



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán

“Efecto del tipo de surfactante sobre la permeación
transdérmica de diclofenaco en liposomas elásticos”

T E S I S

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

P R E S E N T A:

FLORES MELÉNDEZ MARTIN ISAAC

Asesora: M. en C. María Guadalupe Nava Arzaluz
Coasesora: Dra. Flora Adriana Ganem Rondero

CUAUTITLAN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO. 2013



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES**

U.N.A.M.
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
ASUNTO: VOTO APROBATORIO



**DRA. SUEMI RODRÍGUEZ ROMO
DIRECTORA DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE**

**ATN: L.A. ARACELI HERRERA HERNÁNDEZ
Jefa del Departamento de Exámenes
Profesionales de la FES Cuautitlán.**

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos a comunicar a usted que revisamos el: Trabajo de Tesis

Efecto del tipo de surfactante sobre la permeación transdérmica de diclofenaco en liposomas elásticos

Que presenta el pasante: Martín Isaac Flores Meléndez

Con número de cuenta: 305012867 para obtener el Título de: Químico Farmacéutico Biólogo

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO**.

ATENTAMENTE

"POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 07 de agosto de 2013.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	MFC. Ma. Eugenia R. Posada Galarza	
VOCAL	QFB. José Antonio Garduño Rosas	
SECRETARIO	M. en C. María Guadalupe Nava Arzaluz	
1er. SUPLENTE	QFB. Guadalupe Rebollar Barrera	
2do. SUPLENTE	Dra. Elizabeth Piñón Segundo	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).

AGRADECIMIENTOS

A mi abuela *Clara Herrera Herrera* por el apoyo durante toda mi formación académica y hacerme ver las cosas más sencillas, Gracias Abuelita.

A mi Tía *Julieta Meléndez* por toda esa ayuda que me ha brindado y recordarme que debo ser mejor.

A la *Dra. Flora Adriana Ganem Rondero* por haberme abierto las puertas y permitirme ser parte de su grupo de trabajo.

A la *M. en C. María Guadalupe Nava Arzalúz* por ser maestra, profesora y lo más importante amiga durante todo este tiempo.

A la *M. en C. Marina L. Morales Galicia* por permitirme ser su alumno y enseñarme a trabajar.

A mis amigos: *Eric Reyes, Samanta Reyes, Lucía Miranda, Claudia Romero, Mariana Ruíz, Mariana Salazar, Mónica Jiménez* que a pesar de habernos distanciado por perseguir cada quién sus sueños, les agradezco su apoyo infinito en cada etapa de mi vida y nunca olvidarnos, hoy cumplo mi sueño y ustedes son parte de él.

A la UNAM por haberme dado la oportunidad de ser parte de esta hermosa universidad y permitirme crecer dentro de sus puertas como un segundo hogar.

A CONACyT (Proyecto 129320) y PAPIIT (IN216313) por el apoyo brindado para la realización de esta investigación. Al Sr. Draucin Jiménez del Taller de Vidrio Soplado de la Facultad, por haber fabricado las celdas de difusión tipo Franz.

A cada una de las personas que se han cruzado en mi vida, ya que gracias a todos ustedes Martín es quién es Hoy .

Gracias

DEDICATORIAS

A mi madre Margarita Meléndez por ayudarme a crecer durante todo este tiempo y levantarme cada vez que caía, a pesar de todas las diferencias ese es nuestro trabajo ser amigos, gracias por todo ese apoyo y enseñarme a crecer y ser por mí mismo.

A la familia que yo elegí. Mónica Martínez, Anel García, Sarai Gómez, Jonathan García, Windy Cristóbal, Jazmín Agüeros, Verónica Arroyo, Moisés Monzón, Guillermo Bautista, Marcos Ortega, David Vega, Xiomara Gutiérrez, Gabriel Torres y todos aquellos miembros de esta familia que formamos, hoy soy yo y pronto ustedes, los quiero.

A Sergio A. Álvarez por demostrarme que soy una persona diferente y nunca dejar de creer en mí, gracias por todo este tiempo y ser parte importante en mi vida.

Este trabajo se los dedico a ustedes por ser parte de este sueño que gracias a todos hoy se convirtió en una meta que logré alcanzar, Los quiero.

Índice General

LISTA DE ABREVIATURAS	7
ANALISIS OF VARIANCE/ANÁLISIS DE LA VARIANZA	7
COEFICIENTE DE VARIACIÓN	7
CON DICLOFENACO	7
CONCENTRACIÓN MICELAR CRÍTICA	7
COEFICIENTE DE DIFUSIÓN	7
DALTONS.....	7
VALOR DE F DE FISCHER	7
VALOR DE F CRÍTICA	7
COEFICIENTE DE PARTICIÓN DEL FÁRMACO EN PIEL Y LA FORMULACIÓN	7
COEFICIENTE PARTICIÓN OCTANOL/AGUA	7
POTENCIAL DE HIDRÓGENO	7
LOGARITMO NEGATIVO DE LA CONSTANTE DE ACIDEZ	7
CANTIDAD DE FÁRMACO PERMEADO	7
COEFICIENTE DE CORRELACIÓN DE PEARSON	7
REVOLUCIONES POR MINUTO.....	7
SIN DICLOFENACO	7
ESTRATO Córneo	7
VALOR DE T DE STUDENT.....	7
UNITED STATES OF AMERICA.....	7
ULTRAVIOLETA-VISIBLE	7
GRADIENTE DE CONCENTRACIÓN A TRAVÉS DEL ESTRATO Córneo	7
ÍNDICE DE FIGURAS	8
ÍNDICE DE TABLAS	11
RESUMEN	14
INTRODUCCIÓN	15
OBJETIVOS	17
MARCO TEÓRICO	18
PIEL (GENERALIDADES).....	18
PERMEACIÓN TRANSDÉRMICA	21
LIPOSOMAS	27
TENSOACTIVOS	31
PARTE EXPERIMENTAL	34
MATERIALES	34
MÉTODOS	36
ESPECTRO DE ABSORCIÓN	36
PREPARACIÓN DE CURVAS DE CALIBRACIÓN PARA DETERMINAR LA EFICIENCIA DE ENCAPSULAMIENTO DEL DICLOFENACO EN LOS LIPOSOMAS.....	36
PREPARACIÓN DE CURVAS DE CALIBRACIÓN PARA CUANTIFICAR DICLOFENACO EN UN MEDIO BIOLÓGICO (SOLUCIÓN AMORTIGUADORA DE FOSFATOS pH=6.5 EN CONTACTO CON PIEL ABDOMINAL HUMANA).....	37
DETERMINACIÓN DEL TIEMPO DE EXTRACCIÓN DEL DICLOFENACO DE LA PIEL	38
CUANTIFICACIÓN DE DICLOFENACO EXTRAÍDO DE LA PIEL	38
DETERMINACIÓN DE LA SOLUBILIDAD DEL DICLOFENACO.....	39
MÉTODO GENERAL DE PREPARACIÓN DE LIPOSOMAS FLEXIBLES	39
ESTUDIO DE LA CINÉTICA DE PERMEACIÓN <i>IN VITRO</i> DE DICLOFENACO A TRAVÉS DE PIEL ABDOMINAL HUMANA	42
MÉTODO DE EXTRACCIÓN DE DICLOFENACO RETENIDO EN LA PIEL	43

RESULTADOS Y DISCUSIÓN	44
DETERMINACIÓN DE LA SOLUBILIDAD DEL DICLOFENACO	44
DETERMINACIÓN DE LA LONGITUD DE ONDA DE MÁXIMA ABSORCIÓN	44
CURVA DE CALIBRACIÓN DE DICLOFENACO EN DIFERENTES MEDIOS	46
CURVA DE CALIBRACIÓN PARA CUANTIFICAR LA EFICIENCIA DE ENCAPSULAMIENTO DEL DICLOFENACO	46
CURVA DE CALIBRACIÓN PARA CUANTIFICAR DICLOFENACO EN UN MEDIO BIOLÓGICO (SOLUCIÓN AMORTIGUADORA DE FOSFATOS pH=6.5 EN CONTACTO CON PIEL ABDOMINAL HUMANA POR 24 h).....	48
SELECTIVIDAD	49
CARACTERIZACIÓN DE LIPOSOMAS FLEXIBLES CARGADOS, LIPOSOMAS CONVENCIONALES Y SUS PLACEBOS CORRESPONDIENTES.....	49
TAMAÑO	49
POTENCIAL Z.....	53
ELASTICIDAD.....	56
DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE DICLOFENACO EN LAS SUSPENSIONES LIPOSOMALES (FARMACO LIBRE Y ENCAPSULADO)	58
EFICIENCIA DE ENCAPSULACIÓN	59
DETERMINACIÓN DEL TIEMPO DE EXTRACCIÓN.....	60
CINÉTICA DE PERMEACIÓN	61
RETENCIÓN DE DICLOFENACO EN PIEL	65
CONCLUSIONES	66
REFERENCIAS	68
ANEXOS	72
ANEXO I PROPIEDADES FÍSICOQUÍMICAS Y FARMACOLÓGICAS DEL DICLOFENACO (PLM MÓVIL, 2013)	72
ANEXO II CURVAS DE CALIBRACIÓN DE DICLOFENACO EN SOLUCIÓN AMORTIGUADORA DE FOSFATOS pH 6.5	76
ANEXO III DATOS DE TAMAÑO DE LIPOSOMAS	87
ANEXO IV DATOS DE POTENCIAL Z DE LOS LIPOSOMAS	89
ANEXO V DATOS DE ELASTICIDAD DE LIPOSOMAS.....	96
ANEXO VI EFICIENCIA DE ENCAPSULACIÓN DE DICLOFENACO EN LIPOSOMAS	97
ANEXO VII CINÉTICA DE PERMEACIÓN	99
ANEXO VIII DATOS DE FLUJO DE PERMEACIONES.....	103
ANEXO IX DETERMINACIÓN DE SOLUBILIDAD DEL DICLOFENACO EN SOLUCIÓN AMORTIGUADORA DE FOSFATOS pH=6.5	105
ANEXO X SELECTIVIDAD DEL MÉTODO.....	106

Lista de abreviaturas

ABREVIATURA	
ANOVA/ANADEVA	Analysis Of Variance/análisis de la varianza
C.V.	Coeficiente de Variación
c/d	Con diclofenaco
CMC	Concentración Micelar Crítica
D	Coeficiente de difusión
Da	Daltons
F	Valor de F de fischer
F_c	Valor de F crítica
K	Coeficiente de partición del fármaco en piel y la formulación
K_{o/w}	Coeficiente partición octanol/agua
pH	Potencial de hidrógeno
pKa	Logaritmo negativo de la constante de acidez
Q	Cantidad de fármaco permeado
r²	Coeficiente de correlación de Pearson
rpm	Revoluciones por minuto
s/d	Sin diclofenaco
SC	Estrato córneo
t	Valor de t de student
USA	United States of America
UV-Vis	Ultravioleta-Visible
ΔC	gradiente de concentración a través del estrato córneo

Índice de figuras

1. Estratos de la piel y algunos componentes.	18
2. Representación de la difusión de un fármaco a través de la piel.	23
3. Representación de las principales vías de absorción percutánea.	25
4. Esquema de liposomas (Imagen tomada de González, 2008).	27
5. Esquema de liposomas elásticos (transfersomas).	28
6. Posibles mecanismos de permeación de los liposomas como sistemas de suministro de fármacos a través de la piel.	30
7. Estructura molecular del tween 80.	32
8. Estructura molecular del SPAN 60.	33
9. Estructura molecular del colato de sodio.	33
10. Celdas verticales tipo Franz empleadas en los estudios de permeación.	42
11. Espectro de absorción de diclofenaco en solución amortiguadora de fosfatos pH= 6.5.	44
12. Espectro de absorción del diclofenaco en solución amortiguadora de fosfatos pH= 6.5 en contacto con piel humana durante 24 h.	45
13. Espectro de absorción del diclofenaco en etanol en contacto con piel humana durante 48 h.	45
14. Curva de calibración de diclofenaco en solución amortiguadora de fosfatos pH=6.5.	47
15. Curva de calibración de diclofenaco en solución amortiguadora de fosfatos pH 6.5 en contacto con piel humana empleada para cuantificar el diclofenaco en el medio receptor durante los estudios de permeación.	48

16. Gráfico de barras indicando el tamaño promedio de los liposomas.	50
17. Intervalos de Tukey para el tamaño de los liposomas.	51
18. Gráfico de dispersión de datos para el tamaño de los liposomas.	51
19. Uniformidad del tamaño de los liposomas con diclofenaco.	52
20. Uniformidad del tamaño de los liposomas sin diclofenaco.	52
21. Representación del Potencial Z.	53
22. Gráfico comparativo de Potencial Z de Liposomas en mili volts (mV), c/d: con diclofenaco, s/d: sin diclofenaco.	54
23. Intervalos de confianza de Tukey del tamaño de los liposomas.	55
24. Comparación de tamaño inicial (azul) y final (rojo) en prueba de elasticidad.	57
25. Ionización del diclofenaco al pH utilizado con solución amortiguadora de fosfatos pH=6.5.	58
26. Porcentaje de recobro a dos tiempos distintos (24 y 48 h).	60
27. Cinética de permeación de liposomas con diclofenaco.	62
28. Estructura molecular del diclofenaco.	72
29. Curva de calibración Diclofenaco en solución amortiguadora de fosfatos pH=6.5.	77
30. Curva de calibración de diclofenaco en fosfatos para reproducibilidad.	79
31. Límite de cuantificación inferior experimental para la curva de calibración de diclofenaco en solución amortiguadora de fosfatos pH=6.5.	81
32. Curva de calibración de diclofenaco en solución amortiguadora de fosfatos pH 6.5 en contacto con piel humana abdominal por	83

24 h.	
33. Curva de calibración de diclofenaco en solución amortiguadora de fosfatos pH 6.5 en contacto con piel humana abdominal por 24 h reproducibilidad.	85
34. Gráfico de dispersión de tamaño.	90
35. Gráfico de comparación de medias de tamaño con Intervalos de Tukey.	91
36. Gráfico de Análisis de medias del tamaño.	93
37. Gráfico del Potencial Z de los liposomas.	93
38. Intervalos de comparación de Tukey del Potencial Z.	94
39. Gráfico de Permeación de diclofenaco encapsulado en Liposomas elásticos Tween 80 c/d.	99
40. Gráfico de Permeación de diclofenaco encapsulado en Liposomas elásticos SPAN 60 c/d.	100
41. Gráfico de Permeación de diclofenaco encapsulado en Liposomas elásticos Colato de sodio c/d	101
42. Gráfico de Permeación de diclofenaco encapsulado en Liposomas convencionales.	102
43. Gráfico de barridos de diclofenaco para seletividad	106

Índice de tablas

1. Características ideales de un fármaco para la vía transdérmica.	22
2. Capacidad de las moléculas para la penetración transdérmica.	22
3. Clasificación de los liposomas y sus componentes.	28
4. Resultados de la curva de calibración para cuantificar diclofenaco encapsulado.	47
5. Resultados de la validación para cuantificar diclofenaco en el medio receptor durante los estudios de permeación.	49
6. Media del tamaño de los liposomas (n=9). (c/d: Con diclofenaco, s/d: sin diclofenaco).	50
7. Potencial Z de liposomas (s/d: sin diclofenaco, c/d: con diclofenaco).	54
8. Tamaño inicial y final obtenidos en la prueba de elasticidad (s/d: sin diclofenaco, c/d: con diclofenaco), *t crítico de 4.30.	56
9. Determinación de concentración de diclofenaco en las suspensiones liposomales.	58
10. Eficiencia de encapsulamiento.	59
11. Parámetros de cinética de permeación.	63
12. Datos de Curva de calibración en solución amortiguadora de fosfatos.	76
13. Parámetros de la curva de calibración en solución amortiguadora de fosfatos.	76
14. Datos de curva de diclofenaco para reproducibilidad.	78
15. Datos de reproducibilidad de la curva de calibración de diclofenaco en solución amortiguadora de fosfatos pH=6.5.	78

16. Datos de límite de cuantificación inferior.	80
17. Datos para límite de cuantificación inferior de la curva de calibración de diclofenaco en solución amortiguadora de fosfatos pH=6.5.	80
18. Datos de la curva de calibración en solución amortiguadora de fosfatos en contacto con piel abdominal humana por 24 h.	82
19. Datos de curva de calibración en solución amortiguadora de fosfatos en contacto con piel abdominal humana por 24 h.	83
20. Datos de Reproducibilidad de la curva de calibración de diclofenaco en solución amortiguadora de fosfatos pH 6.5 en contacto con piel humana abdominal por 24 h.	84
21. Parámetros de reproducibilidad de la curva de calibración de diclofenaco en solución amortiguadora de fosfatos pH 6.5 en contacto con piel humana abdominal por 24 h.	84
22. Datos del recobro de diclofenaco en piel abdominal humana tras 24 h.	86
23. Datos del recobro de diclofenaco en piel abdominal humana tras 48 h.	86
24. Datos de caracterización de tamaño liposomas.	87
25. Datos de la caracterización del Potencial Z de los liposomas.	89
26. Análisis de la Varianza del Tamaño de liposomas.	91
27. Datos de Comparación de muestras múltiples con intervalos de tukey del tamaño.	92
28. ANOVA de Potencial Z.	94
29. Datos de Comparación de muestras múltiples Intervalos de Tukey para Potencial Z.	95
30. Datos de elasticidad de liposomas.	96

31. Datos de eficiencia de encapsulamiento de diclofenaco en los liposomas.	97
32. Datos de cuantificación del diclofenaco en la suspensión de liposomas.	98
33. Permeación del diclofenaco contenido en liposomas elásticos con Tween 80.	99
34. Permeación de diclofenaco contenido en liposomas elásticos SPAN 60.	100
35. Permeación de diclofenaco contenido en liposomas elásticos con Colato de sodio.	101
36. Permeación de diclofenaco contenido en liposomas convencionales.	102
37. Datos de flujo 1 (tiempo 1 a 4 h).	103
38. ANOVA Flujo 1.	103
39. Datos de flujo 2 (tiempo 4 al 7 h).	104
40. ANOVA flujo 2.	104
41. Diclofenaco total permeado por celda.	104
42. ANOVA diclofenaco total permeado.	105
43. Solubilidad del diclofenaco en solución amortiguadora de fosfatos.	105
44. Barridos de diclofenaco en solución amortiguadora de fosfatos pH=6.5 y solución amortiguadora de fosfatos pH=6.5 en contacto con piel abdominal humana por 24 h.	106

RESUMEN

En la vía transdérmica los liposomas elásticos son parte de la tecnología farmacéutica de vanguardia, sin embargo existe mucha controversia alrededor de su desempeño como acarreadores de fármacos, ya que como es bien conocido la piel funciona como una barrera que impide el paso de sustancia exógenas hacia el cuerpo.

En el presente trabajo se incorporaron 3 surfactantes (TWEEN® 80, SPAN® 60 y Colato de sodio) en liposomas, demostrando que en comparación con los liposomas convencionales (es decir, sin surfactante) tienen un mejor desempeño. La incorporación del surfactante disminuyó el tamaño promedio de las vesículas y aumento la uniformidad del mismo (disminuyó el índice de polidispersión), se observó que el potencial Z es dependiente tanto del surfactante como del estado de ionización del fármaco; Se obtuvo que los liposomas son elásticos ya que conservan su tamaño hasta en un 99% (como es el caso de los liposomas preparados con SPAN® 60) cuando se hacen pasar por una membrana con un tamaño menor al de las vesículas. La eficiencia de encapsulamiento del fármaco se vio también favorecida al incluir el surfactante, esta fue hasta 4 veces mayor cuando se empleó Tween® 80. La permeación del diclofenaco a través de la piel y su deposición en la misma fue favorecida con la incorporación del surfactante a los liposomas, siendo mayor al emplear SPAN® 60. Los surfactantes mejoran notablemente las propiedades de los liposomas como acarreadores de fármacos para la vía transdérmica.

INTRODUCCIÓN

La piel es el órgano más extenso del cuerpo, el cual brinda una protección como barrera contra el ataque de agentes exógenos, así como evita la pérdida de sustancias endógenas y agua. Esta se encuentra constituida por una amplia gama de células especializadas provistas con enzimas que le permiten una actividad metabólica especial (Bouwstra y Honeywell-Nguyen., 2002; Bronaugh, 2001).

Debido a su amplia área superficial se ha utilizado como vía de administración de medicamentos tanto de uso local como sistémico (Bronaugh, 2001). Además, con los avances en la tecnología farmacéutica y estudios fisiológicos de la piel se han desarrollado productos que ofrecen ventajas para la administración transdérmica de fármacos, por lo que es una vía alterna a la oral, con la ventaja de que la piel evita la degradación química o enzimática de la que algunos fármacos son objeto cuando se administran por vía oral.

Entre los nuevos sistemas de liberación desarrollados para la vía transdérmica se encuentran los liposomas elásticos ultraflexibles (también conocidos como Transfersomas®) los cuales se encuentran constituidos de fosfolípidos a los que se les añade un surfactante (generalmente no iónico) que les confiere elasticidad y estabilidad en cuanto a su tamaño, haciendo posible su paso a través de membranas con un tamaño de poro menor al del liposoma (Gregoriadis, G. 2007).

En la actualidad existen varios fármacos formulados en liposomas y liposomas elásticos ya que debido a su capacidad de encapsulamiento y su naturaleza lipídica poseen buenas propiedades de permeabilidad a través de la piel y otros tejidos, con la posibilidad de funcionalizar su superficie con ligandos específicos que permitan direccionarlos hacia un sitio en particular, liberando el fármaco incluso a nivel intracelular (Clares, B. 2003).

Dado que la función de la piel es de protección, existe una controversia en cuanto a la capacidad acarreadora que tienen los sistemas liposomales de transportar fármacos hacia torrente sanguíneo desde la piel.

En este trabajo se evaluaron los efectos que tienen el SPAN® 60, Colato de Sodio y TWEEN® 80 sobre las características fisicoquímicas: eficiencia de encapsulación, tamaño y potencial zeta de liposomas cargados con diclofenaco y sobre la permeación del diclofenaco contenido en liposomas elásticos.

OBJETIVOS

Objetivo Principal:

Evaluar el efecto del tipo de tensoactivo sobre las características fisicoquímicas de liposomas elásticos conteniendo diclofenaco y sobre la permeación transdérmica en piel humana de diclofenaco encapsulado en los liposomas.

Objetivos particulares:

Preparar liposomas elásticos conteniendo diclofenaco como fármaco modelo, empleando tres tensoactivos (TWEEN® 80, SPAN® 60 y Colato de Sodio).

Caracterizar los liposomas por tamaño, potencial Z, elasticidad y eficiencia de encapsulamiento del principio activo.

Realizar estudios de permeación *in vitro* en piel humana, empleando celdas de difusión tipo Franz.

Determinar si el tipo de tensoactivo empleado ejerce una influencia en las propiedades fisicoquímicas de los liposomas elásticos que afecten la permeabilidad del diclofenaco a través de la piel.

MARCO TEÓRICO

Piel (Generalidades)

La piel no solo es el órgano más grande del cuerpo humano, a su vez es la primer barrera biológica de protección contra el medio ambiente con la que contamos, parte de su capacidad se le atribuye a la amplia variedad de células que la conforman, de manera que le brindan una permeabilidad de 10^2 a 10^4 veces menor a la que presentan los capilares sanguíneos. Se encuentra constituida a grandes rasgos por 3 capas: la epidermis (sin irrigación sanguínea), la dermis y tejido subcutáneo o hipodermis (Cevc *et. al*, 2010).

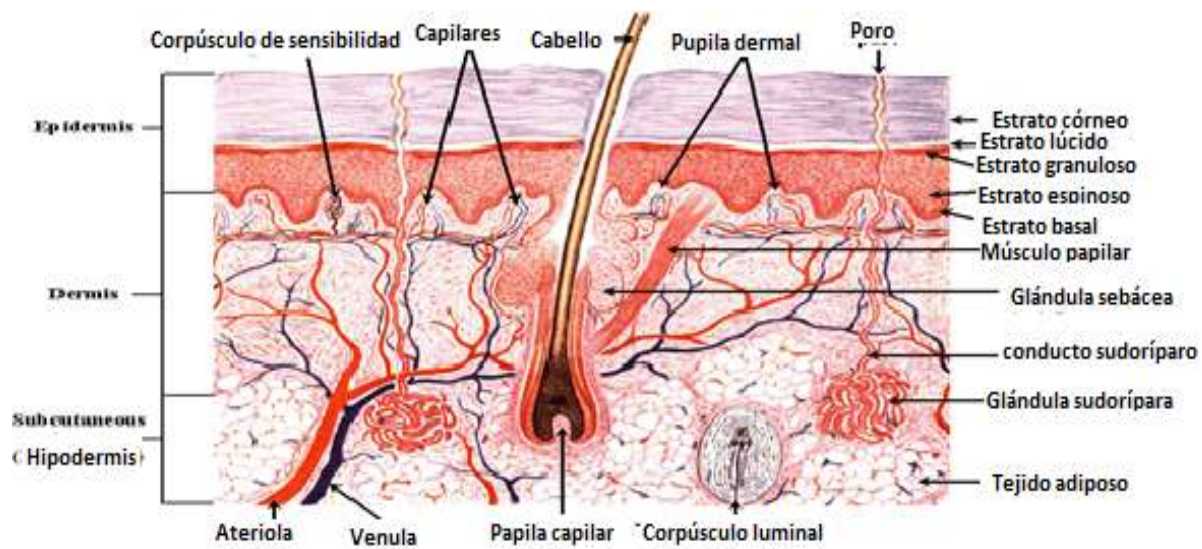


Figura 1. Estratos de la piel y algunos componentes (Cevc *et al.*, 2010).

