



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES

CUAUTITLÁN

LIBERACIÓN TRANSDÉRMICA PROMOVIDA POR
MICROAGUJAS DE KETOROLACO TROMETAMINA
FORMULADO EN LIPOSOMAS ELÁSTICOS

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICA FARMACÉUTICO BIOLÓGICA

PRESENTA

CYNTHIA RODRÍGUEZ GARZA

ASESORA: DRA. FLORA ADRIANA GANEM RONDERO
COASESORA: DRA. MARÍA GUADALUPE NAVA ARZALUZ

CUAUTITLÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO 2018



Universidad Nacional
Autónoma de México



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**

ASUNTO: VOTO APROBATORIO

**M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE**

**ATN: I.A. LAURA MARGARITA CORTAZAR FIGUEROA
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 comunicar a usted que revisamos el: Trabajo de Tesis

Liberación transdérmica promovida por microagujas de ketorolaco trometamina formulado en liposomas elásticos.

Que presenta la pasante: **Cynthia Rodríguez Garza**

Con número de cuenta: 303085557 para obtener el Título de la carrera: Química Farmacéutico Biológica.

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

ATENTAMENTE

"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 02 de Agosto de 2017.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

| | NOMBRE | FIRMA |
|----------------------|-----------------------------------|-------|
| PRESIDENTE | DESS. Rodolfo Cruz Rodríguez | |
| VOCAL | Q.F.B. Guadalupe Rebollar Barrera | |
| SECRETARIO | Dra. Flora Adriana Ganem Rondero | |
| 1er. SUPLENTE | Dr. David Quintanar Guerrero | |
| 2do. SUPLENTE | Dra. Elizabeth Piñón Segundo | |

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

LMCF/cga*

Dedicatorias

Dedico esta tesis a mis dos pequeños **Melissa y Diego**, por quienes toda mi vida tiene sentido, Melissa mi princesa hermosa, eres lo que siempre soñé, tan fuerte e inteligente, que tan pequeña me llenas de orgullo y satisfacción, te amo y te adoro mi amor; y Diego mi pequeño amor, tan lindo y tan buen hijo que me haces sentir la mamá más feliz y me haces sentir orgullosa, te amo y te adoro mi amor. Son el motor de mi vida y siempre que doy un paso lo hago pensando en ustedes, son lo más importante por siempre. Gracias por tanto amor, me encanta que sean parte de mí y sean la causa de mi felicidad y mi fortaleza.

A ti Edson, mi Químico favorito, al que más admiro, y porque este proyecto de vida está escrito a tu lado, eres el amor de mi vida. Gracias por tu compañía y cariño. Te amo mucho.

Agradezco con el corazón a mis papás Magdalena y Adrián, porque siempre ante toda circunstancia me han apoyado y porque lo que he logrado en la vida es gracias a ustedes. Porque siempre están para mí y por esto y mucho más son los mejores papás. Esta tesis es dedicada a ustedes porque también está reflejado su esfuerzo en mí.

A ti ma, por todo tu amor y apoyo incondicional, porque eres la mujer que siempre está detrás de mí, mi soporte más grande, gracias por tanto, te debo la vida entera. Te amo muchísimo!

A ti pa, porque eres el hombre que más admiro en el mundo, porque eres el orgullo de la familia y que siempre nos has enseñado a ser unidos, tu eres mi ídolo por siempre. Te amo muchísimo!

A mis hermanos Adrián, Pamela y Ximena, son parte de mí, estoy orgullosa de ustedes y es que cada uno brilla de manera diferente, soy afortunada de tenerlos como hermanos, y porque aunque vamos lento hacemos lo que queremos y logramos nuestros objetivos.

A mis abuelitos, mamá Licha y papá Ramiro, aunque estemos lejos los amo mucho mucho y siempre los tengo presentes; y a mis abuelitos Cele y Pancho porque los llevo siempre en mi corazón.

Agradecimientos

Agradezco a la Dra. Adriana Ganem, por su paciencia ante tanto tiempo que me tomo terminar, por compartirme su gran conocimiento y sabiduría, generar en mí el impulso de querer ser una gran científica como usted. La admiro y quiero mucho.

Agradezco la Dra. Lupita Nava, porque siempre estuvo al pendiente y me apoyo mucho, por todo lo que me enseñó y porque además de ser una gran guía en este proyecto me brindo su amistad y su gran conocimiento. Gracias por todo la quiero mucho.

