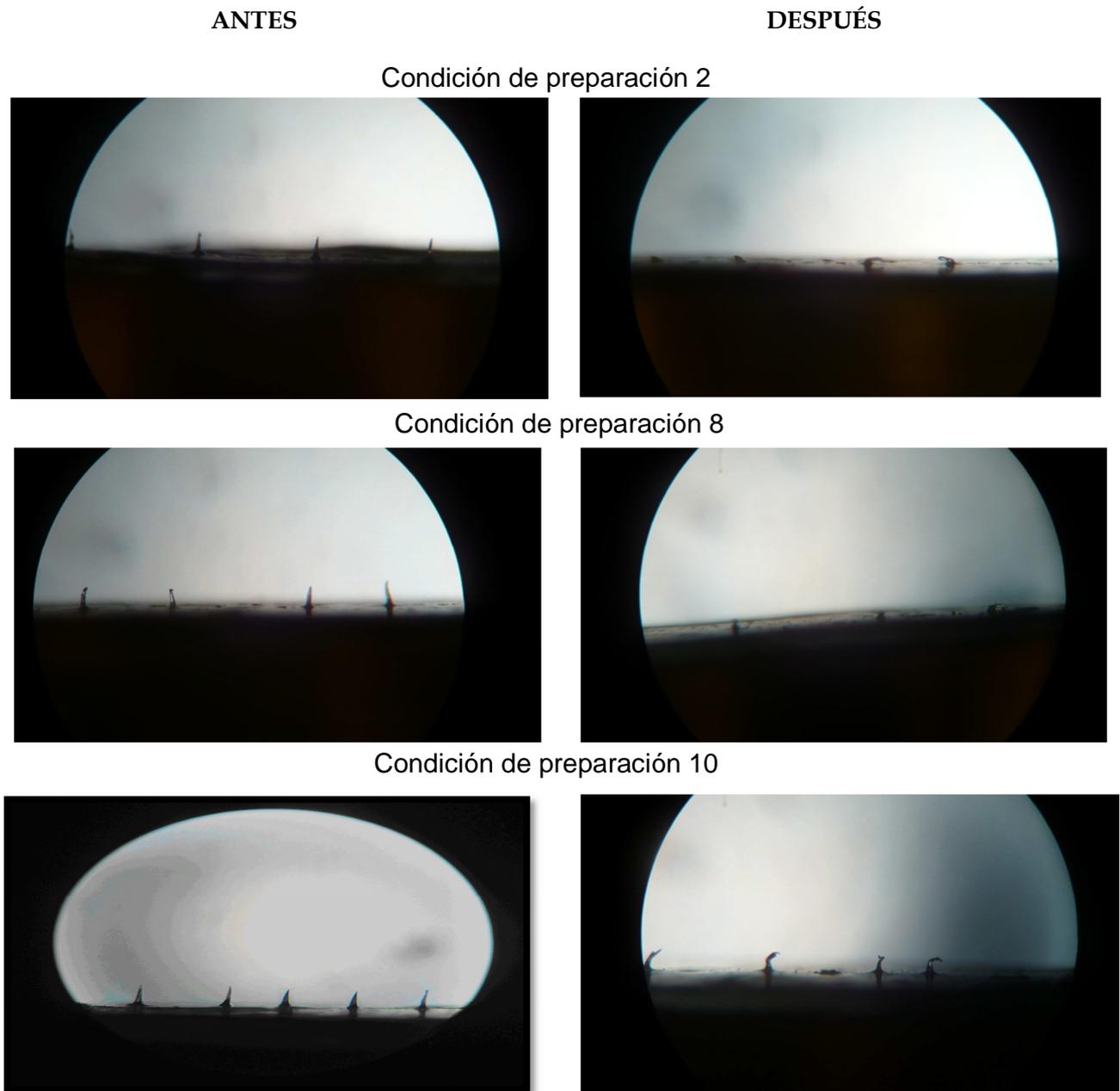


Figura 18. Imágenes al microscopio estereoscópico (40X) de las microagujas obtenidas bajo las condiciones de preparación 2, 8 y 10, antes y después someterse al texturómetro para medir su resistencia mecánica.

