



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

ESTUDIO DE LA PERMEABILIDAD TRANSDÉRMICA DE
NANOPARTÍCULAS DE PLATA

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA:

JOSÉ LUIS RODRÍGUEZ RAMÍREZ

ASESOR:

Dra. ADRIANA GANEM RONDERO

CUAUTITLÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO 2014



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**

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

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



**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

Estudio de la permeabilidad transdérmica de nanopartículas de plata

Que presenta el pasante: José Luis Rodríguez Ramírez
Con número de cuenta: 405028528 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 12 de noviembre de 2013.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	DESS. Rodolfo Cruz Rodríguez	
VOCAL	QFB. Guadalupe Rebollar Barrera	
SECRETARIO	Dra. F. Adriana Ganem Rondero	
1er. SUPLENTE	Dr. José Juan Escobar Chávez	
2do. SUPLENTE	M. en C. Ma. Guadalupe Nava Arzaluz	

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

Agradecimientos.

A la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán por darme la oportunidad de obtener una parte importante de mi formación académica.

A Dra. Norma Laura Delgado por el apoyo otorgado para realizar las imágenes de Microscopia de Transmisión Electrónica.

A mi asesora de tesis Dra. Adriana Ganem Rondero, por su apoyo incondicional, por confiar en mí, por transmitirme sus conocimientos y en especial le agradezco por darme la oportunidad de realizar este trabajo ya que siempre me demostró su calidad, no solo como profesora sino también como un excelente ser humano.

Al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (IN216313-3) y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (129320) por el apoyo económico brindado para la elaboración de este proyecto.

A el Técnico Draucin Jiménez del taller de vidrio de soplado (FES Cuautitlán) por el apoyo en la elaboración de piezas de vidrio utilizadas para este proyecto.

Dedicatorias.

A Dios. Por darme la oportunidad de terminar este trabajo de tesis a pesar de todas las adversidades y momentos de desesperación.

A mi mamá y papá. Ustedes son parte fundamental de este éxito, siendo en todo momento mi pilar para nunca caer. Les agradezco todo su apoyo durante todo este tiempo, gracias por todas sus palabras de aliento y porque me dieron esta increíble oportunidad de realizar este sueño. Los amo y con ustedes aprendí que las cosas solamente pueden salir bien.

A mi hermano Omar Rodríguez. Eres una parte muy importante en mi desarrollo como persona, soportaste todos mis desvelos mientras estudiaba, mis malos momentos y siempre me apoyaste incondicionalmente para realizar este sueño. Te amo y siempre estaremos juntos para enfrentar cualquier situación, sabes que eres mi mejor amigo.

A mi tía Dra. Mercedes Rodríguez Villafuerte. Por ser una inspiración para estudiar en la UNAM. Te agradezco todo el apoyo que siempre le has otorgado a mi familia, en especial agradezco tus consejos, eres un gran ser humano.

A la familia Ramírez. Son las mujeres más valientes y generosas, demuestran en todo momento que en este mundo habitan personas con grandes sentimientos como ustedes. En especial agradezco y dedico este trabajo a mi abuela “maru” por ser un ejemplo de vida ya que siempre me has demostrado el buen corazón que tienes, enseñándome que siempre debes luchar por lo que quieres con entusiasmo y humildad. Eres una persona increíble a la cual admiro y quiero muchísimo.

A mis primos Sandy, Fer, Oscar y Gera. Son los mejores amigos que se puede tener. Agradezco por todos los momentos agradables e inigualables que he compartido a su lado y por ser mis cómplices en todas nuestras aventuras.

A la familia Flores. Estoy muy feliz de tener personas como ustedes en mi vida., siempre apoyando en cualquier situación. Gracias por siempre estar cerca.

A todos mis amigos. Por todos los momentos que compartimos, cada uno de ustedes aportó algo para poder crecer como ser humano y profesionalista.

En general agradezco a todas las personas que directa o indirectamente formaron parte de una de las mejores etapas de mi vida durante la universidad.

“Por mi raza hablara el espíritu”

“Todo lo que somos es el resultado de qué hemos pensado; está fundado en nuestros pensamientos y está hecho de nuestros pensamientos”. Amor, Voluntad y Sabiduría.

Índice General.

ÍNDICE GENERAL	1
ÍNDICE DE FIGURAS	3
ÍNDICE DE TABLAS	3
ÍNDICE DE GRÁFICAS	3
LISTA DE ABREVIATURAS	4
RESUMEN	5
1. MARCO TEÓRICO	6
1.1. INTRODUCCIÓN	6
1.2. PIEL	7
1.2.1.1. <i>Características Generales</i>	7
1.2.2. <i>Constitución de la piel</i>	8
1.2.2.1. <i>Epidermis</i>	8
1.2.2.2. <i>Dermis</i>	16
1.3. SISTEMAS DE LIBERACIÓN DE FÁRMACOS A TRAVÉS DE LA PIEL	18
1.3.1. <i>Ventajas y desventajas de los sistemas de liberación de fármacos en la piel</i>	18
1.4. RUTAS DE TRANSPORTE DE FÁRMACOS A TRAVÉS DE LA PIEL	19
1.5. ABSORCIÓN PERCUTÁNEA	21
1.5.1. <i>Factores limitantes en la absorción</i>	21
1.5.2. <i>Transporte de fármacos en la piel</i>	23
1.5.3. <i>Modelo matemático (ley de Fick)</i>	23
1.6. MECANISMOS QUE INCREMENTAN LA ABSORCIÓN PERCUTÁNEA	25
1.6.1. <i>Promotores de absorción químicos</i>	25
1.6.2. <i>Promotores de absorción físicos</i>	27
1.7. CUANTIFICACIÓN DE FARMACOS EN PIEL	28
1.7.1. <i>Métodos in vivo</i>	28
1.7.2. <i>Métodos in vitro</i>	29
1.8. NANOPARTÍCULAS DE PLATA	30
1.8.1. <i>Obtención de nanopartículas de plata</i>	30
1.8.2. <i>Propiedades físicas</i>	33
1.8.3. <i>Propiedades químicas</i>	33
1.8.4. <i>Nanopartículas de plata como agentes antimicrobiano</i>	34
2. OBJETIVOS	35
2.1. OBJETIVO GENERAL	35
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	35

3. METODOLOGÍA.....	36
3.1. DIAGRAMA DE FLUJO.....	36
3.2. DETERMINACIONES PREVIAS.....	37
3.3. CURVAS DE CALIBRACIÓN.....	38
3.4. ESTUDIOS DE PERMEACIÓN DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA A TRAVÉS DE PIEL <i>IN VITRO</i>	38
3.5. PREPARACIÓN DE MUESTRAS PARA MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN (TEM).....	39
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	40
5. CONCLUSIONES.....	53
6. PERSPECTIVAS.....	54
7. REFERENCIAS.....	55
ANEXOS.....	60
ANEXO I. DATOS ESTUDIO DE PERMEACIÓN.....	60
ANEXO II. FLUJOS OBTENIDOS PARA ESTUDIOS DE PERMEACIÓN.....	66
ANEXO III. PRUEBAS ESTADÍSTICAS.....	68

Índice de Figuras.

Figura 1. Capas de la piel.	8
Figura 2. Representación esquemática de las capas de la epidermis.....	9
Figura 3. Estrato córneo.....	12
Figura 4. Representación esquemática de la Dermis.....	16
Figura 5. Vías de transporte a través de la piel.....	20
Figura 6. Celda de difusión tipo Franz.	30
Figura 7. Diagrama de flujo de la metodología general seguida en el trabajo.	36
Figura 8. Barrido del complejo phen-brom.	40
Figura 9. Barrido de complejo NpsAg-phen-brom.....	41
Figura 10. Fotografías de piel al término de las permeaciones en celdas de Franz.....	48
Figura 11. Fotografías por microscopía electrónica de transmisión (TEM).	51

Índice de Tablas.

Tabla 1. Funciones de la Piel.....	7
Tabla 2. Componentes de la epidermis y su función.....	13
Tabla 3. Factores limitantes en la absorción.....	22
Tabla 4. Promotores de absorción químicos.....	27
Tabla 5. Datos Curva de calibración. Complejo Nps Ag-Phen-Brom.	41
Tabla 6. Cantidad de nanopartículas de plata en el medio receptor/unidad de área de piel expuesta. ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$).....	44
Tabla 7. Cantidad acumulada de nanopartículas de plata/área de piel expuesta. ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)..	46
Tabla 8. Flujos obtenidos en las pruebas de permeación ($\mu\text{g}/\text{cm}^2\text{h}$).....	49

Índice de Gráficas.

Gráfica 1. Curva de calibración para las nanopartículas de plata.....	42
Gráfica 2. Cantidad de nanopartículas permeadas/unidad de área de piel expuesta.	45
Gráfica 3. Cantidad acumulada de nanopartículas de plata/área de piel.	46
Gráfica 4. Flujos obtenidos durante las permeaciones de nanopartículas de plata en piel. ($\mu\text{g}/\text{cm}^2\text{ h}$).....	49
Gráfica 5. Dispersión absorbancia vs concentración.....	68
Gráfica 6. Histograma distribución normal para la concentración de NP-Ag.....	69

Lista de abreviaturas.

Abreviatura	Significado	Abreviatura	Significado
°C	Grados centígrados	PEG	Polietilenglicol
µg	microgramos	pH	Iones hidronio
Abs	Absorbancia	phen	Fenantrolina
Brom	Bromopirogalol	Phen-Brom	Fenantrolina-Bromopirogalol
C.V.	Coefficiente de variación	PVP	polivinilpirrolidona
cm	Centímetros	r ²	Coefficiente de determinación
Conc.	Concentración	TEM	Microscopía electrónica
D.E.	Desviación Estándar	UV-Vis	Ultravioleta-visible
EDTA	Ácido etilendiaminotetracético	W/O	Agua en aceite
Ec	Etrato Córneo		
EtOH	Etanol		
h	Hora		
Kg.	Kilogramo		
KHz	kilohercio		
M	Molaridad		
Min.	Minuto		
ml.	Mililitro		
mm.	Milímetro		
nm.	Nanómetro		
NMF.	Factor de retención hídrico		
Np.	Nanopartículas		
Nps-Ag	Nanopartículas de plata		
O/W	Aceite en agua		

RESUMEN.

La administración transdérmica de fármacos ha sido profundamente estudiada en años recientes, debido a que nuevas tecnologías han surgido como novedosas alternativas que permiten un mayor control para ser dirigidas a la célula diana, tal es el caso de las nanopartículas ya que poseen una gran estabilidad en fluidos biológicos y cuentan con una mayor posibilidad de escalamiento.

La absorción de cualquier fármaco o partícula a través de la piel se ve limitado por la barrera biológica de este (estrato córneo) el cual es altamente selectivo para el paso de fármacos liposolubles.

Existen dos vías por las cuales un fármaco puede a travesar la piel estas son:

- 1) Vía transpendicular
- 2) Vía transepidérmica

En la primera se efectúa el paso de fármacos a través estructuras diferentes al estrato córneo como: glándulas sudoríparas y folículos pilosos. La segunda vía permite el paso de fármacos por medio del estrato córneo.

Los medios por los cuales podemos determinar la cantidad de un fármaco que pasa por la piel, comprende técnicas *in vitro* e *in vivo*, dentro de los cuales podemos mencionar la técnica más utilizada, determinación empleando celdas de difusión tipo Franz. Esta técnica nos permite conocer la cantidad de fármaco que pasa por la piel a un determinado tiempo de estudio.

En el presente trabajo se evaluó la capacidad que poseen las nanopartículas de plata para a travesar las capas de la piel. Por su gran parecido biológico con la piel humana y simular las condiciones *in vitro*, se utilizó piel de cerdo (oreja) junto con el empleo de celdas de Franz.

1. MARCO TEÓRICO.

1.1. Introducción.

Son bien conocidas en la industria farmacéutica las vías de administración por las que un fármaco puede ingresar al organismo. De ellas, la vía oral y la parenteral son vías tradicionales y comúnmente empleadas en la formulación de un medicamento.

Hoy en día existen numerosas investigaciones acerca de la formulación de medicamentos que pueden ser administrados por vía transdérmica. Esta vía ofrece diversas ventajas sobre las dos vías antes mencionadas, como la posibilidad de evitar la degradación de fármacos por efecto del pH gástrico o de las enzimas presentes en el tracto gastrointestinal. Además, permite evitar el efecto de primer paso hepático. Por otro lado, esta vía puede aplicarse buscando un efecto puramente local, o bien sistémico, existiendo en el mercado sistemas transdérmicos de liberación controlada (parches con distintos fármacos). Por otro lado la piel representa por su gran tamaño en el organismo una adecuada vía de administración para fármacos que no puedan ser administrados por otras vías o que simplemente se presenten como formulaciones novedosas que contribuyan a una mejora en la función sistémica del organismo.

No obstante, esta vía presenta como principal limitante, su función como barrera de permeación, lo que limita el transporte de fármacos a través de la piel. La barrera de permeación cutánea está constituida por la capa más externa y de hecho la más delgada de todas las capas de la piel, el Estrato córneo (Ec).

Así pues los fármacos deben cumplir con ciertas características fisicoquímicas para poder penetrar en la piel, entre las que se encuentran una lipofilia relativamente alta y un peso molecular bajo (menor a 500 Da).

Además, muchos de los fármacos capaces de penetrar el Ec, lo hacen a una velocidad muy baja o en cantidades reducidas. Es por ello que en las últimas décadas se han propuesto una serie de estrategias para vencer la barrera de permeabilidad, favoreciendo el transporte del fármaco a través del Ec. Estas estrategias consisten en el uso de promotores de absorción de tipo químico y físico. Los promotores químicos incluyen una gran variedad de estructuras (surfactantes o disolventes como el etanol o el propilenglicol) que actúan provocando desorden en los lípidos intercelulares, extrayendo lípidos, desnaturalizando proteínas o incrementando el coeficiente de partición Ec/formulación. Los promotores físicos incluyen técnicas como la iontoforesis (aplicación de corriente eléctrica), la sonoforesis (uso de ultrasonido de baja frecuencia), microagujas y el uso de nanoacarreadores.

Las nanopartículas, sobre todo aquellas con tallas inferiores a los 60 nm, se ha visto que son capaces de penetrar la piel, razón por la cual las formulaciones que emplean nanopartículas han despertado un gran interés en la industria farmacéutica.

1.2. PIEL.

1.2.1.1. Características Generales.

La piel es el órgano de mayor tamaño en nuestro organismo, y desarrolla diversas funciones que permiten un adecuado funcionamiento del mismo. La piel es un sistema bastante complejo el cual no solo cumple con funciones básicas como brindar protección al impedir la entrada de agentes extraños, además de esto, ha resultado ser una excelente vía para la administración de fármacos, por ese motivo podemos decir que la piel, es un órgano de ingeniería única, es la principal forma en que entramos en contacto directo con el entorno (Bouwstra y cols.; 2002).

La función comúnmente conocida de la piel es la de proteger a nuestro organismo frente a factores externos que pueden ocasionar algún daño grave, estos factores pueden ser: ambientales, químicos y microbiológicos, aunque no es de todos conocido, la piel permite la vida mediante algunas de sus principales funciones como: homeostasis, sensación, metabolismo, regulación de la temperatura y control de la pérdida de agua. El ser humano está compuesto aproximadamente de un 70% de agua en todo el organismo y es necesario mantener esta cantidad por lo que la piel actúa como una barrera protectora contra la pérdida de esta (Poet y Mcdougal; 2002). La piel cuenta además con la función de indicar los rasgos únicos de cada individuo como su color, textura y presencia de imperfecciones. Algunas de sus principales funciones se enlistan en la Tabla. 1 (Poet y Mcdougal; 2002).

Tabla 1. Funciones de la Piel.

Función	Serie de Actividades
Barrera	Control de la pérdida de agua y electrolitos. Protección contra agentes físicos, químicos y biológicos.
Sensibilidad	Percepción de estímulos como: frío, calor, dolor, presión, etc.
Regulación de la temperatura	Variación del flujo sanguíneo, sudoración.
Control hemodinámico	Cambios vasculares periféricos
Secreción y excreción	Función glandular, crecimiento de pelo.
Síntesis	Vitamina D.
Función Inmunológica	Actividad de las células de Langerhans.

La superficie total de la piel es aproximadamente de 2500 cm² para niños y de 18000 cm² para el adulto, su peso aproximado es de 4.9 Kg en el hombre y 3.1 Kg en la mujer. Por toda la piel podemos encontrar diversas estructuras macro y micromoleculares que la componen, tal es el caso de los folículos pilosos, los cuales varían de acuerdo al sexo y raza de cada individuo. Las barreras de permeabilidad están situadas en varias capas de células localizadas en la epidermis, mientras que la dermis y la hipodermis otorgan la protección mecánica a nuestro organismo. La epidermis tiene la característica de ser impermeable mientras que la dermis suele ser más permeable, sobre todo en el caso de moléculas hidrofílicas. La epidermis es la capa más externa de la piel y por lo tanto representa la primer barrera de la piel para evitar el paso de sustancias potencialmente nocivas (Poet, Mcdougal; 2002).

1.2.2. Constitución de la piel.

La piel está constituida por tres distintos estratos: Epidermis, dermis e hipodermis. Estas tres capas se esquematizan en la figura 1 y se describen a continuación.

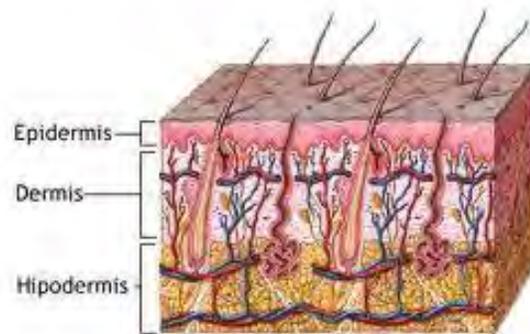


Figura 1. Capas de la piel.
(Junqueira y Carneiro; 2006).

1.2.2.1. Epidermis.

La epidermis es en sí una membrana compleja de múltiples estratos en la cual podemos encontrar de 15 a 25 capas de células apiladas, sin embargo estas varían en el espesor que cada una posee, podemos encontrar capas con espesor desde los 0.06mm hasta los 0.8mm. El origen de la epidermis se localiza en el ectodermo. La epidermis no contiene vasos sanguíneos y por lo tanto los nutrientes y productos de desecho deben difundir a través de la capa de unión dermo-epidérmica con el fin de mantener la integridad del tejido. La epidermis es un epitelio estratificado pavimentoso en el que sus células superficiales se encuentran de manera cornificada. La estratificación es el resultado del cambio en el

interior de los queratinocitos a medida que ascienden al exterior procedentes de la capa basal, en la que continuamente se están formando por mitosis hacia la superficie de la piel y posteriormente se desprenden. La epidermis es la capa externa de la piel y contribuye con varias funciones vitales, como el desarrollo del Ec. Está constituida por cuatro capas, las cuales están representadas en la Figura 2:

- Estrato basal
- Estrato espinoso
- Estrato granuloso
- Estrato córneo (Ec)

Una quinta capa, el estrato lúcido, es algunas veces descrita pero es usualmente considerada como una capa baja del Ec.

Cada estrato está compuesto de varias células cuyo grosor varía en función de la localización anatómica. Los queratinocitos son las principales células que podemos encontrar dentro de las diversas capas que componen a la epidermis. Las células de la epidermis se originan en la lámina-basal. Dentro de esta capa se encuentran diferentes tipos de células como: melanocitos, células de Langerhans y células de Merkel.