Capas de la piel

Epidermis

La epidermis (figura 1) es la capa más externa de la piel, no se encuentra irrigada por el flujo sanguíneo, ésta se nutre por el proceso de difusión a partir de los capilares sanguíneos que se localizan en la dermis y que se encargan de distribuir los nutrientes requeridos por las células. La epidermis se encuentra conformada por 5 capas, las cuales son: Estrato córneo, estrato lúcido, estrato granuloso, estrato espinoso y estrato basal enunciadas de la capa externa a la interna.

El estrato córneo comprende de 5 a 20 μm de la epidermis, es la capa más externa y el principal obstáculo en la vía de administración transdérmica, formada por corneocitos anucleados que se encuentran unidos entre ellos por lípidos intercelulares y corneodesmosomas (complejos proteínicos de unión intercelular). Los lípidos que componen esta capa son: Estearatos, fosfolípidos, ceramidas, colesterol libre y/o sulfatado; teniendo como principal actividad la de formar una barrera que evite la pérdida de agua transepidermal, además estos son los responsables del pH ligeramente ácido de la piel que va de 5 a 6 (Cevc, *et. al*, 2010).

El estrato granuloso se encuentra formado por queratinocitos en proceso de pérdida de su núcleo, en esta capa se comienzan a formar los gránulos de querato-hialina y abundan los cuerpos lamelares o de Odland, los cuales juegan un papel fundamental en la formación de la barrera de la piel. En este estrato, los cuerpos lamelares se funden con la membrana celular, liberando su contenido lipídico que rodea a los queratinocitos del estrato córneo (Takanori, 2005).

El estrato espinoso comprende de 10 a 20 capas de células donde los queratinocitos comienzan a producir grandes cantidades de queratina.

El estrato basal es la capa más profunda de la epidermis, en esta se encuentran las células como: queratinocitos, melanocitos, células de Langerhans y células de Merkel. Contiene aproximadamente el 8% del agua total de la epidermis, esta capa con el paso de los años pierde su capacidad de retener agua al volverse más delgada (Takanori, 2005).

Dermis

Esta es la segunda capa de la piel, se encuentra sobre el tejido subcutáneo y por debajo de la epidermis, usualmente tiene un grosor que va de 2 a 4 mm, sus componentes más importantes son el colágeno y la elastina, los cuales son los responsables de darle firmeza y flexibilidad a la piel. Se le suele dividir en dos partes, la primer parte más interna se le conoce como capa papilar, en esta se encuentran las terminaciones nerviosas y los capilares sanguíneos. La siguiente capa se conoce como reticular, en esta se encuentran las glándulas sudoríparas y el nacimiento del vello, es en esta capa donde se lleva a cabo la absorción de los fármacos a circulación sistémica debido a la irrigación de los capilares (Navarrete, 2003).

Hipodermis

Usualmente conocido como tejido subcutáneo, es la capa más profunda de la piel la cual recubre a los músculos. El grosor de esta capa depende de la región que recubre, pudiendo ir de 4 hasta 9 mm. En esta capa se encuentra una gran parte de los adipocitos y el tejido graso, es por ello que su grosor también depende del estado nutricional del individuo (Navarrete, 2003).

Funciones del estrato córneo

Efecto Barrera

Debido a su composición lipídica esta capa provee un efecto barrera. Este se debe a que los corneocitos poseen queratina y una proteína altamente resistente que junto a los lípidos crean un efecto impermeable; además, a esto hay que sumar el efecto de los corneodesmosomas, que contienen mezclas de ácidos grasos poliinsaturados, colesterol y ceramidas que refuerzan esta barrera.

pH cutáneo

El pH de la piel depende de la composición química de cada capa de manera que se mantiene próximo a 7 en las capas más internas (dermis e hipodermis), mientras que en la epidermis es más cercano a 5. Esto se debe a que en la epidermis se presenta la actividad de enzimas que hidrolizan los ácidos grasos, también se ve influido por la sudoración y las secreciones de las glándulas presentes en la piel (sudoríparas y sebáceas). El pH cutáneo confiere otra barrera contra microorganismos.

Permeación transdérmica

La permeación transdérmica se define como el paso de un fármaco a través de las capas de la piel. A pesar de que la piel tiene como función el evitar que sustancias exógenas entren al organismo, algunas sustancias al tener propiedades de liposolubilidad adecuadas se abren paso a través de esta. La piel tiene función de barrera pero aun así ciertos productos químicos son capaces de pasar a través de ella, es por ello que en los últimos años se ha optado por utilizarla como vía de administración de fármacos. Una de las principales limitantes de esta vía son las características del fármaco y la adecuación de éste a una formulación (Naik et al., 2000). En las tablas 1 y 2 se muestran las características ideales que debe tener un fármaco para poder ser utilizado en la vía transdérmica.

Tabla 1. Características Ideales de un fármaco para la vía transdérmica.

Características Ideales	
Coeficiente de partición	$10 < K_{OW} < 1000$
Peso molecular	$< 400 \text{ Da}$
Punto de fusión	$< 200 \text{ }^\circ\text{C}$
Dosis terapéutica	$< 10 \text{ mg dia}^{-1}$
pH de saturación de la solución acuosa	pH 5-9
Solubilidad acuosa	$> 1 \text{ mg/ mL}$

Tabla 2. Capacidad de las moléculas para la penetración transdérmica. (Kligman, 1984)

Grado de penetración	Características
Pobre	Polímeros de alto peso molecular y macromoléculas (proteínas y polisacáridos).
Pobre	Electrolitos solubles en agua (sodio, cloro)
Pobre	Sustancias solubles en agua (glucosa, urea)
Buena	Sustancias liposolubles
Excelente	Sustancias liposolubles, no polares, bajo peso molecular

Los fármacos para que puedan ser absorbidos por la piel se enfrentan al estrato córneo y posteriormente deben difundir a través de los demás estratos de la epidermis y dermis, para así poder acceder a la circulación sistémica. Esto se lleva a cabo en varias etapas:

1. Disolución y liberación del fármaco a partir de la formulación.
2. Equilibrio de partición del fármaco en la capa mas externa del estrato córneo.
3. Difusión del fármaco a traves del estrato córneo por medio de la vía intercelular lipídica.
4. Partición del fármaco del estrato córneo hacia la epidermis viable acuosa.
5. Difusión hacia la dermis superior.
6. Incorporación del fármaco a la red capilar para su distribución sistémica.

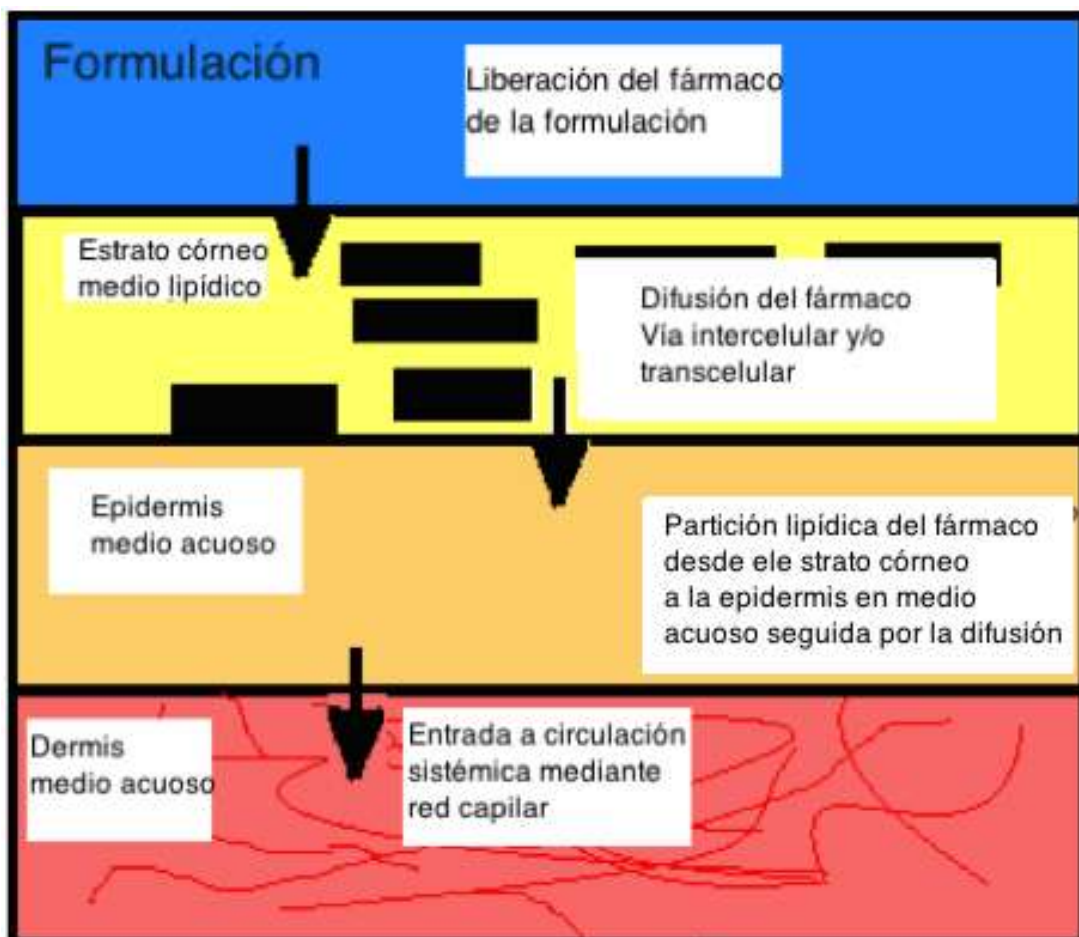


Figura 2. Representación de la difusión de un fármaco a través de la piel

Mecanismos de absorción de fármacos a través de la piel

Tras pasar el estrato córneo, el fármaco se encuentra dentro de un medio con secreciones lipídicas y acuosas (sudor), en el cual puede optar por dos vías de absorción para llegar a la dermis. Estas vías son: transepidérmica y folicular.

Vía transepidérmica

Esta vía hace referencia a que el fármaco puede pasar sobre las uniones lipídicas entre cada célula o pudiere optar por la vía intracelular (ver figura 2). La primera de estas es la más viable ya que de esta manera se puede asegurar que mayor cantidad de fármaco será capaz de llegar a la red capilar y el efecto sistémico será mayor.

La vía transcelular reduce drásticamente la cantidad de fármaco que pueda llegar a torrente sanguíneo, pero si se busca un efecto local es deseable que opte por esta vía de penetración.

Vía folicular (pilosebácea / sudorípara)

Al administrar un fármaco sobre la piel, dependiendo de la zona de aplicación, es posible encontrarse con gran número de folículos pilosebáceos y glándulas sudoríparas (ver figura 3), mediante las cuales puede acceder a capas más internas de la piel. Esta vía no es de gran importancia ya que tiene mucha variación y representa menos del 0.1% de la superficie total de la piel (Trommer y Neubert, 2006).

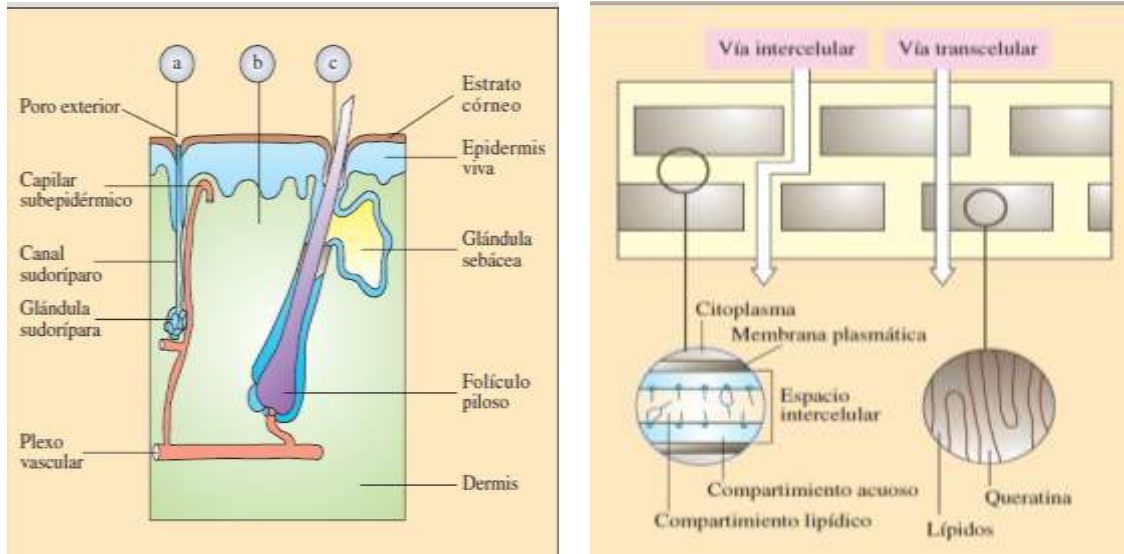


Figura 3. Representación de las principales vías de absorción percutánea: Izquierda: a) sudorípara; b) transepidérmica, y c) pilosebácea. Derecha: vía intercelular y vía transcelular (Diez y Domínguez, 1990).

Al tratarse de un fenómeno de difusión y de absorción de fármacos a través de una membrana semipermeable, el organismo busca el equilibrio entre el fármaco en el área de aplicación con el que va penetrando, de manera que se generan flujos de fármaco que son influenciados por las propiedades del mismo como: el peso molecular, coeficiente de partición, promotores de absorción presentes, entre otros. El transporte de fármacos a través del estrato córneo obedece la primera ley de difusión de Fick:

$$\frac{dM}{dt} = \frac{D \cdot \Delta C \cdot K}{h}$$

Dónde:

dM/dt es la razón de la cantidad de fármaco permeada por unidad de tiempo en el estrato córneo.

D es el coeficiente de difusión

ΔC gradiente de concentración a través del estrato córneo

K coeficiente de partición del fármaco (octanol/agua)

h espesor de la capa córnea

Gracias al modelo de Fick se puede deducir que:

- El coeficiente de difusión “ D ” indica la capacidad de movilidad del fármaco a través del estrato córneo.
- El coeficiente de partición piel/formulación “ K ”, al no poder ser determinado directamente, se realiza una aproximación utilizando el coeficiente de partición octanol/agua.
- La velocidad de absorción transdérmica se ve influenciada por el espesor de las capas, en especial el estrato córneo (Guy, 1996), el grado de hidratación de la piel y la liberación del fármaco del vehículo.
- A mayor coeficiente de partición octanol/agua el fármaco tiene una difusión facilitada al ser más lipofílico.

Factores que afectan la permeación transdérmica

La piel al tener función de barrera se ve influenciada por diversos factores que modifican su capacidad protectora y por ello modifican la permeación transdérmica; dentro de estos factores tenemos:

- Condición fisiológica y patológica de la piel
- Nivel de hidratación
- Variación de la composición de la piel en base a la zona corporal
- Naturaleza fisicoquímica de la molécula aplicada
- Excipientes de la formulación
- Concentración de la molécula
- Coeficiente de partición de la molécula

Debido a estos factores interferentes se han desarrollado diversas formulaciones con mejor desempeño en la permeación.

Liposomas

Los liposomas son un arreglo laminar de lípidos, generalmente formados por fosfolípidos de la misma naturaleza. En solución acuosa forman una bicapa lipídica (figura 4), de esta manera mantienen constantes sus propiedades fisicoquímicas dentro de la solución. Gracias a la propiedad de formar bicapas es posible encapsular moléculas dentro de los liposomas y de esta manera mejorar la permeación a través de diferentes tejidos y mucosas (Williams, 2003; Boinpally, 2003).

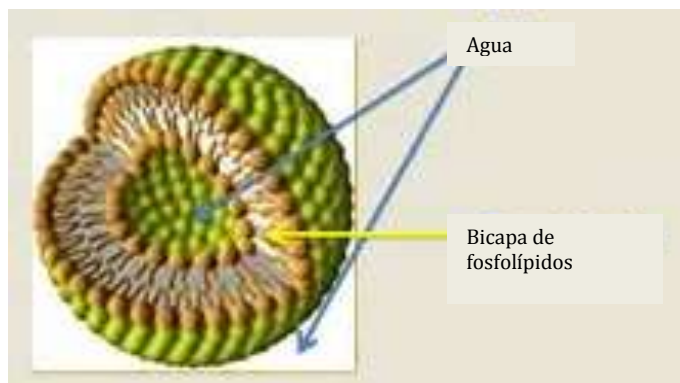


Figura 4. Esquema de liposomas (Imagen tomada de Gonzalez, 2008).

En las formulaciones de liposomas se han incorporado otros componentes con la finalidad de mejorar sus propiedades como acarreadores de principios activos, facilitando su permeación a través de la piel, uno de estos componentes es un tensoactivo, cuya adición hace que el liposoma se torne flexible (como se muestra en la figura 5), la tabla 3 muestra los diferentes tipos de vesículas que se han obtenido al variar los ingredientes que las componen. (Cevc *et al.*, 1996).

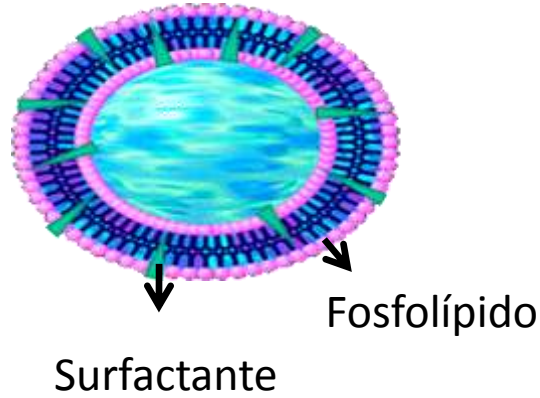


Figura 5. Esquema de liposomas elásticos (transfersomas®).

Tabla 3. Clasificación de liposomas y sus componentes

Tipos de liposoma	Componentes
Liposoma convencional	Fosfolípidos y colesterol
Niosomas	Surfactantes no iónicos
Transfersomas	Fosfolípidos, surfactantes iónicos y no iónicos
Etosomas	Fosfolípidos, altas concentraciones de etanol
Cerasomas	Ceramidas
Esfingosomas	Esfingolípidos
Novasomas	Polímeros orgánicos

Ventajas del uso de liposomas

Los liposomas generalmente se incorporan en formas farmacéuticas de administración transdérmica con fármacos de bajo peso molecular, aunque cabe resaltar que también se utilizan para incorporar macromoléculas como el interferón y a su vez existen algunas formulaciones intravenosas que contienen fármacos dentro de liposomas (Weiner, 1989; Barenholz, 2001).

Dentro de las ventajas de la utilización de liposomas se encuentran (Calderón, 2010):

Sustitución de la vía oral.

Posibilidad de evitar degradación en tracto gastrointestinal.

Factibilidad de sustituir multidosis por una sola administración.

Incremento del transporte de fármacos hidrosolubles por vía transdérmica.

Formas farmacéuticas menos invasivas.

Concentraciones plasmáticas constantes.

Desventajas del uso de liposomas:

Estabilidad física y química. Con el tiempo tienden a degradarse y fusionarse incrementando su tamaño. Requieren estar en refrigeración para evitar la degradación de fosfolípidos y lípidos que los conforman. No obstante estos problemas pueden resolverse liofilizándolos. Por otro lado los fármacos hidrofílicos, con el tiempo tienden a ser expulsados al medio externo acuoso.

En la figura 6 se muestran los posibles mecanismos de permeación de los liposomas como sistemas de suministro de fármacos a través de la piel.

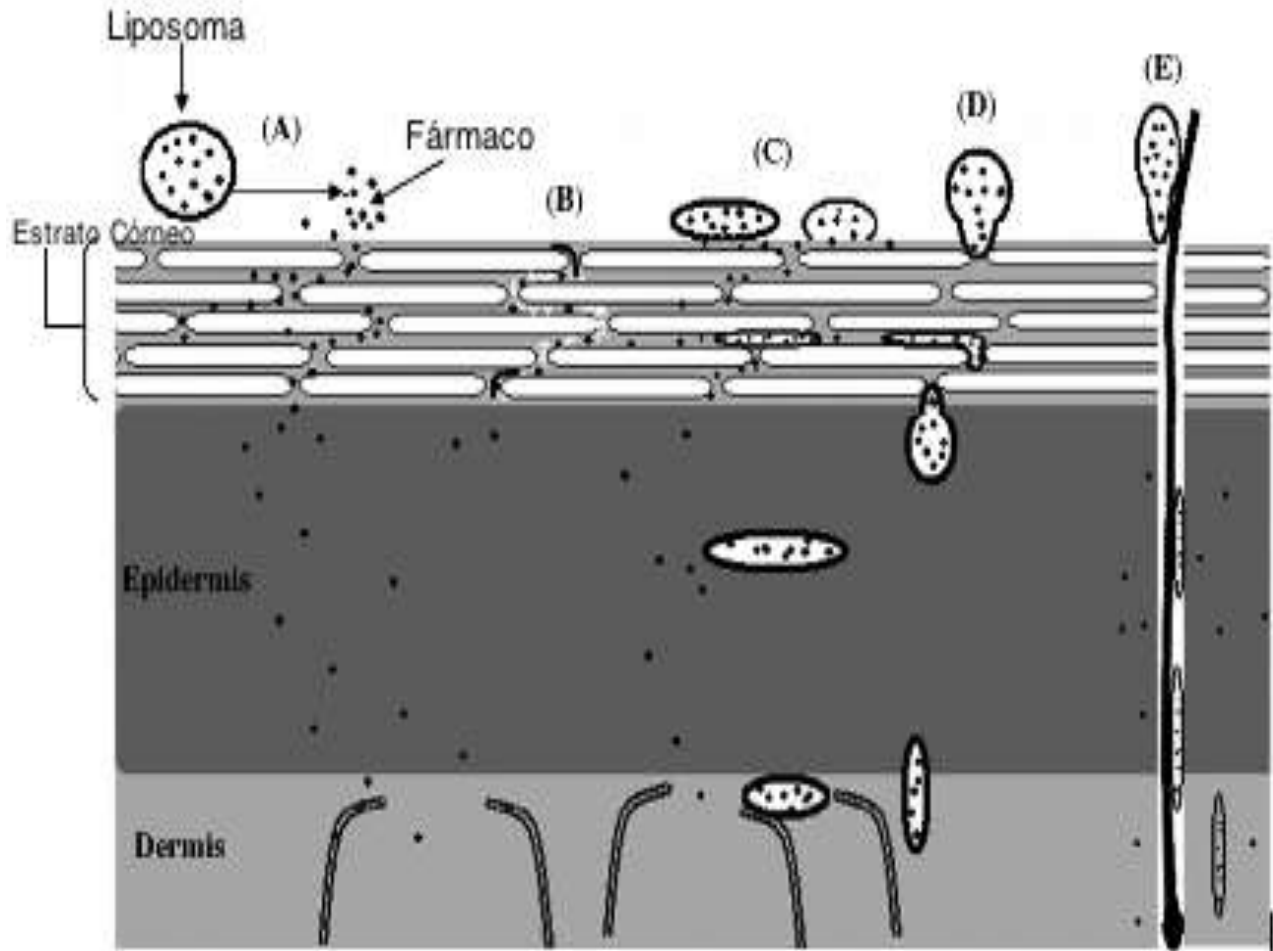


Figura 6. Posibles mecanismos de permeación de los liposomas como sistemas de suministro de fármacos a través de la piel. (A) mecanismo de fármaco libre, (B) potenciadores de la permeación por cambios de la estructura de lípidos intercelulares, (C) adsorción y / o fusión de la vesícula con el estrato córneo (SC), (D) penetración de la vesícula intacta dentro y a través de la piel intacta, (E) penetración de la vesícula intacta a través de los folículos pilosos (Maghraby et al., 2008).

Tensoactivos

Los tensoactivos (del inglés “surface-active-agents” agentes activos de superficie) son moléculas anfipáticas que debido a su estructura química poseen una región hidrofílica y otra hidrofóbica (cadena no polar), la región polar generalmente se encuentra cargada debido a la presencia de heteroátomos como Nitrógeno, Azufre, Oxígeno y Fósforo dentro de los grupos funcionales como éter, tiol, éteres, sulfatos y sulfonatos; por otro lado la región no polar está constituida por cadenas hidrocarbonadas, átomos de halógenos y átomos de oxígeno no ionizados (Salager, 2002).

Los tensoactivos se clasifican de acuerdo a la carga que presentan en solución de la siguiente manera:

Tensoactivos Iónicos

Dentro de los tensoactivos iónicos tenemos a los tensoactivos aniónicos y catiónicos. Los tensoactivos catiónicos se encuentran formados por sales cuaternarias de amonio y en algunos casos grupos halogenados, mientras que los aniónicos se ven influenciados por grupos sulfatos, sulfonatos y sulfosuccinatos principalmente (Salager, 2002).