Con el fin de determinar si había diferencias significativas entre los valores de fuerza medidos con el texturómetro, se procedió a realizar un análisis de varianza de un factor:

Variable de respuesta: Gramos fuerza

Hipótesis nula (las medias son iguales)

$$H_0: \mu_1 = \mu_2 = \mu_3$$

Hipótesis alternativa: Al menos un par de medias son diferentes

$$\mu_1 \neq \mu_2 \neq \mu_3$$

Tabla 9. Análisis de varianza de un factor para los gramos fuerza requeridos para doblar las microagujas obtenidas bajo diferentes condiciones de preparación.

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza		
2	3	7031.50	2343.83	567908.34		
8	3	8976.08	2932.03	1056672.96		
10	3	21701.31	7233.77	8434157.63		
ANÁLISIS DE VARIANZA						
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	42762464.67	2	21381232.33	6.37	0.03274	5.1432
Dentro de los grupos	20117477.86	6	3352912.97			
Total	62879942.53	8				

Al comparar el valor de F con el valor crítico (nivel de confianza del 95 %), se concluye que se rechaza la hipótesis nula y que por lo tanto existen diferencias significativas entre las medias, por lo tanto, se procedió a realizar la prueba del rango múltiple de Duncan, con el fin de determinar la diferencia entre los pares de medias de las tres condiciones de preparación. El procedimiento seguido fue el siguiente:

Tabla 10. Prueba de comparaciones múltiples de Duncan para los resultados de resistencia mecánica a las tres condiciones de preparación de microagujas.

Resultados		
g.l.=Número total de datos - número de tratamientos		
g.l. = 9-3=6		
Se busca d en Tablas de Duncan para 2, y 3 tratamientos con 6 g.l.:		
2 tratamientos:	3.461	
3 tratamientos:	3.587	
Calcular los rangos significativos mínimos (D):		
D = d*(CMerror/n)^{1/2}		
CMerror =	3352912.97	
n=	3	
(Cmerror/n) =	1117637.65	
(Cmerror/n)^{1/2} =	1057.18	
D2 =	3658.91	
D3 =	3792.11	
Ordenar las medias en orden creciente:		
Media 1	Media 2	Media 3
2343.83	2932.03	7233.77
Rangos:	Media 3 - Media 1 =	4889.94
	Media 2 - Media 1 =	588.20
	Media 3 - Media 2 =	4301.74
Comparar los rangos con los D calculados:		
Media 3 - Media 1 con D3:	4889.94 > 3792.11	
Media 2 - Media 1 con D2:	588.2 < 3658.91	
Media 3 - Media 2 con D2:	4301.74 > 3658.91	

Por tanto, la media 3 es diferente de las medias 1 y 2, sin que existan diferencias entre las medias 1 y 2. Esto nos permite concluir que un tiempo de centrifugado de 60 minutos por una única vez, sin secado posterior, permite obtener microagujas más resistentes que al centrifugar y secar múltiples ocasiones, de acuerdo a las condiciones arriba descritas. Esto es importante, pues con ello el procedimiento de fabricación de microagujas se simplifica enormemente, reduciendo además tiempos y costos. El tiempo de centrifugado, más que el secado influye de manera directa en el llenado eficiente de los moldes, favoreciendo una mayor penetración de polímero, lo que resultó en estructuras más densas y por lo tanto más resistentes.