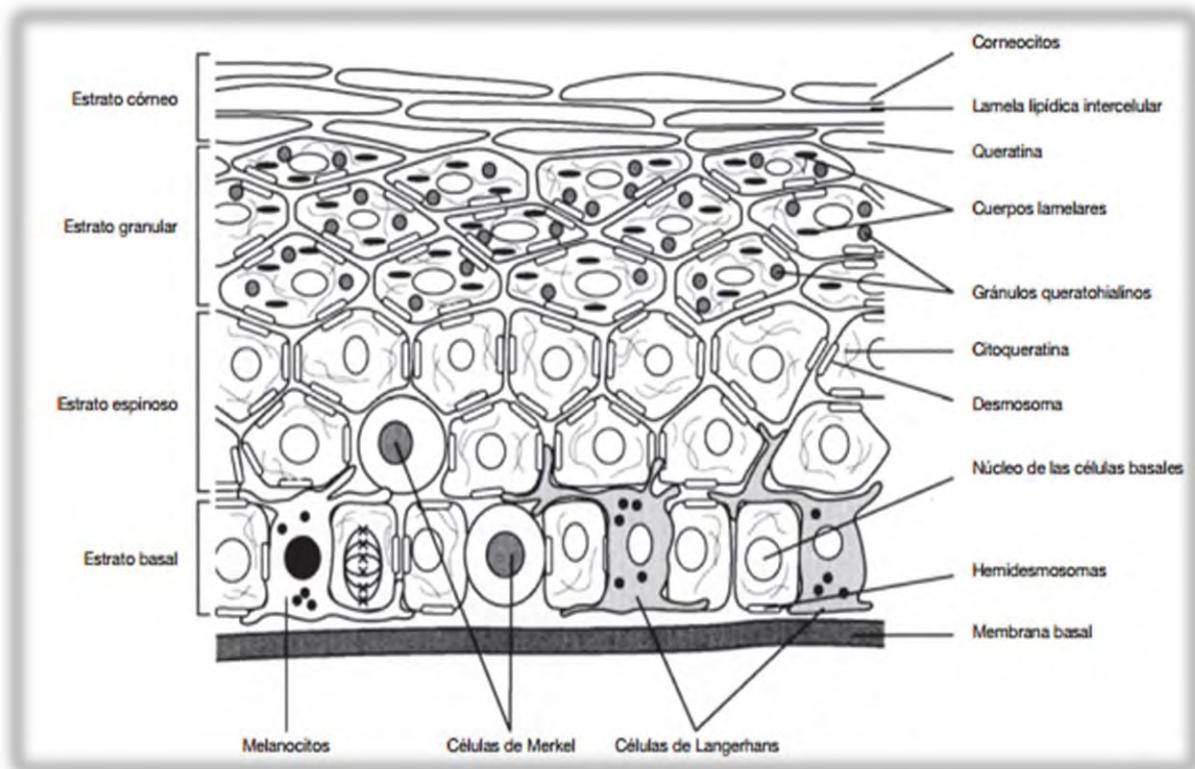


Figura 2. Representación esquemática de las capas de la epidermis. (Williams; 2006).

Estrato basal.

El estrato basal es una capa continua que da origen a todos los queratinocitos, las células de la capa basal son similares a las de otros tejidos que se localizan dentro del cuerpo, ellas contienen los típicos organelos como son mitocondrias y ribosomas, y las células son metabólicamente activas. Esta capa contiene células únicas (queratinocitos) dentro de la epidermis que sufren una división celular vía mitosis. En promedio, las células basales se dividen una vez cada 200 a 400 horas.

En adición a los queratinocitos, el estrato basal contiene otro tipo de células especializadas como los melanocitos. Los melanocitos llevan a cabo la síntesis de melanina, la cual tiene la función de dar energía a la piel por medio de la absorción de rayos UV. Existen el mismo número de melanocitos en una zona del cuerpo determinada en los tipos de piel más oscuros y más claros, pero en la piel más oscura se tiene mayor actividad y eficiencia de melanocitos.

Las células de Langerhans también se encuentran dentro del estrato basal. Estas células se caracterizan por ser células dendríticas y conectar a los queratinocitos. Las células de Langerhans se derivan de la médula ósea y son reconocidas como las células de mayor presencia antigénica dentro de la piel. Los antígenos se unen fácilmente a la superficie de las células, y las células de Langerhans, aunque no son en sí mismas fagocíticas, pueden presentar los antígenos a los linfocitos en los ganglios linfáticos. En comparación con otras membranas del cuerpo, la piel entra en contacto con muchos antígenos potenciales y por lo tanto las células de Langerhans juegan un papel importante en condiciones tales como la dermatitis de contacto alérgica.

Otro tipo de célula especializada que se encuentra dentro del estrato basal son las células de Merkel. Estas células son encontradas en gran cantidad cerca de los sitios sensitivos del cuerpo como los labios y puntas de los dedos. Las células de Merkel son asociadas con terminaciones nerviosas que se encuentran en el lado dérmico de la membrana basal y tienen un rol importante en la sensación cutánea.

Estrato espinoso.

El estrato espinoso (también conocido como la capa espinosa o capa de células espinosas) se encuentra en la parte superior de la capa basal, y junto con estas dos capas se denomina la capa de Malpighi. La capa espinosa consiste de dos a seis filas de queratinocitos que cambian de morfología de células columnares a células poligonales, dando una apariencia de espinas cuando son observadas por medio del microscopio. Las espinas son, en realidad, desmosomas, puentes intercelulares que permiten la adhesión y comunicación entre células. La estructura molecular de los desmosomas está muy bien definida. Están compuestos de

proteínas transmembranales, proteínas de placa y filamentos intermedios asociados a proteínas. Estas moléculas forman conexiones entre las moléculas correspondientes de las células adyacentes.

La diferenciación epidérmica son los cambios estructurales y bioquímicos, como ocurre con la migración de los queratinocitos hacia la epidermis. Este proceso implica la formación de queratina y de la cubierta cornificada a medida que los queratinocitos migran hacia la superficie y los filamentos se agregan en forma de cúmulos de queratina. Los queratinocitos de la capa basal también empiezan la síntesis de los cuerpos lamelares. Tanto la proliferación como la diferenciación están altamente reguladas por una compleja cadena de eventos, controlados por factores de crecimiento, interleucinas, ácido araquidónico y sus metabolitos, vitamina D3, calcio y retinoides.

Estrato granuloso.

A medida que pasan desde el estrato espinoso al estrato granuloso, los queratinocitos continúan con los procesos de diferenciación y síntesis de queratina y empiezan a aplanarse. Solo una de tres capas de células del estrato granuloso contiene enzimas, las cuales comienzan con la degradación de componentes celulares viables como lo es el núcleo y organelos. Las células del estrato granuloso se componen de 1 a 4 hileras de células que contienen gránulos de queratohialina.

Estrato córneo.

El estrato córneo (Ec) es la capa más externa de la piel, la cual actúa como barrera protectora de nuestro cuerpo frente al medio ambiente, especialmente limita la salida de agua y previene el ingreso de microorganismos y compuestos químicos. Está compuesto de células muertas llamadas corneocitos, aproximadamente se encuentran de 12-15 capas de corneocitos en el Ec. El espesor promedio del Ec. es alrededor de 10-20 μm (Garidel y cols.; 2010). La estructura del Ec. (Figura 3) se asemeja a una estructura de ladrillo y mortero donde la queratina y la porción interna de la cubierta cornificada forman los ladrillos y los lípidos forman el mortero que une los corneocitos entre sí, proporcionando una barrera hidrofóbica. El Ec de la epidermis sirve como una barrera a la desecación de las capas de los tejidos y excluye la entrada de sustancias nocivas del medio ambiente. (Pailler-Matei y cols.; 2007).

Las células poliédricas planas que forman esta capa compacta experimentan cambios estructurales y bioquímicos. Estas células están compuestas principalmente de filagrina y queratina, esta última se compone de una porción proteínica interna compuesta de proteínas (involucrina, cistatina A, lorocrina, tricohialina, filagrina), unidas por enzimas

transglutaminasas para formar una cubierta insoluble. La porción externa lipídica de la cubierta celular cornificada es una capa continua de hidroxiceramida que se une covalentemente a la porción interna de la cubierta cornificada. Las clases de lípidos más predominantes que podemos encontrar en el Ec son: colesterol y ceramidas (Bouwstra y cols.; 2002).

El Ec sufre una renovación de células la cual se produce cada 2-3 semanas. Las células se descaman continuamente de la superficie de la piel por un proceso llamado descamación. En la capa externa del Ec que se pierde, los espacios intercelulares son permeables al sudor y al sebo. La muda de las células de la piel sana está en equilibrio con los procesos de proliferación y diferenciación, los tres procesos están influenciados por los lípidos epidérmicos. La interacción entre la porción lipídica de la cubierta celular cornificada y las lamelas intercelulares es importante para la cohesión normal y la barrera contra la permeabilidad epidérmica. Las células muertas que se acumulan durante la descamación del Ec forman el estrato lúcido.

Una característica importante en el Ec es que posee una baja hidratación, conteniendo solo un 20% de agua, razón por la cual el Ec es altamente lipofílico siendo una barrera muy eficiente frente a los fármacos que son administrados en la piel. Además de ser altamente lipofílico, el espacio intercelular que posee es solo de $0.1\mu\text{m}$, no obstante la mayoría de fármacos que son administrados utilizan esta vía como medio de acceso para poder penetrar y dirigirse hacia el sitio de acción.

Debido a que el uso de seres vivos para la experimentación es muy restringido, el modelo animal para la piel humana, es el cerdo. La piel porcina se puede obtener muy fácilmente a partir de granjas o directamente en el rastro. Sus propiedades histológicas y bioquímicas han demostrado que son similares a la piel humana. Estudios indican que el espesor del Ec en la piel porcina es de $21\text{-}26\mu\text{m}$ (Godin y Touitou; 2007).

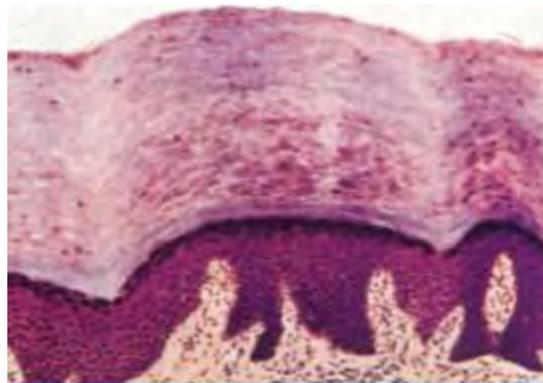


Figura 3. Estrato córneo (Godin y touitou, 2007).

En la tabla 2 se muestran las distintas estructuras que componen la epidermis así como las principales células de cada estrato y su función de estos.

Tabla 2. Componentes de la epidermis y su función.

Componentes de Epidermis	Estructuras celulares	Función
Estrato basal	Melanocitos	Participa en la regeneración de la epidermis
Estrato espinoso	Queratinocitos	Síntesis de queratina
Estrato granuloso	Queratohialina	Barrera a sustancias líquidas
Estrato córneo (Ec)	Corneocitos	Limita la pérdida de agua y entrada de sustancias químicas y biológicas

Células transitorias.

- **Células de Langerhans:** Son células presentadoras de antígeno que son capaces de fagocitar y presentar antígenos procesados a linfocitos T, que pueden iniciar una respuesta inmune primaria, y también a las células T de memoria. Al realizar esta tarea, las células de Langerhans protegen al individuo de infecciones superficiales. Se piensa también que juegan un papel en la prevención del cáncer por su respuesta a los antígenos tumorales.
- **Melanocitos:** Los melanocitos son células dentríticas productoras de melanina que se encuentran principalmente en la capa basal. Los melanocitos de los mamíferos producen dos tipos de melanina: la eumelanina (negra) y la feomelanina (amarilla a marrón-rojiza). La melanina absorbe la luz ultravioleta pero también sirve como destructora de radicales libres.
- **Células de Merkel:** Las células de Merkel son mecanorreceptores de adaptación lenta de tipo 1, que se localizan en la capa basal o justo debajo de ella. Están localizadas principalmente en la almohadilla tilótrica y en el epitelio del pelo, y responden a estímulos táctiles.

Pelo y estructuras.

El pelo es una característica de los mamíferos y protege al individuo de diferentes maneras. Proporciona una barrera física, microbiana y química y ayuda al camuflaje y a la señalización entre animales. La longitud y la densidad del pelo proporcionan aislamiento térmico, mientras que el color y el brillo tienen un papel termorregulador.

El pelo se forma a partir del folículo piloso en el ciclo de crecimiento que es controlado por factores internos y externos. Los folículos pilosos se forman durante el desarrollo embrionario por interacciones complejas entre las células mesenquimatosas y ectodérmicas. Su papel es la producción del pelo en un ciclo claramente definido, para reemplazar la caída por la muda y condiciones patológicas.

Anatómicamente el folículo piloso se divide en tres segmentos: el infundíbulo, el istmo, y el segmento inferior. Cada folículo primario está asociado a un músculo, una glándula sudorípara y una glándula sebácea que, juntos, forman la unidad pilosebácea. Los folículos agrupados, como los que se encuentran en el perro y en el gato, se refieren a folículos en los cuales un pelo primario está asociado a varios pequeños pelos secundarios, cada uno de ellos desembocando en la dermis por la misma apertura. El radio entre los pelos primarios y los secundarios determina los diferentes tipos de capa que se encuentran en las distintas especies y razas de mamíferos. Los folículos pilosos compuestos están agrupados en unidades foliculares que normalmente comprenden tres folículos compuestos.

El folículo piloso representa un importante depósito para la aplicación de sustancias tópicas, el cual se puede comparar con el Ec. El mayor porcentaje de folículo piloso puede ser encontrado en el cuero cabelludo y la frente. El depósito del folículo piloso por lo general se extiende dentro del tejido, alcanzando una profundidad de 2000 μ m, en comparación con el Ec el cual se localiza en la capa más externa de la piel con una profundidad aproximadamente de 5 μ m (Lademann y cols.; 2007).

Glándulas sebáceas.

Las glándulas sebáceas son glándulas simples, alveolares, con un conducto que se abre directamente a la superficie cutánea o en el infundíbulo. Los primeros tipos de glándulas se refieren a las sebáceas libres; y los últimos, a las glándulas pilosebáceas. Su densidad y tamaño depende del lugar anatómico. Son más abundantes alrededor de las uniones mucocutáneas, espacios interdigitales, en la espalda, en la zona anorectal y en la barbilla. Están ausentes en el plano nasal y en las almohadillas plantares.

El sebo tiene un papel protector y de comportamiento. Combinado con el sudor forma una emulsión cérea que proporciona una barrera de protección frente a organismos patógenos. El sebo es rico en ceras y, al recubrir la superficie de la piel y del pelo, controla el sudor y proporciona a los animales una capa brillante que puede contribuir a la reflexión del calor. Las glándulas sebáceas especializadas son capaces de producir feromonas y juegan un papel en el comportamiento animal. En los últimos años, las glándulas sebáceas se han usado en la modulación de la distribución de medicamentos tópicos como los productos para el control de las pulgas.

Los lípidos sebáceos son sintetizados activamente por las glándulas sebáceas y son secretados como el producto de la muerte celular (secreción holocrina). Sin embargo, estudios recientes sugieren que el paso de componentes iónicos al sebo resulta de un transporte paracelular. El sebo es almacenado en las glándulas sebáceas, que son controladas por factores endócrinos y no-endócrinos. En general, los andrógenos estimulan la actividad glandular, aumentando y potenciando la secreción de sebo. Los estrógenos y los glucocorticoides tienden a tener el efecto contrario.

Glándulas sudoríparas.

Las glándulas sudoríparas son glándulas tubulares simples y en espiral. Las que tienen un conducto que se abre en el infundíbulo son conocidas como glándulas epitriquiales (anteriormente “apocrinas”), las que tienen los ductos que se abren directamente en la superficie de la piel son llamadas atriquiales (anteriormente “ecrinas”). En algunas especies, existen glándulas sudoríparas específicas que están implicadas en la producción de olor.

Aunque el sudor no tiene una función universal, protege la piel y sus estructuras específicas, como los párpados y las almohadillas, de daños de fricción; mantiene la flexibilidad de la piel, y proporciona defensas microbianas a través de la presencia de inmunoglobulinas, citoquinas, transferinas e iones inorgánicos como el cloruro de sodio.

La secreción de sudor varía entre las especies, y se describen diferentes modos de secreción. Incluye: muerte celular, transporte paracelular, exocitosis, liberación de pequeños fragmentos de citoplasma apical de las células y transporte transcelular de iones y de agua.

Unión dermoepitelial.

La unión dermoepitelial es la interfase entre la epidermis y la dermis. Está compuesta de la membrana plasmática y la membrana basal. Esta última se divide en: lámina lúcida, lámina densa y sublámina densa.

Los queratinocitos basales están firmemente adheridos a los filamentos proteicos de anclaje que se encuentran en la lámina lúcida, principalmente por los hemidesmosomas. Esta unión célula-sustrato está compuesta por proteínas de placas y proteínas transmembranales. Hay adhesiones focales que se localizan a lo largo del estrato basal de queratinocitos cultivados y se les atribuye la mediación de las adhesiones durante la migración celular.

La lámina densa se compone de colágeno IV, formando una red robusta que restringe el paso de moléculas de la dermis a la epidermis y viceversa, pero permite el paso de las células inmunes en ambos sentidos.

La sublámina densa se localiza debajo de la lámina densa y está formada por fibrillas de anclaje, compuestas por colágeno VII, que se insertan en placas de anclaje en la dermis superficial. Esta intrincada red de moléculas provee una amplia base de adhesión entre la dermis y la epidermis.

1.2.2.2. Dermis.

La dermis consiste principalmente de una matriz extracelular compuesta de colágeno, elastina y glucosaminoglicanos.

La dermis es el mayor componente estructural de la piel (figura 4). Proporciona una matriz para las estructuras de soporte y las secreciones que mantienen e interaccionan con la epidermis y sus anexos. Éstas incluyen el tejido conjuntivo, vasos sanguíneos y linfáticos, nervios y receptores, y componentes celulares. Es una estructura termorreguladora y sensorial importante, que contribuye significativamente al almacenamiento del agua en el cuerpo.

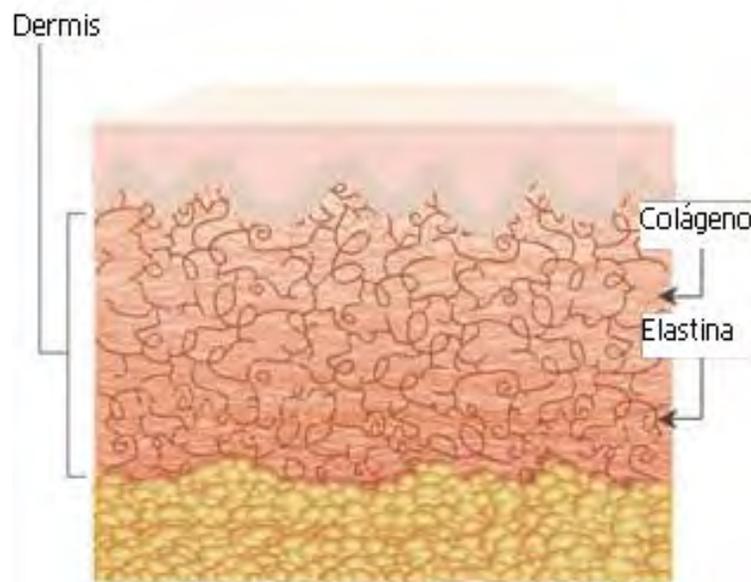


Figura 4. Representación esquemática de la Dermis.
(Godin y toutitou, 2007)

Tejido conjuntivo.