A todos mis amigos del laboratorio por su apoyo y aporte de conocimiento con los equipos y procedimientos Martin, Sergio, Viri, Zaida; y amigos de la carrera que de alguna forma me ayudaron durante todo este tiempo.

Agradezco a la Sra. Berta, Sr. Jome, Escarlett y Begoña, porque nos apoyaron mucho a Edson y a mí en esta etapa tan importante de nuestra vida, ustedes son parte de nuestra familia.

Agradezco especialmente a Lic. Memo Maldonado, por todo el esfuerzo para resolver el problema que detuvo mi titulación, sin tu profesionalismo y apoyo esto no lo hubiera podido concluir, ¡Gracias!

Agradezco a la Ing. Teresa Álvarez y al equipo Jabotière que más que compañeros de trabajo son mis amigos; por darme la oportunidad en este tiempo de concluir con los trámites de mi titulación, por la oportunidad de aprender, dejarme envolver en el ámbito profesional y hacerme sentir tan eficiente e importante como Química aunque todavía no tenía el título.
¡Gracias!

A los miembros del comité de tesis: DESS Rodolfo Cruz, Dr. David Quintanar, Dra. Elizabeth Piñón, Q.F.B. Guadalupe Rebollar; por el tiempo dedicado para la revisión de este trabajo.

A la UNAM porque es un orgullo pertenecer a esta gran familia de conocimiento, por el espacio y dedicación a todos los estudiantes que llegamos con la emoción y entusiasmo de aprender y salir de aquí preparados para poder aplicar y expresar el conocimiento adquirido en el ámbito profesional.

A Dios porque nunca me dejas y me acompañas en todo momento a mí y a mi familia

Índice General

| | |
|--|-----------|
| Índice general | I |
| Índice de figuras | III |
| Índice de tablas | III |
| Índice de gráficas | IV |
| Índice de ecuaciones | V |
| Lista de abreviaturas | VI |
| | |
| 1. Introducción | 1 |
| | |
| 2. Marco teórico | 3 |
| 2.1 Ketorolaco Trometamina (KT) | 3 |
| 2.2 La piel | 4 |
| 2.3 Penetración transdérmica | 5 |
| 2.4 Estudios de liberación | 6 |
| 2.5 Promotores o potenciadores de permeabilidad | 8 |
| 2.5.1 Microagujas | 10 |
| 2.5.2 Liposomas elásticos (LE) | 13 |
| 2.5.2.1 Mecanismo de formación de los LE | 15 |
| 2.5.2.2 Métodos de preparación de liposomas elásticos. | 17 |
| 2.5.2.3 Estabilidad de los LE | 18 |
| | |
| 3. Objetivos e Hipótesis | 19 |
| | |
| 4. Metodología | 20 |
| 4.1 Reactivos y Equipos | 20 |
| 4.2 Métodos analíticos | 21 |
| 4.2.1 Obtención de la longitud de onda máxima | 21 |
| 4.2.2 Linealidad | 21 |
| 4.2.3 Precisión | 22 |
| 4.2.4 Exactitud | 22 |
| 4.3 Método de preparación y caracterización de los LE con KT | 22 |
| 4.3.1 Preparación de LE con KT | 22 |
| 4.3.2 Caracterización de los LE | 22 |
| 4.3.2.1 Determinación del tamaño de vesícula | 23 |