Tensoactivos no iónicos

Generalmente se tratan de cadenas poliméricas de ésteres, copolímeros etoxilados, resinas sulfonadas, aunque otros polímeros naturales usados son: gomas xantanas, derivados de polisacáridos y celulosas modificadas (Seong-Su, 2000).

Concentración micelar crítica

Es un fenómeno fisicoquímico que presentan los tensoactivos en solución a cierta concentración (diferente para cada tensoactivo), la región hidrófoba genera una interacción menor en el medio (generalmente acuoso) formando agregados de partículas llamadas “micelas”, a este punto en la concentración se le conoce como concentración micelar crítica (CMC).

Al alcanzar la CMC la soluciones de surfactantes presentan un comportamiento no ideal, en ciertos casos se presenta la formación de geles o cristales líquidos con poca actividad surfactante. (Salager, 1993).

Propiedades químicas de los tensoactivos utilizados en este trabajo

Tween 80

La figura 7 muestra la estructura química del Tween 80.

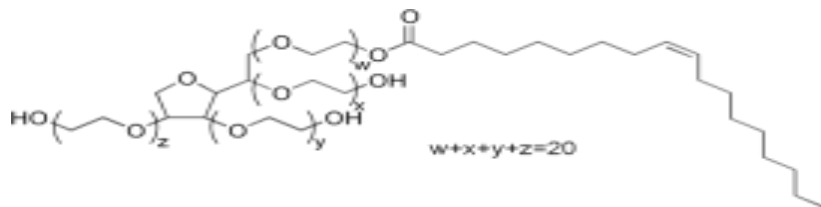


Figura 7. Estructura molecular del Tween 80

Peso molecular: 1310 g/mol.

Descripción: Líquido de consistencia oleosa, incoloro o ligeramente amarillento.

Solubilidad: Altamente soluble en agua y disolventes orgánicos.

Usos: Agente emulsificante en preparaciones farmacéuticas.

SPAN® 60

En la figura 8 se muestra la estructura química del SPAN® 60.

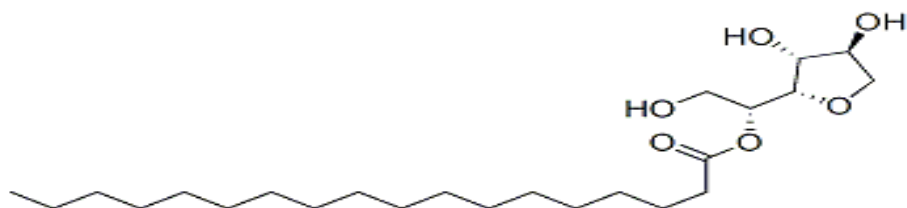


Figura 8. Estructura molecular del SPAN® 60

Peso Molecular: 430.62 g/mol

Descripción: cristales blancos de gran tamaño, consistencia oleosa, inodoros.

Solubilidad: Insoluble en agua fría, muy soluble en aceites minerales y parafinas.

Uso: Agente emulsificante.

Colato de Sodio

La Figura 9 presenta la estructura química del colato de sodio.

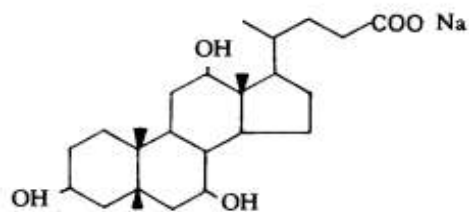


Figura 9. Estructura molecular del colato de sodio

Descripción: Polvo fino de color blanco, inodoro, derivado de ácidos biliares.

Peso molecular: 408 g/mol.

Solubilidad: Soluble en disolventes orgánicos, poco soluble en agua fría.

Uso: Agente emulsificante

PARTE EXPERIMENTAL

MATERIALES

Reactivos.

Fosfato monobásico de potasio (Fermont, Monterrey, México)

Agua destilada (Obtenida de un equipo Millipore, Corp., Bedford, MA, USA)

Hidróxido de sodio (Productos químicos Monterrey, México)

Etanol (Fermont, Monterrey, México)

Metanol (Fermont, Monterrey, México)

Cloroformo (Fermont, Monterrey, México)

Fosfatidilcolina de frijol de soya (Epikuron® 200, pureza=95%, Degussa Texturant Systems, Alemania)

Sephadex® G10 (Sigma Aldrich, USA)

TWEEN® 80 (Merck, Alemania)

SPAN® 60 (Droguería Cosmopolita, México)

Membranas de policarbonato, tamaño de poro 50 y 100 nm (Millipore, Corp., Bedford, MA, USA)

Colato de sodio (Sigma Aldrich, USA)

Diclofenaco (Globe Chemicals, S.A.)

Equipos e Instrumentos

Cristalería en general

Celdas de permeación tipo Franz modificadas con área de exposición de 1.9 cm² y volumen receptor de 11.8mL .

Rotavapor (Laborota 4000, Alemania)

Balanza Analítica BBC32 (Boeco:Germany)

Potenciómetro (pHmeter 340 Corning, USA)

Microcentrífuga (Hettich EBA 12, Alemania)

Espectrofotómetro UV-Vis (Varian, Modelo Cary IE 95031003, Australia)

Baño de agua (Polyscience, USA)

Agitador multiplaza (VELP Scientifica Multistirrer 15, USA)

Zetasizer® (Malvern system, ZAN 3600, USA)

Dermatoma “Zimmer® Electric Dermatome” (REF 44622 Zimmer Orthopaedic surgical products Dover, Ohio)

Vortex (M 16715, Mixer USA)

Recirculador de líquidos con termostato (VWR, Scientific, USA)

Material Biológico

Piel abdominal humana, obtenida por lipectomía (Donación de Medilaser, Av. Paseo de la Reforma No. 35, Piso 4, Colonia Tabacalera, Delegación Cuauhtémoc, México D.F.), Conservada a -20°C.

MÉTODOS

ESPECTRO DE ABSORCIÓN

Se determinó la longitud de onda máxima de absorción para el diclofenaco en solución amortiguadora de fosfatos pH= 6.5, en solución amortiguadora de fosfatos pH= 6.5 en contacto con piel 24h, y en etanol en contacto con piel durante 24 h.

PREPARACIÓN DE CURVAS DE CALIBRACIÓN PARA DETERMINAR LA EFICIENCIA DE ENCAPSULAMIENTO DEL DICLOFENACO EN LOS LIPOSOMAS

Los parámetros determinados se llevaron a cabo bajo los protocolos de validación (Guía de Q.F.B, 2006), realizándose curvas de calibración de diclofenaco en una solución amortiguadora de fosfatos pH= 6.5.

LINEALIDAD

Se prepararon seis puntos a diferentes concentraciones de diclofenaco en solución amortiguadora de fosfatos pH=6.5 en un rango de 5.1- 51 µg/mL, cada punto se hizo por triplicado. A los resultados se les efectuó un análisis de regresión lineal calculando la ordenada al origen, la pendiente, el coeficiente de determinación ($r^2 \geq 0.98$), y el coeficiente de variación (C.V. ≤ 3 %).

LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN EXPERIMENTAL

Se evaluó mediante el análisis de soluciones diluidas de diclofenaco. La menor concentración en la que el valor promedio de su determinación analítica estuviese en el ± 20 % de su valor nominal y con un coeficiente de variación igual o menor a 3 %.

REPRODUCIBILIDAD

Se preparó una curva de calibración en un rango de 5.1- 51 µg/mL, cada punto se hizo por triplicado, se calculó el valor del coeficiente de variación porcentual (C.V.), el cual no deberá exceder el 3 %, este dato se comparó con el dato de la curva realizada inicialmente.

PREPARACIÓN DE CURVAS DE CALIBRACIÓN PARA CUANTIFICAR DICLOFENACO EN UN MEDIO BIOLÓGICO (SOLUCIÓN AMORTIGUADORA DE FOSFATOS pH=6.5 EN CONTACTO CON PIEL ABDOMINAL HUMANA)

Se preparó curvas de calibración para cuantificar la cantidad de diclofenaco capaz de permear a la solución receptora (solución amortiguadora de fosfatos pH=6.5) durante la prueba de permeación. Para ello se preparó una solución amortiguadora de fosfatos pH=6.5 y se puso en contacto con piel abdominal humana manteniendo las mismas condiciones a las que se realizaron los estudios de permeación. Se retiró el exceso de grasa subcutánea a la piel abdominal, y la parte interna del tejido se puso en contacto con la solución amortiguadora de fosfatos pH= 6.5 en un recipiente parecido al de la celda de Franz, agitando durante 24 h. Posteriormente, se filtró el fluido por una membrana Millipore (0.45 μm) y con dicho fluido se realizaron curvas de calibración en un rango de 5-50 $\mu\text{g/mL}$. Las soluciones fueron analizadas espectrofotométricamente a una longitud de onda de 275 nm, utilizando como blanco la solución amortiguadora que estuvo en contacto con piel abdominal humana durante 24 h. Se evaluaron los siguientes parámetros: linealidad, y límite de cuantificación, según marca "Guidance for Industry, Bioanalytical Method Validation" (Food and Drug Administration, 2001).

LINEALIDAD

Se prepararon seis puntos a diferentes concentraciones de diclofenaco en un rango de 5.1- 51 $\mu\text{g/mL}$ utilizando como medio solución amortiguadora de fosfatos pH=6.5 en contacto con piel abdominal humana durante 24 h, cada punto se hizo por triplicado. A los resultados se les efectuó un análisis de regresión lineal calculando la ordenada al origen, la pendiente, el coeficiente de determinación ($r^2 \geq 0.98$). Además se calculó el valor del coeficiente de variación (CV), el cual no debe exceder el 15 %. El análisis se realizó por triplicado.

REPRODUCIBILIDAD

Se preparó una curva de calibración de diclofenaco en un rango de concentraciones de 5.1- 51 $\mu\text{g/mL}$, cada punto se hizo por triplicado, se calculó el valor del coeficiente de variación porcentual (CV), el cual no debe exceder el 15 %, este dato se comparó con el dato de la curva realizada inicialmente.

SELECTIVIDAD

Se prepararon dos soluciones de diclofenaco con concentración de 5.1 $\mu\text{g/mL}$, una de ellas en solución amortiguadora de fosfatos $\text{pH}=6.5$, la cual se había mantenido durante 24 h en contacto con piel abdominal humana; y la otra, en solución amortiguadora de fosfatos $\text{pH}=6.5$. A ambas soluciones se les realizó un barrido en el rango 200 a 400 nm.

DETERMINACIÓN DEL TIEMPO DE EXTRACCIÓN DEL DICLOFENACO DE LA PIEL

Se realizó una prueba para determinar el tiempo de extracción óptimo, en la cual se añadió una solución de diclofenaco de concentración conocida sobre piel abdominal humana, esperando a que se evaporará el disolvente, posteriormente la piel se cortó en pedazos pequeños y se colocó en un vial con 5 mL de etanol, se dejó en agitación durante 24 y 48 h con la finalidad de determinar el tiempo ideal de agitación para la extracción del fármaco retenido en la piel.

CUANTIFICACIÓN DE DICLOFENACO EXTRAÍDO DE LA PIEL

Al final de las pruebas de permeación se recuperó la piel, se eliminó el exceso de formulación, se cortó en pedazos pequeños, se colocaron en un vial con 10 mL de etanol y se extrajo el diclofenaco dejando la piel en etanol agitando durante 48 h. Posteriormente la solución obtenida se filtró y se leyó en el espectrofotómetro a 282 nm. Para la cuantificación se preparó una solución de etanol en contacto con piel abdominal humana durante 48 h, con la cual se preparó un estándar de 10.32 $\mu\text{g/mL}$.

DETERMINACIÓN DE LA SOLUBILIDAD DEL DICLOFENACO

Para la determinación de la solubilidad del diclofenaco se saturaron 3 mL de solución amortiguadora de fosfatos pH=6.5, dejando en agitación constante durante 24 h, posteriormente se centrifugó la solución a 3500 rpm durante 5 minutos, se tomó una muestra del sobrenadante, la cual se llevó a un volumen de 50 mL y se determinó su concentración empleando la curva de calibración de diclofenaco en solución amortiguadora de fosfatos pH=6.5, realizándose por triplicado.

Se realizó lo mismo pero con etanol como disolvente para determinar su solubilidad y emplearlo como disolvente en el procedimiento de extracción.

MÉTODO GENERAL DE PREPARACIÓN DE LIPOSOMAS FLEXIBLES

Los liposomas flexibles se prepararon de acuerdo al método de evaporación de fase inversa (Gamboa, 2005). Se pesaron 430 mg de fosfatidilcolina y se disolvieron en 10 mL de etanol, se adicionaron 20 mg de diclofenaco y 70 mg del tensoactivo (TWEEN® 80, SPAN® 60 o Colato de sodio). Se formó una solución en un matraz bola y se evaporó en rotavapor a presión reducida y 30 rpm, formándose una película en la cara interna del matraz bola, los residuos del disolvente se eliminaron dejando el matraz expuesto al medio ambiente toda la noche. La película se hidrató con 15 mL de solución amortiguadora de fosfatos pH= 6.5 con etanol al 7%, formando la dispersión con ayuda del vórtex durante 15 min. Posteriormente los liposomas se dejaron 2 h en reposo para que hincharan. Una vez pasadas las 2 h, la dispersión se filtró tres veces a través de una membrana de policarbonato con un tamaño de poro de 100 nm.

Este método se empleó para preparar:

- Liposomas flexibles cargados con diclofenaco. (empleando el tensoactivo correspondiente: TWEEN® 80, SPAN® 60, colato de sodio).
- Liposomas flexibles placebos (empleando el tensoactivo correspondiente, TWEEN® 80, SPAN® 60, Colato de Sodio).
- Liposomas convencionales cargados con diclofenaco (sin tensoactivo).
- Liposomas convencionales placebos (sin tensoactivo y sin diclofenaco).

En cualquier caso se respetaron las cantidades de los demás componentes.

CARACTERIZACIÓN DE LIPOSOMAS OBTENIDOS

Determinación del tamaño promedio de los liposomas

La distribución de tamaño de la suspensión de liposomas se determinó empleando un Zetasizer (Malvern system, ZAN 3600, USA) con Angulo de 90° a 25°C, después de haberlos pasado través de una membrana de 0.1 µm (Isopore®, Millipore, Bedford, MA, USA), diluyendo la muestra con agua destilada. Cada medición se realizó por triplicado.

Potencial Z

Se determinó el potencial Z con ayuda de un Zetasizer® (Malvern system, ZAN 3600, USA), considerando la viscosidad y la constante dieléctrica del agua, 150V de corriente eléctrica, a una temperatura de 25°C y utilizando una celda de capilar doblado, el medio de dispersión fue agua destilada.

Eficiencia de encapsulamiento

Para determinar la tasa de encapsulamiento se utilizaron columnas de Sephadex®-G10 para retener el diclofenaco libre en la dispersión obtenida de liposomas. La dispersión liposomal se hizo pasar a través de las columnas de Sephadex mediante centrifugación. Esta técnica se optimizó haciendo pruebas para determinar la velocidad y el tiempo de centrifugación, así como el volumen necesario para que el fármaco libre quedara retenido y se eluyeran solamente los liposomas cargados con el diclofenaco. La optimización se realizó haciendo pasar una solución del fármaco con una concentración de 1 mg/mL de fármaco. Cada prueba se analizó por espectrofotometría UV a 265 nm para verificar que no presentara la señal característica del diclofenaco, lo cual indicaría que el fármaco estaba siendo eluido, cuando lo que se buscaba es que quedara retenido en la columna.

Elasticidad

Las dispersiones de liposomas se hicieron pasar por un filtro de tamaño de poro de 50 nm (menor al tamaño de los liposomas flexibles recién elaborados) y se diluyó con agua destilada, determinando el tamaño de las vesículas, en un equipo Zetasizer® (Malvern system, ZAN 3600, USA), por triplicado.

Determinación de concentración de diclofenaco en las suspensiones liposomales (Fármaco libre y fármaco encapsulado)

Se tomaron muestras de las suspensiones de liposomas, se le añadieron 3 mL de etanol para disolver los liposomas, se llevaron a un volumen de 25 mL con solución amortiguadora de fosfatos pH=6.5. Se determinó su concentración empleando la curva de calibración de diclofenaco en solución amortiguadora de fosfatos pH= 6.5.

ESTUDIO DE LA CINÉTICA DE PERMEACIÓN *IN VITRO* DE DICLOFENACO A TRAVÉS DE PIEL ABDOMINAL HUMANA

El procedimiento que se siguió para llevar a cabo las permeaciones fue el siguiente:

1. Se utilizó piel abdominal humana a la cual se le quitó el tejido graso con ayuda de un escalpelo. Se cortaron porciones de piel con un grosor de 0.1 mm de la parte externa de la piel utilizando el equipo Dermatoma (Zimmer® Electric Dermatome), la piel obtenida era utilizada el mismo día.
2. Posteriormente la piel abdominal humana se montó en celdas verticales tipo Franz (*Figura. 10*). Se realizaron permeaciones para la solución de diclofenaco en solución amortiguadora de fosfatos pH 6.5 y para la suspensión de liposomas, ambas con un contenido aproximado de 1 mg/mL de diclofenaco.



Figura 10. Celdas verticales tipo Franz empleadas en los estudios de permeación.

Para el estudio, el compartimiento receptor consistió en una solución amortiguadora de fosfatos pH 6.5, la cual se mantuvo a 37°C con agitación constante. Durante la permeación se tomaron muestras de 1 mL a los siguientes tiempos: 1, 2, 3, 4, 5, 6, y 7 horas, reponiendo el volumen con medio de disolución fresco. Las muestras tomadas a cada tiempo, se analizaron en el espectrofotómetro a 280 nm, utilizando como blanco solución amortiguadora de fosfatos pH 6.5 que estuvo en contacto con piel y su respectivo placebo, bajo las mismas condiciones que durante la permeación.

Se realizaron 4 pruebas de permeación, una para cada formulación de liposomas (ya sean con Tween 80, SPAN 60, Colato de sodio o liposomas sin tensoactivo). Para cada prueba de permeación se montaron 5 celdas con la formulación correspondiente y 1 celda con su placebo respectivo para ser usada como blanco durante las lecturas de permeación y extracción.

MÉTODO DE EXTRACCIÓN DE DICLOFENACO RETENIDO EN LA PIEL

Una vez terminada la prueba de permeación se retiró la piel de cada una de las celdas, eliminando el exceso de diclofenaco de la superficie con agua destilada. La piel fue cortada en finas porciones, las cuales se colocaron en viales, agregando 5 mL etanol, cada uno de los sistemas se mantuvo en agitación constante durante 48 h, y a temperatura ambiente. Posteriormente se filtraron las soluciones (Millipore® 0.45 µm) y se analizaron en el espectrofotómetro a 282 nm.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

DETERMINACIÓN DE LA SOLUBILIDAD DEL DICLOFENACO

Con la finalidad de saber si no se saturaría el medio receptor con el diclofenaco durante las permeaciones y mantener condiciones sink se determinó la solubilidad del diclofenaco en solución amortiguadora de fosfatos pH=6.5, encontrándose que tiene una solubilidad de 1.24 mg/mL. Ver Anexo IX.

DETERMINACIÓN DE LA LONGITUD DE ONDA DE MÁXIMA ABSORCIÓN

En la figura 11 se muestra el espectro de absorción del diclofenaco en solución amortiguadora de fosfatos pH=6.5 y en la figura 12 de diclofenaco en solución amortiguadora de fosfatos pH=6.5 en contacto con piel abdominal humana. En estas figuras se observa un máximo de absorción a 280 y 275 nm, respectivamente.

Por otro lado, para las pruebas de extracción se determinó que el diclofenaco en etanol tiene un máximo de absorción a 282 nm (figura 13).

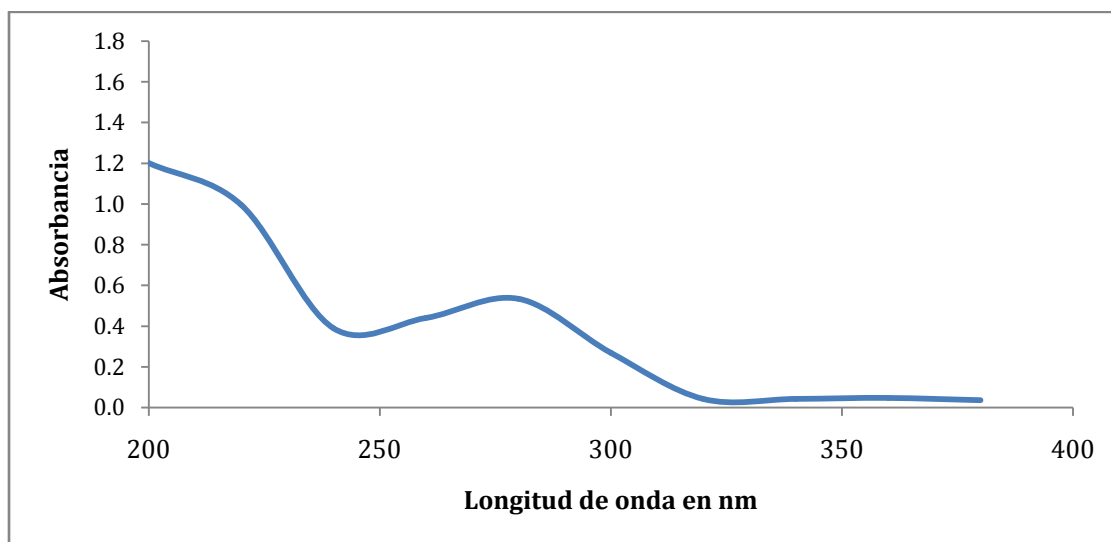


Figura 11. Espectro de absorción de diclofenaco en solución amortiguadora de fosfatos pH= 6.5.

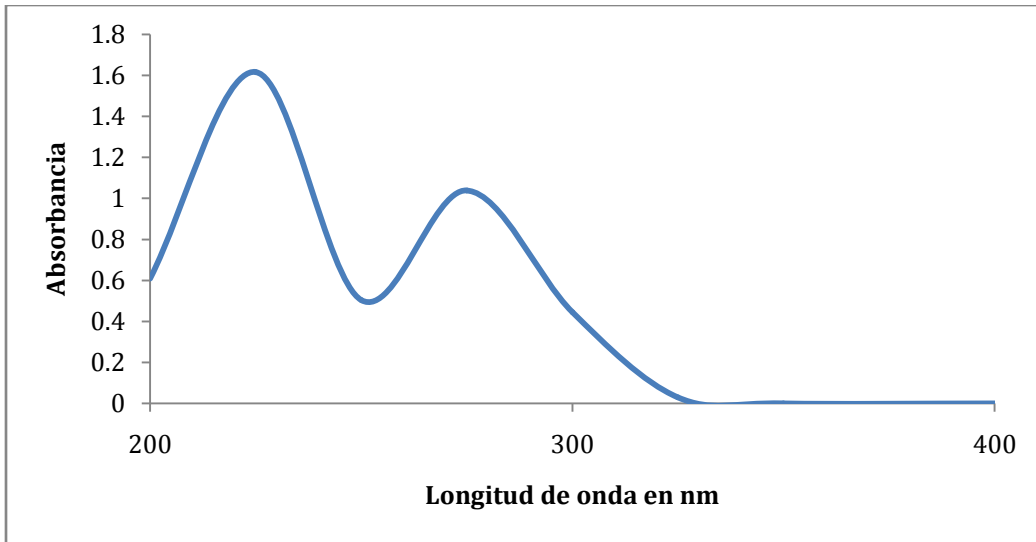


Figura 12. Espectro de absorción del diclofenaco en solución amortiguadora de fosfatos pH= 6.5 en contacto con piel humana durante 24 h.

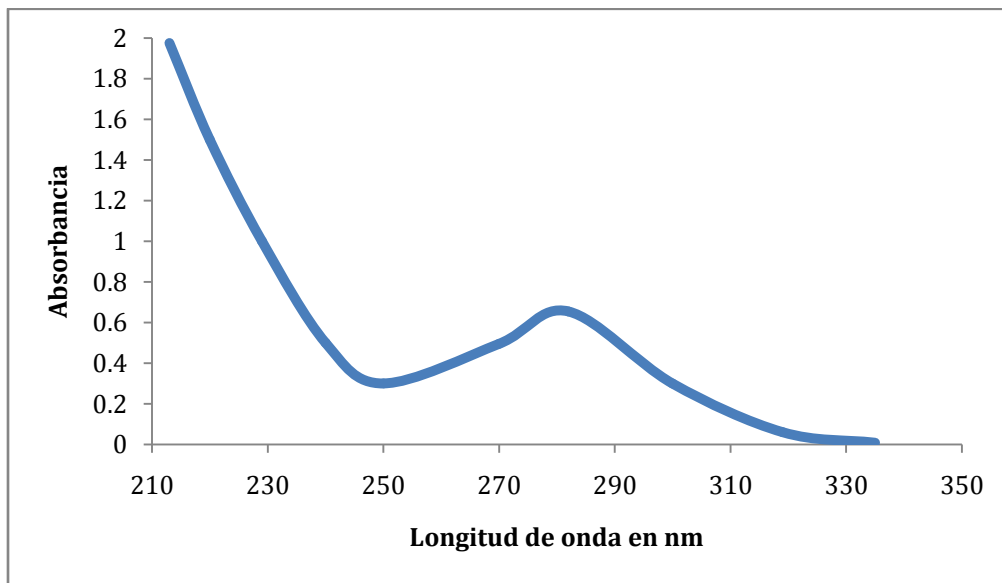


Figura 13. Espectro de absorción del diclofenaco en etanol en contacto con piel humana durante 48 h.