La matriz del tejido conjuntivo dérmico consiste principalmente en fibras de colágeno y elásticas, organizadas en un patrón coherente, principalmente haces de colágeno rodeadas de fibras elásticas. Los componentes no fibrosos consisten en proteoglicanos, una sustancia de base y determinadas glicoproteínas. La dermis superficial se compone de fibras delgadas de colágeno irregularmente distribuidas, y una red de finas fibras de elastina. En la dermis más profunda el colágeno es grueso y denso y las fibras tienden a ir en paralelo a la superficie cutánea; las fibras de elastina también son gruesas pero menos numerosas.

Colágeno.

El colágeno es la mayor proteína extracelular de la dermis, y forma alrededor del 80% de la matriz extracelular. Estas fibras proporcionan fuerza y elasticidad, pero también están involucradas en la migración celular, la adhesión y la quimiotaxis. Son secretadas por los fibroblastos cutáneos. Las fibras son muy resistentes a las proteasas animales pero son degradadas por las colagenasas que secretan principalmente los fibroblastos.

La renovación del colágeno en la dermis es lenta y se controla por componentes celulares dérmicos, en concreto fibroblastos pero también células inflamatorias que son capaces de responder en situaciones particulares como daño cutáneo o heridas por mordedura. La hidroxiprolina, un aminoácido que es un componente abundante y vital de las fibras de colágeno, es liberada durante la degradación del colágeno.

En los individuos adultos, la mayor parte del colágeno dérmico está formado por fibras de tipo I (87%) y III (10%) que se alinean en fibras relativamente grandes. El colágeno de tipo IV, V y VII se encuentra en la membrana basal. El colágeno de tipo V, que representa aproximadamente el 3% del colágeno dérmico, se encuentra cerca de todos los tejidos conectivos.

Fibras elásticas.

Las fibras elásticas forman una red en toda la dermis y también se encuentran en la vaina de los folículos pilosos y en las paredes de los vasos sanguíneos y linfáticos. Están compuestas por dos componentes: elastina y microfibrillas proteicas. La elastina es un material amorfo que forma la médula de las fibras elásticas totalmente maduras, y que está rodeada por una red de microfibrillas.

Glicosaminoglicanos y proteoglicanos.

Estas sustancias son secretadas por los fibroblastos. Originalmente llamados mucopolisacáridos (polisacáridos viscosos), el término fue introducido después (glicano=polisacáridos; glicosamino= que contiene hexosaminas). No obstante, los polisacáridos están normalmente ligados a proteínas y son, entonces, llamados proteoglicanos.

Nervios.

El patrón general de la distribución nerviosa es similar al de los vasos sanguíneos que discurren generalmente los unos al lado de los otros. Un plexo de nervios se encuentran por debajo de la epidermis, y terminaciones de nervios libres penetran también en la epidermis en sí. Redes nerviosas están también asociadas al folículo piloso, a las glándulas sudoríparas y sebáceas y al músculo piloerector. Terminaciones nerviosas encapsuladas se encuentran también en los mecanorreceptores como los corpúsculos de Pacini, que se encuentran en la dermis profunda.

1.3. SISTEMAS DE LIBERACIÓN DE FÁRMACOS A TRAVÉS DE LA PIEL.

La principal función de la piel es proveer una barrera para que el agua pueda ser transportada dentro del cuerpo. La habilidad de una sustancia para penetrar la piel depende de la composición del vehículo. Cuando alguna formulación farmacéutica es aplicada directamente sobre la piel, un alto porcentaje de la formulación no puede atravesar la barrera más compleja de la piel, el Ec.

La asociación de los corneocitos del Ec con los lípidos intercelulares, es crucial para mantener la funcionabilidad de la barrera y poder brindar una capacidad de transporte al agua dentro del organismo.

1.3.1. Ventajas y desventajas de los sistemas de liberación de fármacos en la piel.

Se ha planteado que el éxito de todo sistema terapéutico transdérmico depende de la capacidad de la sustancia de difundir a través de la piel, en cantidades suficientes para lograr el efecto terapéutico deseado. Los sistemas de liberación necesitan poseer determinadas características para poder traspasar la epidermis, si se tiene en cuenta que la permeabilidad de la piel no es idéntica en toda su superficie y que varía entre individuos. Con los nuevos sistemas se regula la penetración a través de la piel conjugando la permeabilidad y la velocidad de liberación del principio activo (Saez y cols.; 2003).

Los sistemas de liberación en la piel ofrecen una serie de ventajas y desventajas frente a la administración convencional, estas se mencionan a continuación:

Ventajas:

- Administración sencilla.
- Liberación gradual y flujo controlado en el tiempo con máxima absorción.
- Ingreso de una cantidad constante de principio activo con niveles sanguíneos uniformes, constantes y sostenidos.
- La administración de activos a través de la piel elimina el efecto de primer paso hepático.
- Útil para sustancias de semivida de eliminación muy corta, generalmente 6 a 8 horas.
- Permite disminuir la frecuencia de administración y la dosis de principio activo.

Desventajas.

- El número de fármacos que pueden ser administrados es reducido.
- Posibles reacciones adversas en el sitio de aplicación.

1.4. RUTAS DE TRANSPORTE DE FÁRMACOS A TRAVÉS DE LA PIEL.

La piel humana selectiva y efectivamente inhibe la penetración de cualquier sustancia química. El elemento más importante de control es generalmente el E_c y técnicas acelerantes usualmente tratan de reducir esta barrera con el fin de maximizar el flujo de los fármacos administrados vía cutánea, aunque en ocasiones la ruta folicular también puede ser relevante (Smith y Maibach; 2006).

En la superficie de la piel, una molécula tiene dos posibles rutas (figura 5) para alcanzar el tejido viable, estas son:

1. Vía Transpendicular, la cual se divide en:
 - Transfolicular: a través de los folículos pilosos y las glándulas sebáceas.
 - Transudorípara: a través de los conductos y glándulas sudoríparas.

2. Vía Transepidérmica: la cual pasa a través del estrato córneo (Ec).

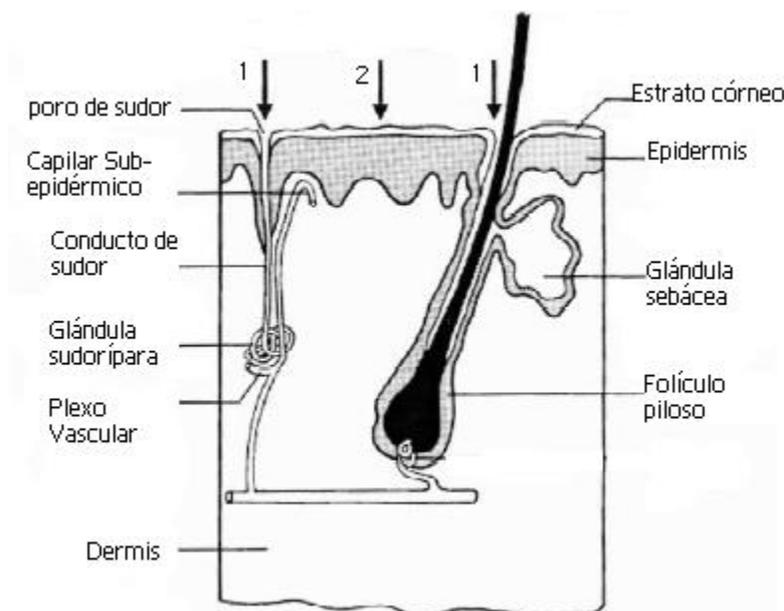


Figura 5. Vías de transporte a través de la piel.

1) Vía transpendicular, 2) Vía transepidérmica. (Smith y Maibach, 2006).

De manera general se puede decir que las vías por las cuales un fármaco ingresa a la circulación sistémica, pueden ser la epidérmica y folicular, con predominio de la primera. El paso de los fármacos por cualquiera de las diferentes vías de acceso se desarrolla en dos pasos. Tras su administración se establece, en primer lugar, un gradiente de concentración de fármaco desde las distintas vías de entrada. En un segundo paso, el fármaco pasa a través de la piel por difusión pasiva consiguiéndose un flujo del mismo normalmente constante a lo largo de todo el espesor de la piel (Barry, 2002).

La vía de paso mayoritaria es la transepidérmica debido a que el Ec ocupa cerca del 99% de la superficie cutánea. Dentro de esta vía se presentan dos microrutas por las cuales los fármacos pueden tener acceso a la circulación. La primer vía es la intracelular, esta vía supone el paso de los fármacos a través de las membranas córneas y los lípidos que impregnan la queratina; la segunda microruta de acceso es la vía intercelular, la cual supone el paso de los fármacos por el espacio lipídico intercelular que une las células del Ec, esta vía no representa un acceso fácil para los fármacos y es prácticamente despreciable debido a que solo representa el 1% de espacio en el Ec (Yamashita y Hashida, 2003). Ambas vías de penetración están implicadas en la permeación de un fármaco y cualquiera de las dos vías podrá ser utilizada, dependiendo de las características fisicoquímicas que posea el fármaco.

1.5. ABSORCIÓN PERCUTÁNEA.

Los procesos mediante los cuales un fármaco ingresa al organismo se pueden explicar de la siguiente manera:

- Liberación: Se favorece cuando el principio activo se encuentra en forma dispersa.
- Adsorción: Es el proceso mediante el cual el fármaco queda retenido en la superficie de la piel, generalmente por uniones fisicoquímicas a componentes cutáneos de elevado peso molecular.
- Penetración: Depende de la afinidad del principio activo por la capa córnea y puede ser favorecida por productos que la mejoren y por propiedades oclusivas de los excipientes.
- Permeación: Consiste en el paso del fármaco a través de la piel por difusión desde una capa histológica a otra totalmente distinta.
- Absorción: Es el proceso que sufre el fármaco tras su aplicación sobre la piel para acceder a la circulación sistémica.

1.5.1. Factores limitantes en la absorción.

Factores inherentes de la estructura de la piel.

Zona de la piel: El grosor de la misma y el grado de vascularización provocan una gran variabilidad en la tasa de absorción, siendo baja en regiones plantares (1%) y elevado en la región escrotal (42%). Las fricciones aumentan el riego sanguíneo local y por tanto, la absorción.

Estado de la piel: Las lesiones cutáneas que provocan la pérdida de Ec hacen que aumente el grado de absorción.

Temperatura de la piel: Al aumentar la temperatura se incrementa la vasodilatación y la energía disponible para la difusión pasiva.

Edad: La absorción de sustancias es mayor en la infancia y menor en la vejez.

pH: Se sabe que la forma no ionizada se absorbe mejor que la forma ionizada.

Hidratación de la piel: Ya que se establece un equilibrio entre el grado de hidratación de los diversos compartimientos estructurales de la piel, el contenido en agua dependerá de la existencia de sustancias que por su característica hidrofílica o por su constitución molecular la retengan. La hidratación de la capa córnea está influenciada por la composición de las secreciones de los órganos anexos. Las glándulas sudoríparas aportan un alto contenido hídrico, mientras las glándulas sebáceas ofrecen lípidos hidrófilos (colesterol y derivados)

formándose una microemulsión O/W o W/O denominada manto hidrolipídico. Este se extiende por la superficie de la capa córnea proporcionando el grado de humedad, lubricación y elasticidad propia de cada piel. (Villarino y Landoni, 2006).

En las restantes capas de la epidermis la retención de agua se debe al llamado factor de retención hídrico NMF (Factor de retención hídrico) constituido por diversos tipos de moléculas (ácido úrico, lactato sódico, citrato, etc.). En la dermis, el papel que desempeñan los mucopolisacáridos (ácido hialurónico, sulfato de condroitina, etc.) es fundamental debido a su alto número de grupos polares que posibilitan la retención de agua (Santos, Guerrero; 1994).

Factores inherentes a la forma farmacéutica.

Coefficiente de reparto octanol/agua: Es conocido que a mayor coeficiente de reparto O/W aumenta el grado de absorción, este es el caso de las hormonas sexuales donde debido a su alto coeficiente, la posibilidad de absorción sistémica es bastante grande, caso contrario sucede con los corticoides que tendrán una menor absorción.

Peso molecular: Presenta una relación inversa frente a la difusión.

Concentración: Presenta una correlación directa en cuanto a la velocidad de penetración siempre que no se supere el límite de solubilidad del fármaco en el vehículo.

Otros factores vendrán condicionados al vehículo, pudiendo interactuar tanto a nivel de la piel como del principio activo que vehiculiza. Una interacción vehículo/principio activo influye en la mayor o menor liberación o cesión del fármaco. La utilización de coadyuvantes como los tensoactivos, aceleradores en las formulaciones tópicas, pueden modificar el grado de penetración de los fármacos.

Los factores que condicionan una absorción percutánea, se resumen en la tabla 3.

Tabla 3. Factores limitantes en la absorción.

Factores limitantes en la absorción	
Estructura de la piel	Forma farmacéutica
Zona de la piel	Coefficiente de reparto o/w
Temperatura de la piel	Peso molecular
Edad	Concentración del fármaco
pH	Componentes de la formulación
Hidratación de la piel	

1.5.2. Transporte de fármacos en la piel.

El transporte de fármacos dentro de la piel se realiza por medio de difusión pasiva, el cual se efectúa por el paso del fármaco a través de una membrana semipermeable.

El fármaco dentro de sus propiedades debe ser suficientemente lipofílico para poder atravesar el E_c , aunque también debe poseer un carácter hidrofílico que le permita acceder a la circulación sistémica. Desde un punto de vista de la liberación del fármaco, es mejor que el control en la liberación del principio activo, resida en la liberación de este desde la formulación, con objeto de obtener velocidades de absorción uniformes.

El transporte sobre la piel ocurre primeramente por difusión pasiva, la cual indica que el rango de difusión o transporte dentro de la membrana es proporcional a la diferencia en la concentración del activo en ambos sentidos de la membrana. El fármaco debe encontrarse en solución en el lugar de la absorción. Cuando se atraviesa la membrana, las moléculas se disuelven en la capa lipídica de la membrana, esto debido a su liposolubilidad y al coeficiente de difusión. Las moléculas del principio activo dejan la membrana lipídica y se disuelven nuevamente en el medio acuoso, esta ocasión dentro de la membrana con relación a su gradiente de concentración. Este mecanismo es ampliamente regido por la ley de Fick.

1.5.3. Modelo matemático (ley de Fick).

Como se sabe, la mayoría de las moléculas son absorbidas en la piel por medio de difusión pasiva, ya que el principal obstáculo de la penetración en la piel se encuentra en una capa no viable, el estrato córneo (E_c), la ley de difusión de Fick ha sido generalmente aceptada para la descripción del transporte de fármacos a través de la piel. De acuerdo con esta ley, se supone que el transporte es una transferencia de masa de solutos individuales, impulsados por el movimiento molecular aleatorio (Godin y Touitou, 2007) Desde un punto de vista macroscópico, la difusión es un proceso que depende del tiempo. En ocasiones es importante conocer a qué velocidad ocurre la difusión o la velocidad de transferencia de masas. La ecuación matemática se puede expresar de la siguiente manera:

$$J = \frac{M}{At}$$

En esta ecuación se expresa como flujo de difusión (J), definido como la masa o número de átomos (M), que difunden perpendicularmente a través de la unidad de área de un sólido (A) por unidad de tiempo (t). La forma diferencial de esta ecuación es la siguiente:

$$J = \frac{1}{A} \frac{dM}{dt}$$

En donde el flujo de difusión (J) se expresa en kilogramos o átomos por metro cuadrado por segundo ($\text{Kg/m}^2 \text{ s}$). La condición para que exista un estado estacionario es que el flujo de difusión no cambie respecto al tiempo. Para describir la permeación de fármacos a través de la piel es más conveniente expresar la concentración en función de la masa de las sustancias que difunden por unidad de volumen (primera ley de Fick). La ecuación es la siguiente:

$$J = -D \frac{dc}{dx}$$

En donde la constante de proporcionalidad D se denomina coeficiente de difusión y se expresa en metros cuadrados por segundo (m^2/s). El término dc/dx se refiere al gradiente de concentración y se expresa en unidades de átomos/ cm^3 . El signo negativo en esta ecuación nos indica que la dirección de difusión es contraria al gradiente de concentración, es decir, va de elevada concentración a baja concentración.

El gradiente de concentración indica la forma en que los átomos o iones varían en función de la distancia en donde obtenemos que: dc es la diferencia de la concentración a través de la distancia dx . Esta ecuación se aplica a los procesos mediados por difusión en soluciones isotrópicas, bajo condiciones estables. Los factores que afectan la difusión son la temperatura y el coeficiente de difusión.

La mayoría de las situaciones prácticas de difusión son en estado no estacionario o difusión dinámica de los átomos. En una zona determinada del sólido, el flujo de difusión y el gradiente de concentración varían con respecto al tiempo, generando acumulación o agotamiento de las sustancias que difunden. En una condición no estacionaria se emplea la segunda ley de Fick, la cual se describe a continuación:

$$\frac{\partial C}{\partial t} = \frac{\partial C}{\partial x} \left(D \frac{\partial C}{\partial x} \right)$$

Si se supone que el coeficiente de difusión no es una función de la ubicación (x) ni de la concentración (C) de la especie que difunde, la ecuación se simplifica de la siguiente manera:

$$\frac{\partial C}{\partial t} = D \frac{\partial^2 C}{\partial x^2}$$

La difusión es un mecanismo de transporte muy eficaz en distancias cortas. La relación entre el tiempo Δt que tarda una molécula en migrar a lo largo de la longitud media de la distancia al cuadrado X y su coeficiente de difusión, se observa en la siguiente ecuación:

$$\Delta t = x^2/2D$$

1.6. MECANISMOS QUE INCREMENTAN LA ABSORCIÓN PERCUTÁNEA.

Para poder contrarrestar la resistencia natural que opone la piel por medio del Ec, el cual impide el paso de sustancias, es necesario incluir dentro de las formulaciones farmacéuticas excipientes que puedan incrementar el paso del principio activo a través de la piel, estas sustancias son conocidas como promotores de absorción químicos o moduladores de la penetración. Cuando se desea administrar fármacos de peso molecular demasiado grande, se emplean técnicas físicas que favorecen el paso del principio activo desde la piel hasta la circulación sistémica, estas técnicas físicas son conocidas como promotores de absorción físicos.

1.6.1. Promotores de absorción químicos.

Hidratación del estrato corneo (Ec).

El método más seguro y usado para el incremento en la liberación del fármaco sobre la piel, es aumentar el contenido de agua en el Ec. La hidratación del Ec aumenta la penetración de la mayoría de las sustancias. El contenido de agua en el Ec bajo condiciones normales es cerca de 15-20% del peso del tejido hidratado (esta variación depende en gran medida del medio ambiente). Los parches oclusivos generalmente son utilizados como un método para mejorar la penetración. Algunas sustancias farmacológicamente inactivas y que no causan daño al organismo, pueden ser promotores para la hidratación del Ec, y así favorecer a la absorción de un fármaco.

Ácidos grasos.

Los ácidos grasos insaturados con cadenas largas hidrocarbonadas son más efectivos que los ácidos grasos saturados. Los ácidos grasos poseen un balance óptimo tanto de afinidad como de coeficiente de partición para los lípidos del Ec. Las cadenas largas de ácidos grasos tienen una mayor afinidad por los lípidos del Ec e incluso pueden retardar la penetración de fármacos. La cabeza polar de estas cadenas interactúa con los grupos polares

de los lípidos que conforman la barrera de permeabilidad de la piel (Ec), mientras que la cadena alquílica se inserta entre las cadenas de la bicapa, rompiendo su orden, lo que ocasiona mayor fluidez entre ellos y un aumento en la difusión del activo. (Barry B.W; 2001).

Terpenos.