| | |
|---|----|
| 4.3.2.2 Determinación del potencial Z | 23 |
| 4.3.2.3 Eficiencia de encapsulamiento del fármaco en los LE | 23 |
| 4.3.2.4 Prueba de elasticidad | 24 |
| 4.4 Estudio de liberación “ <i>in vitro</i> ” de KT a partir de los LE | 24 |
| 4.5 Prueba de permeación “ <i>in vitro</i> ” de KT formulado en LE a través de piel de oreja de cerdo intacta y pretratada con microagujas | 25 |
| 4.6 Extracción del fármaco retenido en la piel al final de las permeaciones | 26 |
| 5. Resultados y discusión | 27 |
| 5.1 Preparación de los LE | 27 |
| 5.2 Caracterización de los LE | 27 |
| 5.2.1 Tamaño de vesícula | 27 |
| 5.2.2 Potencial Zeta | 28 |
| 5.2.3 Determinación de la eficiencia de encapsulamiento | 28 |
| 5.2.4 Prueba de elasticidad | 29 |
| 5.3 Estudios de liberación “ <i>in vitro</i> ” de KT a partir de LE | 30 |
| 5.4 Estudios de permeación de KT formulado en LE a través de piel intacta y extracción del fármaco remanente en la piel. | 32 |
| 5.5 Estudios de permeación “ <i>in vitro</i> ” de KT a través de piel tratada con microagujas y extracción del fármaco remanente en la piel | 34 |
| 6. Conclusiones | 38 |
| 7. Perspectivas | 39 |
| Referencias | 40 |
| Anexos | 45 |
| Anexo 1. Tamaño de vesícula | 45 |
| Anexo 2. Potencial Z | 46 |
| Anexo 3. Eficiencia de encapsulamiento | 47 |
| Anexo 4. Prueba de elasticidad | 51 |
| Anexo 5. Liberación “ <i>in vitro</i> ” del KT formulado en LE | 52 |
| Anexo 6. Permeación de KT en LE a través de la piel tratada con Microagujas | 57 |
| Anexo 7. Extracciones de KT retenido en la piel | 61 |

Índice de figuras

| | |
|--|----|
| Figura 1. Estructura química del KT | 3 |
| Figura 2. Estructura de la piel | 4 |
| Figura 3. Vías de penetración a través de la piel | 5 |
| Figura 4. Microagujas sólidas | 10 |
| Figura 5. Microagujas recubiertas | 11 |
| Figura 6. Microagujas solubles | 11 |
| Figura 7. Microagujas huecas | 12 |
| Figura 8. Métodos de liberación de fármaco usando microagujas | 12 |
| Figura 9. Representación esquemática de los liposomas | 13 |
| Figura 10. Visualización de liposomas elásticos por microscopía electrónica de transmisión (TEM) | 16 |
| Figura 11. Celda de difusión tipo Franz | 24 |
| Figura 12. Rodillo de microagujas y direcciones para las microperforaciones | 25 |
| Figura 13. Proceso de permeación de LE con KT empleando microagujas | 36 |

Índice de tablas

| | |
|--|----|
| Tabla 1. Ventajas y desventajas de los LE | 14 |
| Tabla 2. Métodos de preparación de liposomas elásticos | 17 |
| Tabla 3. Coeficientes de correlación y constantes de los modelos matemáticos | 32 |
| Tabla 4. Parámetros de la cinética de permeación | 35 |
| Tabla 5. Datos del tamaño de los liposomas elásticos de tres lotes diferentes | 45 |
| Tabla 6. Valores de Potencial Z en tres lotes diferentes | 46 |
| Tabla 7. Datos de curva de calibración de KT en etanol, para la prueba de cuantificación de % eficiencia de encapsulamiento | 48 |
| Tabla 8. Parámetros de la curva de KT en etanol | 48 |
| Tabla 9. Datos de reproducibilidad y repetibilidad del método de cuantificación del % de encapsulamiento | 49 |
| Tabla 10. Datos para el parámetro de exactitud para el método de eficiencia de encapsulamiento | 50 |
| Tabla 11. Datos obtenidos en la prueba de permeación en piel tratada con Microagujas | 50 |
| Tabla 12. Datos de tamaño de vesícula para la prueba de elasticidad | 51 |
| Tabla 13. Datos de curva de calibración de KT en solución amortiguadora de fosfatos pH 7.4, para la prueba "in vitro" de liberación de KT en TFS | 53 |
| Tabla 14. Parámetros de la curva de KT en solución amortiguadora de fosfatos pH 7.4 | 53 |