CURVA DE CALIBRACIÓN DE DICLOFENACO EN DIFERENTES MEDIOS

El objetivo principal de las curvas de calibración empleadas es asegurar su fiabilidad y la confianza de los datos obtenidos. Los parámetros que se evaluaron para la cuantificación del diclofenaco fueron: linealidad, límite de cuantificación experimental y reproducibilidad.

CURVA DE CALIBRACIÓN PARA CUANTIFICAR LA EFICIENCIA DE ENCAPSULAMIENTO DEL DICLOFENACO

La técnica empleada para determinar la eficiencia de encapsulación fue mediante la interpolación de la lectura de absorbancia en la curva de calibración de diclofenaco en solución amortiguadora de fosfatos pH=6.5, de la solución obtenida después de pasar la suspensión liposomal por la columna de Sephadex, los liposomas eluidos se disolvieron con etanol y se diluyeron a un volumen de 25 mL con solución amortiguadora de fosfatos pH=6.5.

Se observa que la curva es lineal con un valor de coeficiente de determinación mayor a 0.98 (Figura 14 y tabla 4). Los valores de coeficiente de variación son menores al 2.5%. En cuanto al límite de cuantificación experimental se obtuvo de 0.5 µg/mL ya que no modificó el porcentaje de coeficiente de variación más allá del 2.5%. Datos condensados en la tabla 4.

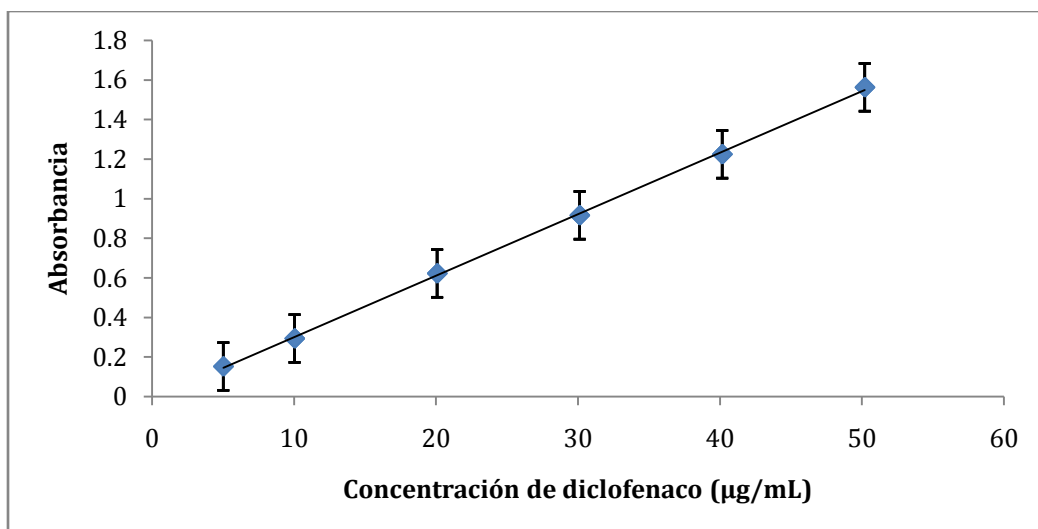


Figura 14. Curva de calibración de diclofenaco en solución amortiguadora de fosfatos pH=6.5

Tabla 4. Resultados de la curva de calibración para cuantificar diclofenaco encapsulado

Linealidad		Límite de cuantificación experimental	Reproducibilidad (%Coeficiente de variación)
$r^2=0.99958$	%C.V.:2.01	0.5 µg/mL	1.76

CURVA DE CALIBRACIÓN PARA CUANTIFICAR DICLOFENACO EN UN MEDIO BIOLÓGICO (SOLUCIÓN AMORTIGUADORA DE FOSFATOS pH=6.5 EN CONTACTO CON PIEL ABDOMINAL HUMANA POR 24 h)

La cuantificación de diclofenaco en la solución receptora durante los estudios de permeación se realizó por espectrofotometría UV, mediante la interpolación de las lecturas obtenidas en cada muestreo en una curva de calibración, a la cual se le determinaron los parámetros de linealidad y reproducibilidad.

Se obtuvo que la curva es lineal (figura 15) con un valor de $r^2= 0.99934$ y al haber obtenido un coeficiente de variación menor al 15% como se indica en “Bioanalytical Method Validation Guidance for Industry” (F.D.A., 2001) el método cumple con el parámetro de linealidad, en la repetición de la curva el método es repetible ya que su porcentaje de coeficiente de variación es menor del 15%. Datos condensados en la tabla 5.

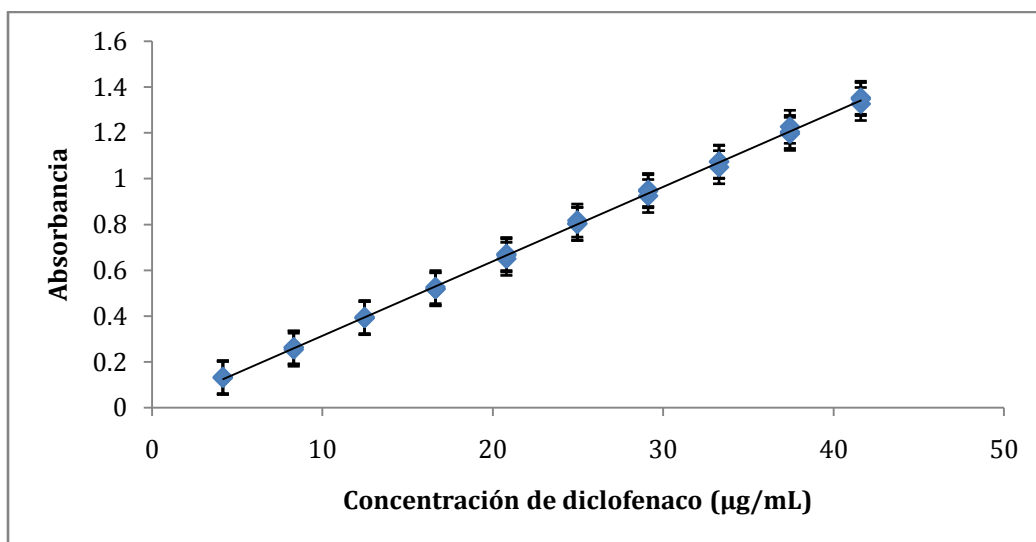


Figura 15. Curva de calibración de diclofenaco en solución amortiguadora de fosfatos pH=6.5 en contacto con piel humana, empleada para cuantificar el diclofenaco en el medio receptor durante los estudios de permeación.

Tabla 5. Resultados de la curva de calibración para cuantificar diclofenaco en el medio receptor durante los estudios de permeación.

Linealidad		Reproducibilidad (Coeficiente de variación)
$r^2=0.99934$	% C.V.: 1.73	4.11 %

SELECTIVIDAD

Se compararon los barridos de las soluciones (i.e., diclofenaco en solución amortiguadora de fosfatos pH 6.5 y solución amortiguadora de fosfatos pH 6.5 en contacto con piel), encontrándose que la longitud de onda de máxima absorción no se desplaza y ambos espectros presentan el mismo perfil por lo que el método se considera selectivo en base a las consideraciones de la “Guidance for Industry. Bioanalytical Method Validation, Food and Drug Administration, United States of America 2001” (ver anexo X).

CARACTERIZACIÓN DE LIPOSOMAS FLEXIBLES CARGADOS, LIPOSOMAS CONVENCIONALES Y SUS PLACEBOS CORRESPONDIENTES.

Tamaño

Se observó (ver figura 16 y tabla 6) que los liposomas con tensoactivo (es decir los liposomas flexibles) tienen un tamaño hasta un 85% menor que los liposomas sin tensoactivo, dentro de estos los que tienen un tamaño más pequeño son aquellos que tienen en su formulación Colato de sodio.

En comparación con los placebos se observa que el fármaco (en este caso el diclofenaco) tiene un impacto en el tamaño final de estos ya que contribuye a disminuir el tamaño final de los liposomas ya sea con o sin tensoactivo.

Tabla 6. Tamaño promedio de los liposomas (n=9). (c/d: Con diclofenaco, s/d: sin diclofenaco)

Muestra	Media (nm)	Desviación Estándar (nm)	Índice de Polidispersión
Liposomas convencionales s/d	225.13	0.13	0.22
Liposomas convencionales c/d	146.01	0.03	0.10
Liposomas elásticos SPAN® 60 s/d	163.46	0.03	0.17
Liposomas elásticos SPAN® 60 c/d	147.29	0.01	0.35
Liposomas elásticos TWEEN® 80 s/d	163.93	0.06	0.15
Liposomas elásticos TWEEN® 80 c/d	144.64	0.05	0.16
Liposomas elásticos Colato s/d	119.60	0.02	0.12
Liposomas elásticos Colato c/d	133.06	0.02	0.14

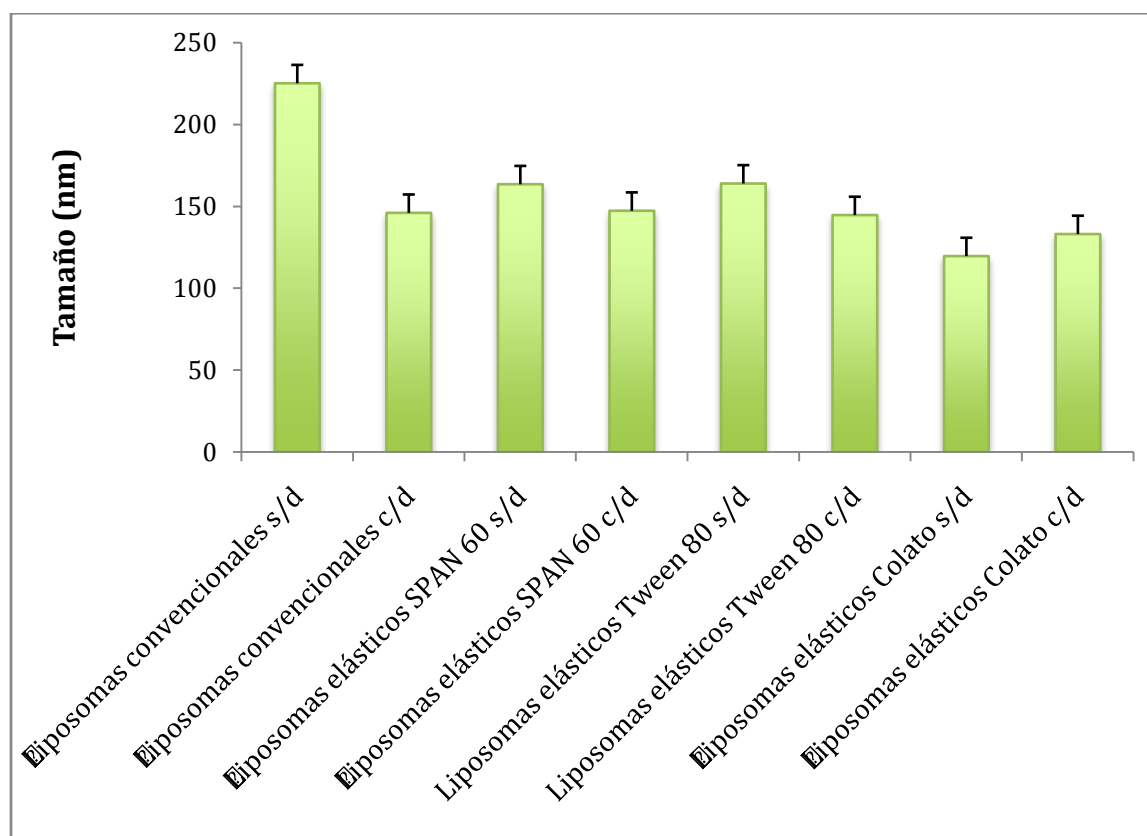


Figura 16. Gráfico de barras indicando el tamaño promedio de los liposomas

A su vez se realizó un estudio de Dispersión de datos, Análisis de varianza (ver Anexos tabla 26 y 27) e intervalos de Tukey al 95% los cuales arrojaron los siguientes resultados (ver figura 17 y 18):

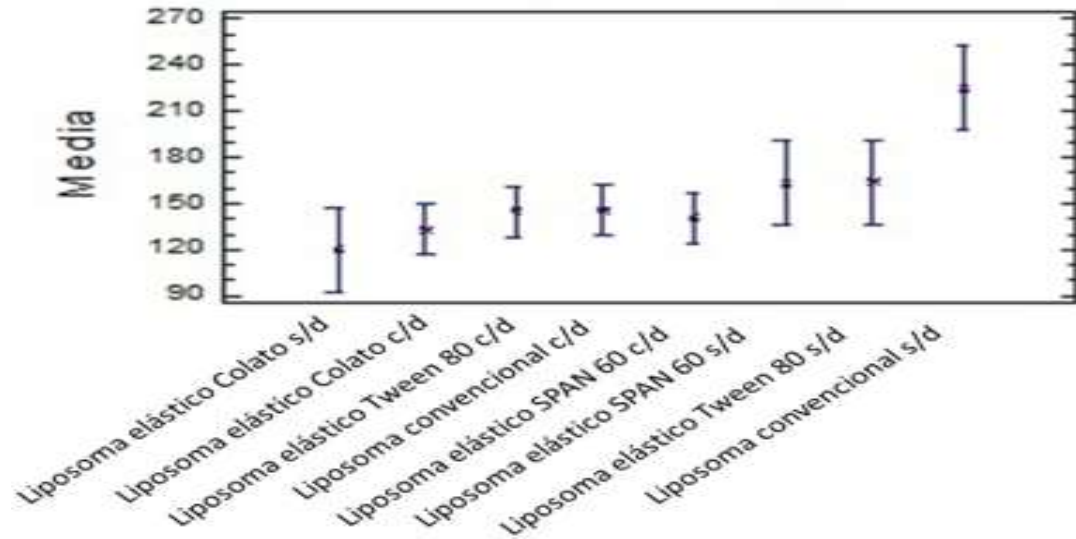


Figura. 17 Intervalos de Tukey para el tamaño de los liposomas

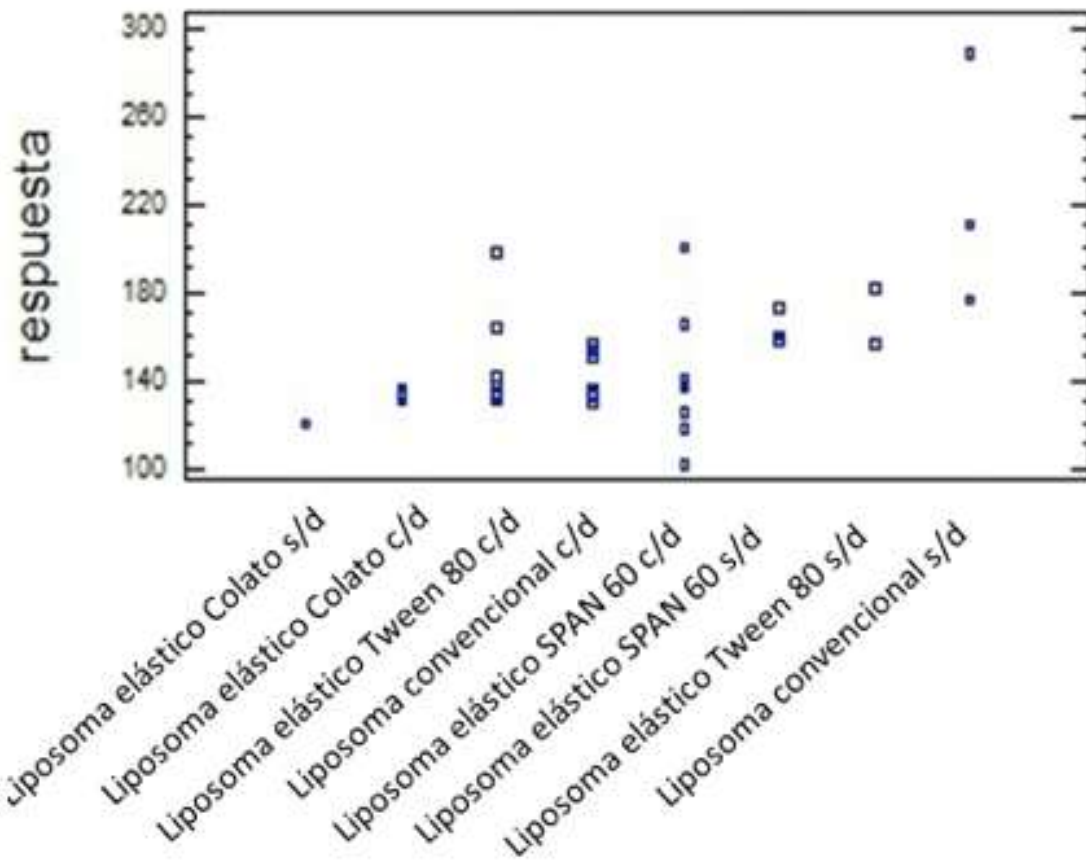


Figura. 18 Gráfico de dispersión de datos para el tamaño de los liposomas

En la figura 17 se corrobora estadísticamente que los liposomas que contienen diclofenaco no presentan diferencias significativas de tamaño entre ellos, pero el lote que no tiene diclofenaco ni tensoactivo (TWEEN® 80, SPAN® 60 o Colato de Sodio) presentan diferencia significativa comparándose con cualquier otro lote, de manera que el fármaco y el tensoactivo si tienen impacto en el tamaño de los liposomas. A su vez en la figura 18 se puede observar que este mismo lote presenta mayor dispersión teniendo tamaños que pueden ir desde 180 hasta 295 nm.

La uniformidad del tamaño de los liposomas con diclofenaco basada en el Índice de Polidispersión (IPD) muestra la siguiente tendencia (figura 19):

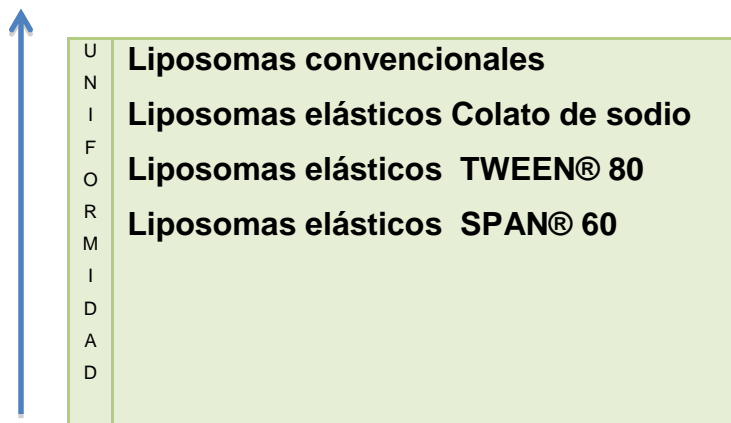


Figura 19. Uniformidad del tamaño de los liposomas con diclofenaco

Por otro lado entre los placebos de liposomas elásticos y liposomas sin tensoactivo se muestra la siguiente tendencia (figura 20):

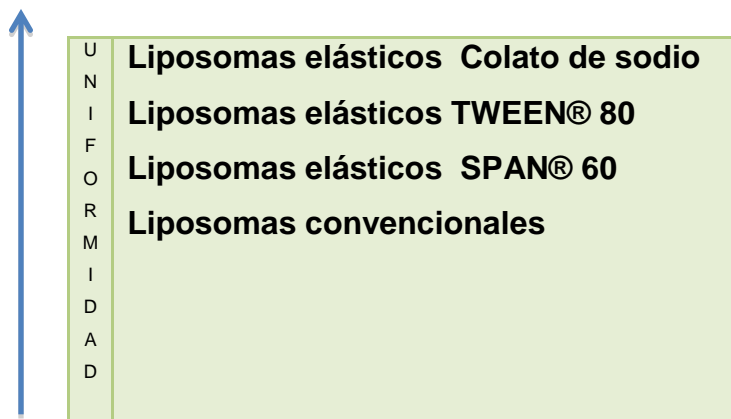


Figura 20. Uniformidad del tamaño de los liposomas sin diclofenaco

Se observa que el efecto del tensoactivo es muy marcado en la uniformidad de tamaño pero también nos arroja un resultado interesante al comparar los lotes de liposomas sin tensoactivo con diclofenaco y su respectivo placebo (marcado en la figura. 20 como Liposoma s/s s/f) reduciendo drásticamente su dispersión al incorporar al diclofenaco en su formulación, es decir, el fármaco contribuye a incrementar la uniformidad de tamaño.

Potencial Z

El potencial Z se define como la diferencia de carga (generalmente expresada en mV) entre dos partículas presentes en una dispersión (ver figura 21), en la formulación de liposomas es de suma importancia conocer este dato ya que está relacionada con la capacidad que tienen de mantenerse en suspensión evitando su coalescencia en función del tiempo.

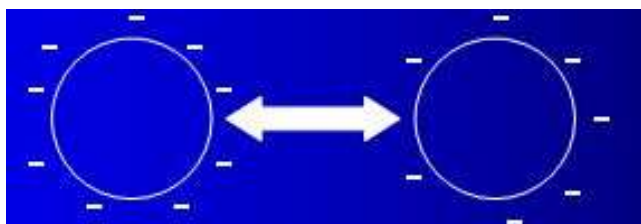


Figura 21. Representación del Potencial Z

Tras analizar los datos se observa en las (figuras 22 y 23 y en la tabla 7, que el potencial Z de los liposomas a un pH de 6.5 depende de los tensoactivos y de la presencia del fármaco.

Tabla 7. Potencial Z de liposomas (s/d: sin diclofenaco, c/d: con diclofenaco)

Muestra	Media (mV)	Desviación estándar
Liposoma convencionales s/d	-7.96	0.48
Liposomas convencionales c/d	-17.8	5.77
Liposomas elásticos SPAN® 60 s/d	-17.50	2.25
Liposomas elásticos SPAN® 60 c/d	-23.34	3.53
Liposomas elásticos TWEEN® 80 s/d	-14.13	5.71
Liposomas elásticos TWEEN® 80 c/d	-14.81	2.95
Liposomas elásticos Colato s/d	-12.61	5.84
Liposomas elásticos Colato c/d	-16.86	3.26

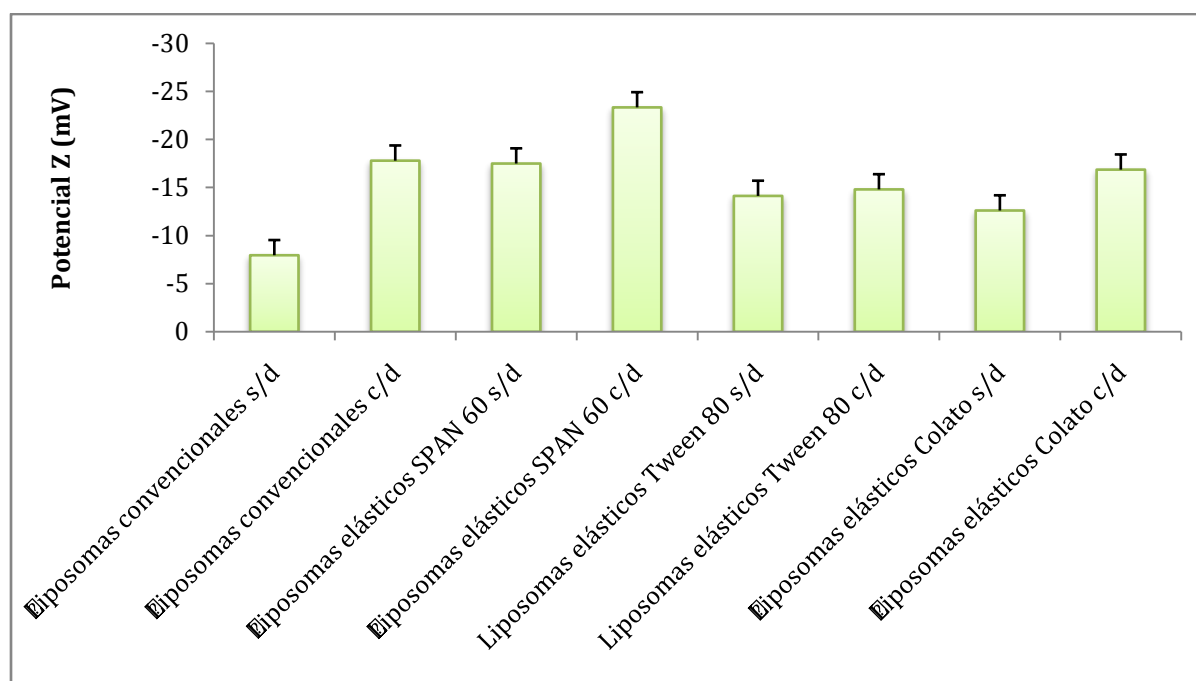


Figura 22. Gráfico comparativo de Potencial Z de Liposomas en mili volts (mV), c/d: con diclofenaco, s/d: sin diclofenaco.