Los terpenos constituyen el grupo de los aceites esenciales. Estos poseen características que pueden ser utilizadas como potenciadores en la liberación de fármacos de forma pasiva, esto debido a que tienen la facultad de incrementar la difusión desarticulando la estructura de los lípidos del Ec. (Mohammed y cols.; 2007).

Alcoholes.

Estas sustancias son utilizadas para modificar la estructura del Ec. Los alcoholes de cadenas cortas son los menos irritantes y más utilizados. Este tipo de alcoholes difunden libremente sin afectar la constante de permeación del permeante, extraen lípidos y péptidos libres, incrementando el paso para solutos iónicos y polares. (Kanikkannan y Mandip; 2002).

DMSO (dimetilsulfóxido).

Es un excelente disolvente aprótico con gran constante dieléctrica. Su efecto como promotor de absorción es irreversible. Este compuesto químico actúa por sí mismo aumentando la capacidad disolvente del Ec. En una concentración mayor al 60% afecta en gran medida su estructura lipídica. En concentraciones menores a 20% interacciona con las proteínas de la membrana realizando un desplazamiento del agua. (Williams y Barry; 2012).

Propilenglicol.

Esta sustancia no tiene efectos sobre la penetración de moléculas hidrofílicas. No penetra en los queratinocitos, pero estabiliza a la queratina de su desnaturalización térmica. El propilenglicol actúa arrastrando aquellas moléculas a las que solubiliza. Desplaza el agua de los grupos polares de los lípidos, aun sin movilizarlos en gran medida. (Williams y Barry; 2012).

En la tabla 4 se enuncian algunos ejemplos utilizados como promotores de absorción químicos.

Tabla 4. Promotores de absorción químicos.

Promotores de absorción químicos	
Mecanismo	Sustancia
Hidratación del estrato córneo	H ₂ O
Ácidos grasos	Dimetilacetamida
Terpenos	d-limoneno
Alcoholes	Etanol, propanol
Dimetilsulfóxido (DMSO)	

1.6.2. Promotores de absorción físicos.

Iontoforesis.

La iontoforesis es la capacidad de introducir iones fisiológicamente activos a través de la epidermis y mucosas facilitados por una corriente o carga eléctrica. Es decir, una corriente continua provoca la transferencia iónica al colocar iones de la misma carga sobre polos de igual signo. El objetivo es el envío de concentraciones de un fármaco a una superficie limitada, con una exposición mínima del resto del organismo a dicha sustancia.

En la iontoforesis los iones activos atravesarán la piel a través de los orificios de las glándulas sudoríparas, sebáceas y folículos pilosos en donde se puede presentar un mayor flujo de corriente. La penetración se estima entre 1 y 5 mm, logrando una mayor profundidad en el organismo gracias a la circulación capilar y el transporte de membrana.

Traspasada la epidermis, los iones del electrodo activo se almacenan y actúan de forma local prolongando el efecto durante horas o días. Asimismo, el depósito de estos iones bajo la piel parece que altera su pH y ejerce una estimulación química alrededor de los receptores y las terminaciones nerviosas libres, provocando sobre el sistema una acción terapéutica al activar reflejos víscero-cutáneos. La iontoforesis nos permite introducir sustancias a través de la piel y evitar el paso a través de la mucosa gástrica y la sobrecarga del tubo digestivo o la necesidad de una inyección parenteral. No obstante, hay que tener en cuenta que si el flujo de sangre local es elevado puede eliminar el medicamento rápidamente de la zona a tratar y distribuirla por todo el organismo, donde un fármaco vía oral o inyectable logra los mismos efectos, pero de manera más fácil y menos costosa. (Yiping y cols; 2005).

Sonoforesis.

Se trata de la introducción de sustancias en el interior del organismo mediante energía ultrasónica (20-100kHz) (Labouta y col; 2013), procedimiento por el que se introducen en el organismo, moléculas completas, a diferencia de la iontoforesis que introduce iones dependiendo de su polaridad.

Las moléculas introducidas se desdoblán en el interior de los tejidos diana, en elementos y radicales mediante procedimientos químicos naturales, y deben recombinarse con los radicales existentes en el organismo. Su profundización es bastante discutida. Las sustancias a introducir son muy variables.

1.7. CUANTIFICACIÓN DE FARMACOS EN PIEL.

1.7.1. Métodos *in vivo*.

Radioactividad en excreciones.

La absorción percutánea *in vivo* es determinada mediante el método indirecto de medición de la radioactividad en excreciones después de la aplicación tópica del compuesto marcado. Es necesario utilizar una metodología de marcado debido a que los niveles plasmáticos del compuesto son muy bajos después de la administración tópica del mismo. La sustancia que normalmente se utiliza como marcador es el tritio. La limitación en realizar una determinación de fármacos por medio de las excreciones es que la metodología no considera el metabolismo que ocurre en la piel. (Escobar Chávez, 2006).

Radioactividad en Sangre.

La radioactividad en plasma puede ser medida y determinarse la absorción percutánea por relación de áreas bajo la curva del perfil de concentraciones plasmáticas en función del tiempo seguido tópicamente y de una aplicación intravenosa. (Escobar Chávez, 2006).

1.7.2. Métodos *in vitro*.

Tape Stripping.

Este método es una técnica simple que nos permite determinar la cantidad de principio activo que se encuentra en el Ec. Con esta técnica se puede conocer el perfil de concentración del principio activo a lo largo del Ec (Silva Álvarez, 2005). Además esta técnica es empleada para obtener información acerca de la homogeneidad y la distribución de formulaciones en la superficie de la piel y el Ec.

Para poder emplear correctamente esta técnica, es necesario delimitar el área en donde se aplicará la formulación. Después de un tiempo establecido el Ec es removido con la ayuda de una serie de cintas adhesivas que son removidas del sitio de aplicación de una manera progresiva. La cinta contiene una cantidad de corneocitos y la correspondiente cantidad de fármaco en estudio para después ser analizado por algún método analítico.

Esta técnica depende y se ve limitada en gran medida por factores intrínsecos y extrínsecos ya que afectan la cantidad de SC removido. Como factores intrínsecos se pueden mencionar algunos como: Espesor del SC, cantidad de lípidos (la cual dependerá del sitio en donde se aplique la formulación), edad, tipo de piel, raza, época del año. Los factores extrínsecos que afectan esta técnica son los siguientes: La fuerza con la que se retira la cinta, duración de la presión de la cinta en la piel (Lademann y cols.; 2009).

Celdas de Difusión.

Empleando las celdas de difusión es posible evaluar la absorción percutánea *in vitro*. Una celda de difusión convencional está compuesta por dos compartimientos uno donador y otro receptor, los cuales se encuentran separados por una membrana biológica (piel), tal como se muestra en la (figura 5). El EC se encuentra en contacto con el fármaco dentro del compartimiento donador y en el compartimiento receptor se coloca un medio de disolución el cual al mismo tiempo está en contacto con la parte interna de la piel expuesta. La cantidad de fármaco que pasa a través de la piel se puede cuantificar obteniendo muestras de la parte receptora a diferentes tiempos para posteriormente analizarlas mediante algún método analítico. (Moser y cols., 2001).

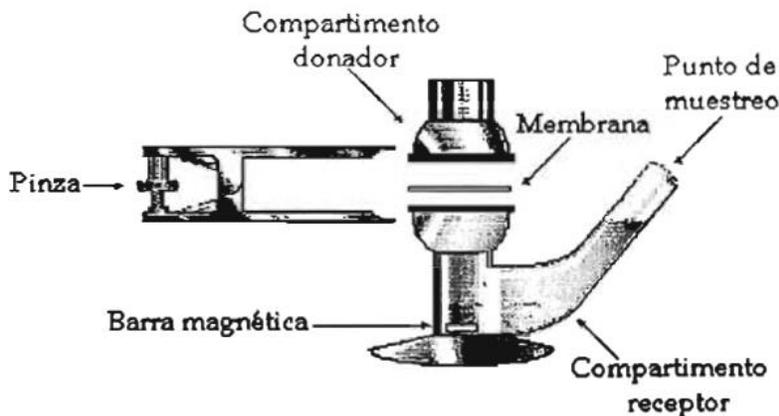


Figura 6. Celda de difusión tipo Franz. (Moser y cols., 2001).

1.8. NANOPARTÍCULAS DE PLATA.

Los metales de tamaño nanométrico que se encuentran en el intervalo de 1-50nm, actualmente han cobrado gran importancia dentro de los estudios de la industria farmacéutica. Estos son obtenidos principalmente como una dispersión de un sólido en un líquido. Las nanopartículas se caracterizan por poseer una gran área superficial, ya que una fracción importante de los átomos que las forman se encuentran en la superficie. Las nanopartículas presentan ventajas con respecto a otros sistemas coloidales, como una buena estabilidad en fluidos biológicos y una mayor posibilidad de escalamiento comparado con otros sistemas coloidales.

1.8.1. Obtención de nanopartículas de plata.

Las nanopartículas de plata han desarrollado un gran interés en el campo de la nanotecnología ya que cuentan con aplicaciones dentro de la medicina que son de gran utilidad, ayudan como: Biosensores, marcadores y actualmente se emplean como agentes antimicrobianos.

La mayoría de los métodos actualmente empleados para la obtención de nanopartículas de plata requieren el uso de muchos disolventes, los cuales son altamente reactivos, además se requieren periodos largos para obtener una reacción favorable en la obtención de las nanopartículas de plata. Las nanopartículas de plata presentan una inestabilidad considerable, debido a que cuentan con un periodo de vida muy corto y después de este periodo tienden a aglomerarse. (Raghuraman Kannan, 2006).

Existen dos métodos básicos para la síntesis de nanopartículas de plata, estos son el método por condensación y el método por dispersión. En los métodos por dispersión, las nanopartículas de plata son formadas a partir de partículas de plata de gran tamaño, por medio de una ruptura de materia. Los métodos de condensación consisten en que a partir de un sistema homogéneo de átomos o moléculas de plata se forman nanopartículas; la modificación en las rutas de síntesis y la variación en las condiciones de operación de estos métodos permiten obtener nanopartículas de plata de diferentes formas y tamaños.

Recientemente se han propuesto métodos para producir nanopartículas de plata a partir de extractos vegetales y microorganismos. Estos métodos han permitido reducir los tiempos de obtención y evitan el uso de componentes tóxicos, siendo más amigables con el medio ambiente. (Fayas y cols,2011; Ravindran y cols, 2013).

Método de dispersión.

Entre los métodos de dispersión para la síntesis de nanopartículas de plata más frecuentemente usados a nivel industrial, se encuentra la condensación de vapores metálicos en gas inerte (IGC).

El principio básico del IGC consiste en que una masa sólida de metales de plata, es introducida dentro del elemento de calentamiento en el que rápidamente es fundida, tomando temperaturas entre su punto de fusión y ebullición (por arriba de los 2000°C), posteriormente un gas inerte es continuamente introducido en la cámara, el cual remueve los vapores metálicos y los conduce a lo largo de la cámara donde poco a poco el gas inerte enfría los vapores, formando las nanopartículas metálicas. Por este método de síntesis generalmente se pueden obtener nanopartículas con un tamaño entre 50-10nm, el tamaño de las nanopartículas puede ser controlado dependiendo de la temperatura a la cual se calienta el metal y la presión del gas inerte utilizado.

Método de condensación.

Por medio de este método se puede tener un mayor control en la morfología y tamaño de las nanopartículas de plata, mediante este método los iones de una sal de plata comúnmente (AgNO_3) son reducidos por un agente reductor. Los agentes reductores más utilizados son: Citrato de sodio, peróxido de hidrógeno, formaldehído, ácido ascórbico y algunos monosacáridos. El empleo de un agente estabilizante es importante para el control del tamaño y la forma que se requiera tener en las nanopartículas, como lo son: polivinipirrolidona (PVP), polietilenglicol (PEG), carboxilatos y algunos citratos (Sarkar y cols., 2009). En el proceso de reducción se generan átomos metálicos de plata que mediante las fuerzas de atracción de Van de Waals, inician un proceso de nucleación y crecimiento

hasta la formación de nanoestructuras. El control de la morfología y el tamaño de las nanopartículas se pueden regular por la variación de factores relacionados con las condiciones de operación de cada método, lo cual es muy difícil lograr con los métodos de dispersión.

En la actualidad existen muchos métodos de síntesis de nanopartículas de plata muy novedosos en cuanto al empleo de técnicas de control del tamaño y morfología de las nanopartículas. Dentro de los métodos más empleados para la síntesis de nanopartículas de plata por medio de condensación son el método de síntesis por polioliol y el método de micela invertida.

Método de polioliol.

Es uno de los métodos más empleados para la síntesis de nanopartículas de plata. A través de este método una sal de plata (AgNO_3) es disuelta en un agente reductor (etilenglicol) en la presencia de PVP el cual actúa como agente estabilizante, que impide la formación de aglomerados de partículas. El PVP juega un papel importante ya que sus átomos de oxígeno y nitrógeno pueden promover la adsorción de las cadenas poliméricas en la superficie de las nanopartículas metálicas, actuando como un agente protector que evita la aglomeración de partículas (Wang y cols.; 2005). Con el uso de este método se han logrado sintetizar nanopartículas de plata con morfologías distintas como son: Esferas, cubos, nanoplatos triangulares y tetraedros.

Método de micela invertida.

Este método está formado por una fase polar dispersa, por la acción de un surfactante en una fase no polar. Este sistema está constituido por dos fases las cuales son: Moléculas de surfactantes que estabilizan las nanopartículas formadas y solutos en la fase acuosa (sales de plata y agentes reductores). El surfactante más utilizado en este método es sulfosuccinato (AOT). Algunas de las interacciones que se presentan en este método incluyen: El intercambio de moléculas del surfactante entre las micelas invertidas, fusión de micelas invertidas, reacciones cinéticas intramicelares, nucleación de partículas metálicas, crecimiento de las partículas formadas vía uniones intramicelares e intercambio intermicelar de los contenidos de la fase acuosa (Xu y col., 2006).

Este método es una técnica versátil con la cual se puede tener un control en las propiedades de las nanopartículas como lo es: tamaño, geometría, morfología, homogeneidad y área superficial. Mediante el control de parámetros como el tamaño de la micela, la relación sal de plata-agente reductor y la velocidad de intercambio micelar, es posible obtener nanopartículas de plata con un tamaño de 1nm (Zhang y cols., 2006).

1.8.2. Propiedades físicas.

Dentro de las propiedades físicas de las nanopartículas de plata, sobresalen sus propiedades ópticas, las cuales son dominadas por el número de oscilaciones producidas por electrones conductores libres, resultantes de las interacciones con la radiación electromagnética. El campo eléctrico producido por la radiación, induce la formación de un dipolo en la nanopartícula, una fuerza restauradora en la nanopartícula intenta compensar este efecto y como resultado se obtiene una única y característica resonancia a una longitud de onda determinada (Espinoza, 2007).

La longitud de onda de absorción de las nanopartículas de plata depende de factores como el tamaño de partícula, morfología, naturaleza del medio que las rodea, así como la distancia entre nanopartículas (Zielinska y cols., 2009). Las técnicas de mayor utilización para la caracterización y estudio ha sido el empleo del espectrofotómetro de absorción de luz (UV-vis), apoyado por el uso del microscopio electrónico de transmisión (TEM).

1.8.3. Propiedades químicas.

El área superficial de las nanopartículas se incrementa marcadamente con el decrecimiento del tamaño, nanopartículas con un tamaño de 1nm tendrán aproximadamente el 100% de sus átomos en la superficie, en cambio las nanopartículas con un tamaño de 10nm tendrán cerca del 15% de sus átomos en la superficie, por lo que una nanopartícula con una gran área superficial será mucho más reactiva.

Las nanopartículas de plata han recibido una considerable atención debido a sus atractivas propiedades fisicoquímicas y la fuerte toxicidad para un amplio rango de microorganismos, lo que ha mostrado ser una promesa como nuevo agente antimicrobiano y antiviral.

El mecanismo por el cual las nanopartículas de plata tienen acción bactericida no está totalmente establecido, una de las teorías más aceptadas es que la membrana de la bacteria posee muchas proteínas conteniendo sulfuro y fósforo, lo que podrían ser sitios de preferencia de las nanopartículas de plata, esto provocaría imperfecciones a nivel membrana afectando procesos respiratorios y la división celular, llevando a la muerte de la bacteria (Espinoza, 2007).

1.8.4. Nanopartículas de plata como agentes antimicrobiano.

Desde siglos anteriores la plata ha sido utilizada como tratamiento frente a diversos padecimientos como: quemaduras, heridas e infecciones bacterianas.

Debido al surgimiento de infecciones causadas por diferentes bacterias junto con el aumento en la resistencia a antibióticos, ha surgido la necesidad de emplear nuevas alternativas para el tratamiento de las infecciones causadas por microorganismos. Estas investigaciones consideran a las nanopartículas de plata como una novedosa vía para combatir microorganismos.

El mecanismo de acción por el cual las nanopartículas de plata sirven como agentes antimicrobianos, no está muy bien definidos, algunas investigaciones señalan que una característica que puede ayudar a las nanopartículas para que cuenten con estas propiedades frente a bacterias, es su gran área superficial teniendo un mayor contacto frente a microorganismos. Las nanopartículas de plata interactúan con la membrana celular de las bacterias uniéndose a las proteínas de la pared celular las cuales contienen sulfuro, además se creó que las nanopartículas de plata pueden a travesar la membrana celular y unirse directamente al fósforo del ADN de las bacterias atacando directamente al proceso de respiración y división celular provocando la muerte de la bacteria. (Sondi y Salopek-Sondi, 2004).

La forma y tamaño de las nanopartículas de plata son un factor importante a considerar ya que el efecto antimicrobiano es dependiente de estas dos propiedades (Mahendra y cols., 2009) señalan que cuando se tiene un tamaño menor a 10nm incrementa la radioactividad de las nanopartículas y se produce un efecto electrostático dentro de la célula de la bacteria. La forma triangular de las nanopartículas de plata puede a travesar fácilmente la membrana celular.

En la actualidad podemos encontrar nanopartículas de plata en diversos productos como lo son: dispositivos médicos, productos cosméticos (desodorantes y geles) y en productos textiles.

2. OBJETIVOS.

2.1. Objetivo General.

Evaluar la permeabilidad de una dispersión de nanopartículas de plata a través de piel *in vitro*, empleando celdas verticales tipo Franz, con el fin de determinar su capacidad de penetración y con ello conocer el riesgo potencial que representa su inclusión en formulaciones o materiales destinados a proveer un efecto bacteriostático.

2.2. Objetivos específicos.

- Contar con un método espectrofotométrico que permita la cuantificación de las nanopartículas de plata capaces de permear a través de la piel.
- Realizar estudios de permeación *in vitro* de nanopartículas de plata a través de piel con el empleo de celdas de Franz.

3. METODOLOGÍA.

3.1. Diagrama de flujo.

La metodología general que se siguió en el presente trabajo se muestra en la figura 7.