| | |
|--|----|
| Tabla 15. Datos para reproducibilidad y repetibilidad del método de liberaciones de KT en LE | 54 |
| Tabla 16. Exactitud para el método de cuantificación de liberaciones de KT en LE | 55 |
| Tabla 17. Datos obtenidos de la prueba de liberación de KT en LE | 55 |
| Tabla 18. Datos de curva de calibración de KT en solución amortiguadora de fosfatos pH 7.4 en contacto con piel | 58 |
| Tabla 19. Parámetros de la curva de calibración de KT en solución amortiguadora de fosfatos pH 7.4 en contacto con piel | 58 |
| Tabla 20. Reproducibilidad y repetibilidad del método de cuantificación | 59 |
| Tabla 21. Exactitud del método | 60 |
| Tabla 22. Datos obtenidos para la prueba de permeaciones de KT en LE en piel tratada con Microagujas | 60 |
| Tabla 23. Datos de la curva de calibración de KT en NaOH 0.1N en contacto con piel | 62 |
| Tabla 24. Parámetros de la curva de calibración de KT en NaOH 0.1N en contacto con piel | 62 |
| Tabla 25. Reproducibilidad y repetibilidad del método | 63 |
| Tabla 26. Exactitud del método | 64 |
| Tabla 27. Datos obtenidos de la prueba de extracciones de KT retenido en piel de la prueba de permeación tratada con microagujas | 64 |

Índice de gráficas

| | |
|--|----|
| Gráfica 1. Diferencia de tamaño entre los LE antes y después de ser extruidos a través de una membrana de policarbonato de 0.05 μm | 29 |
| Gráfica 2. Perfil de liberación "in vitro" de KT a partir de los LE | 30 |
| Gráfica 3. Permeación a través de piel de oreja de cerdo de KT incluido en LE | 35 |
| Gráfica 4. Porcentaje de KT formulado en LE que pasó a través de la piel en los estudios de permeación a través de piel intacta (PI) y al tratar la piel con microagujas (LE MC) | 36 |
| Gráfica 5. Porcentaje de KT extraído de la piel al final de los estudios de permeación en piel intacta (PI) y piel tratada con microagujas (LE MC) | 37 |
| Gráfica 6. Espectro de absorción de KT en etanol | 47 |
| Gráfica 7. Curva de calibración de ketorolaco trometamina en etanol | 48 |
| Gráfica 8. Espectro de absorción de KT en solución amortiguadora de fosfatos pH 7.4 | 52 |
| Gráfica 9. Curva de calibración de ketorolaco trometamina en solución amortiguadora fosfatos pH 7.4 | 53 |
| Gráfica 10. Modelo matemático de orden cero | 55 |
| Gráfica 11. Modelo matemático de primer orden | 56 |
| Gráfica 12. Modelo matemático Higuchi | 56 |

| | |
|--|----|
| Gráfica 13. Modelo matemático Korsmeyer-Peppas | 56 |
| Gráfica 14. Espectro de absorción de KT en una solución amortiguadora de fosfatos pH 7.4 en contacto con piel | 57 |
| Gráfica 15. Curva de calibración de ketorolaco trometamina en solución amortiguadora de fosfatos pH=7.4 en contacto con piel | 58 |
| Gráfica 16. Espectro de absorción de KT en NaOH 0.1N, en contacto con piel | 61 |
| Gráfica 17. Curva de calibración de ketorolaco trometamina en NaOH 0.1N en contacto con piel. | 62 |

Índice de ecuaciones

| | |
|---|----|
| Ecuación 1. Primera ley de Fick | 6 |
| Ecuación 2. Segunda ley de Fick | 6 |
| Ecuación 3. Modelo cinético de orden cero | 7 |
| Ecuación 4. Modelo cinético de primer orden | 7 |
| Ecuación 5. Modelo matemático de Higuchi | 8 |
| Ecuación 6. Modelo matemático de Korsmeyer-Peppas | 8 |
| Ecuación 7. Porcentaje de eficiencia de encapsulación | 24 |

Lista de abreviaturas

| | |
|----------------|--|
| AINES | Antiinflamatorio no esteroideo |
| Cm | Centímetros |
| COX | Ciclo-oxigenasa |
| C.V. | Coefficiente de Variación |
| Da | Dalton |
| FATMLV | Frozen and Thawed multi-layered vesicles |
| H | Horas |
| J | Flujo |
| KT | Ketorolaco trometamina |
| LE | Liposomas elásticos |
| MAA | Ácido metacrílico |
| MC | Microagujas |
| Mg | Miligramos |
| mL | Mililitros |
| MLV | multi-layered vesicles |
| µm | Micrómetros |
| Mm | Milímetros |
| mV | Milivolts |
| Nm | Nanómetros |
| O/W | Aceite en agua |
| PBS | Solución amortiguadora de fosfatos |
| SC | Estrato córneo |
| TEM | Microscopía electrónica de transmisión |
| TFS | Transfersomas |
| Tg | Temperatura de transición vítrea |
| T _L | Tiempo de latencia |
| UV-VIS | Ultravioleta-Visible |
| VP | Vinilpirrolidona |