Al realizar el análisis de varianza (ver Anexo tabla 28 y 29) con intervalos de Tukey (figura 23), se observa que el potencial Z de los liposomas en suspensión solo muestra diferencia significativa entre los liposomas elásticos de SPAN 60 con los liposomas elásticos de Tween 80, pero al comparar los lotes cargados con sus placebos correspondientes se observa que la carga de repulsión la aporta en su mayor parte el diclofenaco, ya que al pH impuesto de 6.5 se encuentra en su forma ionizada como se muestra en la figura 25.

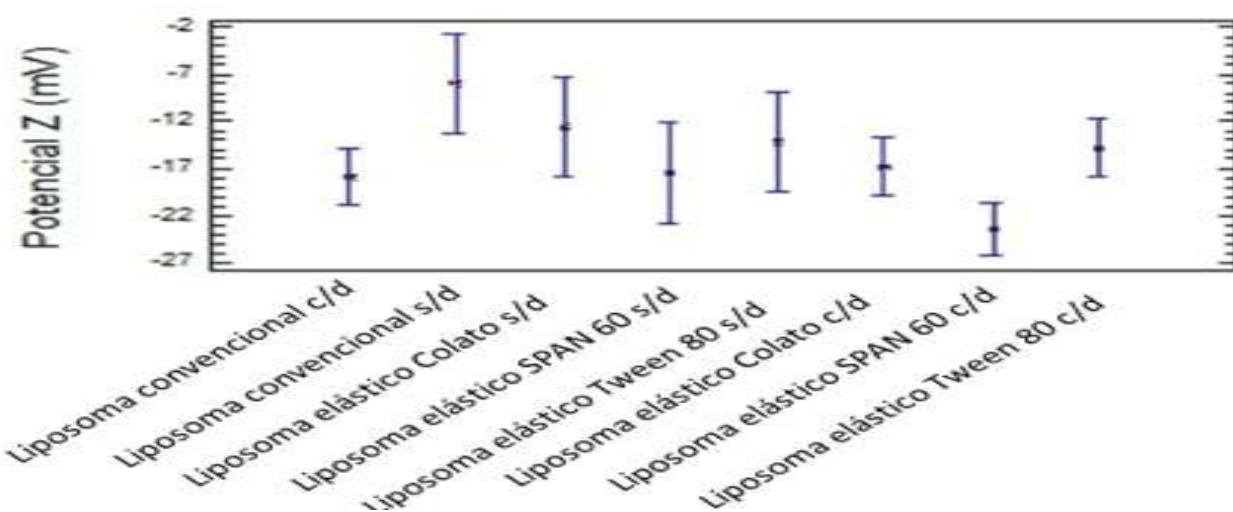


Figura 23. Intervalos de confianza de Tukey del tamaño de los liposomas

Elasticidad

La prueba de elasticidad se realizó al hacer pasar los liposomas por una membrana de policarbonato con un tamaño de poro menor (50 nm) al de su tamaño original (> 100 nm).

Tabla 8. Tamaño inicial y final obtenidos en la prueba de elasticidad (s/d: sin diclofenaco, c/d: con diclofenaco), *t crítico de 4.30

Formulación de Liposomas	Tamaño (nm)		Índice de Polidispersión		% conservación de tamaño	% pérdida tamaño	Valor de "t" estadístico*
	T. inicial	T. final	T. Inicial	T. Final			
Liposomas convencionales s/d	225 ± 0.13	128 ± 0.11	0.22	0.15	57.01	42.99	2.97
Liposomas elásticos SPAN® 60 s/d	163.46 ± 0.03	144.5 ± 3	0.17	0.02	88.4	11.6	4.37
Liposomas elásticos TWEEN® 80 s/d	163.93 ± 0.06	125.56 ± 1.36	0.15	0.21	76.59	23.41	7.84
Liposomas elásticos Colato s/d	119.6 ± 0.02	78.6 ± 17.7	0.12	0.22	65.71	34.29	1.51
Liposomas elásticos TWEEN® 80 c/d	142.46 ± 0.05	79.3 ± 3.9	0.16	0.59	55.66	44.34	14.48
Liposomas elásticos Colato c/d	133.33 ± 0.02	94 ± 4.87	0.14	0.47	70.5	29.5	5.72
Liposomas elásticos SPAN 60 c/d	125.66 ± 0.18	125.1 ± 0.79	0.35	0.29	99.55	0.45	4.18
Liposomas convencionales c/d	151 ± 0.03	115.76 ± 9.64	0.1	0.38	76.74	23.26	4.72

En base a los datos obtenidos (ver tabla 8 y figura 18) se encontró que los liposomas placebos presentan mayor elasticidad en el siguiente orden: SPAN 60 > Tween 80 > Colato de sodio > sin fármaco. Mientras que los liposomas cargados con fármaco en general presentan una mayor conservación del tamaño con respecto a los liposomas que no contienen diclofenaco, lo que infiere que posiblemente el diclofenaco tenga una actividad parecida al de un tensoactivo, la formulación ideal para los liposomas de diclofenaco fue en la que se incluyó SPAN 60 como tensoactivo ya que conservo un 99.54% de su tamaño tras pasarlos por una membrana de 50 nm de tamaño de poro. En la figura 24 se muestra la comparación del tamaño en un gráfico de barras antes y después de la prueba de elasticidad.

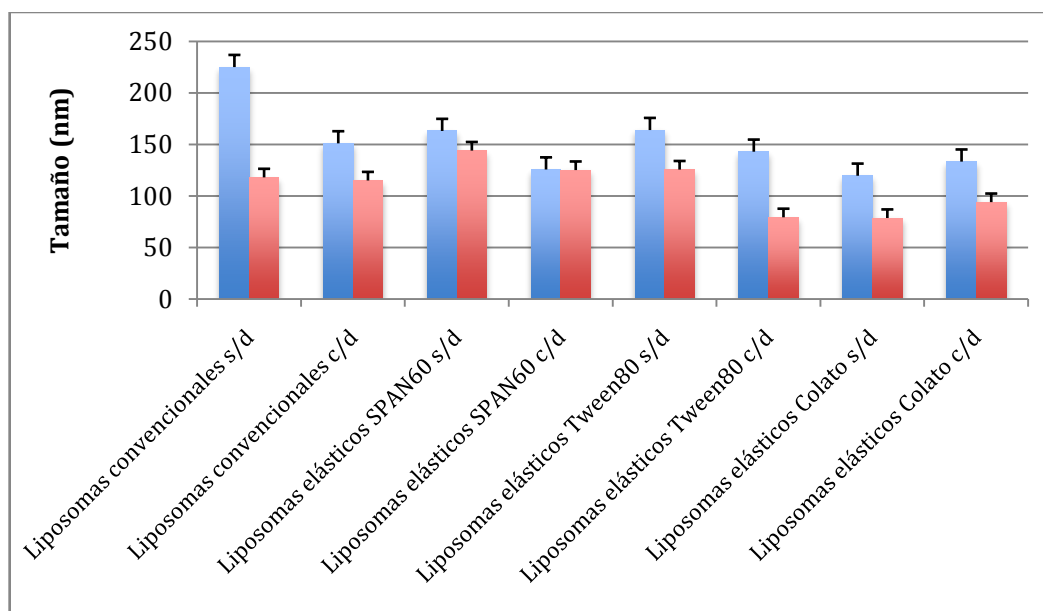


Figura 24. Comparación de tamaño inicial (azul) y final (rojo) en la prueba de elasticidad

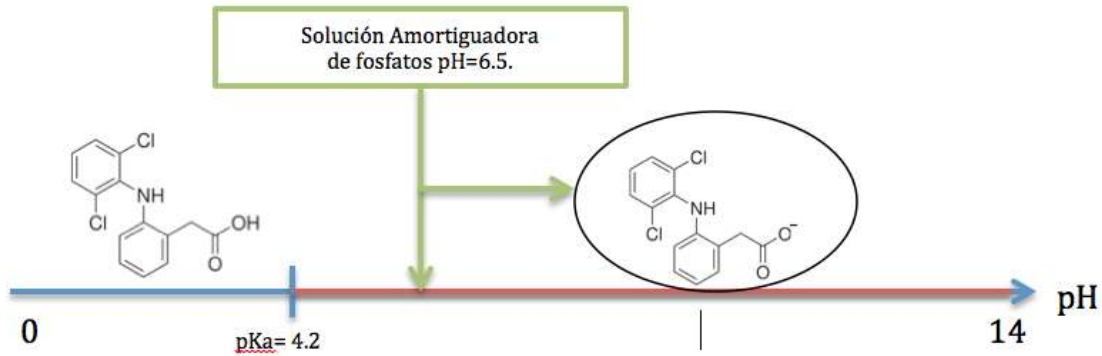


Figura 25. Ionización del diclofenaco al pH utilizado con solución amortiguadora de fosfatos pH=6.5.

DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE DICLOFENACO EN LAS SUSPENSIONES LIPOSOMALES (FARMACO LIBRE Y ENCAPSULADO)

Durante el proceso de elaboración de los liposomas no todo el fármaco es encapsulado y parte de este puede perderse. Se cuantificó el fármaco contenido en las suspensiones liposomales obteniendo los siguientes resultados ver tabla 9.

Tabla 9. Determinación de concentración de diclofenaco en las suspensiones liposomales.

Liposomas	Media (mg/mL)	Desviación estándar
Liposomas elásticos TWEEN® 80	1.51	0.08
Liposomas elásticos Colato de Sodio	1.20	0.03
Liposomas elásticos SPAN® 60	1.49	0.01
Liposomas elásticos Sin tensoactivo	1.08	0.03

EFICIENCIA DE ENCAPSULACIÓN

Se demostró que al añadir un tensoactivo el liposoma es capaz de retener mayor cantidad de fármaco, además de que se ha encontrado que si el tensoactivo añadido se encuentra por debajo de su Concentración Micelar Crítica (alrededor del 15% p/v, para los tres tensoactivos utilizados) la eficiencia de encapsulamiento aumenta (Williams, 2012), ver tabla 10, en general se obtuvo el siguiente orden de eficiencia de encapsulamiento: SPAN® 60 > Colato de Sodio > TWEEN® 80 >> sin tensoactivo

Tabla 10. Eficiencia de encapsulamiento.

Tensoactivo empleado	Media de encapsulamiento (mg/mL)	Media de carga de diclofenaco de la suspensión de liposomas (mg/mL)	% encapsulamiento	Desviación Estándar
Tween 80	1.048	1.512	69.28	0.04
Colato de Sodio	0.845	1.206	70.095	0.01
SPAN 60	1.480	1.496	98.890	0.02
Sin tensoactivo	0.304	1.088	28.00	0.02

DETERMINACIÓN DEL TIEMPO DE EXTRACCIÓN

Se determinó el porcentaje de recobro de las muestras utilizadas para la prueba encontrándose que a las 48 h de agitación en etanol se recobra poco más del 90% del diclofenaco agregado (ver figura 26), mientras que a las 24 h de agitación solo se obtiene un 59.91%, por lo que el tiempo de extracción empleado fue el de 48 h.

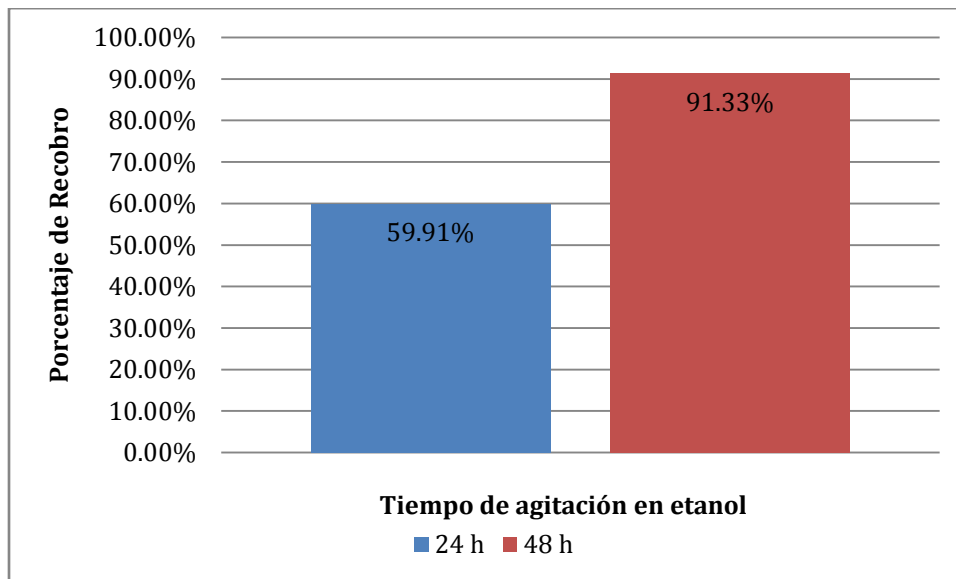


Figura 26. Porcentaje de recobro a dos tiempos distintos (24 y 48 h).

CINÉTICA DE PERMEACIÓN

Se realizaron 4 permeaciones *in vitro* con piel abdominal humana, una para cada formulación, colocando 1 mL de la formulación en cada celda bajo condiciones no oclusivas. Para cada experimento (n=5) se emplearon las mismas celdas de Franz modificadas, así como el mismo corte de piel (0.1 mm de grosor) para así disminuir la variación de los datos. El diclofenaco se cuantificó cada hora durante 7 horas continuas, realizando la cuantificación inmediatamente después de que se tomara la muestra, ajustando a cero el equipo con el blanco (celda con el placebo). En la figura 26 se observa la cinética de permeación del diclofenaco formulado en liposomas elásticos (TWEEN® 80, SPAN® 60 y Colato) y convencionales.

Se graficaron los datos de cantidad de diclofenaco permeada por unidad de área de piel expuesta a la formulación ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) en función del tiempo (h), para determinar la influencia del tipo de tensoactivo sobre el transporte del fármaco a través de la piel.

En la figura 27 se pueden observar que el proceso de permeación de los liposomas es bifásico, por lo que se tienen dos pendientes y por tanto, dos flujos, el primero corresponde a las cuatro primeras horas, mientras que el segundo es de la cuarta a la séptima hora.

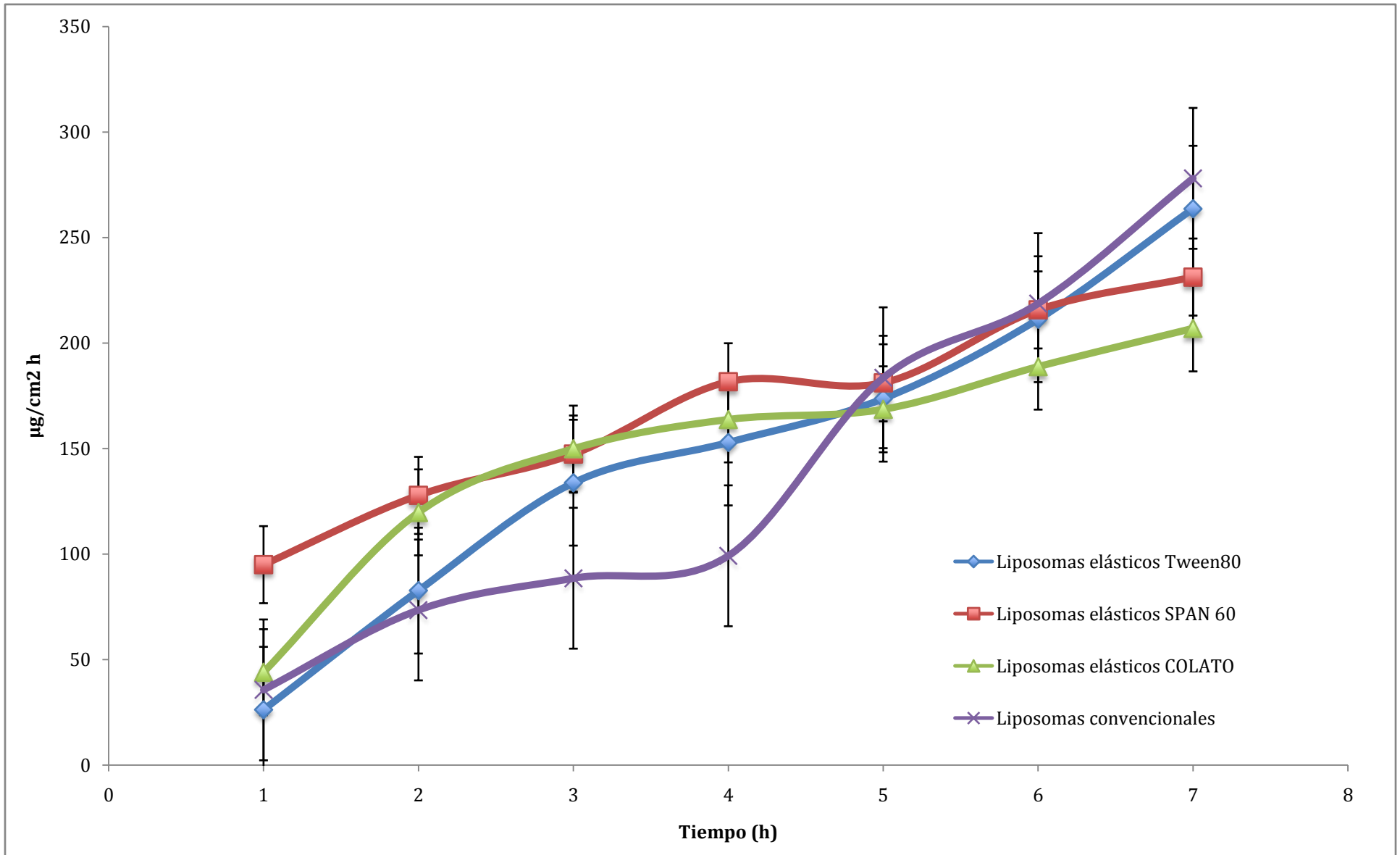


Figura 27. Cinética de permeación de liposomas con diclofenaco

En la Tabla 11 se muestran los parámetros obtenidos de la cinética de permeación: flujo de ambos intervalos, tiempo de latencia y los microgramos de fármaco retenidos en la piel al final de la permeación.

Tabla 11. Parámetros de cinética de permeación

Tipo de liposoma	Flujo 1 (1 a 4 h) ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)/h	Flujo 2 (4 a 7h) ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)/h	Tiempo de latencia (h)	Q máx. (μg)	μg retenidos en piel
Liposomas elásticos TWEEN® 80	43,11 \pm 8,15	36,99 \pm 12,51	0.27 \pm 0.22	747,52 \pm 88,01	9,25 \pm 1,3
Liposomas elásticos SPAN® 60	24,64 \pm 7,76	20,86 \pm 4,64	----	655,76 \pm 41,1	4,47 \pm 0,45
Liposomas elásticos Colato	38,95 \pm 8,02	14,95 \pm 4,24	0.02 \pm 0.02	586,75 \pm 51,73	3,09 \pm 0,45
Liposomas convencionales	32,39 \pm 24,53	45,85 \pm 27,76	0.90 \pm 0.05	788,33 \pm 236,6	3,54 \pm 0,46

Al analizar los datos estadísticamente no se encontraron diferencias para el primer flujo entre los tensoactivos empleados y los liposomas convencionales ($F= 1.88$ y $F_c=3.28$), por lo que la velocidad a la cual el diclofenaco pasa a través de la piel en ese primer lapso de tiempo, no se ve afectada por la presencia de los tensoactivos. Por otro lado, después de las cuatro horas, se observa una reducción en el flujo para todas las formulaciones con excepción de los liposomas convencionales existiendo diferencias significativas entre los tensoactivos empleados ($F= 4.47$ y un $F_c=3.28$). De cualquier modo, el TWEEN® 80 muestra flujos promedio superiores a los encontrados con las otras formulaciones, debido a que su estructura es muy similar a la del ácido oleico, el cual se ha demostrado que al tener una insaturación cis en la posición 9:10 (igual a la del TWEEN® 80), efectúa un anclaje asimétrico en la membrana lipídica de las células favoreciendo el flujo en las primeras capas (Ganem *et al.*, 1997), pero a su vez

promueve la retención de diclofenaco en la piel, de modo que la naturaleza del tensoactivo y su estructura impactan sobre la permeación transdérmica del diclofenaco. En cuanto al tiempo de latencia el cual se expresa como el tiempo que tarda el fármaco en llegar al compartimento receptor y que se establezca un gradiente de difusión, se observa la siguiente tendencia: Liposomas con SPAN® 60 < Colato < TWEEN® 80 < Convencionales. Las diferencias en los tiempos de latencia se pueden deber a que los tensoactivos utilizados son también promotores de absorción. El SPAN 60, es un éster de sorbitán, se ha reportado que actúa desordenando los fosfolípidos de la membrana y la queratina (Majella, 2013) por lo que promueve el paso de fármacos a través de la piel, en este caso del diclofenaco de manera inmediata.

El Tween 80 como ya se ha mencionado, tiene un mecanismo de acción como promotor parecido al del ácido oleico debido a la insaturación de tipo cis en la posición 9:10. El colato de sodio al ser un ácido biliar con naturaleza lipídica se intercala entre los lípidos intercelulares aumentando la fluidez de la membrana de las células, promoviendo el paso a un menor ritmo por su acción sobre la región lipídica de las células y la similitud al colesterol que contiene la membrana lipídica de las células del estrato córneo (Ganem, et al., 1997).

En comparación a los demás tensoactivos los liposomas convencionales, es decir a los que no se les adicionó ningún surfactante, muestran un tiempo de latencia mayor (ver tabla 11), pues los liposomas al no ser capaces de permear intactos, tarda en establecerse un gradiente de concentración con el fármaco libre de la formulación.

RETENCIÓN DE DICLOFENACO EN PIEL

Los tensoactivos al actuar como promotores de permeación transdérmica, dependiendo de su naturaleza pueden promover que el fármaco contenido en los liposomas elásticos se retengan con mayor facilidad en la piel (Majella, 2013), esto se debe a que los tensoactivos suelen aumentar la fluidez de la membrana de las células facilitando su paso en los estrato superiores (estrato córneo, lúcido y granuloso), pero a medida que el tensoactivo se incorpora con las células al llegar a los estratos inferiores el tensoactivo ya no es suficiente por lo que permanece retenido a lo largo del tejido, debido al coeficiente de partición que presenta el diclofenaco ($\text{LogP}=4.5$), en gran medida esto se ve afectado por el tamaño y la forma de los surfactantes que al provocar la disminución del flujo del fármaco promueve la retención de este en los subsecuentes estratos de la piel.

Debido a estas interacciones se encontró que el TWEEN® 80 es el tensoactivo que favorece en mayor grado la penetración del fármaco en la piel (es por ello que se encuentra la más alta cantidad de diclofenaco en relación a los otros tensoactivos y a los liposomas convencionales) y por tanto, presenta el flujo más elevado.

CONCLUSIONES

Se obtuvieron liposomas convencionales (no elásticos) y elásticos, encontrando que tanto la presencia del diclofenaco (empleado como fármaco modelo) como el tipo de surfactante, influyen en las propiedades fisicoquímicas de los liposomas y en sus características de permeabilidad a través de la piel.

En cuanto a las propiedades fisicoquímicas de los liposomas se encontró lo siguiente:

- (i) La inclusión de un tensoactivo impactó de manera importante la tasa de encapsulación de diclofenaco en los liposomas, obteniendo un porcentaje de 28 % sin surfactante, mientras que con TWEEN® 80 y colato de sodio este se incrementó al 70 % y con SPAN® 60 hasta casi un 99 %.
- (ii) La presencia de diclofenaco redujo de manera importante tanto el tamaño de las vesículas como la dispersión de los datos.
- (iii) Los tres tensoactivos evaluados contribuyeron a la conservación del tamaño de los liposomas al ser extruidos a través de una membrana de 0.05 μm , aunque sin duda el SPAN® 60 fue el tensoactivo que mejor funcionó, lo que se traduce en un incremento importante en la elasticidad de los liposomas.
- (iv) Aunque en todos los casos, la inclusión de diclofenaco en los liposomas incrementó el potencial Z en relación a los liposomas placebo, el uso de SPAN® 60 dió como resultado un valor aún mayor, por lo que puede deducirse que este tensoactivo en combinación con el fármaco, contribuyen a la estabilidad física de los liposomas.

En cuanto al impacto de los surfactantes en las características de permeabilidad los resultados arrojan la siguiente información:

- (i) Se obtuvieron perfiles de permeación con dos flujos, no encontrando diferencias estadísticas entre las formulaciones evaluadas hasta las 4 h. Para tiempos más prolongados, los liposomas convencionales (i.e., sin tensoactivo) presentaron la velocidad de transporte más alta, así como la mayor cantidad total permeada, aunque la dispersión de los datos en este caso es muy amplia, por lo que la inclusión de un tensoactivo reduce considerablemente la dispersión de los parámetros determinados.
- (ii) La inclusión de un tensoactivo a la formulación disminuyó el tiempo de latencia considerablemente, siendo el más efectivo el SPAN® 60 con el cual se hizo prácticamente cero.
- (iii) En cuanto a la cantidad de fármaco retenido en piel al final de la permeación, esta es prácticamente el doble para el TWEEN® 80 respecto al resto de las formulaciones.