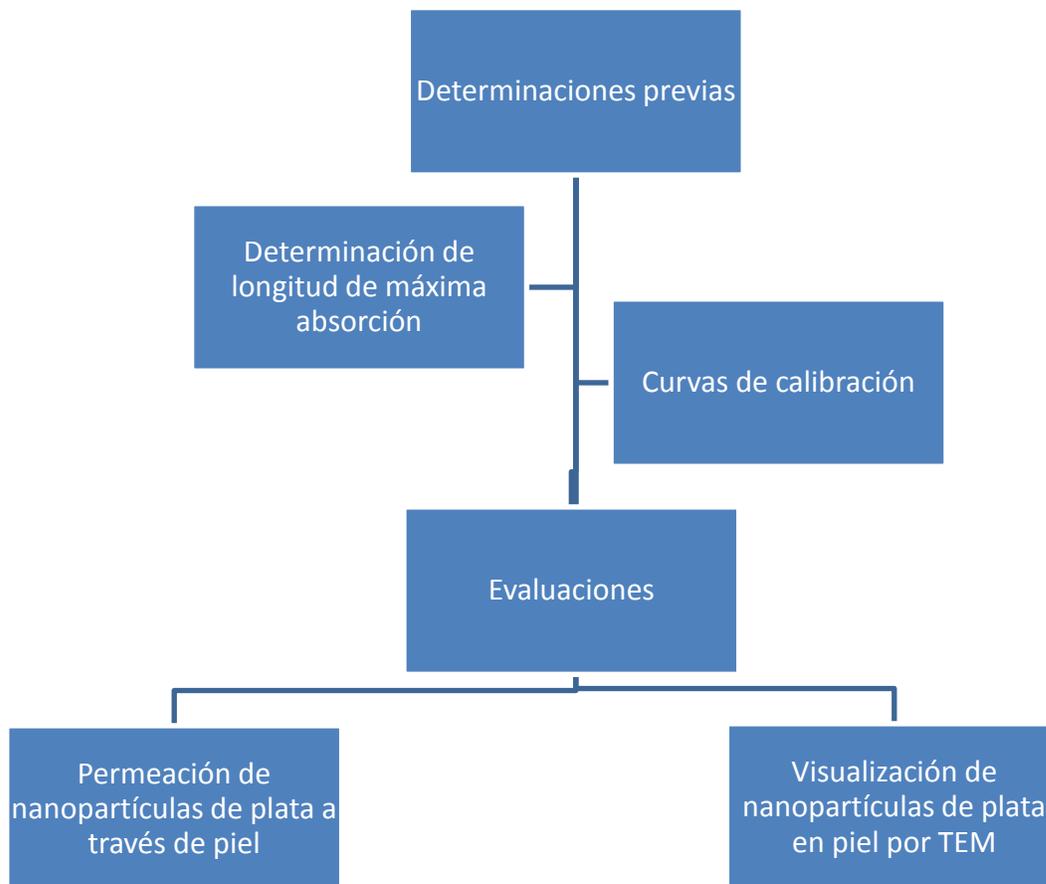


Figura 7. Diagrama de flujo de la metodología general seguida en el trabajo.

3.2. Determinaciones previas.

Preparación de soluciones.

Las soluciones empleadas para realizar los espectros de absorción y cuantificaciones se prepararon de la siguiente manera:

Nitrato de plata 10^{-5} M. Preparar por dilución de un estándar de nitrato de plata con una concentración 0.1M, las diluciones se llevaron a cabo en agua destilada.

1,10 fenantrolina 10^{-3} M. Pesar 49.56mg de 1,10 fenantrolina grado reactivo, diluir y disolver con agua destilada en un matraz aforado de 250ml.

Bromopirogalol 10^{-4} M. Pesar 13.96mg de bromopirogalol más 2.5g de acetato de amonio grado reactivo, disolver y diluir con agua destilada en un matraz aforado de 250ml.

Acetato de amonio 20%. Pesar 20g de acetato de amonio grado reactivo, disolver y diluir en 100ml de agua destilada.

Espectros de absorción.

Se determinó la longitud de onda de máxima absorción para las nanopartículas de plata. Los espectros se corrieron de 300nm hasta 800nm. Se realizaron 2 diferentes barridos como se muestra a continuación

Barrido A. En un matraz de 50ml adicionar 5ml de bromopirogalol (10^{-4} M), de la misma manera adicionar 1ml de 1,10 fenantrolina (10^{-3} M) y 1ml de acetato de amonio al 20%. Llevar a la marca de aforo con agua destilada.

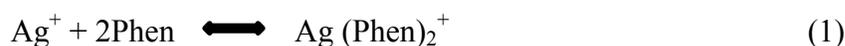
Barrido B. En un matraz de 50ml adicionar 5ml de bromopirogalol (10^{-4} M), de la misma manera adicionar 1ml de 1,10 fenantrolina (10^{-3} M) y 1ml de acetato de amonio al 20% y 1ml de suspensión de nanopartículas de plata.

Con estas soluciones se determinó la longitud de onda de máxima absorción que presenta el complejo entre la plata (Ag), el bromopirogalol (brom) y la fenantrolina (phen), mediante un barrido de 300nm-800nm. Esto se realizó para cada una de las soluciones antes descritas con la finalidad de conocer si existía alguna interferencia en el método. La longitud de onda en la cual se presenta una mayor absorción es de 605nm.

3.3. Curvas de calibración.

Con los reactivos (bromopirogalol, fenantrolina, EDTA, acetato de amonio) preparados anteriormente se preparó la curva de calibración adicionando a un matraz volumétrico de 5ml, las siguientes cantidades de cada uno de los reactivos: 1ml de fenantrolina (10^{-3} M), 0.5ml de acetato de amonio al 20%, 1ml de las diferentes concentraciones de nanopartículas de plata, 0.5ml de EDTA, 0.5ml de bromopirogalol (10^{-5} M). Estas soluciones se llevan a la marca de aforo con agua destilada. Las curvas de calibración se realizan por triplicado a diferentes concentraciones (0.032, 0.064, 0.096, 0.128, 0.15, 0.19 $\mu\text{g/ml}$), las cuales se leyeron a una longitud de onda de 605nm.

La reacción que se lleva a cabo entre la plata y los reactivos se describe a continuación:



La reacción ocurre en una primera instancia entre la plata y fenantrolina, formando una sal, la cual se hace más reactiva cuando se adiciona el compuesto bromopirogalol ya que este le otorga la coloración y da más sensibilidad al complejo para poder ser cuantificado por espectrofotometría. Además de esto, la incorporación de bromopirogalol hace que la reacción tenga mayor estabilidad siempre que el pH de la solución se encuentre cercano a 7.

El complejo final de la reacción contiene una coloración azul la cual se debe a la adsorción del bromopirogalol por parte del complejo previamente formado entre la plata y fenantrolina. La coloración que se observaría cuando solo se forma el complejo plata y fenantrolina sería una coloración amarilla la cual es muy rápida y poco estable. Esta coloración amarilla no se presentó durante este estudio debido a que primero se agregaron y mezclaron todos los reactivos para finalmente agregar la plata.

3.4. Estudios de permeación de nanopartículas de plata a través de piel *in vitro*.

Se realizaron estudios *in vitro* por sextuplicado de la permeabilidad de nanopartículas de plata en piel, utilizando celdas de difusión tipo Franz, empleando como membrana biológica piel de cerdo, recuperada del rastro antes de ser tratada con agua caliente o vapor. Las nanopartículas de plata empleadas fueron proporcionadas por el grupo de investigación del Doctor Yacaman de la Universidad de Texas, USA. Estas nanopartículas presentan un tamaño promedio de $6.5\text{nm} \pm 2.4\text{nm}$ y una concentración de plata de $100\mu\text{g/ml}$. Para preparar la piel, esta fue separada del cartílago de la oreja empleando un escalpelo, se lavó con agua, se cortaron fragmentos de $700\mu\text{m}$ utilizando un dermatoma y se congeló para su

uso. Los fragmentos de membrana obtenidos se colocaron en la celda de Franz (área de exposición de 0.78 cm^2) empleando como medio receptor agua destilada (1ml de capacidad del sistema receptor), manteniendo la temperatura del medio a 37°C con agitación constante. En el medio donador se colocó 1ml de la dispersión de nanopartículas con una concentración de $100\mu\text{g/ml}$. Los estudios de permeación tuvieron una duración de 6 h continuas. La cuantificación se realizó, tomando una muestra del medio receptor y recuperando esta con 1ml de medio fresco. Se realizaron un total de 6 pruebas de permeación (una cada semana) y en cada una de estas pruebas se montaron 7 celdas (6 con dispersión de nanopartículas y 1 blanco).

3.5. Preparación de muestras para microscopía electrónica de transmisión (TEM).

Se tomaron fragmentos de piel expuesta a las nanopartículas de plata a diferentes tiempos, en las cuales se buscó visualizar las nanopartículas que se encontraban en la superficie de la piel. Las muestras se sometieron a la siguiente metodología para su visualización en el microscopio de transmisión electrónica: todas las muestras se fijaron con glutaraldehído al 2% en buffer de Cacodilato (0.1 M a $\text{pH}=7.4$) y se dejaron durante 4 horas a temperatura ambiente. Posterior a las 4 horas de fijación, las muestras se lavaron durante 5min con buffer de Cacodilato y sacarosa (4%). El paso de postfijación se realiza con OsO_4 en buffer de cacodilato, las muestras se deben almacenar a una temperatura de 4°C y se lavan 3 veces con buffer de cacodilatos durante 10 minutos.

Como segunda etapa se procede a la deshidratación de las muestras en serie creciente de etanol (30%, 50%, 70%, 90%, 96%, y 2 veces en etanol absoluto), 15 min en cada etapa. Para la inclusión en parafina se utilizó resina epoxi (EPON Polarbed 812) de la siguiente manera:

Lavar la muestra con óxido de propileno (100%) durante 10min, posteriormente pasarla por diferentes concentraciones de resina como se muestra a continuación:

- Oxido de propileno - Resina Epoxi 2:1 [60 minutos].
- Oxido de propileno - Resina Epoxi 1:1 [60 minutos].
- Oxido de propileno - Resina Epoxi 1:2 [60 minutos].
- Resina Epoxi (100%). Al terminar esta etapa se dejan reposar las muestras durante toda la noche. Al siguiente día se cambia la resina y se polimeriza en estufa a 55°C durante 48h.

Para observar los cortes en el microscopio se utilizó un ultramicrotomo que permite un mayor corte histológico para la percepción adecuada de los cortes. Los cortes de piel impregnados con nanopartículas se observaron sin emplear alguna tinción.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

Como ya se mencionó, las nanopartículas de plata fueron proporcionadas por el grupo de investigación del Dr. Yacaman de la Universidad de Texas USA, por lo que las condiciones bajo las cuales se obtuvieron las NP de plata, datos de soluciones utilizadas, tamaño de partícula y concentraciones, fueron proporcionadas directamente por estos investigadores (Yacaman y cols.; 2005).

Los barridos que se muestran en las Figuras 8 y 9 se realizaron conforme a lo descrito en la metodología. Estas pruebas nos permitieron conocer la longitud de onda de máxima absorción a la cual se realizarían las mediciones correspondientes para conocer la cantidad de nanopartículas de plata en los estudios de permeación, respecto al tiempo. El primer barrido (Figura 8) muestra la longitud de onda de máxima absorción para el complejo Fenantrolina-bromopirogalol (phen-brom). En un segundo barrido, mostrado en la Figura 9, se puede ver la longitud de onda a la cual absorbe el complejo final de nanopartículas de plata NPs Ag-phen-brom.

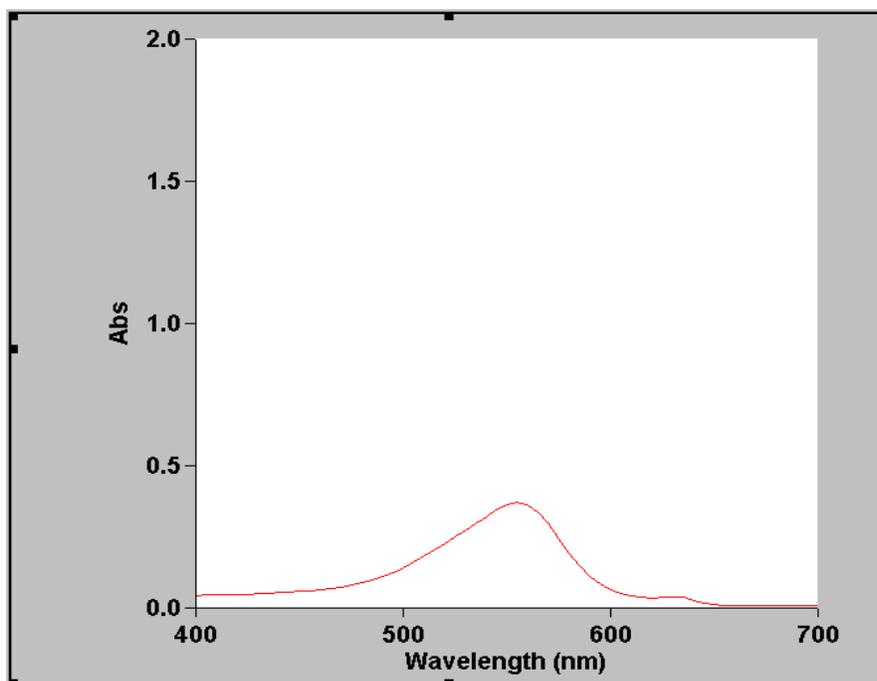


Figura 8. Barrido del complejo phen-brom.

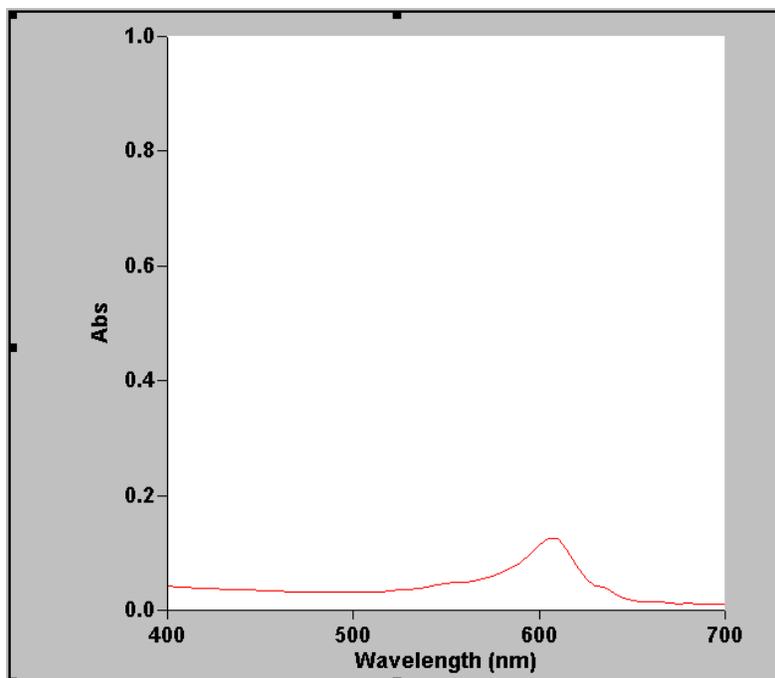


Figura 9. Barrido de complejo NpsAg-phen-brom.

Con estos barridos se determinó que la longitud de onda de máxima absorción para el complejo Phen-Brom ocurre a 555nm, mientras que para el complejo con plata, el máximo se encuentra a 605nm, por lo que para cuantificar las nanopartículas de plata durante los estudios de permeación, la cuantificación se realizó a 605nm.

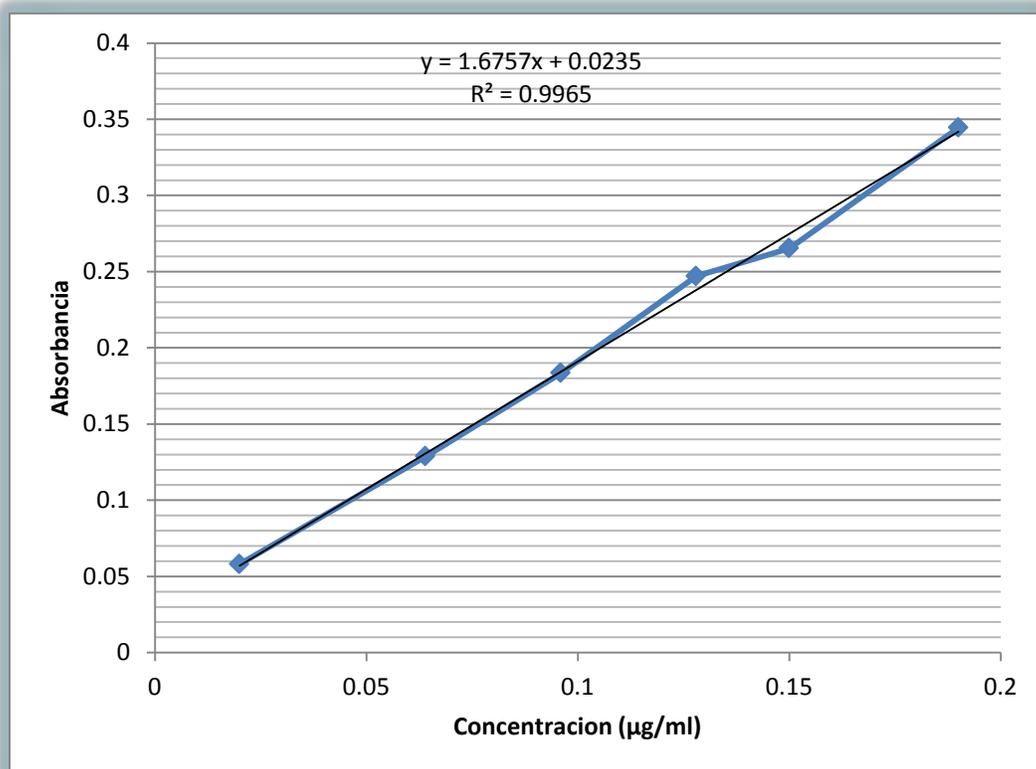
A esta longitud de onda se leyeron las soluciones de la curva de calibración, formando el complejo con la dispersión de nanopartículas en la forma ya expuesta en la metodología. Los resultados se muestran en la Tabla 5.

Tabla 5. Datos Curva de calibración. Complejo Nps Ag-Phen-Brom.

Concentración ($\mu\text{g/ml}$)	Absorbancia	ABS/CONC		
0.032	0.057	1.78	Promedio	1.83
0.032	0.059	1.84	D.E	0.045
0.032	0.06	1.87	C.V	2.40%
0.064	0.1278	1.99	Promedio	2.006
0.064	0.1283	2	D.E	0.02
0.064	0.1302	2.03	C.V	1.03%
0.096	0.1836	1.91	Promedio	1.9
0.096	0.1835	1.91	D.E	5.7×10^{-3}
0.096	0.1832	1.9	C.V	0.30%

Continuación tabla 5. Datos curva de calibración. Complejo Nps Ag-Phen-Brom.

0.128	0.245	1.91	Promedio	1.93
0.128	0.25	1.95	D.E	0.02
0.128	0.248	1.93	C.V	1.03%
0.15	0.2689	1.79	Promedio	1.76
0.15	0.2595	1.73	D.E	0.032
0.15	0.2675	1.78	C.V	1.82%
0.19	0.3389	1.78	Promedio	1.77
0.19	0.3364	1.77	D.E	5.77x10 ⁻³
0.19	0.338	1.77	C.V	0.32%



Gráfica 1. Curva de calibración para las nanopartículas de plata. Empleando agua como medio de disolución.

La curva de calibración que se presenta en la Gráfica 1, mostró ser lineal dentro del rango de concentraciones probadas, con un coeficiente de determinación (r^2) de 0.9965. Con excepción de la concentración más baja de 0.032 $\mu\text{g/ml}$, para el resto de las concentraciones se obtuvieron coeficientes de variación menores al 2%, como se muestra en la tabla 5.

Se calculó el límite de cuantificación (LC) y límite de detección (LD) para la curva de calibración realizada para los estudios de permeación, los cálculos y resultados se muestran a continuación:

$$LC = \frac{10 (D.E \text{ ordenada al origen})}{pendiente}$$

$$LC = \frac{10 (0.0068)}{1.7195}$$

$$LC = 0.039 \mu\text{g/ml}$$

$$LD = \frac{3.3 (D.E \text{ ordenada al origen})}{pendiente}$$

$$LD = \frac{3.3 (0.0068)}{1.7195}$$

$$LD = 0.013 \mu\text{g/ml}$$

Estudios de permeación.