1. INTRODUCCIÓN

Antiguamente se creía que los medicamentos aplicados tópicamente sólo podían ejercer su acción "*in situ*", pero después de años de estudio se ha demostrado que, a través de la piel, vía capilares periféricos, los fármacos pueden acceder a la circulación sistémica sin sufrir degradaciones producidas por el metabolismo hepático o por la acción de los ácidos y enzimas del tracto gastrointestinal, lo que supone una gran ventaja (Ariza, 2004).

A finales de 1970 aparecen los primeros Sistemas Terapéuticos Transdérmicos propiamente dichos: sistemas de soporte de principios activos de acción sistémica, con liberación programada, constante y sostenida del fármaco (Allevato, 2007).

La administración transdérmica difiere de la administración tópica tradicional, pues esta última implica el transporte del fármaco a tejidos epidérmicos y/o dérmicos viables de la piel para un efecto terapéutico local, mientras que sólo una mínima fracción del fármaco se transporta a la circulación sanguínea sistémica.

Con el objeto de administrar agentes terapéuticos a través de la piel humana para obtener efectos sistémicos, se deben considerar la totalidad de las propiedades morfológicas, biofísicas y fisicoquímicas de la piel (Lakshmana et al., 2008).

La administración transdérmica de fármacos proporciona una vía conveniente para una variedad de indicaciones clínicas. Para la administración transdérmica, la capa más externa de la piel, el estrato córneo (SC, por sus siglas en inglés) es la barrera principal para la penetración del fármaco; así que para eludir el SC y para aumentar el flujo a través de la piel, han sido utilizadas diferentes alternativas para promover la penetración (Dhamecha et al., 2009; Lakshmana, 2008; Lakshmi et al., 2012). Estas mejoras han llevado a proponer técnicas nuevas tanto físicas como químicas, enfocadas a ayudar a los fármacos a penetrar la piel hasta alcanzar el torrente sanguíneo y así, poder tener un efecto sistémico.

Este tipo de administración de fármacos ha demostrado ser superior a la convencional administración oral debido a sus distintas ventajas. No obstante, tiene sus propias limitaciones, como su incapacidad para transportar moléculas grandes o muy hidrofílicas, precisamente atribuible a su incapacidad para superar las propiedades de barrera del SC entre otras (Prajapati et al., 2011).

Recientemente, los acarreadores coloidales han despertado un gran interés para la administración de fármacos por vía transdérmica, entre ellos, las vesículas lipídicas ultraflexibles, también llamadas liposomas elásticos (LE), liposomas ultradeformables o Transfersomas®, los cuales parecen ser una excelente alternativa por su capacidad para deformarse y pasar intactos a través del SC.

Un LE es una vesícula artificial diseñada para ser como una vesícula celular, y se utiliza para entregar fármacos o material genético en una célula (Patel, 2009).

Los LE se han usado como portadores de fármacos para una amplia gama de moléculas pequeñas, péptidos, proteínas y vacunas, tanto "*in vitro*" como "*in vivo*" (Vinod et al., 2012.) La singularidad de este tipo de sistemas portadores de fármacos reside en el hecho de que pueden acomodar en su estructura a fármacos hidrófilos, lipófilos, así como anfifílicos.

La vía transdérmica es una ruta viable para la administración de agentes terapéuticos potentes, de bajo peso molecular, que no pueden soportar el ambiente del tracto gastro-intestinal y/o son objeto de considerable metabolismo de primer paso por el hígado (Lakshmi et al., 2012). Además, es una ruta atractiva debido a la gran área de la superficie de la piel y facilidad de administración, otras ventajas son que no implica el uso de agujas, y no causa dolor y como ya se había mencionado se evita la degradación del fármaco debido al efecto de primer paso hepático (Andrews et al., 2013).