REFERENCIAS

1. Barenholz, Y. (2001). Liposome applications: problems and prospects. *Current Opinion in Colloid and Interface Science*, 6, 66 – 77.
2. Boinpally, R. (2003). Lecithin vesicles for topical delivery diclofenac. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 56, 389-392.
3. Bouwstra, J.A., Honeywell-Nguyen, P.L. (2002). Skin structure and mode of action of vesicles. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 54(1), S41–S55.
4. Bronuagh, R. L. (2002). Topical Absorption of Dermatological Products. Marcel Dekker Inc., Brooklyn, New York. p. 2-4, 115-119.
5. Calderon-Lojero, I. (2010). Liberación transdérmica promovida por microagujas de un fármaco anorexígeno formulado en nanopartículas. Universidad Nacional Autónoma de México, Tesis de Maestría, México, 15.
6. Cevc, G., Blume, G., Schatzlein, A., Gebauer, D., Paul, A. (1996). The skin: a pathway for systemic treatment with patches and lipid-based agent carriers. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 18, 349–378.
7. Cevc, G. (2003). Lipid vesicles and other colloids as drug carriers on the skin. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 56, 676 – 704.
8. Clares, B. (2003). *Sistemas de transporte y liberación de fármacos de aplicación tópica: Liposomas multilaminares portadores de Acetonido*. Granada: Universidad de Granada, Tesis Doctoral. 20 – 25.

9. Diez, S., y Domínguez, M. (1990). Permeabilidad cutánea, *Piel*, 5, 503-509.
10. F.D.A., (2001), "Guidance for Industry Bioanalytical Method Validation". U.S.A., 4.
11. Gamboa-Álvarez, E. M. (2005). Influencia del peso molecular y la solubilidad en la eficiencia de atrapamiento de tres principios activos hidrosolubles en vesículas lipídicas ultraflexibles (transfersomas). Universidad Nacional Autónoma de México, Tesis de Licenciatura, 40.
12. Ganem, A., Kalia, Y. N., Falson-Rieg F., Buri P. (1997). Mechanisms of oral permeation enhancement. *International Journal of Pharmaceutics*, 156, 127 – 142.
13. Gonzalez, P. (2008). *Infinite Fractal*. Recuperado el 10 de Marzo de 2013, de http://www.infinitefractal.com/movabletype/blogs/my_blog/metodos-de-produccion-de-lipos.html
14. Gupta, P. N., Mishra V., Rawat A., Dubey P., Mahor S., Jain S., Chatterji D.P., Vyas S.P., (2004). Non-invasive vaccine delivery in transfersomes, niosomes and liposomes: a comparative study. *International Journal of Pharmaceutics*, 293, 73 – 82.
15. Guy, R. H. (1996). Current status and future prospects of transdermal drug delivery. *Pharmaceutical Research*, 13 (12), 1765-1769.
16. Gregoradis, G. (2007). Liposome Technology. University of London Press, 3rd edition, London, 97.
17. Kligman, A. (1984). Skin permeability: dermatologic aspects of transdermal drug delivery. *American Heart Journal*, 108 (1), 200-2006.

18. Maghraby, B.W., and Williams, A. (2008). Liposomes and skin: From drug delivery to model membranes. *European Journal of Pharmaceutical*, 34 (4-5) 203-222.
19. Majella, E.L. (2013). Skin permeation enhancers. *International Journal of Pharmaceutics*, 447, 12-21.
20. McGrath, J. A., Uitto, J. (2008). Rook's Textbook of Dermatology, Chapter 3. Anatomy and Organization of Human Skin. Wiley-Blackwell Press. 3 – 16.
21. MSDS diclofenaco <http://www.sciencelab.com/msds.php?msdsId=9923738>
[consultado el 10 de abril del 2013.](#)
22. Mustafa, E., Abdallah O. Y., Naggar, F.V., Khalafallah, N. M. (2007). Lipid vesicle for skin delivery of drugs: Reviewing three decades of research. *International Journal of Pharmaceutics*, 332, 1 – 16.
23. Naik, A., Yogeshvar, N., Guy, K., y Guy, R. (2000). Transdermal Drug Delivery: overcoming the skin's barrier function. *Pharmaceutical Science y Technology Today*, Volume 3 Issue 9, 318-326.
24. Navarrete, F.G. (2003). Histología de la piel. *Revista de la Facultad de Medicina UNAM*, 40(4), 130-133
25. PLM móvil diclofenaco http://www.facmed.unam.mx/bmnd/dirijo.php?bib_vv=6
[consultado el 10 de abril del 2013.](#)
26. Salager, J.L. (1993). Surfactantes en solución Acuosa, Universidad de los Andes, 1- 6.

27. Seong-Su, K., Pauly, T., Pinnavaia, T. (2000). Non-ionic surfactant assembly of ordered, very large pore molecular sieve silicas from water soluble silicates, *Chemical Community*, 1661-1662
28. Takanori, I., Nishino, K., Nayar, S. (2005). The appearance of human skin. Columbia University, New York, US. 5 – 18.
29. Prow, T.W., Grice J. E., Lin L.L., Faye, R., Butler M., Becker W., Wurm E.M., Yoong, C., Robertson T.A., Soyer, H.P., Roberts M.S. (2011). Nano particles and microparticles for skin drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 63, 470 – 491.
30. Trommer, H., y Neubert, R. (2006). Overcoming the stratum Corneum: The modulation of skin penetration. *Skin Pharmacology and Physiology*, 19, 106-121.
31. Weiner, N., Martin, F., Riaz, M. (1989). Liposome novel drug delivery system. *Drug Development and Industrial Pharmacy* 15, 1523–1554.
32. Williams, A. C. (2003). Transdermal and Topical Drug Delivery. University of Bradford, *Pharmaceutical Press*, London, UK pp 3.
33. Williams, A., Barry, B. (2012). Penetration enhancers. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 64, 128 – 137.

ANEXOS

Anexo I. Propiedades fisicoquímicas y farmacológicas del Diclofenaco (PLM móvil, 2013)

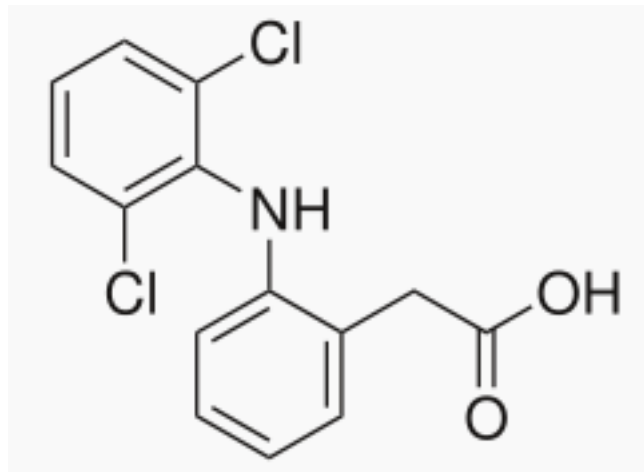


Figura 28. Estructura molecular del diclofenaco.

Descripción: Cristales finos o polvo blanco, inodoro, incoloro, estable ante la luz y la humedad.

Solubilidad: en agua fría y solventes orgánicos como etanol y metanol.

Uso: Antiinflamatorio no esteroideo usado en tratamiento de dolores musculares y artritis reumatoide.

DL₅₀= 53 mg/kg

En caso de contacto causa irritación de mucosas

RECOMENDACIONES SOBRE ALMACENAMIENTO: Consérvese a temperatura ambiente a no más de 25°C.

ALTERACIONES EN LOS RESULTADOS DE PRUEBAS DE LABORATORIO: No se han reportado a la fecha.

CONTRAINDICACIONES:

- Hipersensibilidad al diclofenaco
- Hipersensibilidad al ácido acetilsalicílico u otros antiinflamatorios no esteroideos (AINEs).
- Pacientes en los que los ataques de asma, urticaria o rinitis aguda se ven precipitados por el ácido acetilsalicílico u otro antiinflamatorio no esteroideo.

REACCIONES SECUNDARIAS Y ADVERSAS: Entre los efectos adversos se pueden mencionar reacciones cutáneas en el sitio de aplicación. En raras ocasiones pueden ocurrir reacciones alérgicas.

Alteraciones de piel y tejido subcutáneo:

Comunes (> 1/100, < 1/10): dermatitis de contacto (por ejemplo, rash localizado, prurito, eritema, edema o pápulas).

Raros (> 1/10,000, 1/1,000): dermatitis bulbosa.

Muy raros (> 1/10,000): alergias de la piel generalizadas, urticaria, angioedema, reacciones de fotosensibilidad).

Alteraciones respiratorias, torácicas y mediastinales:

Muy raros (> 1/10,000): broncoespasmo.

RESTRICCIONES DE USO DURANTE EL EMBARAZO Y LA LACTANCIA: No debe ser aplicado por un periodo prolongado. Durante el último trimestre de embarazo el uso de diclofenaco u otros inhibidores de la sintetasa de prostaglandinas puede resultar en el cierre prematuro del *ductus arteriosus* o inercia uterina.

FARMACOCINÉTICA Y FARMACODINAMIA:

Farmacocinética:

Es un inhibidor de la ciclooxigenasa y su potencia es mayor que el de la indometacina, naproxeno y otros medicamentos por vía oral; además, disminuye las concentraciones intracelulares del ácido araquidónico en leucocitos. Después de ingerido DICLOFENACO se absorbe en forma rápida y completa por el tracto gastrointestinal y su concentración máxima se obtiene de 2 a 3 horas cuando se administra junto con los alimentos, altera su absorción, pero no modifica su efectividad. Se liga ampliamente a proteínas plasmáticas en 99%, su vida media en plasma es de 1 a 2 horas previa ingesta oral.

Por lo que su efecto terapéutico es mayor que su vida media plasmática.

Metabolismo: La biotransformación del diclofenaco involucra parcialmente la glucoronidación de la molécula intacta, pero especialmente hidroxilaciones simples y múltiples lo que resulta en abundantes metabolitos fenólicos, muchos de los cuales son convertidos a glucorónidos conjugados.

Dos de los metabolitos fenólicos son biológicamente activos, aunque en mucho menor grado que el diclofenaco.

Eliminación: La aclaración sistémica total del diclofenaco a partir del plasma es de 263 ± 56 ml/min. La vida media plasmática terminal es de 1-2 horas. Cuatro de los metabolitos, incluyendo los dos metabolitos activos, también tiene una vida media plasmática corta de 1-3 horas. Un metabolito el 3'-hidroxi-4'metoxi-diclofenaco, tiene una vida media más larga pero es virtualmente inactivo. El diclofenaco y sus metabolitos son excretados principalmente en la orina.

Características en los pacientes: No se espera una acumulación de diclofenaco o sus metabolitos en pacientes con falla renal. En pacientes con hepatitis crónica o con cirrosis no descompensada la cinética y el metabolismo del diclofenaco o sus metabolitos es el mismo que en pacientes sin enfermedad hepática.

Farmacodinamia: Productos tópicos para las articulaciones y el dolor muscular. Preparaciones antiinflamatorias no esteroideas para uso tópico.

El diclofenaco es un antiinflamatorio no esteroideo con amplias propiedades analgésicas, antiinflamatorias y antipiréticas. Su mecanismo de acción primordial es la inhibición de la síntesis de prostaglandinas.

INTERACCIONES MEDICAMENTOSAS Y DE OTRO GÉNERO: Debido a que la absorción sistémica del diclofenaco a partir de la aplicación tópica es muy baja, son muy poco probables las interacciones.

Anexo II. Curvas de Calibración de diclofenaco en solución amortiguadora de fosfatos pH 6.5

Tabla 12. Datos de Curva de calibración en solución amortiguadora de fosfatos

Sistema	[$\mu\text{g/mL}$]	A	A/C
1	5.02	0.1526	0.0304
2	10.04	0.2941	0.0293
3	20.08	0.6228	0.0310
4	30.12	0.9162	0.0304
5	40.16	1.224	0.0305
6	50.2	1.5624	0.0311
1	5.02	0.1527	0.0304
2	10.04	0.2938	0.0292
3	20.08	0.6224	0.0309
4	30.12	0.9166	0.0304
5	40.16	1.2242	0.0304
6	50.2	1.5628	0.0311
1	5.02	0.1527	0.0304
2	10.04	0.2939	0.0292
3	20.08	0.6223	0.0309
4	30.12	0.9155	0.0303
5	40.16	1.2244	0.0304
6	50.2	1.5624	0.0311

Tabla 13. Parámetros de la curva de calibración en solución amortiguadora de fosfatos

Parámetros	
Media	0.0304
Des.std	0.0006
CV	2.019384874
r2	0.9995

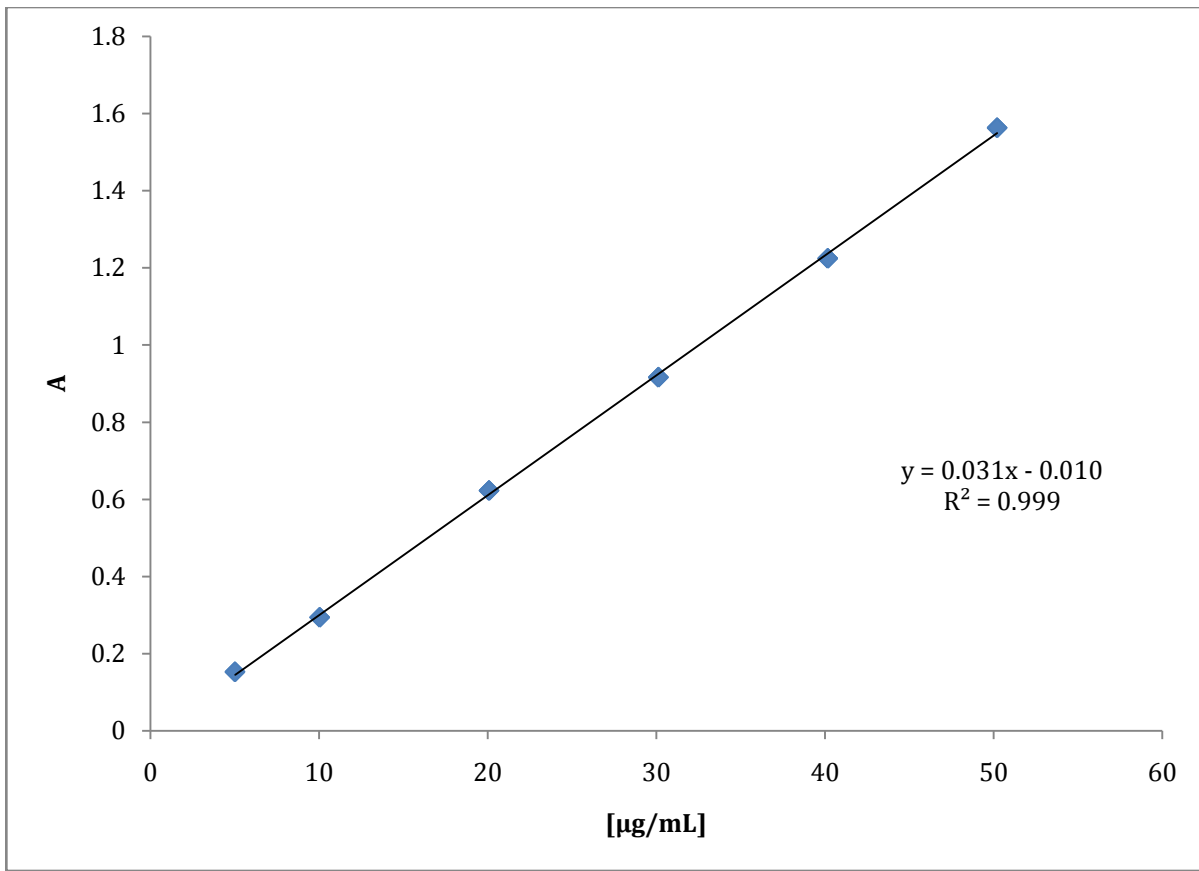


Figura 29. Curva de calibración Diclofenaco en solución amortiguadora de fosfatos pH=6.5

Curvas de Calibración de diclofenaco en solución amortiguadora de fosfatos pH 6.5 para Reproducibilidad

Tabla 14. Datos de curva de diclofenaco para reproducibilidad

Concentración	A	A/ C	Dev std	Media	%CV
5	0.1671	0.0334	0.0004	0.0331	1.4106
5	0.1672	0.0334			
5	0.1631	0.0326			
10	0.3154	0.0315	0.0006	0.0322	1.8803
10	0.3259	0.0325			
10	0.3259	0.0325			
20	0.6325	0.0316	0.0002	0.0317	0.7775
20	0.6307	0.0315			
20	0.64	0.0320			
30	0.9651	0.0321	0.0001	0.0320	0.3383
30	0.9643	0.0321			
30	0.9591	0.0319			
40	1.3027	0.0325	0.0005	0.0325	1.7252
40	1.3035	0.0325			
40	1.3039	0.0325			
50	1.6139	0.0322	0.0003	0.0322	1.1524
50	1.6326	0.0326			
50	1.5954	0.0319			

Tabla. 15 Datos de reproducibilidad de la curva de calibración de diclofenaco en solución amortiguadora de fosfatos pH=6.5.

Parámetros	
Media	0.0323
Des STD	0.0005
%CV	1.7043

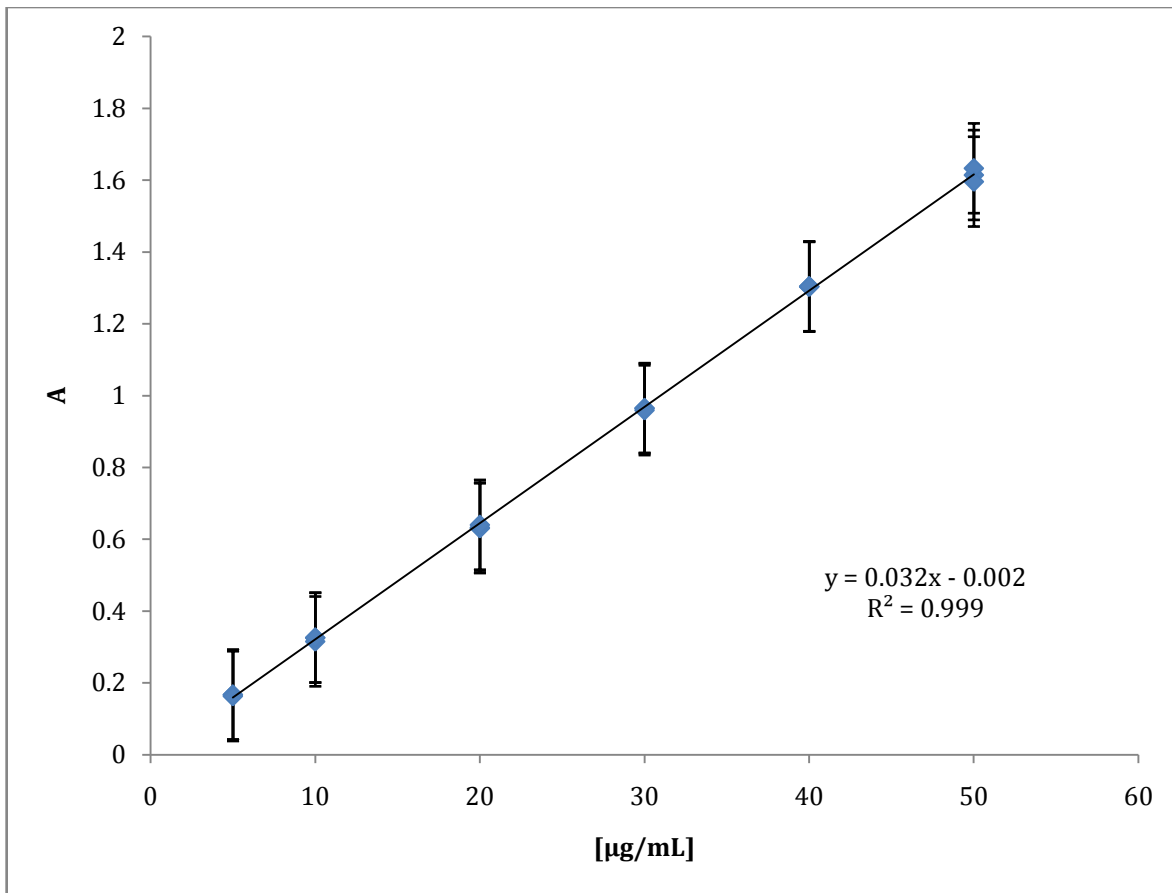


Figura 30. Curva de calibración de diclofenaco en fosfatos para reproducibilidad.

Límite de cuantificación experimental para la Curva de Calibración de diclofenaco en solución amortiguadora de fosfatos pH 6.5.

Tabla 16. Datos de límite de cuantificación inferior

Sistema	[$\mu\text{g/mL}$]	A	A/C
1	5.02	0.1526	0.0303
2	10.04	0.2941	0.0292
3	20.08	0.6228	0.0310
4	30.12	0.9159	0.0304
5	40.16	1.224	0.0304
6	50.2	1.5624	0.0311
1	5.02	0.1527	0.0304
2	10.04	0.2938	0.0292
3	20.08	0.6224	0.0309
4	30.12	0.9166	0.0304
5	40.16	1.2242	0.0304
6	50.2	1.5628	0.0311
1	5.02	0.1527	0.0304
2	10.04	0.2939	0.0292
3	20.08	0.6223	0.0309
4	30.12	0.9163	0.0304
5	40.16	1.2244	0.0304
6	50.2	1.5624	0.0311
5.1	2.008	0.0617	0.0307
5.2	2.008	0.0616	0.0306
5.3	2.008	0.0626	0.0311

Tabla 17. Datos para límite de cuantificación inferior de la curva de calibración de diclofenaco en solución amortiguadora de fosfatos pH=6.5.

Parámetros	
Promedio	0.0305
Desviacion	0.0005
%CV	1.9394

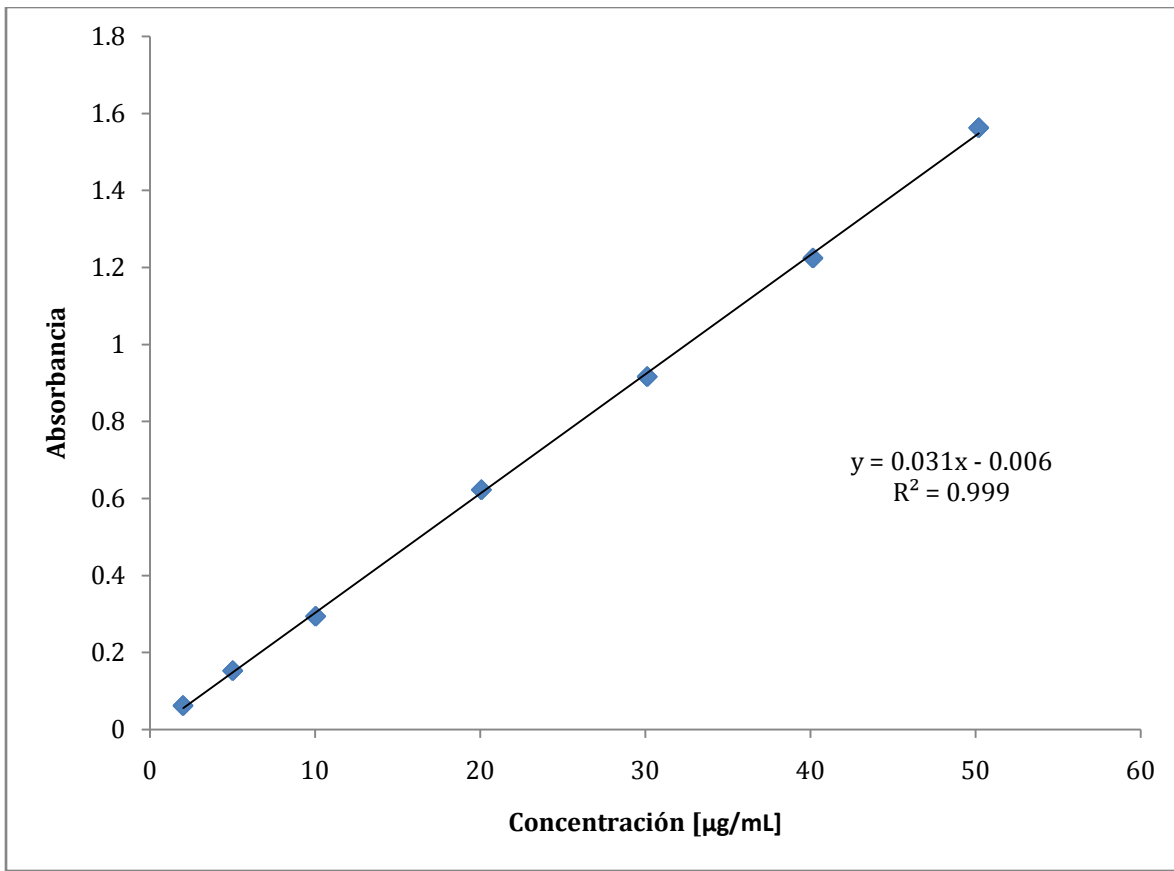


Figura 31. Límite de cuantificación inferior experimental para la curva de calibración de diclofenaco en solución amortiguadora de fosfatos pH=6.5.