Debido a sus propiedades antisépticas, las nanopartículas de plata han sido incluidas en cremas, diversos productos tópicos como geles, textiles y productos quirúrgicos. Sin embargo, poca información existe acerca de su capacidad para penetrar y permear la piel. Es por ello que en este trabajo, con el fin de conocer la permeabilidad de las nanopartículas de plata en piel, se realizaron estudios *in vitro* utilizando el modelo de celdas de difusión tipo Franz, usando como membrana biológica piel de oreja de cerdo, ya que se sabe que la piel de cerdo posee características histológicas y de permeabilidad parecidas a la piel humana, tal como lo demuestran estudios realizados por Barbero y Frash (2009), donde se menciona que la permeabilidad entre los dos tipos de tejido es similar, encontrándose mayor variabilidad en la permeabilidad de piel humana.

El tiempo total de exposición de las nanopartículas con la piel fue de 6 h, durante los cuales se tomaron muestras del medio receptor a las 0.5, 1, 2, 3, 4, 5 y 6h. En el estudio realizado se determinó la cantidad total permeada de nanopartículas de plata por unidad de área, dividiendo esta cantidad entre el área expuesta de la piel (0.78cm²), estos resultados se muestran en la Tabla 6. Como ya se explicó, se realizaron un total de 6 permeaciones (una por semana), cada una por sextuplicado, por lo que en la Tabla 6 se reporta la cantidad promedio encontrada para cada tiempo. Como puede verse, la cantidad de nanopartículas que pasa a través de la piel se va incrementando al transcurrir el tiempo de exposición (Tabla 6, Gráfica 2). El tamaño que una partícula pueda tener es un factor determinante en la permeabilidad, ya que sustancias con un diámetro pequeño suelen a travesar fácilmente el Ec. Lo esperado en este estudio fue que al tener partículas con un diámetro menor a 10nm, estas atravesaran fácilmente la piel. En este caso, desde los primeros 30 minutos ya se encontró plata en el medio receptor. No obstante al finalizar el estudio de permeación solo el 1.5% de nanopartículas de plata fue capaz de atravesar las capas de la piel. El cálculo para obtener el porcentaje de nanopartículas se realizó de la siguiente manera:

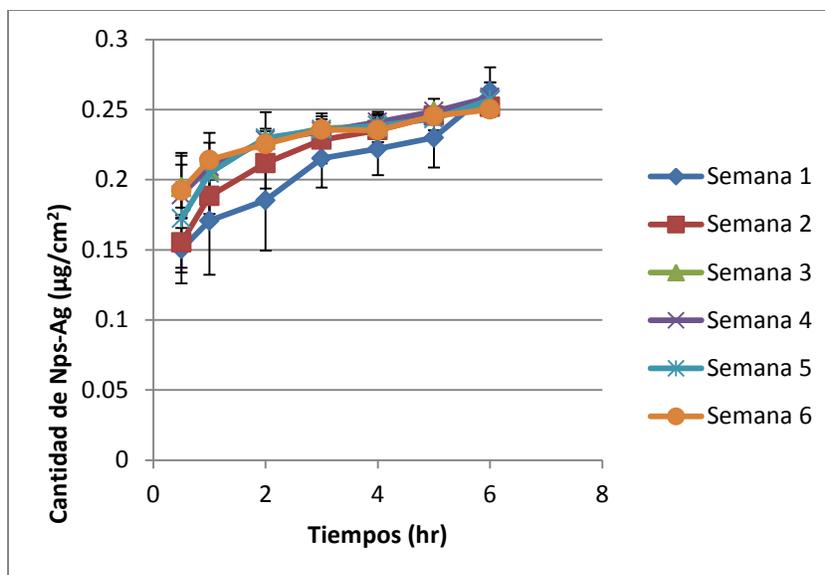
$$\frac{\text{Concentración de NP final}}{\text{Concentración inicial de NP}} \times 100$$

$$\frac{1.55\mu\text{g/ml}}{100\mu\text{g/ml}} \times 100 = 1.55\%$$

Tabla 6. Cantidad de nanopartículas de plata en el medio receptor/unidad de área de piel expuesta. (µg/cm²).

Tiempos (hr)	Semana 1	D.E	Semana 2	D.E	Semana 3	D.E	Semana 4	D.E	Semana 5	D.E	Semana 6	D.E
0.5	0.1504	0.0244	0.1551	0.0179	0.1947	0.0224	0.1891	0.0090	0.1722	0.0385	0.1923	0.0267
1	0.1707	0.0385	0.1882	0.0197	0.2073	0.0073	0.2092	0.0045	0.2045	0.0289	0.2141	0.0122
2	0.1853	0.0359	0.2118	0.0180	0.2282	0.0038	0.2282	0.0063	0.2297	0.0185	0.2254	0.0110
3	0.2152	0.0208	0.2284	0.0169	0.2368	0.0064	0.2344	0.0026	0.2357	0.0115	0.2357	0.0035
4	0.2220	0.0188	0.2353	0.0117	0.2378	0.0077	0.2410	0.0055	0.2387	0.0096	0.2353	0.0085
5	0.2299	0.0212	0.2455	0.0039	0.2489	0.0023	0.2487	0.0090	0.2434	0.0081	0.2455	0.0033
6	0.2630	0.0170	0.2519	0.0017	0.2543	0.0075	0.2588	0.0107	0.2571	0.0123	0.25	0.0032

Nota: Se muestra el promedio de 6 determinaciones para cada tiempo.



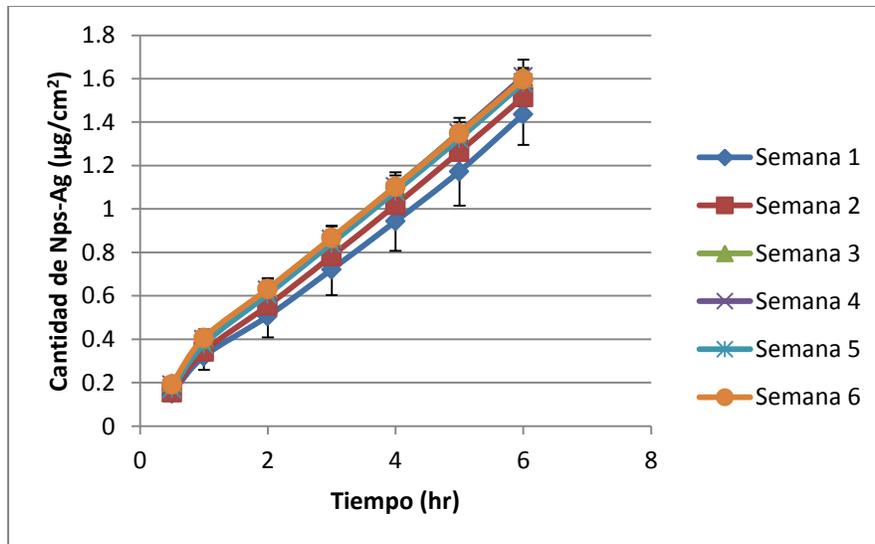
Gráfica 2. Cantidad de nanopartículas permeadas/unidad de área de piel expuesta. Para las permeaciones realizadas cada semana. En la gráfica aparecen las barras de error expresadas como la desviación estándar para cada punto.

En los datos mostrados en la Tabla 6, se realizó la corrección correspondiente por la dilución efectuada al extraer la muestra del medio receptor y reponer con un volumen equivalente de medio, esto a partir de los datos obtenidos que se reportan en el Anexo 1, Tabla 9. La concentración inicial de plata fue de $100\mu\text{g}/\text{ml}$ (Yacaman y cols.; 2005). Como ya se mencionó, la cantidad de nanopartículas que pasó a través de la piel fue incrementando al transcurrir el tiempo (Tabla 6), algunos estudios muestran que las sustancias de tamaño nanométrico se introducen a la piel por medio de los folículos pilosos en donde existe un rápido proceso con una duración aproximada de 1hr y posteriormente la penetración puede llevarse a cabo fuera de los folículos pilosos durante varios días, este proceso está determinado por el gradiente de concentración de la sustancia que sea aplicada vía tópica (Lademann y cols.; 2007). Se ha demostrado que las nanopartículas con tamaños $< 10\text{nm}$ pueden permanecer almacenadas en los folículos pilosos por un periodo de 10 días (Lademann y cols.; 2011). Diversos estudios señalan la inhabilidad de las nanopartículas metálicas para a travesar la piel, como el realizado por Prow y cols. (2011) que señalan que las nanopartículas de plata no atraviesan la piel, encontrando agregados de dichas nanopartículas almacenadas en el folículo piloso; en otro estudio con nanopartículas de hierro, Baroli y cols. (2007), demuestran que con un tamaño menor a 10nm , las nanopartículas pueden penetrar el Ec pero son incapaces de tener una buena permeabilidad para a travesar todas las capas de la epidermis, formando aglomerados que prácticamente se almacenan en las capas más externas de la piel.

No obstante, en este estudio se encontró que aunque la mayoría de las nanopartículas no permearon, un 1.5 % de la cantidad inicial colocada alcanzó el medio receptor.

Tabla 7. Cantidad acumulada de nanopartículas de plata/área de piel expuesta. ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$).

Tiempos (hr)	Semana 1	D.E	Semana 2	D.E	Semana 3	D.E	Semana 4	D.E	Semana 5	D.E	Semana 6	D.E
0.5	0.1504	0.0244	0.1551	0.0179	0.1947	0.0224	0.1891	0.0090	0.1722	0.0385	0.1923	0.0267
1	0.3212	0.0614	0.3434	0.0352	0.4019	0.0290	0.3983	0.0055	0.3767	0.0601	0.4064	0.0387
2	0.5064	0.0972	0.5551	0.0532	0.6301	0.0277	0.6265	0.0047	0.6064	0.0724	0.6318	0.0497
3	0.7216	0.1179	0.7835	0.0680	0.8669	0.0226	0.8609	0.0036	0.8421	0.0815	0.8675	0.0527
4	0.9436	0.1366	1.0188	0.0780	1.1047	0.0291	1.1019	0.0078	1.0808	0.0879	1.1028	0.0514
5	1.1735	0.1577	1.2643	0.0814	1.3536	0.0294	1.3506	0.0165	1.3241	0.0953	1.3483	0.0506
6	1.4365	0.1416	1.5162	0.0831	1.6079	0.0334	1.6094	0.0260	1.5812	0.1074	1.5983	0.0518



Gráfica 3. Cantidad acumulada de nanopartículas de plata en el medio receptor por unidad de área de piel.

Los datos de la tabla 7 y gráfica 3 se obtuvieron al realizar de manera consecutiva la sumatoria de los valores de cantidad de nanopartículas de plata permeada, previamente obtenidos para cada tiempo. Esto se hizo puesto que en cada muestreo el volumen del medio receptor fue retirado en su totalidad. Los cálculos se hicieron con los datos reportados en el Anexo 1 tabla 10. Entonces de acuerdo a los datos que se muestran en la Tabla 7 Cantidad acumulada de nanopartículas de plata/área de piel expuesta. ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$), la cantidad total permeada, después de 6 h fue de $1.5582 \mu\text{g}/\text{cm}^2 \pm 0.068$. Considerando la concentración inicial en el donador, el coeficiente de permeabilidad calculado es de $0.0024 \pm 9.10 \times 10^{-5} \text{ cm}/\text{h}$. Los datos obtenidos muestran una tendencia lineal con muy poca variabilidad en el proceso (gráfica 3). Se encontró que aproximadamente el 1.5% de la dispersión de nanopartículas logró permear a través de la piel, alcanzando el medio receptor.

En el caso de las nanopartículas de plata existe poca información sobre estudios de permeación con los que se pueda hacer una comparación, algunos estudios como el realizado por Larese y cols. (2009), señala que las nanopartículas de este material solo se encuentran en la superficie del Ec y que la vía de penetración más probable es la intercelular, teniendo la hipótesis de que las nanopartículas de plata que atraviesan la piel se encuentran como plata elemental.

Para el presente estudio la baja concentración encontrada en la celda receptora puede deberse a que las nanopartículas penetraron y se almacenaron en los folículos pilosos pero no pudieron atravesar todas las capas de la piel, esto se puede demostrar ya que el flujo calculado (Tabla 8) fue considerablemente bajo en relación a la investigación realizada por Larese y cols, (2009) en donde obtienen un mayor flujo y por lo tanto una mayor cantidad de nanopartículas de plata encontradas en el sistema receptor .

Además de que el Ec es la principal barrera para impedir el paso de sustancias a través de la piel, existen otras características que dificultan el paso de las nanopartículas como son las cargas electrostáticas y el pH. La naturaleza electrofílica que poseen las nanopartículas es otro factor encontrado en la literatura que puede afectar el paso de las nanopartículas a través de la piel, existiendo unión a las proteínas del Ec y formando así agregados moleculares que impiden la penetración. En otros estudios de permeación se señala que las moléculas con alta carga electrofílica pueden formar complejos con las cargas que poseen las proteínas del Ec, formando grandes depósitos de moléculas en el Ec y así la difusión continuara aún después de que la exposición a la sustancia haya terminado (Hostýnek y cols; 2006). En un interesante estudio Monteiro-Riviere y cols. (2013) estudian la penetración de nanopartículas de plata en queratinocitos epidermales humanos. Los autores encuentran que las nanopartículas de plata son capaces de formar complejos proteínicos llamados coronas proteicas, que modulan la internalización celular de las nanopartículas. De este modo, dependiendo de la proteína con la que se asocian, será su capacidad para penetrar.

Para el caso de nanopartículas metálicas existe la teoría de que puede ocurrir una oxidación debido al sudor que se encuentra en la piel haciendo que la penetración sea muy baja y que las nanopartículas permanezcan sobre la superficie de la piel. (Filon y cols.; 2009). En la figura 10 se muestran fragmentos de piel en donde se puede observar que después de un periodo de exposición a las nanopartículas, la piel presenta manchas oscuras en el área de contacto, esto puede indicar que las nanopartículas de plata sufrieron una oxidación y por esta razón no pudieron penetrar las capas de la piel, encontrando pequeñas cantidades de plata en el sistema receptor de las celdas de Franz.

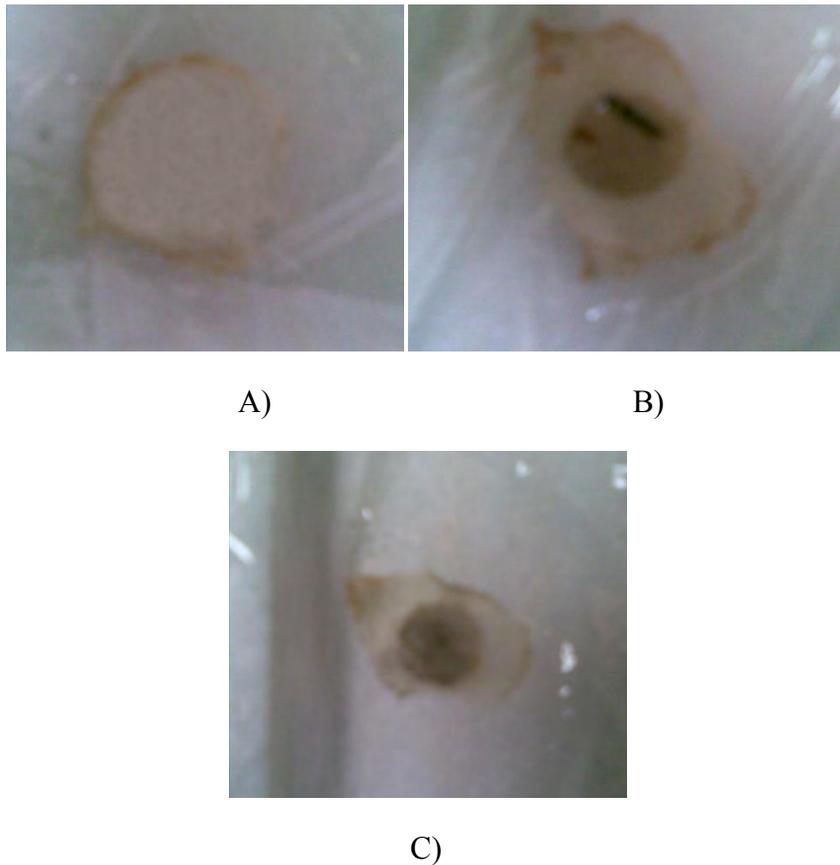


Figura 10. Fotografías de piel al término de las permeaciones en celdas de Franz. A) Muestra de piel con agua destilada (blanco); B) y C) muestras de piel al finalizar el tiempo de exposición con nanopartículas de plata.

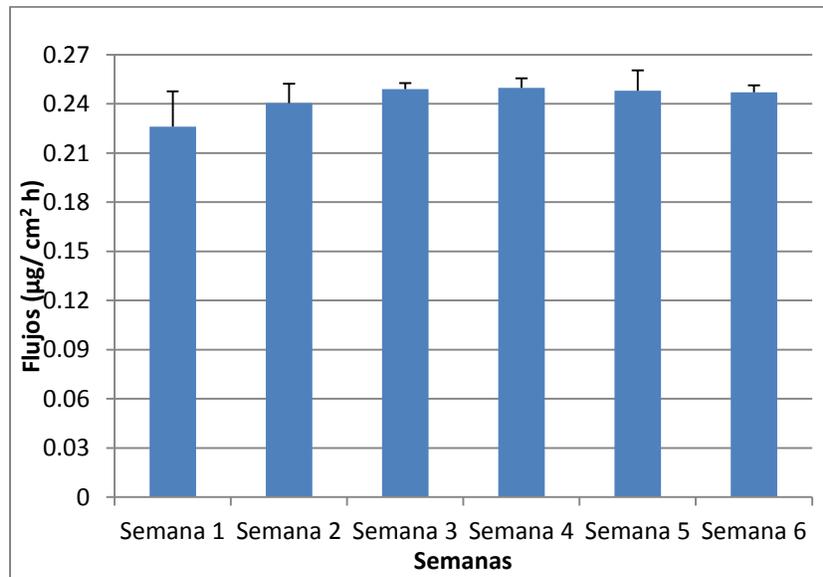
Para conocer la manera mediante la cual las nanopartículas penetran la piel es necesario determinar el flujo que se mantiene durante el estudio de permeación. En la tabla 8 se encuentran los datos de los flujos obtenidos para el presente estudio, en donde se observa (gráfica 4) que los flujos obtenidos en los diferentes ensayos realizados fueron bastante reproducibles.

La pobre penetración de las nanopartículas metálicas tiene una gran utilidad ya que están siendo investigadas y aplicadas como agentes bacteriostáticos y debido a que su mecanismo de acción no está lo suficientemente claro, lo ideal es que permanezcan en capas externas de la piel.

Tabla 8. Flujos obtenidos en las pruebas de permeación ($\mu\text{g}/\text{cm}^2\text{h}$).