Hay muchos fármacos con elevada acción farmacológica y bajo peso molecular que pueden ser administrados por vía transdérmica, no obstante, algunos de estos presentan baja permeabilidad a través de la piel por lo que hay que recurrir a estrategias que favorezcan su penetración. En este trabajo se propone combinar un acarreador (liposomas elásticos) y un promotor de absorción físico (microagujas) con la finalidad de promover la permeación de ketorolaco trometamina.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 Ketorolaco trometamina

El ketorolaco trometamina (KT, Figura 1) es un fármaco anti-inflamatorio no esteroideo con una actividad analgésica y anti-inflamatoria potente debido al efecto inhibitor de la síntesis de prostaglandinas. Es un inhibidor no selectivo de la ciclo-oxigenasa (COX). El fármaco se usa actualmente por vía oral y por vía intramuscular en dosis múltiples, divididas clínicamente para el tratamiento del dolor, sobre todo el dolor post-quirúrgico (Begum et al., 2012; Honeywell-Nguyen et al., 2004) .

Los fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINES por sus siglas en inglés) son los fármacos más usados a nivel mundial. Específicamente el ketorolaco, fue introducido al mercado hace más de una década. Su uso se incrementó rápidamente, por lo que también lo hicieron sus efectos adversos gastrointestinales, renales y hematológicos (Zavaleta et al., 2007).

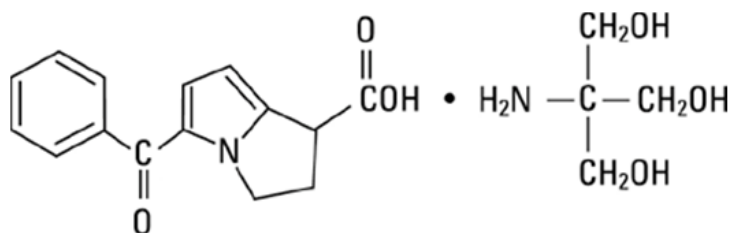


Figura 1. Estructura química del KT

El peso molecular del KT es 376.41 g/mol, es soluble en agua con un pka 3.5 con un coeficiente de reparto 0.26 (n-octanol/agua). El KT tiene una vida media biológica corta de 4 - 6 horas, por lo que requiere una dosificación frecuente para mantener el efecto.

Sus efectos adversos como la hemorragia gastrointestinal, perforación, ulceración péptica y la insuficiencia renal hacen necesario el desarrollo de otras estrategias de administración de este fármaco. La solución ideal sería la de dirigir el fármaco sólo a las células o tejidos afectados por la enfermedad (Begum et al., 2012).

El suministro transdérmico ciertamente parece ser una ruta atractiva de administración para mantener los niveles de KT en sangre durante un período prolongado de tiempo (Alsarra et al., 2005).

2.2 La piel

La piel es el órgano de mayor tamaño del organismo, asimismo, uno de los más complejos. La piel está constituida por la epidermis, dermis e hipodermis (Figura 2). Cada una de estas estructuras es física y funcionalmente diferente, con apéndices (pelos, glándulas sebáceas y sudoríparas) en diferentes proporciones, las cuales varían de acuerdo a la especie animal y la localización anatómica (Villarino, 2006).