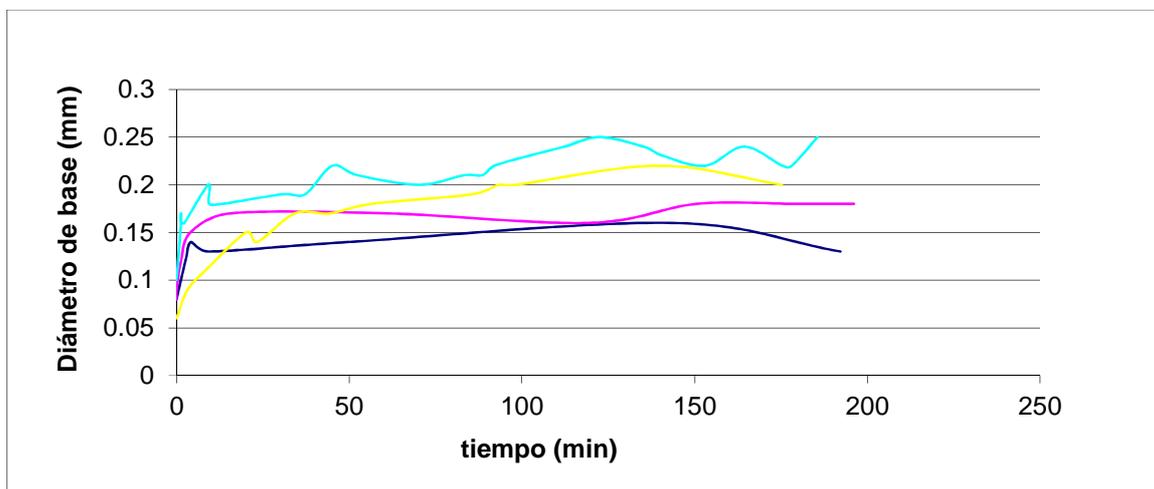
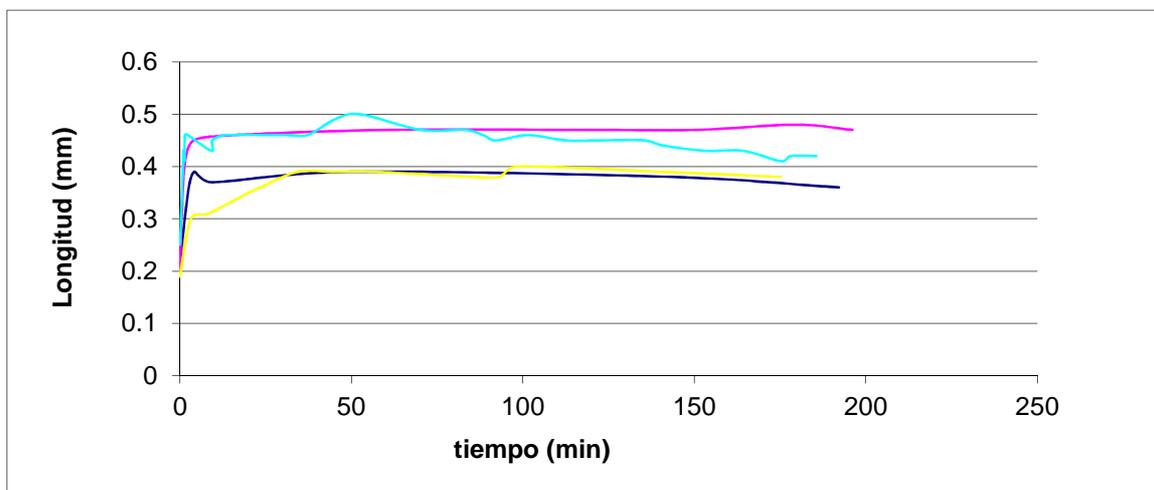
La fuerza que se necesita para doblar o fracturar las microagujas de quitosán o de algún otro polímero, es una prueba que no ha sido ampliamente difundida, y sin embargo esta prueba es importante ya que permite evaluar el comportamiento de las microagujas cuando se aplica una fuerza, siendo importante para determinar su resistencia al insertarlas en la piel. Li et al. (2009) reportan la preparación de microagujas de maltosa y su inserción en piel de rata *in vitro* al aplicar una fuerza de 250 g en arreglos de 54-81 microagujas. Si se compara este valor con los obtenidos en este trabajo, se constata que los arreglos de 5 microagujas obtenidos en las condiciones 2 y 8 (Tabla 8) resistieron una fuerza muy cercana a la reportada por estos autores antes de doblarse. De acuerdo a la Tabla 8 las microagujas obtenidas bajo la condición 10 resistieron una fuerza mucho mayor a la que aplicaron los autores. Esto indicaría que las microagujas de quitosán que se prepararon en este trabajo de tesis tendrían la capacidad de penetrar fácilmente la piel antes de doblarse. Lee et al. (2008), reportan fuerzas de 0.1 N/microaguja (10.2 gramos-fuerza, 51 gramos-fuerza para 5 microagujas) para microagujas cónicas de carboximetilcelulosa de 800 μm de longitud (200 μm de diámetro en la base); 0.51 N/microaguja (260 gramos-fuerza para 5 microagujas) para microagujas cónicas de ácido poliláctico de 800 μm de longitud, llegando hasta 4540 gramos fuerza para microagujas piramidales de ácido poliláctico de 600 μm de longitud (300 μm de diámetro en la base). Esto indica que las condiciones de preparación, el método de fabricación, la geometría y las dimensiones, son algunos de los factores que determinan la resistencia mecánica de las microagujas. Los autores reportan que en general un incremento en el diámetro de la base trae como resultado un aumento en la resistencia de las microagujas, hasta cierto límite, pues un cociente longitud/diámetro de la base muy bajo dificultaría su inserción.