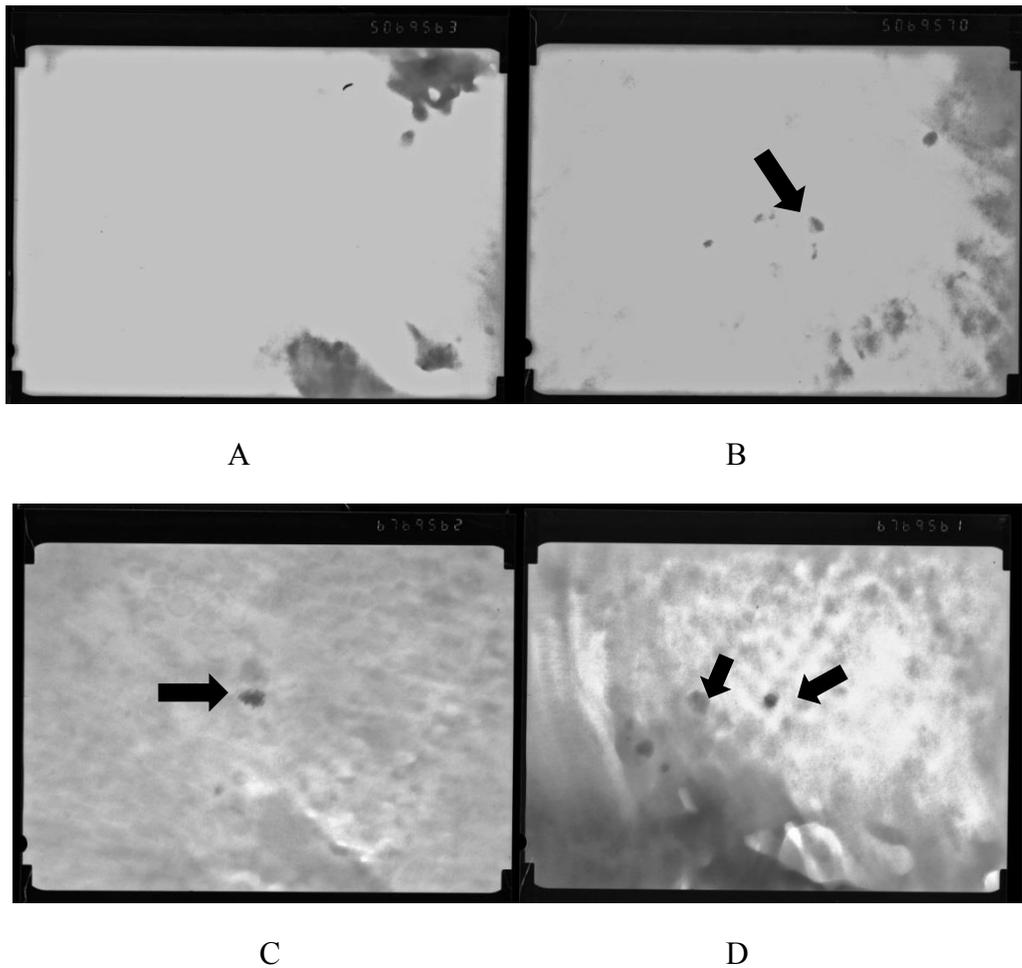
flujos promedio en las pruebas de permeación						
	Semana 1	Semana 2	Semana 3	Semana 4	Semana 5	Semana 6
1	0.203	0.2275	0.2531	0.2445	0.2485	0.2437
2	0.2293	0.2434	0.2472	0.2487	0.2601	0.2457
3	0.2459	0.2506	0.2463	0.2561	0.2356	0.2518
promedio	0.22606667	0.2405	0.24886667	0.24976667	0.24806667	0.24706667
D.E.	0.021632	0.011819898	0.00369369	0.005873103	0.01225575	0.0042194

- Los números 1, 2 y 3 corresponden a las repeticiones realizadas cada semana, mencionando además que para cada repetición se montaron 7 celdas de Franz (6 con nanopartículas y un blanco).



Gráfica 4. Flujos ($\mu\text{g}/\text{cm}^2\text{ h}$) obtenidos durante las permeaciones de nanopartículas de plata en piel.

Una vez finalizada el estudio de permeación, las muestras de piel se observaron al microscopio electrónico de transmisión (TEM) con la finalidad de observar si existió acumulación de nanopartículas de plata en la superficie de la piel, después de diferentes tiempos de contacto. En la figura 11 se muestran las imágenes tomadas en TEM, de los fragmentos de piel que contienen nanopartículas de plata a los diferentes tiempos de permeación. En estas imágenes se puede observar que existe una aglomeración creciente de NP conforme transcurre el tiempo de exposición en la piel: Podemos observar que en la imagen G de la figura 11 existe una mayor cantidad de nanopartículas de plata que permanecen adheridas a la superficie de la piel, como consecuencia del mayor tiempo de contacto.



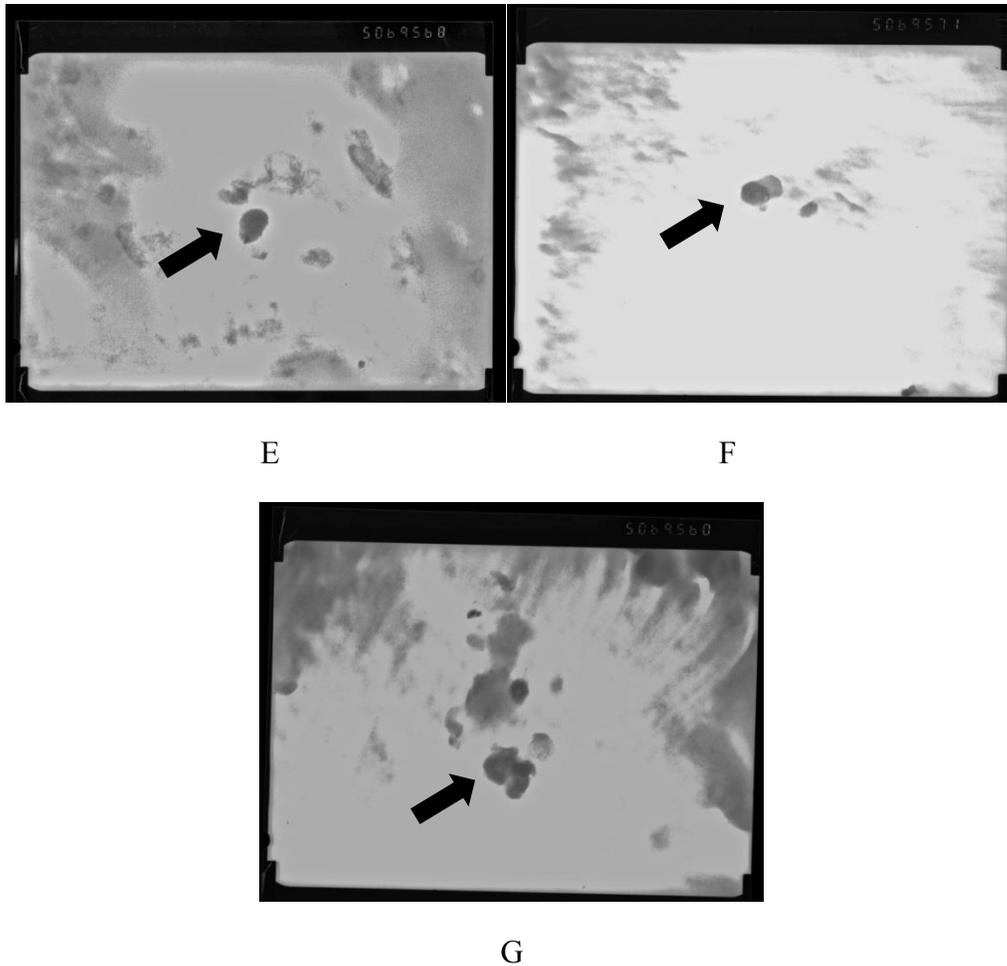


Figura 11. Fotografías por microscopía electrónica de transmisión (TEM). En donde se muestra la superficie de la piel expuesta a nanopartículas de plata durante diferentes tiempos de contacto. A) 30 min, B) 1hr, C) 2hr, D) 3hr, E) 4hr, F) 5hr, G) 6hr. Las flechas en las imágenes indican la presencia de nanopartículas de plata.

Un factor importante de la permeabilidad de las nanopartículas, es el tamaño que estas pueden poseer, debido a que existen diferentes vías por las cuales las nanopartículas pueden penetrar a través de la piel, estas vías pueden ser a través de las glándulas sebáceas o por medio del folículo piloso, se conoce teóricamente que partículas con un diámetro de 7-20nm son detectadas en el folículo piloso (Laresse y col; 2009).

Como se puede observar en las figuras 10 y 11, al transcurrir el tiempo de exposición de las nanopartículas de plata en la piel, estas formaron aglomerados que pueden encontrarse en los intersticios de la superficie de la piel o bien en los folículos pilosos, como lo señalan algunas investigaciones acerca de nanopartículas metálicas con un tamaño menor a 10nm.

Esto tiene una estrecha relación con los datos mostrados en las permeaciones, en las cuales no se encontró gran cantidad de nanopartículas en la fase receptora.

Como ya se mencionó, aunque los resultados obtenidos en este estudio confirman lo encontrado por otros autores acerca de la baja permeabilidad de las nanopartículas de plata a través de la piel, hay que considerar los siguientes factores: (i) El estudio se llevó a cabo en celdas de Franz estáticas. En este sentido, lo que se hizo fue remover completamente el medio receptor para cada muestreo, con el fin de simular lo que ocurre *in vivo*, en donde el soluto al alcanzar la dermis es rápidamente removido por torrente sanguíneo. (ii) Al montar la piel en la celda, se tiene una hidratación excesiva, lo que podría incrementar la penetración de muchas sustancias. (iii) La piel permanece rígida en la celda de difusión, mientras que *in vivo* la flexibilidad de la epidermis puede provocar una traslocación de las partículas y por tanto su penetración, además de que la aplicación de un masaje promovería el transporte hacia capas internas (Larese y cols., 2009).

5. CONCLUSIONES.

- Se empleó un método colorimétrico con el fin de conocer la cantidad de nanopartículas capaces de alcanzar el compartimento receptor de las celdas tipo Franz. Este método, basado en la formación de un complejo con la plata, mostró ser lineal dentro del rango de concentraciones propuesto.
- Se llevaron a cabo pruebas de permeabilidad *in vitro* con el fin de evaluar el paso de las nanopartículas a través de la piel.
- Los estudios de permeación mostraron que el 1.5 % de la cantidad inicial colocada en el donador alcanzó la solución receptora. Esto confirma lo encontrado por otros autores en donde la cantidad total de nanopartículas de plata capaz de atravesar todas las capas de la piel, es mínima, obteniendo un flujo y coeficiente de permeabilidad bajos. Esta baja concentración encontrada en el estudio de permeación puede deberse a que las nanopartículas de plata tuvieron un paso por medio de los folículos pilosos, forma agregados dentro de los folículos.
- Las imágenes de piel muestran que las nanopartículas permanecen preferentemente en la superficie o se filtran por los intersticios o los folículos pilosos.

6. PERSPECTIVAS.

- Realizar estudios de permeación con un mayor tiempo de exposición a las nanopartículas de plata para corroborar si estas sufren alguna oxidación que impida el paso por la piel.
- Utilizar una técnica de microscopia en la cual se pueda observar las diferentes capas de la piel y conocer detalladamente en que sitio permanecen las nanopartículas.
- Evaluar el comportamiento de diferentes formulaciones y tamaños de nanopartículas de plata con la finalidad de conocer la vía de acceso que pueden presentar.

7. REFERENCIAS.

- Barbero A. M., Frash F. H. Pig and guinea pig skin as surrogates for human *in vitro* penetration studies: quantitative studies. *Toxicology in vitro* 23 (2009) 1-13.
- Baroli B., Ennas M. G., Loffredo F., Isola M., Pinna R., López Quintela M. A. Penetration of metallic nanoparticles in human full thickness skin. *Journal of Investigative Dermatology*. 127 (2007) 1701-1712.
- Barry B.W. Novel mechanisms and devices to enable successful transdermal drug delivery. *European journal of pharmaceutical sciences*. 14 (2001) 101-114.
- Barry B.W. Drug delivery routes in skin: a novel approach. *Advanced drug delivery reviews*. 54 (2002) 531-540.
- Bouwstra J.A., Honeywell-Nguyen P.L. Skin structure and mode of action of vesicles. *Advanced drug delivery reviews*. 1 (2002) 541-555.
- Escobar Chávez J. J. Estudio de la penetración a través de la piel de naproxeno sódico utilizando agentes promotores de penetración (azona® y transcutol®), y de digluconato de clorhexidina mediante iontoforesis. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. Tesis de doctorado 2006.
- Espinoza González C. J. Propiedades físicas y químicas de partículas metálicas de tamaño nanométrico. Nanopartículas de plata. Diseño de materiales poliméricos avanzados 6 (2007) 23-27.
- Fayas M.A., Girilal M., Rahman M., Venkatesan R., Kalaichelvan P.T. Biosynthesis of silver and gold nanoparticles using thermophilic bacterium *Geobacillus stearothermophilus*. *Process Biochemistry* 46 (2011) 1958-1962.
- Filon L. F., D'Agostin F., Crosera M., Adami G., Bovenzi M., Maina G. In vitro absorption of metal powders through intact and damaged human skin. *Toxicology in vitro* 23 (2009) 574-579.
- Garidel P., Fölting B., Schaller I., Kerth A. The microstructure of the stratum corneum lipid barrier: Mid-infrared spectroscopic studies of hydrated ceramide: palmitic acid: cholesterol model systems. *Biophysical chemistry* 150 (2010) 144-156.

- Godin B., Touitou E. Transdermal skin delivery: Predictions for humans from in vivo, ex vivo and animal models. *Advanced drug delivery reviews* 59 (2007) 1152-1161.
- Hostynek J.J. Factors determining percutaneous metal absorption. *Food and chemical toxicology* 41 (2003) 327-345.
- Hostýnek J. J., Dreher F., Maibach H.I. Human Stratum corneum penetration by copper; in vivo study after occlusive and semi-occlusive application of the metal as powder. *Food and chemical toxicology* 44 (2006) 1539-1543.
- Junqueira L. C., Carneiro J. *Histología básica*. Masson 6ª edición. Barcelona España (2006) pp 360-370.
- Kanikkannan N., Mandip S. Skin permeation enhancement effect and skin irritation of saturated fatty alcohols. *International journal of pharmaceutics*. 248 (2002) 219-228.
- Labouta I. H., Schneider M. Interaction of inorganic nanoparticles with the skin barrier: current status and critical review. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*. 9 (2013) 39-54.
- Lademann J., Jacobi U., Surber C., Weigmann H. J., Fluhr J. W. The tape stripping procedure-evaluation of some critical parameters. *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics* 72 (2009) 317-323.
- Lademann J., Richter H., Schanzer S., Knorr F., Meinke M., Sterry W., Patzelt A. Penetration and storage of particles in human skin: perspectives and safety aspects. *European Journal and biopharmaceutics* 77 (2011) 465-468.
- Lademann J., Richter H., Teichmann A., Otberg N., Blume-Peytavi U., Luengo J., Weib B., Schaefer U.F., Lehr C.M., Wepf R., Sterry W. Nanoparticles-An efficient carrier for drug delivery into the hair follicles. *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics*. (2007). 66 (2007) 159-164.
- Laresse F. F., D'Agostin F., Crosera M., Adami G., Renzi N., Bovenzi M., Maina G. Human skin penetration of silver nanoparticles through intact and damaged skin. *Toxicology*. 255 (2009) 33-37.
- Mahendra R., Alka Y., Aniket G. Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials. *Biotechnology advances*. 27 (2009) 76-83.

- Mansouri S. Seyed; Ghader S., Experimental study on effect of different parameters on size and shape of triangular silver nanoparticles prepared by a simple and rapid method in aqueous solution. *Arabian journal of chemistry*. 2 (2009) 47-53.
- Mock J.J Barbic M.; Smith D.R.,Schultz D.A.,Schultz S. Shape effects in plasmon resonance of individual colloidal silver nanoparticles. *Journal of chemical physics* 116 (2002) 6755-6759.
- Mohammed A., Abdul A., Yasmin S., Asgar A. Status of terpenes as skin penetration enhancers. *Drug discovery today*. 12 (2007) 1061-1067.
- Monteiro-Riviere N.A., Samberg M.E., Oldenburg S.J., Riviere J.E. Protein binding modulates the cellular uptake of silver nanoparticles into human cells: Implications for in vitro to in vivo extrapolations? *Toxicology Letters* 220 (2013) 286-293.
- Moser K.,Kriwet K., Naik A., Kalia Y. N., Guy R. H. Passive skin penetration enhancement and its quantification *in vitro*. *European Journal of pharmaceutics and biopharmaceutics*. 52 (2001) 103-112.
- Pailler-Mattei C., Pavan S., Vargiolu R., Pirot F., Falson F., Zahouani H.. Contribution of stratum corneum in determining bio.tribologicalproperties of the human skin. *Wear* 263 (2007) 1038-1043.
- Poet T.S., McDougal James N. Skin Absorption and human risk assessment. *Chemico-Biological Interactions* 140 (2002) 19-34.
- Prow T. W., Grice J. E., Lin L., Faye R., Butler M., Becker W., Wurm E. M.T., Yoong C., Robertson T. A., Soyer H.P, Roberts M.S. Nanoparticles and microparticles for skin drug delivery. *Advanced drug delivery reviews* 63 (2011) 470-491.
- Raghuramann K., Katti K. K. Methods for producing silver nanoparticles. US Patent 2006/0045916 A1.
- Ravindran A., Chandran P., Khan S. S. Biofunctionalized silver nanoparticles: Advances and prospects. *Colloids and surface B: Biointerfaces* 105 (2013) 342-352.
- Santos Ramos B., Guerrero Aznar M.D., administración de medicamentos teoría y práctica. Diaz de santos, (1994) pp.36-41.
- Sarkar P., Bhui D. K., Bar H., Sahoo G. P., Prasad S., Misra A. Synthesis and photophysical study of silver nanoparticles stabilized by unsaturated dicarboxylates. *Journal of luminescence* 129 (2009) 704-709.

- Silva Álvarez M. estudio del transporte de sustancias por vía cutánea o mucosal “Evaluación de la liberación y penetración en piel de naproxeno formulado en parches transdérmicos elaborados a partir de dispersiones submicronicas”. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. Tesis de licenciatura 2005.
- Smith E. W., Maibach H. I. percutaneous penetration enhancers. Taylor and Francis group U.S.A (2006). Pp. 22-26.
- Sondi I., Salopek-Sondi B. Silver nanoparticles as antimicrobial agent: a case study on *E.coli* as a model for gram-negative bacteria. Journal of colloid and interface science. 275 (2004) 177-182.
- Villarino N. F, Landoni M. F. Administración transdermica de fármacos “Una alternativa terapéutica”. Analecta Veterinaria 26 (2006) 28-37.
- Wang H., Qiao X., Chien J., Wang X., Ding S. Mechanism of PVP in the preparation of silver nanoparticles. Materials chemistry and physics 94 (2005) 449-453.
- Williams A. C. Transdermal and topical drug delivery. Pharmaceutical press Chicago (2003) pp 1-23.
- Williams A. C.; Barry B. W. Penetration enhancers. Advanced drug delivery reviews. 64 (2012) 128-137.
- Xu J., Han X., Liu H., Hu Y. Synthesis and optical properties of silver nanoparticles stabilized by Gemini surfactant. Colloids and surfaces A: physicochemical Eng. Aspects 273 (2006) 179-183.
- Yacaman M. J., Elechiguerra J. L., Burt J. L., Morones J. R., Camacho-Bragado A., Gao X., Lara H. H. Interaction of silver nanoparticles with HIV-1. Journal of nanobiotechnology 3 (2005). <http://www.jnanobiotechnology.com/content/3/1/6>.
- Yamashita F., Hashida M. Mechanistic and empirical modeling of skin permeation of drugs. Advanced drug delivery reviews 55 (2003) 1185-1199.
- Yiping W., Rashmi T., Qiuxi F., Bozena M. Transdermal iontophoresis: combination strategies to improve transdermal iontophoretic drug delivery. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics. 60 (2005) 179-191.
- Zhang W., Qiao X., Chen J. Synthesis and characterization of silver nanoparticles in AOT microemulsion system. Chemical Physics 330 (2006) 495-500.