Curvas de Calibración de diclofenaco en solución amortiguadora de fosfatos pH 6.5 en contacto con piel abdominal humana por 24 h

Tabla 18. Datos de la curva de calibración en solución amortiguadora de fosfatos en contacto con piel abdominal humana por 24 h.

Sistemas	[µg/mL]	A	A/C
1	4.16	0.1338	0.0321
2	8.32	0.2529	0.0303
3	12.48	0.391	0.0313
4	16.64	0.5186	0.0311
5	20.8	0.6496	0.0312
6	24.96	0.8016	0.0321
7	29.12	0.9506	0.0326
8	33.28	1.0746	0.0322
9	37.44	1.1954	0.0319
10	41.6	1.326	0.0318
1	4.16	0.1295	0.0311
2	8.32	0.2627	0.0315
3	12.48	0.3906	0.0312
4	16.64	0.5264	0.0316
5	20.8	0.6709	0.0322
6	24.96	0.8171	0.0327
7	29.12	0.9241	0.0317
8	33.28	1.0726	0.0322
9	37.44	1.2264	0.0327
10	41.6	1.3533	0.0325
1	4.16	0.1306	0.0313
2	8.32	0.2626	0.0315
3	12.48	0.3959	0.0317
4	16.64	0.5165	0.0310
5	20.8	0.6644	0.0319
6	24.96	0.804	0.0322
7	29.12	0.9449	0.0324
8	33.28	1.0498	0.0315
9	37.44	1.2042	0.0321
10	41.6	1.3474	0.0323

Tabla 19. Datos de validación curva de calibración en solución amortiguadora de fosfatos en contacto con piel abdominal humana por 24 h.

Parámetros	
Media	0.0318
Dev Std	0.0005
%CV	1.7985

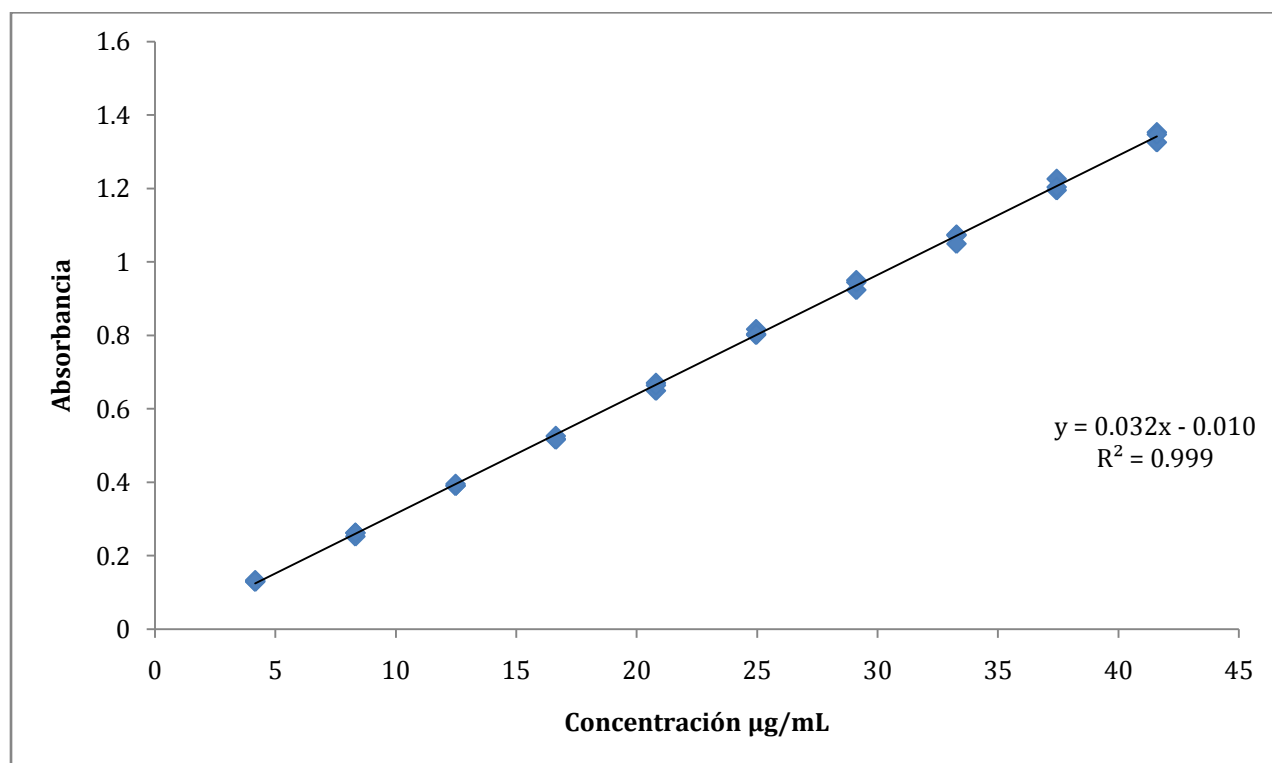


Figura 32. Curva de calibración de diclofenaco en solución amortiguadora de fosfatos pH 6.5 en contacto con piel humana abdominal por 24 h.

Límite de cuantificación experimental para la Curva de Calibración de diclofenaco en solución amortiguadora de fosfatos pH 6.5 para reproducibilidad

Tabla 20. Datos de Reproducibilidad de la curva de calibración de diclofenaco en solución amortiguadora de fosfatos pH 6.5 en contacto con piel humana abdominal por 24 h

Sistemas	[$\mu\text{g}/\text{mL}$]	A	A/C
1	4.16	0.1521	0.0365
2	8.32	0.2779	0.0334
3	12.48	0.4223	0.0338
4	16.64	0.5653	0.0339
5	20.8	0.6836	0.0328
6	24.96	0.8361	0.0334
7	29.12	0.9542	0.0327
8	33.28	1.0958	0.0329
9	37.44	1.2671	0.0338
10	41.6	1.3624	0.0327
1	4.16	0.1383	0.0332
2	8.32	0.2952	0.0354
3	12.48	0.4149	0.0332
4	16.64	0.5692	0.0342
5	20.8	0.6961	0.0334

6	24.96	0.8458	0.0338
7	29.12	0.9848	0.0338
8	33.28	1.1154	0.0335
9	37.44	1.2287	0.0328
10	41.6	1.3818	0.0332
1	4.16	0.1524	0.0366
2	8.32	0.3225	0.0387
3	12.48	0.4106	0.0329
4	16.64	0.5557	0.0333
5	20.8	0.6677	0.0321
6	24.96	0.8399	0.0336
7	29.12	0.9582	0.0329
8	33.28	1.097	0.0329
9	37.44	1.2381	0.0330
10	41.6	1.3711	0.0329

Tabla 21. Parámetros de reproducibilidad de la curva de calibración de diclofenaco en solución amortiguadora de fosfatos pH 6.5 en contacto con piel humana abdominal por 24 h

Parámetros	
Media	0.0337
Dev Std	0.0013
%CV	4.1186

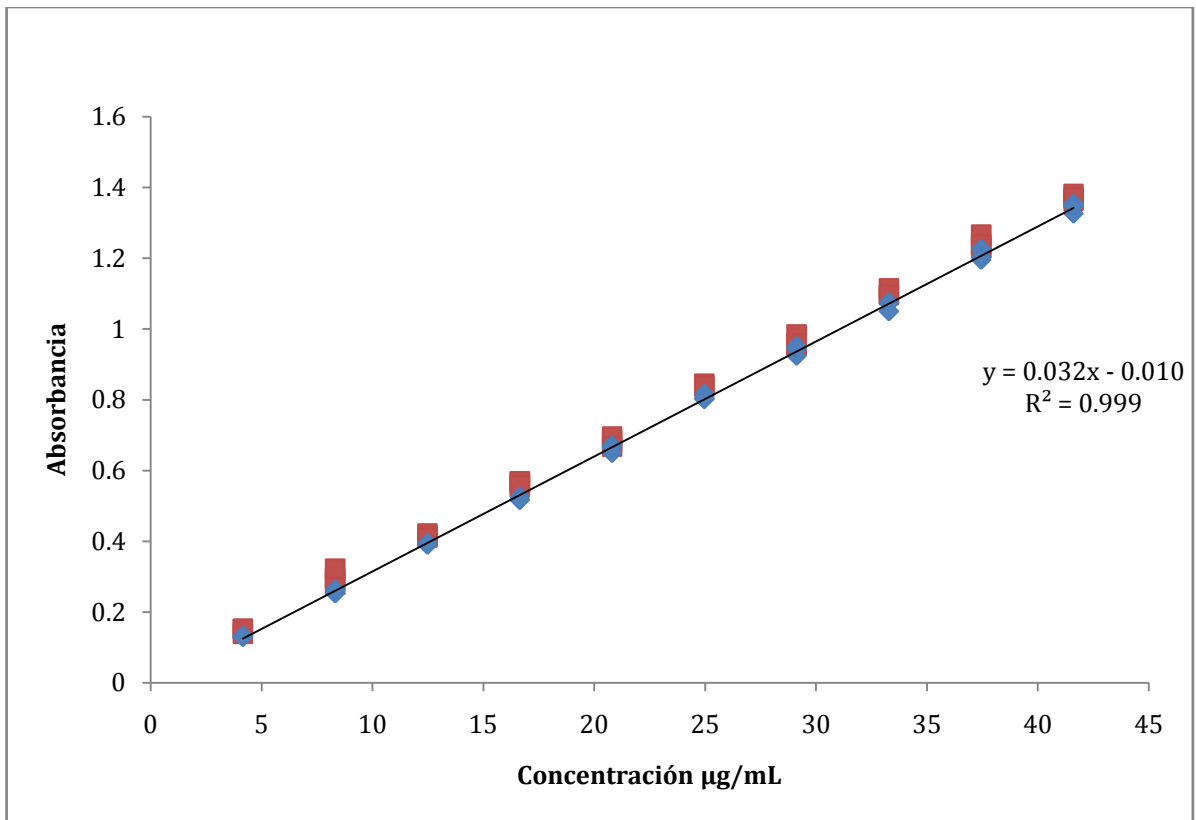


Figura 33. Curva de calibración de diclofenaco en solución amortiguadora de fosfatos pH=6.5 en contacto con piel humana abdominal por 24 hrs reproducibilidad

Datos de Determinación de tiempo en etanol para recobro de diclofenaco de piel humana abdominal.

Tabla 22. Datos del recobro de diclofenaco en piel abdominal humana tras 24 h de agitación en etanol.

Recobro en etanol por 24hrs			Cantidad de diclofenaco adicionada en piel (255.6µg)	
	µg /mL	A	µg de diclofenaco	%RECOBRO
STD	12.78	0.5286		
M1	7.5359	0.3117	150.7198	58.9670
M2	7.7100	0.3189	154.2013	60.3291
M3	7.7245	0.3195	154.4914	60.4426
			Promedio	59.9129

Tabla 23. Datos del recobro de diclofenaco en piel abdominal humana tras 48 h de agitación en etanol.

Recobro en etanol por 48 hrs			Cantidad de diclofenaco adicionada en piel (210.4µg)	
	µg /mL	A	µg de diclofenaco	%RECOBRO
STD	10.44	0.8003	210.4	-
M1	9.8908	0.7582	197.8160	94.0190
M2	9.4629	0.7254	189.2584	89.9517
M3	9.4707	0.726	189.4149	90.0261
			Promedio	91.3322

Anexo III. Datos de tamaño de liposomas

Tabla 24. Datos de caracterización de tamaño liposomas

Muestra	Tamaño (nm)	lpd	Media (nm)	Des. STD (nm)
Liposoma s/s s/f	210.9	0.25	225.1333	0.1396
	176.3	0.07		
	288.2	0.345		
Placebo SPAN 60	172.7	0.21	163.4666	0.0326
	157.5	0.161		
	160.2	0.148		
Placebo Tween 80	180.9	0.24	163.9333	0.0697
	155.8	0.124		
	155.1	0.115		
Placebo Colato	119.9	0.156	119.6	0.0270
	118.6	0.102		
	120.3	0.13		
Transfersoma T80 c/f	134.4	0.115	144.6444	0.0591
	162.5	0.259		
	130.5	0.155		
	140.4	0.11		
	136.9	0.096		
	197.1	0.255		
	132.4	0.141		
	133.3	0.15		
	134.3	0.166		

Transfersoma de Colato c/f	130.6	0.164	133.0666	0.0285
	135.6	0.192		
	133.8	0.131		
	134.3	0.114		
	136	0.11		
	132.1	0.175		
	130	0.137		
	133.7	0.17		
	131.5	0.137		
Transfersoma de SPAN 60 c/f	214	0.243	147.29	0.1867
	137.9	0.124		
	136.6	0.179		
	139.2	0.428		
	136.6	0.359		
	101.2	0.423		
	117.6	0.508		
	124.2	0.58		
	165.8	0.1		
	199.8	0.616		
Liposoma c/f	153.6	0.091	146.0111	0.0385
	155.3	0.027		
	153.4	0.093		
	149.5	0.115		
	151.5	0.137		
	151.5	0.167		
	134.6	0.126		
	136.2	0.118		
	128.5	0.102		

Anexo IV. Datos de potencial Z de los liposomas

Tabla 25. Datos de la caracterización del Potencial Z de los liposomas

Muestra	Potencial Z mV	Media	Des. STD
Liposoma s/s s/f	-7.62	-	0.4864
	-8.52	7.9633	
	-7.75		
Placebo SPAN 60	-19.8	-17.5	2.2516
	-15.3		
	-17.4		
Placebo Tween 80	-20.4	-	5.7178
	-12.8	14.133	
	-9.2	3	
Placebo Colato	-10.6	-	5.8421
	-19.2	12.616	
	-8.05	6	
Transfersoma T80 c/f	-19.5	-	2.9556
	-12.4	14.811	
	-12.9	1	
	-15		
	-13.1		
	-19.4		
	-15.5		
	-14.4		
Transfersoma de Colato c/f	-13.2	-	3.2672
	-16	16.866	
	-17.8	6	

	-20.7		
	-17.5		
	-19.6		
	-18.7		
	-10.3		
	-18		
Transfersoma de SPAN 60 c/f	-20.2	-23.34	3.5381
	-21.8		
	-22		
	-19.7		
	-19.5		
	-27.5		
	-22.9		
	-26.3		
Liposoma c/f	-23.5	-17.8	5.7716
	-30		
	-11.4		
	-13.2		
	-10.7		
	-19.8		
	-24		
	-27.2		
	-18.9		
	-14.2		
-20.8			

Análisis estadístico del tamaño por medio de STATGRAPHICS

Comparación de Varias Muestras

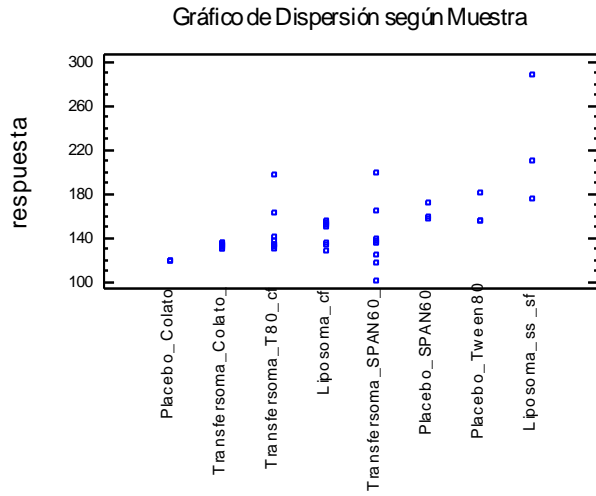


Figura 34. Gráfico de dispersión de datos de tamaño

Tabla 26. Análisis de la Varianza del Tamaño de liposomas

Tabla ANOVA

Análisis de la Varianza					
Fuente	Sumas de cuad.	Gl	Cuadrado Medio	Cociente-F	P-Valor
Entre grupos	24480,5	7	3497,21	7,63	0,0000
Intra grupos	18335,8	40	458,395		
Total (Corr.)	42816,3	47			

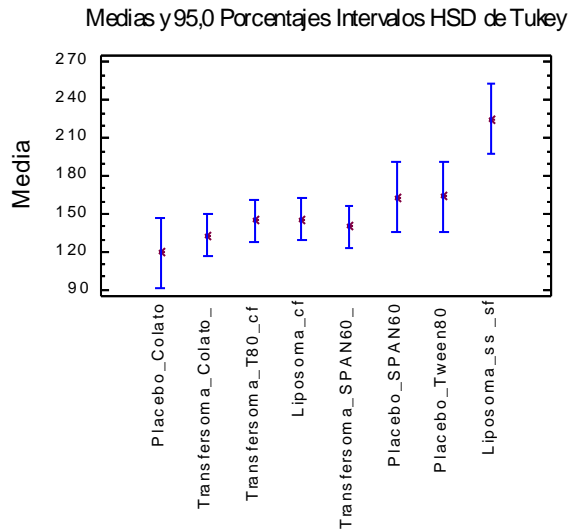


Figura 35. Gráfico de comparación de medias de tamaño con Intervalos de Tukey.

Tabla 27. Datos de Comparación de muestras multiples con intervalos de tukey del tamaño.

Contraste Múltiple de Rango

Método: 95,0 porcentaje LSD

Frec.	Media	Grupos homogéneos
Placebo_Colato 3	119,6	X
Transfersoma_Co9	133,067	X
Transfersoma_SP9	139,878	XX
Transfersoma_T89	144,644	XX
Liposoma_cf 9	146,011	XX
Placebo_SPAN60 3	163,467	X
Placebo_Tween803	163,933	X
Liposoma_ss_sf3	225,133	X

Contraste	Diferencias	+/- Límites
Placebo_Colato - Transfersoma_Colat	-13,4667	28,8478
Placebo_Colato - Transfersoma_T80_c	-25,0444	28,8478
Placebo_Colato - Liposoma_cf	-26,4111	28,8478
Placebo_Colato - Transfersoma_SPAN6	-20,2778	28,8478
Placebo_Colato - Placebo_SPAN60	*-43,8667	35,3311
Placebo_Colato - Placebo_Tween80	*-44,3333	35,3311
Placebo_Colato - Liposoma_ss_sf	*-105,533	35,3311
Transfersoma_Colat - Transfersoma_T80_c	-11,5778	20,3984
Transfersoma_Colat - Liposoma_cf	-12,9444	20,3984
Transfersoma_Colat - Transfersoma_SPAN6	-6,81111	20,3984
Transfersoma_Colat - Placebo_SPAN60	*-30,4	28,8478
Transfersoma_Colat - Placebo_Tween80	*-30,8667	28,8478
Transfersoma_Colat - Liposoma_ss_sf	*-92,0667	28,8478
Transfersoma_T80_c - Liposoma_cf	-1,36667	20,3984
Transfersoma_T80_c - Transfersoma_SPAN6	4,76667	20,3984
Transfersoma_T80_c - Placebo_SPAN60	-18,8222	28,8478
Transfersoma_T80_c - Placebo_Tween80	-19,2889	28,8478
Transfersoma_T80_c - Liposoma_ss_sf	*-80,4889	28,8478
Liposoma_cf - Transfersoma_SPAN6	6,13333	20,3984
Liposoma_cf - Placebo_SPAN60	-17,4556	28,8478
Liposoma_cf - Placebo_Tween80	-17,9222	28,8478
Liposoma_cf - Liposoma_ss_sf	*-79,1222	28,8478
Transfersoma_SPAN6 - Placebo_SPAN60	-23,5889	28,8478
Transfersoma_SPAN6 - Placebo_Tween80	-24,0556	28,8478
Transfersoma_SPAN6 - Liposoma_ss_sf	*-85,2556	28,8478
Placebo_SPAN60 - Placebo_Tween80	-0,466667	35,3311
Placebo_SPAN60 - Liposoma_ss_sf	*-61,6667	35,3311
Placebo_Tween80 - Liposoma_ss_sf	*-61,2	35,3311

* indica una diferencia significativa.

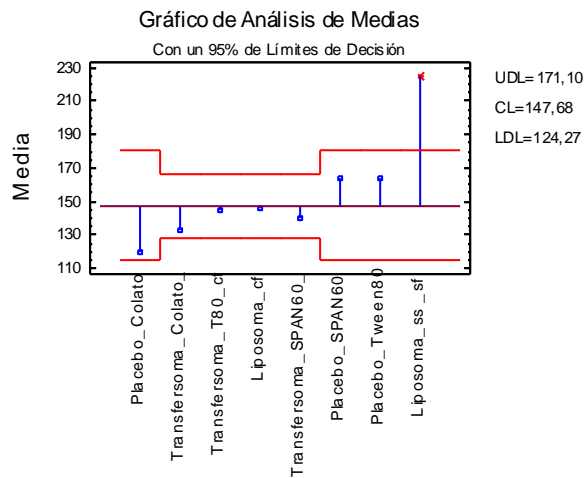


Figura 36. Gráfico de Análisis de medias del tamaño.

Análisis estadístico del potencial Z (mV) por medio de STATGRAPHICS

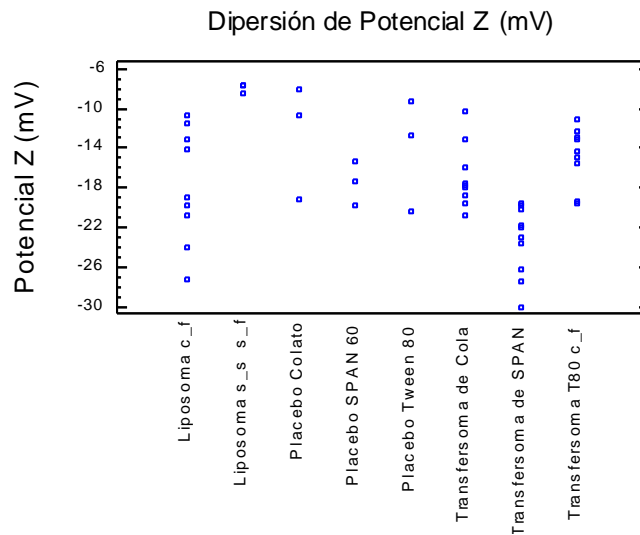


Figura 37. Gráfico del Potencial Z de los liposomas

Tabla 28. ANOVA de Potencial Z

Tabla ANOVA

Análisis de la Varianza

Fuente	Sumas de cuad.	Gl	Cuadrado Medio	Cociente-F	P-Valor
Entre grupos	778,914	7	111,273	6,72	0,0000
Intra grupos	678,714	41	16,554		
Total (Corr.)	1457,63	48			

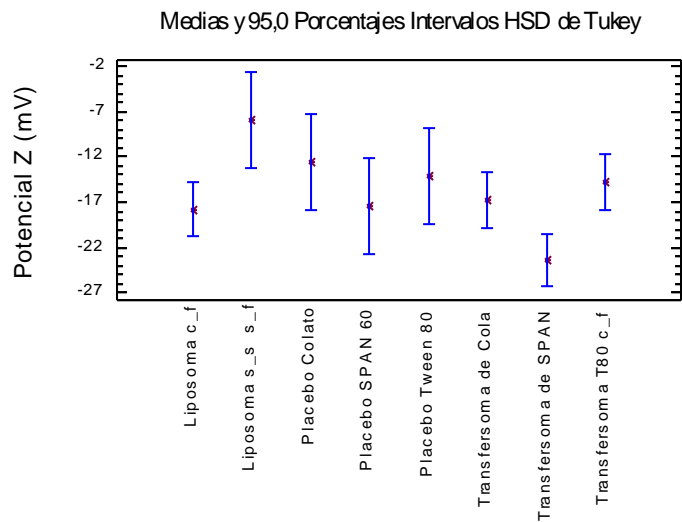


Figura 38. Intervalos de comparación de Tukey del Potencial Z

Tabla 29. Datos de Comparación de muestras multiples Intervalos de Tukey para Potencial Z

Contraste Múltiple de Rango

Método: 95,0 porcentaje LSD		
Frec.	Media	Grupos homogéneos
Transfersoma de10	-23,34	X
Liposoma c_f 9	-17,8	X
Placebo SPAN 603	-17,5	X
Transfersoma de9	-16,8667	X
Transfersoma T89	-14,8111	X
Placebo Tween 83	-14,1333	XX
Placebo Colato 3	-12,6167	XX
Liposoma s_s s3	-7,96333	X

Contraste	Diferencias	+/- Límites
Liposoma c_f - Liposoma s_s s_f	*-9,83667	5,4779
Liposoma c_f - Placebo Colato	-5,18333	5,4779
Liposoma c_f - Placebo SPAN 60	-0,3	5,4779
Liposoma c_f - Placebo Tween 80	-3,66667	5,4779
Liposoma c_f - Transfersoma de Co	-0,933333	3,87346
Liposoma c_f - Transfersoma de SP	*5,54	3,77538
Liposoma c_f - Transfersoma T80 c	-2,98889	3,87346
Liposoma s_s s_f - Placebo Colato	4,65333	6,70903
Liposoma s_s s_f - Placebo SPAN 60	*9,53667	6,70903
Liposoma s_s s_f - Placebo Tween 80	6,17	6,70903
Liposoma s_s s_f - Transfersoma de Co	*8,90333	5,4779
Liposoma s_s s_f - Transfersoma de SP	*15,3767	5,40899
Liposoma s_s s_f - Transfersoma T80 c	*6,84778	5,4779
Placebo Colato - Placebo SPAN 60	4,88333	6,70903
Placebo Colato - Placebo Tween 80	1,51667	6,70903
Placebo Colato - Transfersoma de Co	4,25	5,4779
Placebo Colato - Transfersoma de SP	*10,7233	5,40899
Placebo Colato - Transfersoma T80 c	2,19444	5,4779
Placebo SPAN 60 - Placebo Tween 80	-3,36667	6,70903
Placebo SPAN 60 - Transfersoma de Co	-0,633333	5,4779
Placebo SPAN 60 - Transfersoma de SP	*5,84	5,40899
Placebo SPAN 60 - Transfersoma T80 c	-2,68889	5,4779
Placebo Tween 80 - Transfersoma de Co	2,73333	5,4779
Placebo Tween 80 - Transfersoma de SP	*9,20667	5,40899
Placebo Tween 80 - Transfersoma T80 c	0,677778	5,4779
Transfersoma de Co - Transfersoma de SP	*6,47333	3,77538
Transfersoma de Co - Transfersoma T80 c	-2,05556	3,87346
Transfersoma de SP - Transfersoma T80 c	*-8,52889	3,77538

* indica una diferencia significativa.