6.5 Estudio del efecto de un medio de disolución sobre las dimensiones de las microagujas

Se realizaron pruebas colocando microagujas de aprox. 200 μm de longitud en solución amortiguadora de Bifalato de Potasio pH 5, que simulara el pH encontrado en las capas superficiales de la piel y se tomaron micrografías con el microscopio estereoscópico a diferentes intervalos de tiempo. Las imágenes se analizaron con el programa imagenJ, midiendo longitud, diámetro de la base y área para cada uno de los tiempos. Las variaciones en estas dimensiones se muestran en la Tabla 11.

Tabla 11. Valores promedio \pm desviación estándar para la longitud, diámetro de la base y área de las microagujas en contacto con solución amortiguadora de Bifalato de Potasio pH 5 al tiempo 0 y después de 3 h (n=4) y valores de P al hacer la comparación de medias de dos muestras pareadas ($\alpha = 0.05$).

Dimensión	Tiempo 0	3 h	Valores de P al comparar las medias
Longitud (mm)	0.215 ± 0.0265	0.407 ± 0.0486	0.0061
Diámetro de la base (mm)	0.080 ± 0.0163	0.190 ± 0.0497	0.0168
Área (mm ²)	0.142 ± 0.0731	0.402 ± 0.1147	0.0218



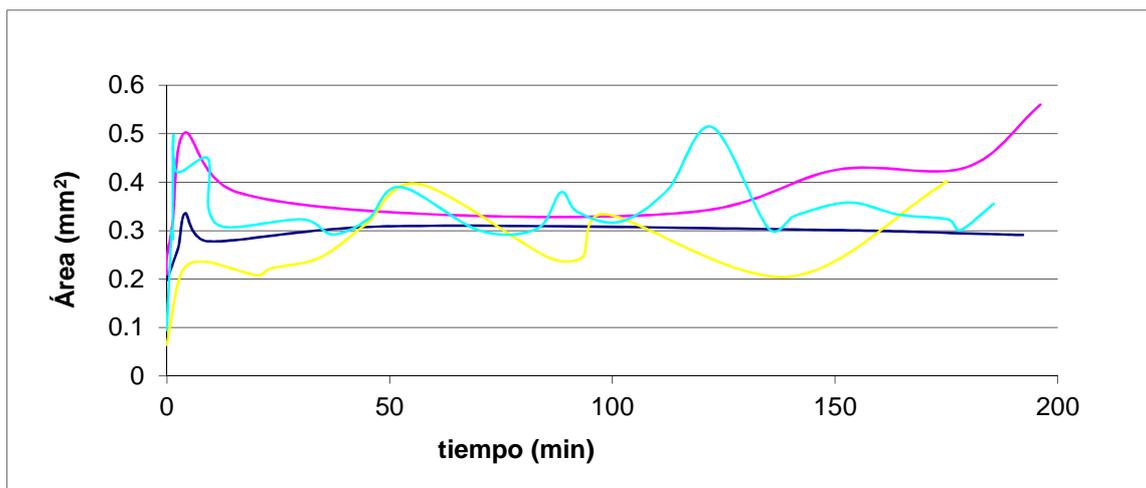


Figura 19. Variaciones en la longitud, el diámetro de la base y el área de las microagujas durante 3 h de contacto con solución amortiguadora de Bifalato de Potasio pH 5. Las líneas corresponden al número de réplicas del experimento ($n = 4$).

Los resultados mostrados en la Tabla 11 para el tiempo 0 (antes de poner en contacto las microagujas con la solución amortiguadora de Bifalato de Potasio) y después de 3 horas de contacto, muestran que en ese lapso de tiempo las microagujas prácticamente duplicaron sus dimensiones, debido a la absorción de medio. Con el fin de determinar si existían diferencias entre las dimensiones de las microagujas a estos dos tiempos se realizó una comparación de medias, encontrando en todos los casos diferencias significativas (Tabla 11). Después de este lapso de tiempo, las microagujas tomaban una apariencia de gel. Lo que hace pensar que al incorporar un principio activo este podría liberarse por efecto de la entrada de medio, el hinchamiento del polímero y la relajación de sus cadenas. No obstante, esto debe confirmarse con un estudio posterior en donde se incluya un fármaco.