- Zielinska A., Skwarek E., Zaleska A., Gazda M., Hupka J. Preparation of silver nanoparticles with controlled particle size. *Procedia chemistry* 1 (2009) 1560-1566.

ANEXOS

Anexo I. Datos estudio de permeación.

Tabla 9. Resultados de permeaciones obtenidas a las diferentes semanas de estudio y a los tiempos de exposición indicados.

Semana 1						
Tiempos (hr)	Absorbancia	Concentración (µg/ml)	Absorbancia	Concentración (µg/ml)	Absorbancia	Concentración (µg/ml)
0.5	0.0436	0.0191	0.0544	0.0252	0.056	0.0261
1	0.0467	0.0208	0.0564	0.0263	0.0679	0.0328
2	0.05	0.0227	0.0637	0.0304	0.0693	0.0336
3	0.0628	0.0299	0.0712	0.0347	0.0738	0.0361
4	0.0656	0.0315	0.0719	0.0351	0.0759	0.0373
5	0.0671	0.0324	0.074	0.0362	0.0788	0.039
6	0.0879	0.0441	0.0799	0.0396	0.0795	0.0394

Semana 2						
Tiempos (hr)	Absorbancia	Concentración (µg/ml)	Absorbancia	Concentración (µg/ml)	Absorbancia	Concentración (µg/ml)
0.5	0.0472	0.0211	0.0554	0.025	0.0568	0.0265
1	0.0584	0.0274	0.059	0.0278	0.068	0.0329
2	0.0637	0.0304	0.0677	0.0327	0.0735	0.036
3	0.0675	0.0326	0.0753	0.037	0.0758	0.0373
4	0.071	0.0346	0.077	0.0379	0.0764	0.0376
5	0.0764	0.0376	0.0784	0.0387	0.0782	0.0386
6	0.0788	0.039	0.0796	0.0394	0.0798	0.0395

Semana 3						
Tiempos (hr)	Absorbancia	Concentración (µg/ml)	Absorbancia	Concentración (µg/ml)	Absorbancia	Concentración (µg/ml)
0.5	0.0648	0.0313	0.0567	0.0265	0.0687	0.0333
1	0.067	0.032	0.0654	0.0314	0.0693	0.0336
2	0.0744	0.0362	0.0728	0.0356	0.0718	0.035
3	0.0758	0.0373	0.0766	0.0377	0.0732	0.0358
4	0.0776	0.0383	0.0773	0.0359	0.0755	0.0371
5	0.0792	0.0392	0.0785	0.0388	0.0779	0.0385
6	0.084	0.041	0.0793	0.0392	0.0786	0.0388

semana 4						
Tiempos (hr)	Absorbancia	Concentración (µg/ml)	Absorbancia	Concentración (µg/ml)	Absorbancia	Concentración (µg/ml)
0.5	0.0638	0.0305	0.0632	0.0301	0.059	0.0279
1	0.0673	0.0325	0.0665	0.032	0.0689	0.0334
2	0.0724	0.0353	0.0714	0.0348	0.0736	0.0367
3	0.0737	0.0361	0.0749	0.0368	0.075	0.0368
4	0.0749	0.0368	0.0763	0.0375	0.0779	0.0385
5	0.0762	0.0375	0.0782	0.0386	0.0812	0.0403
6	0.078	0.0385	0.0822	0.0409	0.0837	0.0417

semana 5						
Tiempos (hr)	Absorbancia	Concentración (µg/ml)	Absorbancia	Concentración (µg/ml)	Absorbancia	Concentración (µg/ml)
0.5	0.0478	0.0214	0.0688	0.0333	0.0557	0.0259
1	0.0665	0.0321	0.0741	0.0363	0.0582	0.0273
2	0.0758	0.0373	0.0765	0.0377	0.0673	0.0325
3	0.0764	0.0376	0.0771	0.038	0.0712	0.0347
4	0.0731	0.0357	0.0784	0.0387	0.0758	0.0373
5	0.0775	0.0382	0.079	0.0391	0.0746	0.0366
6	0.0793	0.0392	0.0847	0.0423	0.0785	0.0388

semana 6						
Tiempos (hr)	Absorbancia	Concentración (µg/ml)	Absorbancia	Concentración (µg/ml)	Absorbancia	Concentración (µg/ml)
0.5	0.0544	0.0252	0.0664	0.0321	0.0678	0.0327
1	0.0653	0.0313	0.0699	0.0339	0.0734	0.035
2	0.0684	0.0332	0.0733	0.0359	0.0742	0.0364
3	0.0739	0.0362	0.0759	0.0373	0.0749	0.0368
4	0.0757	0.0372	0.0721	0.0352	0.0765	0.0377
5	0.0782	0.0386	0.0765	0.0377	0.0782	0.0386
6	0.0789	0.039	0.0779	0.0385	0.0797	0.0395

Tabla 10. Cantidad de nanopartículas de plata por unidad de área. ($\mu\text{g}/\text{ml}$).

Semana 1					
Tiempos (hr)	Cantidad	Cantidad	Cantidad	Promedio	Desv. Estándar
0.5	0.1224	0.1615	0.1673	0.1504	0.0244
1	0.1333	0.1685	0.2102	0.1707	0.0385
2	0.1455	0.1948	0.2153	0.1852	0.0359
3	0.1916	0.2224	0.2314	0.2151	0.0208
4	0.2019	0.225	0.2391	0.2220	0.0187
5	0.2076	0.2320	0.25	0.2299	0.0212
6	0.2826	0.2538	0.2525	0.2630	0.0170

Semana 2					
Tiempos (hr)	Cantidad	Cantidad	Cantidad	Promedio	Desv. Estándar
0.5	0.1352	0.1602	0.1698	0.1551	0.0178
1	0.1756	0.1782	0.2108	0.1882	0.0196
2	0.1948	0.2096	0.2307	0.2117	0.0180
3	0.2089	0.2371	0.2391	0.2284	0.0168
4	0.2217	0.2429	0.2410	0.2352	0.0116
5	0.2410	0.2480	0.2474	0.2455	0.0038
6	0.25	0.2525	0.2532	0.2519	0.0016

Semana 3					
Tiempos (hr)	Cantidad	Cantidad	Cantidad	Promedio	Desv. Estándar
0.5	0.2006	0.1698	0.2134	0.1946	0.0224
1	0.2051	0.2012	0.2153	0.2072	0.0072
2	0.2320	0.2282	0.2243	0.2282	0.0038
3	0.2391	0.2416	0.2294	0.2367	0.0064
4	0.2455	0.2301	0.2378	0.2378	0.0076
5	0.2512	0.2487	0.2467	0.2489	0.0022
6	0.2628	0.2512	0.2487	0.2542	0.0075

Semana 4					
Tiempos (hr)	Cantidad	Cantidad	Cantidad	Promedio	Desv. Estándar
0.5	0.1955	0.1924	0.1788	0.1891	0.0089
1	0.2083	0.2051	0.2141	0.2091	0.0045
2	0.2262	0.2230	0.2352	0.2282	0.0063
3	0.2314	0.2358	0.2358	0.2344	0.0025
4	0.2358	0.2403	0.2467	0.2410	0.0054
5	0.2403	0.2474	0.2583	0.2487	0.0090
6	0.2467	0.2621	0.2673	0.2587	0.0106

Semana 5					
Tiempos (hr)	Cantidad	Cantidad	Cantidad	Promedio	Desv. Estándar
0.5	0.1371	0.2134	0.1660	0.1722	0.0385
1	0.2057	0.2326	0.175	0.2044	0.0288
2	0.2391	0.2416	0.2083	0.2297	0.0185
3	0.241	0.2435	0.2224	0.2356	0.0115
4	0.2288	0.2480	0.2391	0.2386	0.0096
5	0.2448	0.2506	0.2346	0.2433	0.0081
6	0.2512	0.2711	0.2487	0.2570	0.0122

Semana 6					
Tiempos (hr)	Cantidad	Cantidad	Cantidad	Promedio	Desv. Estándar
0.5	0.1615	0.2057	0.2096	0.1923	0.0267
1	0.2006	0.2173	0.2243	0.2141	0.0121
2	0.2128	0.2301	0.2333	0.2254	0.0110
3	0.2320	0.2391	0.2358	0.2356	0.0035
4	0.2384	0.2256	0.2416	0.2352	0.0084
5	0.2474	0.2416	0.2474	0.2455	0.0033
6	0.25	0.2467	0.2532	0.25	0.0032

Tabla 11. Cantidad de nanopartículas de plata acumulada a diversos tiempos. ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$).

Semana 1					
Tiempos (hr)	Cantidad	Cantidad	Cantidad	Promedio	Desv. Estándar
0.5	0.1224	0.1615	0.1673	0.1504	0.0244
1	0.2557	0.3301	0.3775	0.3211	0.0613
2	0.4012	0.525	0.5929	0.5064	0.0971
3	0.5929	0.7474	0.8243	0.7215	0.1178
4	0.7948	0.9724	1.0634	0.9435	0.1365
5	1.0025	1.2043	1.3134	1.1735	0.1577
6	1.2852	1.4583	1.5660	1.4365	0.1416

Semana 2					
Tiempos (hr)	Cantidad	Cantidad	Cantidad	Promedio	Desv. Estándar
0.5	0.1352	0.1602	0.1698	0.1551	0.0178
1	0.3108	0.3384	0.3807	0.3433	0.0351
2	0.5057	0.5480	0.6115	0.5551	0.0532
3	0.7147	0.7852	0.8506	0.7835	0.0679
4	0.9365	1.0282	1.0916	1.0188	0.0779
5	1.1775	1.2762	1.3391	1.2643	0.0814
6	1.4275	1.5288	1.5923	1.5162	0.0830

Semana 3					
Tiempos (hr)	Cantidad	Cantidad	Cantidad	Promedio	Desv. Estándar
0.5	0.2006	0.1698	0.2134	0.1946	0.0224
1	0.4057	0.3711	0.4288	0.4019	0.0290
2	0.6378	0.5993	0.6532	0.6301	0.0277
3	0.8769	0.8410	0.8826	0.8668	0.0225
4	1.1224	1.0711	1.1205	1.1047	0.0290
5	1.3737	1.3198	1.3673	1.3536	0.0294
6	1.6365	1.5711	1.6160	1.6079	0.0334

Semana 4					
Tiempos (hr)	Cantidad	Cantidad	Cantidad	Promedio	Desv. Estándar
0.5	0.1955	0.1929	0.1788	0.1891	0.0089
1	0.4038	0.3980	0.3929	0.3982	0.0054
2	0.6301	0.6211	0.6282	0.6264	0.0047
3	0.8615	0.8570	0.8641	0.8608	0.0035
4	1.0974	1.0974	1.1108	1.1019	0.0077
5	1.3378	1.3448	1.3692	1.3506	0.0164
6	1.5846	1.6070	1.6365	1.6094	0.0260

Semana 5					
Tiempos (hr)	Cantidad	Cantidad	Cantidad	Promedio	Desv. Estándar
0.5	0.1371	0.2134	0.1660	0.1722	0.0385
1	0.3429	0.4461	0.3410	0.3767	0.06014
2	0.5820	0.6878	0.5493	0.6064	0.0723
3	0.8230	0.9314	0.7717	0.8420	0.0814
4	1.0519	1.1794	1.0108	1.0807	0.0879
5	1.2967	1.4301	1.2455	1.3241	0.0952
6	1.5480	1.7012	1.4942	1.5811	0.1074

Semana 6					
Tiempos (hr)	Cantidad	Cantidad	Cantidad	Promedio	Desv. Estándar
0.5	0.1615	0.2057	0.2096	0.1923	0.0267
1	0.3621	0.4230	0.4339	0.4064	0.0386
2	0.575	0.6532	0.6673	0.6318	0.0497
3	0.8070	0.8923	0.9032	0.8675	0.0526
4	1.0455	1.1179	1.1448	1.1027	0.0513
5	1.2929	1.3596	1.3923	1.3482	0.0506
6	1.5429	1.6064	1.6455	1.5982	0.0517

Anexo II. Flujos obtenidos para estudios de permeación.Tabla 12. Flujos de estudios de permeación. ($\mu\text{g}/\text{cm}^2 \text{ h}$).

Semana 1					
Tiempos (hr)	Flujo	Flujo	Flujo	Promedio	Desv. Estándar
0.5	0.1224	0.1615	0.1673	0.1504	0.0244
1	0.2557	0.3301	0.3775	0.3211	0.0613
2	0.4012	0.525	0.5929	0.5064	0.0971
3	0.5929	0.7474	0.8243	0.7215	0.1178
4	0.7948	0.9724	1.0634	0.9435	0.1365
5	1.0025	1.2044	1.3134	1.1735	0.1577
6	1.2852	1.4583	1.5660	1.4365	0.1416

Semana 2					
Tiempos (hr)	Flujo	Flujo	Flujo	Promedio	Desv. Estándar
0.5	0.1352	0.1602	0.1698	0.1551	0.0178
1	0.3108	0.3384	0.3807	0.3433	0.0351
2	0.5057	0.5480	0.6115	0.5551	0.0532
3	0.7147	0.7852	0.8506	0.7835	0.0679
4	0.9365	1.0282	1.0916	1.0188	0.0779
5	1.1775	1.2762	1.3391	1.2643	0.0814
6	1.4275	1.5288	1.5923	1.5162	0.0830

Semana 3					
Tiempos (hr)	Flujo	Flujo	Flujo	Promedio	Desv. Estándar
0.5	0.2006	0.1698	0.2134	0.1946	0.0224
1	0.4057	0.3711	0.4288	0.4019	0.0290
2	0.6378	0.5993	0.6532	0.6301	0.0277
3	0.8769	0.8410	0.8826	0.8668	0.0225
4	1.1224	1.0711	1.1205	1.1047	0.0290
5	1.3737	1.3198	1.3673	1.3536	0.0294
6	1.6365	1.5711	1.6160	1.6079	0.0334

Semana 4					
Tiempos (hr)	Flujo	Flujo	Flujo	Promedio	Desv. Estándar
0.5	0.1955	0.1929	0.1788	0.1891	0.0089
1	0.4038	0.3980	0.3929	0.3982	0.0054
2	0.6301	0.6211	0.6282	0.6264	0.0047
3	0.8615	0.8570	0.8641	0.8608	0.0035
4	1.0974	1.0974	1.1108	1.1019	0.0077
5	1.3378	1.3448	1.3692	1.3506	0.0164
6	1.5846	1.6070	1.6365	1.6094	0.0260

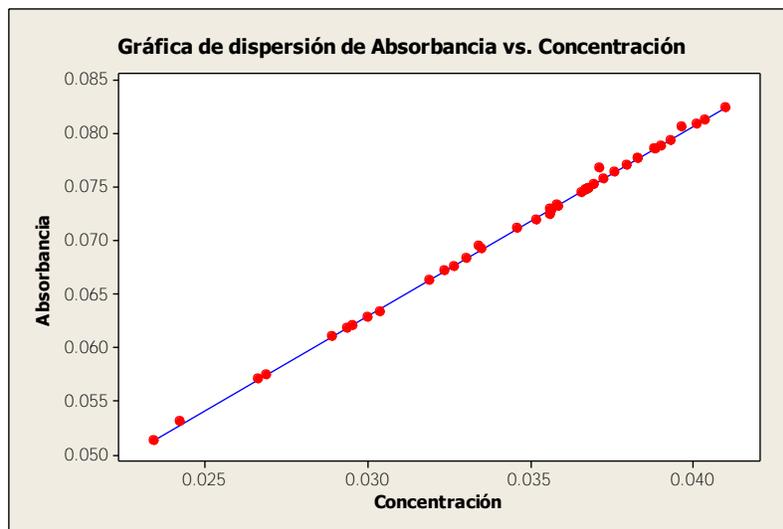
Semana 5					
Tiempos (hr)	Flujo	Flujo	Flujo	Promedio	Desv. Estándar
0.5	0.1371	0.2134	0.1660	0.1722	0.0385
1	0.3429	0.4461	0.3410	0.3767	0.0601
2	0.5820	0.6878	0.5493	0.6064	0.0723
3	0.8230	0.9314	0.7717	0.8420	0.0814
4	1.0519	1.1794	1.0108	1.0807	0.0879
5	1.2967	1.4301	1.2455	1.3241	0.0952
6	1.5480	1.7012	1.4942	1.5811	0.1074

Semana 6					
Tiempos (hr)	Flujo	Flujo	Flujo	Promedio	Desv. Estándar
0.5	0.1615	0.2057	0.2096	0.1923	0.0267
1	0.3621	0.4230	0.4339	0.4064	0.0386
2	0.575	0.6532	0.6673	0.6318	0.0497
3	0.8070	0.8923	0.9032	0.8675	0.0526
4	1.0455	1.1179	1.1448	1.1027	0.0513
5	1.2929	1.3596	1.3923	1.3482	0.0506
6	1.5429	1.6064	1.6455	1.5982	0.0517

Anexo III. Pruebas estadísticas.

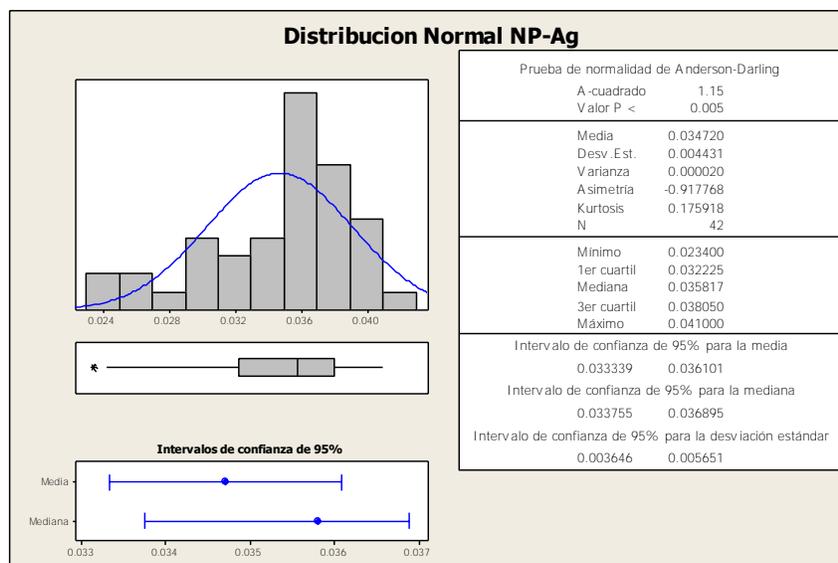
Se realizó un análisis estadístico para determinar si los datos presentan una distribución normal.

Como se puede observar en la gráfica 5 existe una relación directamente proporcional entre la absorbancia y la concentración, esto se puede saber ya que los datos graficados de absorbancia y concentración de las NP-Ag tienden a formar una línea recta. La relación entre la absorbancia y la concentración es importante de acuerdo a la ley de beer $A=\epsilon l C$. En la cual nos indica que la concentración es directamente proporcional a la absorbancia obtenida de un analito.



Gráfica 5. Dispersión absorbancia vs concentración.

En la gráfica 6 se observa que los datos obtenidos de concentración presentan una tendencia a una distribución normal, algunos datos se encuentran fuera de la línea de tendencia, la línea del histograma debe ser similar a una campana de gauss en donde establece que todos los datos dentro de esta línea tienen un comportamiento normal. En este estudio la falta de penetración por parte de las nanopartículas hace que no todos los datos tengan un comportamiento estadísticamente normal.



Gráfica 6. Histograma distribución normal para la concentración de NP-Ag.