Anexo V. Datos de Elasticidad de Liposomas

Tabla 30. Datos de elasticidad de liposomas

Lote	Promedios		% conservación de tamaño	% pérdida tamaño
	T. inicial	T. final		
S/S S/F	225	128	57.0180	42.9819
Placebo SPAN® 60	163.4666	144.5	88.3972	11.6027
Placebo TWEEN® 80	163.9333	125.5666	76.5961	23.4038
Placebo Colato	119.6	78.6	65.7190	34.2809
TWEEN® 80	142.4666	79.3	55.6621	44.3378
Colato	133.3333	94	70.5000	29.4999
SPAN® 60	125.6666	125.1	99.5491	0.4508
Sin surfactante	151	115.7666	76.7513	23.2486

Anexo VI. Eficiencia de encapsulación de diclofenaco en Liposomas

Tabla 31. Datos de eficiencia de encapsulamiento de liposomas

Cuantificación de total de suspensión de liposomas cargados para Permeación				
Componente	Volumen (mL)	A	mg/mL	Promedio
TWEEN® 80	200	0.2638	1.1036	1.0482
		0.2411	1.0124	
		0.2451	1.0285	
Colato	100	0.0969	0.8657	0.8453
		0.0933	0.8368	
		0.0929	0.8336	
SPAN® 60	100	0.1764	1.5048	1.4801
		0.1727	1.4750	
		0.1709	1.4606	
S/S	200	0.0605	0.2865	0.3049
		0.0622	0.2934	
		0.0725	0.3348	

Cuantificación de suspensión de liposomas

Tabla 32. Datos de cuantificación de suspensión de liposomas

Cuantificación de diclofenaco en liposomas completo					
Lote evaluado	Absorbancia	Concentración			
		n			
		mcg/mL	mcg/mL	mg/mL	Media
TWEEN® 80	0.1772	6.0450	1511.2540	1.5112	1.5128
	0.1757	5.9967	1499.1961	1.4991	
	0.1793	6.1125	1528.1350	1.5281	
Colato	0.1437	4.9678	1241.9614	1.2419	1.2060
	0.1373	4.7620	1190.5144	1.1905	
	0.1367	4.7427	1185.6913	1.1856	
SPAN® 60	0.1799	6.1318	1532.9581	1.5329	1.4967
	0.1778	6.0643	1516.0771	1.5160	
	0.1685	5.7652	1441.3183	1.4413	
S/S	0.1235	4.3183	1079.5819	1.0795	1.0889
	0.1245	4.3504	1087.6205	1.0876	
	0.126	4.3987	1099.6784	1.0996	

Anexo VII. Cinética de Permeación

Datos Tween 80

Tabla 33. Permeación de diclofenaco en liposomas elásticos con Tween 80

Celda	1	2	3	4	5	Media
Tiempo (h)	mcg/cm ²					
1	35.6694	29.0922	17.6275	26.0233	22.7942	26.2413
2	102.1415	77.7331	77.3770	64.5048	91.8179	82.7149
3	161.9061	129.8444	104.0332	126.2096	147.2644	133.8515
4	183.5000	135.1124	117.0664	175.1715	153.6619	152.9024
5	183.5329	175.4777	130.9615	215.8169	162.4427	173.6463
6	224.6986	255.2885	163.8201	234.9698	177.7543	211.3063
7	229.4890	267.5755	256.8343	313.3301	251.0699	263.6598

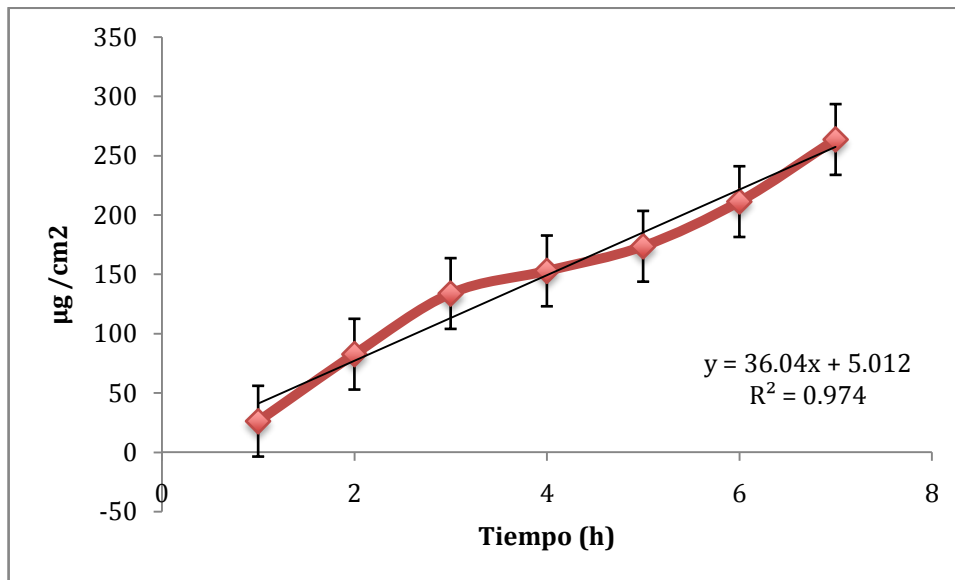


Figura 39. Gráfico de Permeación Liposomas elásticos TWEEN® 80 c/d

Datos SPAN® 60

Tabla 34. Permeación de diclofenaco en liposomas elásticos SPAN® 60

Celda	1	2	3	4	5	Media
Tiempo (h)	$\mu\text{g}/\text{cm}^2$					
1	103.7253	96.6456	94.8242	94.3376	85.4816	95.0028
2	133.8473	134.6236	110.5804	132.7047	127.3736	127.8259
3	154.8153	149.6528	136.0423	149.8842	146.6753	147.4140
4	201.0837	165.2866	163.8848	208.5858	169.4590	181.6600
5	207.7925	174.3651	183.0649	165.5485	175.1291	181.1800
6	219.9201	212.2093	226.0897	223.6752	196.6613	215.7111
7	236.7345	228.2105	232.7685	249.2811	209.4754	231.2940

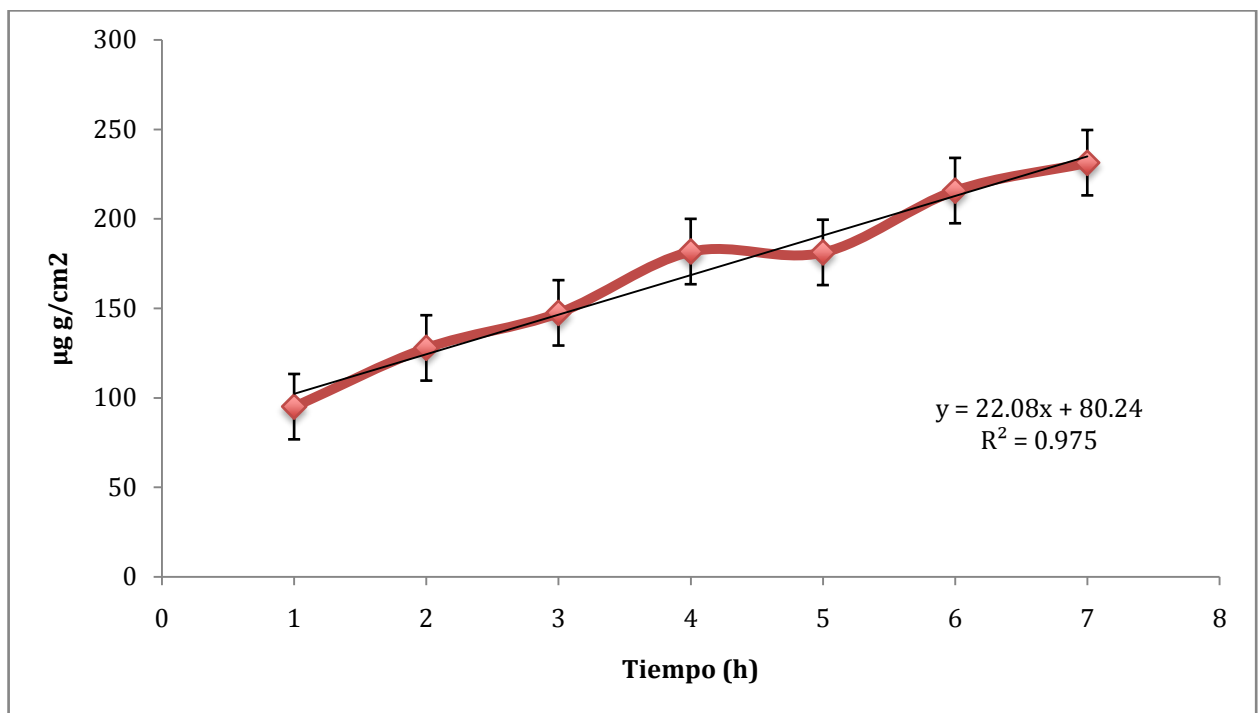


Figura 40. Gráfico de Permeación Liposomas elásticos SPAN 60 c/d

Datos Colato de sodio

Tabla 35. Permeación de diclofenaco en liposomas elásticos Colato de sodio

Celda	1	2	3	4	5	Media
Tiempo (h)	$\mu\text{g}/\text{cm}^2$					
1	35.6694	50.9488	45.5470	45.8090	42.3427	44.0634
2	129.1296	119.3664	116.1058	121.8433	112.4905	119.7871
3	154.8102	160.3203	154.1677	141.1640	139.5184	149.9961
4	201.0770	165.5247	162.2812	144.5970	145.7034	163.8366
5	207.7856	177.0598	164.2885	145.1527	148.8528	168.6279
6	219.9128	197.2413	185.7482	159.8303	181.5050	188.8475
7	236.7266	199.6683	200.9975	188.2081	209.1608	206.9523

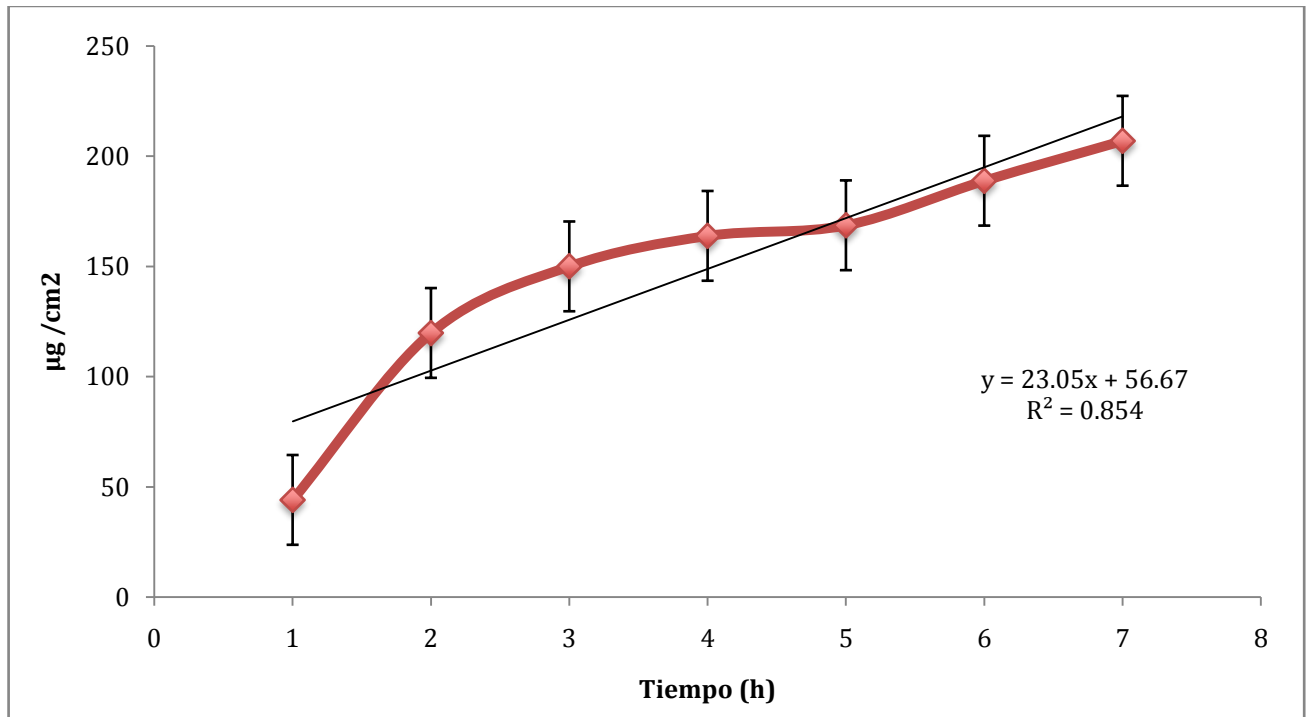


Figura 41. Gráfico de Permeación Liposomas elásticos Colato de sodio c/d

Datos Liposomas convencionales

Tabla 36. Permeación de diclofenaco en liposomas convencionales.

Celda	1	2	3	Media
Tiempo (h)	$\mu\text{g}/\text{cm}^2$			
1	35.6706	35.6706	35.6706	35.6706
2	30.1407	84.8395	105.6215	73.5339
3	55.9451	96.5452	113.2524	88.5809
4	65.4065	118.7386	113.4792	99.2081
5	164.5295	217.4092	168.7711	183.5699
6	189.5480	243.1569	223.5430	218.7493
7	191.5055	284.6326	358.0187	278.0522

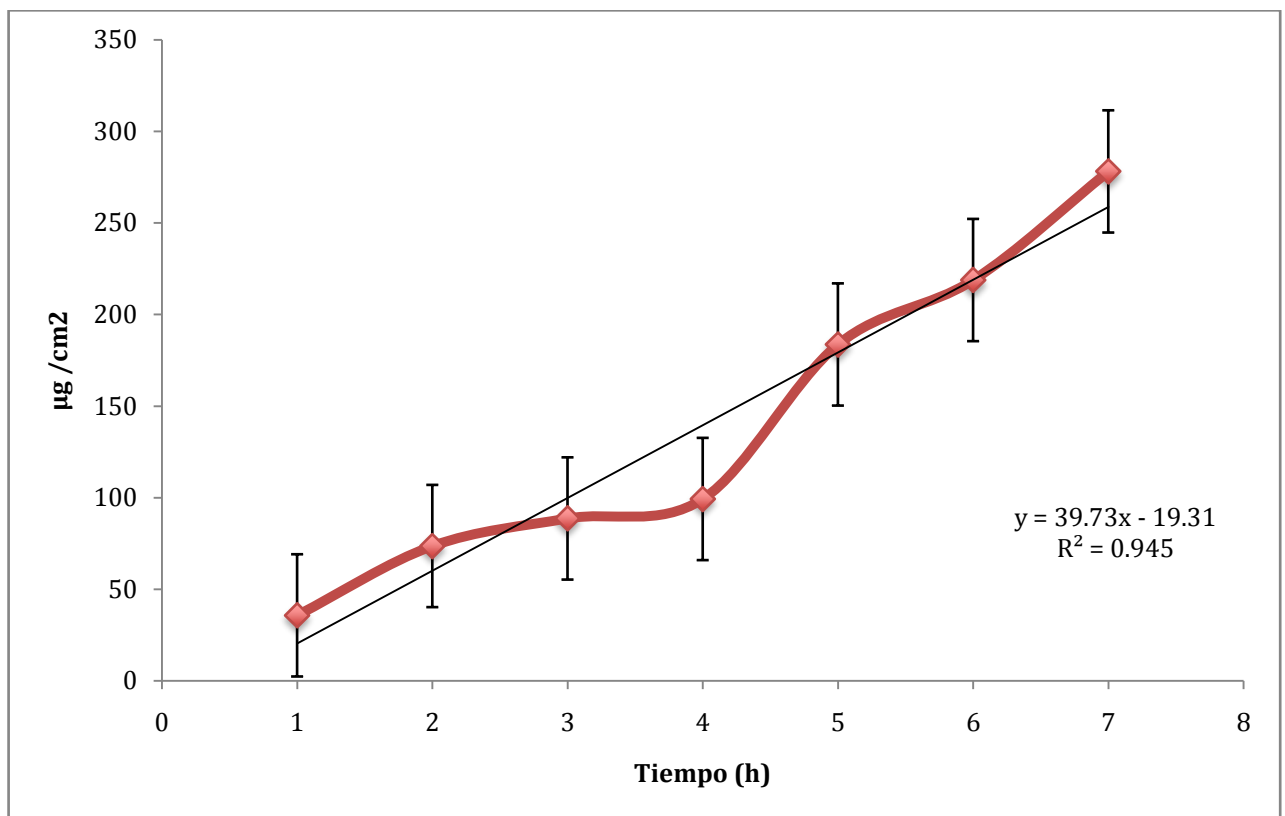


Figura 42. Gráfico de Permeación Liposomas convencionales

Anexo VIII. Datos de flujo en las permeaciones

Tabla 37. Datos de flujo 1 (tiempo 1 a 4 h)

	Flujo($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)/h			
Cel da	Liposomas elásticos Tween 80	Liposomas elásticos SPAN 60	Liposomas elásticos Colato	Liposomas convencionales
1	50.326	14.753	52.19	11.501
2	37.017	22.095	38.468	26.091
3	32.487	23.264	38.826	24.106
4	50.915	35.992	31.568	67.896
5	44.805	27.123	33.711	

Tabla 38. ANOVA Flujo 1

RESUMEN						
<i>Grupos</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>		
Liposomas elásticos Tween 80	5	215.55	43.11	66.4586		
Liposomas elásticos SPAN 60	5	123.227	24.6454	60.2890		
Liposomas elásticos Colato	5	194.763	38.9526	64.3		
Liposomas convencionales	4	129.594	32.3985	601.7760		
ANÁLISIS DE VARIANZA						
<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	969.9523	3	323.3174	1.8872	0.1751	3.2873
Dentro de los grupos	2569.8051	15	171.3203			
Total	3539.7575	18				

Tabla 39. Datos de flujo 2 (tiempo 4 al 7 h).

	Flujo($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)/h			
CEL DA	Liposomas elásticos Tween 80	Liposomas elásticos SPAN 60	Liposomas elásticos Colato	Liposomas convencionales
1	17.913	24.491	11.908	40.322
2	47.72	22.662	12.261	52.343
3	45.216	24.968	13.761	78.839
4	43.363	18.021	14.551	11.905
5	30.754	14.158	22.302	

Tabla 40. ANOVA flujo 2.

RESUMEN						
<i>Grupos</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>		
Liposomas elásticos Tween 80	5	184.966	36.9932	156.5586		
Liposomas elásticos SPAN 60	5	104.3	20.86	21.5709		
Liposomas elásticos Colato	5	74.783	14.9566	18.0272		
Liposomas convencionales	4	183.409	45.8522	771.0849		
ANÁLISIS DE VARIANZA						
<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	2772.1726	3	924.0575	4.4743	0.0196	3.2873
Dentro de los grupos	3097.8824	15	206.525499			
Total	5870.0551	18				

Tabla 41. Diclofenaco total permeado por celda

CELDA	Liposomas elásticos Tween 80	Liposomas elásticos SPAN 60	Liposomas elásticos Colato	Liposomas convencionales
1	650.6472	671.1897	671.1897	542.9565
2	758.6302	647.0225	566.0996	806.9903
3	728.1768	659.9453	569.8681	1015.0546
4	888.3536	706.7620	533.6077	
5	711.8334	593.9048	593.0128	

Tabla 42. ANOVA diclofenaco total permeado.

RESUMEN						
<i>Grupos</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>		
Liposomas elásticos Tween 80	5	3737.6414	747.5282	7747.3967		
Liposomas elásticos SPAN 60	5	3278.8244	655.7648	1689.8023		
Liposomas elásticos Colato	5	2933.7781	586.7556	2676.2055		
Liposomas convencionales	3	2365.0016	788.3338	55980.1954		
ANÁLISIS DE VARIANZA						
<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	104103.7501	3	34701.2500	3.0285	0.0647	3.3438
Dentro de los grupos	160414.0098	14	11458.1435			
Total	264517.7599	17				

Anexo IX. Determinación de solubilidad del diclofenaco en solución amortiguadora de fosfatos pH=6.5

Tabla 43. Solubilidad del diclofenaco en solución amortiguadora de fosfatos pH=6.5.

Muestras	Absorbancia	mg/mL	Media (mg/mL)
1	0.2952	1.2419	1.2482
2	0.3015	1.2672	
3	0.3322	1.3906	
4	0.2582	1.0932	

Anexo X. Selectividad del método

Tabla 44. Barridos de diclofenaco en solución amortiguadora de fosfatos pH=6.5 y solución amortiguadora de fosfatos pH=6.5 en contacto con piel abdominal humana por 24 h.

Longitud de onda en nm	Absorbancia del diclofenaco en solución amortiguadora de fosfatos pH=6.5	Absorbancia del diclofenaco en solución amortiguadora de fosfatos pH=6.5 en contacto con piel abdominal humana por 24 h
200	1	1.17
220	0.8	1.12
250	0.45	0.5
270	0.59	0.7
280	0.57	0.63
300	0.26	0.37
320	0.01	0.02
350	0.01	0.02
370	0.01	0.01
400	0.01	0.01

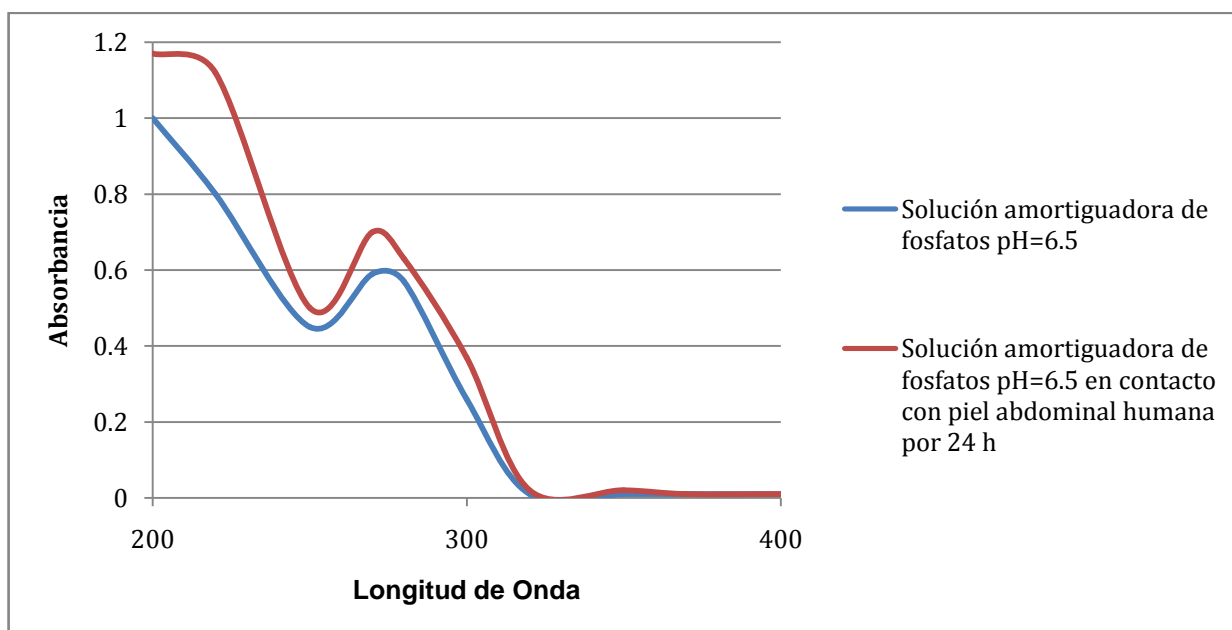


Figura 43. Barridos de diclofenaco para selectividad