7. CONCLUSIONES

Se desarrolló y optimizó un método de moldeo asistido por centrifugación para la fabricación de microagujas de quitosán.

El método propuesto, permite la obtención de microagujas cónicas, sólidas, con dimensiones entre 200 y 500 μm , con características superficiales adecuadas.

Las microagujas obtenidas muestran una buena resistencia mecánica, comparables a las reportadas por otros autores empleando materiales como la maltosa o el ácido poliláctico, lo que implicaría una buena capacidad de inserción en piel.

En contacto con el medio de disolución, las microagujas absorben el medio y se hinchan, lo que podría facilitar la liberación de los fármacos que se incluyeran en la matriz, sirviendo como acarreadores capaces de insertarse en la piel, traspasando el estrato córneo y liberando el fármaco en capas más profundas.

Las microagujas de quitosán, al poseer características físicas, de degradabilidad y baja toxicidad adecuadas, constituyen un sistema acarreador prometedor para la administración transdérmica de fármacos, sobre todo aquellos que difícilmente permean como macromoléculas o fármacos muy hidrofílicos.

8. PERSPECTIVAS

Incluir un fármaco modelo o un marcador para estudiar su liberación a partir de las microagujas de quitosán.

Realizar estudios de penetración en piel con marcadores (e.g., coloridos o fluorescentes) que permitan constatar que las agujas penetran de manera efectiva.

9. REFERENCIAS

Aggarwal, P., and C.R. Johnston. "Geometrical effects in mechanical characterizing of microneedle for biomedical applications." *Sensors and Actuators B: Chemical* 102, 2 (2004): 226-234.

Albery, W.J., and J. Hadgraft. "Percutaneous absorption: theoretical description." *Journal of Pharmacy and Pharmacol* 31 (1979): 129-139.

Arora A., M. Prausnitz and S. Mitragotri. "Micro-scale devices for transdermal drug delivery" *International Journal of Pharmaceutics* 364 (2008): 227-236.

Asbill, C.S., and B.B. Michniak. "Percutaneous penetration enhancers: local versus transdermal activity." *Pharmaceutical Science and Technology Today* 3, 1 (2000): 36-41.

Badawy, Mohamed E.I., and Entsar I. Rabea. "A biopolymer chitosan and its derivatives as promising antimicrobial agents against plant pathogens and their applications in crop protection." *International Journal of Carbohydrate Chemistry* 2011, Article ID 460381 (2011): 29.

Barry, B.W. "Novel mechanisms and devices to enable successful transdermal drug." *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 14 (2001): 101-114.

Boddé, H.J.E., I. Van den Brink, H.K. Kuarten, and F.H.N. de Haan. "Visualisation of in vitro percutaneous penetration of mercuric chloride; transport through intercellular space versus cellular uptake through desmosomes." *Journal Controlled Release* 15 (1991): 227-236.

Bouwstra, J.A., F.E. Dubbelaar, E.S. Gooris, A.M. Weerheim, and M. Ponc. "The role of ceramide composition in the lipid organization of the skin barrier." *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes* 1419 (1999): 127-136.

Bouwstra, J.A., J. Thewalt, G.S. Gooris, and N. Kitson. "A model membrane approach to the epidermal permeability barrier: a X-ray diffraction study." *Biochemistry* 36 (1997): 7717-7725.

Briggaman, R., and C.E. Wheeler. "The epidermal-dermal junction." *Journal of Investigative Dermatology* 65 (1975): 71-84.

Briggaman, R.A. "Epidermal-dermal junction: Structure, composition, function and disease relationship." *Prog. Dermatol* 24 (1990): 1-8.

Bronaugh, RL, and HI Maibach. *Percutaneous Absorption*. Edn. 4 th. New York: Marcel Dekker, 2005.

- Cartaya, O., C. Peniche, and I. Reynaldo. "Polímeros naturales recolectores de iones metálicos." *Revista Iberoamericana de Polímeros* 10, 2 (2009): 81-94.
- Cormier, M., B. Johnson, M. Ameri, K. Nyam, L. Libiran, D.D. Zhang, and P. Daddona. "Transdermal delivery of desmopressin using a coated microneedle array patch system." *Journal Controlled Release* 97 (2004): 503-511.
- Davis, S.P., B.J. Landis, Z.H. Adams, M.G. Allen, and M.R. Prausnitz. "Insertion of microneedles into skin: measurement and prediction of insertion force and needle fracture force." *Journal of Biomechanisms* 37, 8 (2004): 1155-1163.
- Dodane, V., and V.D. Vilivalam. "Pharmaceutical applications of chitosan." *Pharmaceutical Science & Technology Today* 1, 6 (1998): 246-253.
- Donnelly, R.F., D.I.J. Morrow, P.A. McCarron, A.D. Woolfson, A. Morrissey, P. Juzenas, A. Juzeniene, V. Iani, H.O. McCarthy, and J. Moan. "Microneedle-mediated intradermal delivery of 5-aminolevulinic acid: Potential for enhanced topical photodynamic therapy." *Journal of Controlled Release* 129 (2008): 154-162.
- Elias, P.M., and D.S. Friend. "The permeability barrier in mammalian epidermis." *The Journal Cell Biology* 65 (1975): 180-191.
- Elias, P.M., E.R. Cooper, A. Korc, and B.E. Brown. "Percutaneous transport in relation to stratum corneum structure and lipid composition." *Journal of Investigative Dermatology* 76 (1981): 297-301.
- Elias, P.M., V. Mak, C. Thornfield, and K.R. Feingold. "Interference with stratum corneum lipid biogenesis." In *Percutaneous absorption: Drugs-cosmetics-Mechanisms-Methodology*, by R.L. Bronaugh, & H.I. Maibach, 355. Marcel-Dekker, 1999.
- Furusaki, E., Y. Ueno, N. Sakairi, N. Nishi, and S. Tokura. "Facile preparation and inclusion ability of a chitosan derivative bearing carboxymethyl- β -cyclodextrin." *Carbohydrate Polymers* 29, 1 (1996): 29-34.
- Gacén, G. J., and E. I. Gacén. "Quitina y quitosano. Nuevos materiales textiles." *Boletín del Instituto de Investigación Textil y de Cooperación Industrial (INTEXTER)*, 110 (1996): 67-71.
- García, G.E. "Tesis de licenciatura QFB. Caracterización del quitosán como excipiente de compresión directa." U.N.A.M FES-C, 1998.
- Gartner, C., and B. L. López. "Medidas de la rigidez del quitosano en solución a través de la viscosidad intrínseca." *Revista Facultad Ingeniería Universidad Antioquia* 53 (2010): 20-29.
- Gill, H.S., and M.R. Prausnitz. "Coated microneedles for transdermal delivery." *Journal Controlled Release* 117 (2007): 227-237.

- Gross, P., E. Konrad, and H. Mager. "Investigations on chitosan as a natural film forming ingredient in hair cosmetic products under the consideration of ecological aspects." *Parfuem Kosmet* 64 (1983): 367.
- Guy, R. H., and J. Hadgraft. *Transdermal Drug Delivery*. New York: Marcel Dekker, 2003.
- Han, M., D.K. Kim, S.H. Kang, H.-R. Yoon, B.-Y. Kim, S.S Lee, K.D. Kim, and H.G. Lee. "Improvement in antigen-delivery using fabrication of a grooves-embedded microneedle array." *Sensors and Actuators B* 137 (2009): 274-280.
- Harish, P.K.V., F.S. Kittur, and R.N. Tharanathan. "Solid state structure of chitosan prepared under different N-deacetylating conditions." *Carbohydrate Polymers* 50, 1 (2002): 27-33.
- Hilt, J.Z., and N.A. Peppas. "Microfabricated drug delivery devices." *International Journal of Pharmaceutics* 306 (2005): 15-23.
- Hirano, S. "Chitin biotechnology applications." *Biotechnology Annual Review*, 1996: 237-258.
- Illum, L., N.F. Farraj, and S.S. Davis. "Chitosan as a novel nasal delivery system for peptide drugs." *Pharmaceutical Research* 11 (1994): 1186-1189.
- Ito, Y., E. Hagiwara, A. Saeki, N. Sugioka, and K. Takada. "Feasibility of microneedles for percutaneous absorption of insulin." *European Journal Pharmaceutical Sciences* 86 (2006): 1196-1206.
- Ito, Y., H. Murano, N. Amazaki, K. Fukushima, and K. Takada. "Incidence of low bioavailability of leuprolide acetate after percutaneous administration to rats by dissolving microneedles." *International Journal of Pharmaceutics* 407 (2011): 126-131.
- Jameela, S. R., A. Misra, and A. Jayakrishnan. "Crosslinked chitosan microspheres as carriers for prolonged delivery of macromolecular drugs." *Journal Biomaterials Science Polymer Edition* 6 (1994): 621-632.
- Kogan, A., and N. Garti. "Microemulsions as transdermal drug delivery vehicles." *Advances in Colloid Interface Science* 123-126 (2006): 369-385.
- Kumar, M. N. "A review of chitin and chitosan applications." *Reactive and Functional Polymers* 24 (2000): 1-39.
- Lee, J.W., J.H. Park, and M.R. Prausnitz. "Dissolving microneedles for transdermal drug delivery." *Biomaterials* 29, 13 (2008): 2113-2124.
- Lehr, C.M., J.A. Bouwstra, E.H. Schacht, and H.E. Junginger. "In vitro evaluation of mucoadhesive properties of chitosan and some other natural polymers." *International Journal of Pharmaceutics* 78, 1-3 (1992): 43-48.

- Li, G., A. Badkar, S. Nema, Ch.S. Kolli, and A.K. Banga. "In vitro transdermal delivery of therapeutic antibodies using maltose microneedles." *International Journal Pharmaceutics* 368 (2009): 109-115.
- Lu, S., X. Song, D. Cao, Y. Chen, and K. Yao. "Preparation of water-soluble chitosan." *Journal of Applied Polymer Science* 91, 6 (2004): 3497-3503.
- Matriano, J.A., M. Cormier, J. Johnson, W.A. Young, M. Buttery, K. Nyam, and P.E. Daddona. "Macroflux® Microprojection Array Patch Technology: A New and Efficient Approach for Intracutaneous Immunization." *Pharmaceutical Research* 19 (2002): 63-70.
- Mikszta, J.A., J.B. Alarcon, J M. Brittingham, D.E. Sutter, R.J. Pettis, and N.G. Harvey. "Improved genetic immunization via micromechanical disruption of skin-barrier function and targeted epidermal delivery." *Nature Medicine* 8 (2002): 415-419.
- Monteiro-Riviere, N.A., A.O. Inman, V. Mak, P. Wertz, and J.E. Riviere. "Effect of selective lipid extraction from different body regions on epidermal barrier function." *Pharmaceutical Research* 18 (2001): 992-998.
- Nakamura, K., A. Saitoh, N. Yasaka, M. Furue, and K. Tamaki. "Molecular mechanisms involved in the migration of epidermal dendritic in the skin." *Journal Investigative Dermatology* 4 (1999): 169-172.
- Nava-Arzaluz, M. G., I. Calderón-Lojero, D. Quintanar-Guerrero, R. Villalobos-García, and A. Gamén-Quintanar. "Microneedles as Transdermal Delivery Systems: Combination with Other Enhancing Strategies." *Current Drug Delivery* 8 (2011).
- Ogawa, K., and T. Yui. "Structure and function of chitosan. Crystallinity of partially N-acetylated chitosans." *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 57, 9 (1993): 1466-1469.
- Park, J.-H., M.G. Allen, and M.R. Prauznitz. "Biodegradable polymer microneedles: fabrication, mechanics and transdermal drug delivery." *Journal of Controlled release* 104 (2005): 51-66.
- Prausnitz, M.R. "Microneedles for transdermal drug delivery." *Advanced Drug Delivery Reviews* 56, 5 (2004): 581-587.
- Rabea, E.I., M.E. Badawy, C.V. Stevens, G. Smagghe, and W. Steurbaut. "Chitosan as antimicrobial agent: Applications and mode of action." *Biomacromolecules* 4 (2003): 1457-1465.
- Rinaudo, M. "Chitin and chitosan: Properties and applications." *Progress in Polymer Science* 31, 7 (2006): 603-632.

- Roberts, M.S., S.E. Cross, and M.A. Pelett. "Skin Transport." Chap. 4 in *Dermatological and Transdermal Formulations*, by Kenneth A. Walters. Marcel Dekker Inc., 2002.
- Rout, D.K., S.K. Pulapura, and R.A. Gross. "Liquid crystalline characteristics of size-selectively-modified chitosan." *Macromolecules* 26 (1993): 5999-6006.
- Sánchez B., A., M. Sibaja B., J. Vega-Baudrit, and S. Madrigal C. "Síntesis y caracterización de hidrogeles de quitosano obtenido a partir del camarón langostino (*Pleurocodes planipes*) con potenciales aplicaciones biomedicas." *Revista Iberoamericana de polimeros* 8, 4 (2007): 241-267.
- Scheuplein, R.J. "Mechanism of percutaneous adsorption. I. Routes of penetration and the influence of solubility." *Journal of Investigative Dermatology* 45 (1965): 334-346.
- Scheuplein, R.J., and I.H. Blank. "Permeability of the skin." *Physiological Reviews* 51 (1971): 702-747.
- Shahidi, F., J.K.M. Arachchi, and Y. Jeon. "Food applications of chitin and chitosans." *Trends in Food Science and Technology* 10 (1999): 37-51.
- Shaji J., V. Jain y S. Lopdha. "Chitosan: A Novel Pharmaceutical Excipient" *International journal of pharmaceutical and Applied Sciences* 1, 1 (2010): 11-28.
- Shaoyun Y., Y. Zhao, W. Fenglan, Z. Xuan, L. Wanliang, H. Zhang y Q. Zhang. "Nasal insulin delivery in the chitosan solution: in vitro and in vivo studies" *International Journal of Pharmaceutics* 281 (2004): 11-23.
- Shuang, Chi. "Development and characterization of antimicrobial food coatings based on chitosan and essential oils." *The University of Tennessee, Knoxville*, 2004.
- Sieg, A., R.H. Guy, and M.B. Delgado-Charro. "Noninvasive and minimally invasive methods for transdermal glucose monitoring." *Diabetes Technology and Therapeutics* 7 (2005): 174-197.
- Soro Guevara, L.M. Tesis de grado FIMCP "Estudio de la obtención de quitosano a partir de caparazón de camarón (*Penaeus Vannamei*) y su aplicación en la estabilidad de una emulsión aceite agua." *Facultad de Ingeniería en Mecánica y Ciencias de la Producción, Escuela Superior Politécnica del Litoral, Guayaquil - Ecuador*, 2007.
- Squier, C.A. "The permeability of Keratinized and nonkeratinized oral epithelium to horse-radish peroxidase." *Journal of Ultrastructure Research* 43 (1973): 160-177.
- Teo, A.L., Ch. Shearwood, K.Ch. Ng, J. Lu, and Sh. Moolchala. "Transdermal microneedles for drug delivery applications." *Materials Science and Engineering. B.* 132 (2006): 151-154.

Teunissen, M.B.M. "Dynamic nature and function of epidermal langerhans cells in vivo and in vitro: a review, with emphasis on human Langerhans cells." *Histochemical Journal* 24 (1992): 697-716.

Timpl, R., M. Dziadek, S. Fujiwara, H. Nowack, and G. Wick. "Nidogen: A new, self-aggregating basement membrane protein." *European Journal of Biochemistry* 137 (1983): 455-465.

Torres B., E. M. Tesis de Licenciatura "Evaluación in vitro e in vivo del efecto de diferentes aditivos sobre la función de barrera de películas de quitosán a ser aplicadas en piel." Tecnología Farmacéutica, Universidad Nacional Autónoma de México, 2009.

Touitou, E., and B. Godin. "Enhancement in Drug Delivery." By E. Touitou, & B. Barry, 255-278. Boca Raton, FL: CRC Press, 2007.

Walters, K.A., and M.S. Roberts. "The structure and function of skin." Chap. 1 in *Dermatological and transdermal Formulations*, by Kenneth A. Walters, 1-39. Marcel Dekker Inc., 2002.

Wertz, P.W. "Epidermal lipids." *Semin. Dermatol.* 11 (1992): 106-113.

Wei-Ze, L., H. Mei-Rong, Z. Jian-Ping, Z. Yong-Qiang, H. Bao-Hua, L. Ting and Z. Yong. "Super-short solid silicon microneedles for transdermal drug delivery applications." *International Journal of Pharmaceutics* 389 (2010): 122-129.

Wilke, N., A. Mulcahy, S.-R. Ye, and A. Morrissey. "Process optimization and characterization of silicon microneedles fabricated by wet etch technology." *Microelectronics Journal* 36, 7 (2005): 650-656.

Obtenida en la red mundial el 8 de Diciembre 2011.

<http://www.poliformasplasticas.com.mx/categorias.asp>