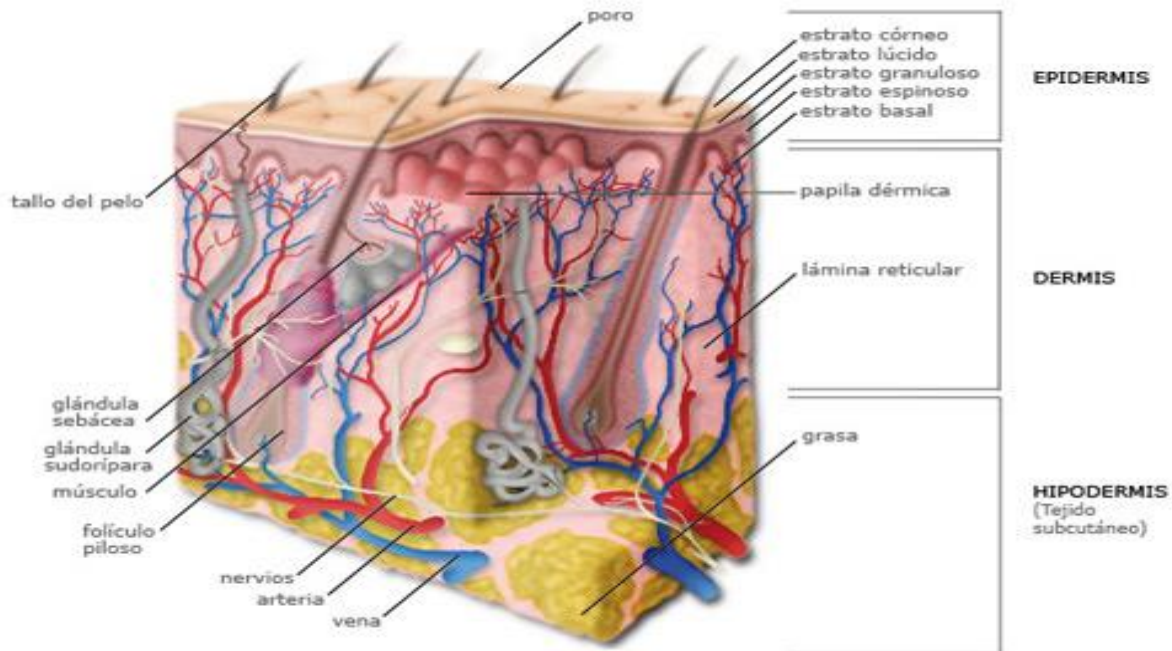


Figura 2. Estructura de la piel (Villasmil, 2011)

La piel sirve como una barrera que protege el cuerpo contra el medio ambiente y evita la pérdida de agua. Esta función de barrera también evita que los fármacos más hidrófilos y con alto peso molecular (> 500 Da) penetren a través de la piel intacta (Andrews, 2013).

La principal barrera para la administración transdérmica de fármacos es el estrato córneo, la capa superior de la piel. El SC mide 10-15 micras de espesor y está compuesto por corneocitos que están rodeados por una matriz extracelular de lípidos. Seguida por los estratos lúcido, granuloso, espinoso y basal; la epidermis viable, que es un tejido celular, de 50-100 μm de espesor. En la membrana basal de la base de la epidermis ofrece una resistencia al transporte de la molécula a través de la epidermis. Aún más profunda es la dermis, que es en gran parte un tejido fibroso que mide 1-2 mm de espesor. Hay un rico lecho capilar en la dermis superficial justo por debajo de la epidermis, que es el sitio principal de absorción del fármaco hacia la circulación sistémica. Por lo tanto, la administración transdérmica de fármacos exitosa

típicamente implica el transporte de fármacos a través de la epidermis a la cama capilar cutánea superficial. Debido a que el SC es la mayor barrera para el transporte, la mayoría de los métodos para promover la permeación transdérmica de fármacos han hecho hincapié en el aumento de la permeabilidad de éste (Andrews et al., 2013).

2.3 Penetración transdérmica

La piel permite el paso de ciertas moléculas desde su superficie, atravesando el SC bajo la influencia de un gradiente de concentración, y su subsiguiente difusión a través del SC, epidermis viable y dermis, para alcanzar finalmente el torrente circulatorio. A este proceso se le conoce como absorción percutánea (Sinha y Kaur, 2000; Villasmil, 2011).

La permeación de los fármacos por vía transdérmica se da mediante la difusión a través de la epidermis y apéndices de la piel como folículos pilosos y glándulas sebáceas, sin embargo, la contribución de estos últimos se considera prácticamente despreciable ya que solo representa el 0.1% de la superficie total de la piel (García, 2012).

Hay dos vías generales por las cuales una sustancia puede penetrar a través de la piel: la vía transepidérmica y a través de los poros (Figura 3).

La vía transepidérmica se puede dividir en la transcelular e intercelular. La ruta más directa es la transcelular, en la que el fármaco tiene que cruzar la piel pasando tanto a través de las estructuras de lípidos del SC, como de los queratinocitos muertos, siendo una resistencia significativa a la permeación, ya que tienen que cruzar las estructuras tanto lipófilas como hidrófilas. La ruta más común es la ruta intercelular, en donde el paso ocurre a través de la matriz lipídica, entre los corneocitos (Trommer y Neubert, 2006).

Vía poros. Si el fármaco utiliza esta vía de acceso lo hará a través de los anexos cutáneos: glándulas sudoríparas (endocrinas y apocrinas) y sistema pilo-sebáceo. Ambas alternativas, tienen una contribución escasa a la cinética de la penetración transdérmica (Ariza, 2004).

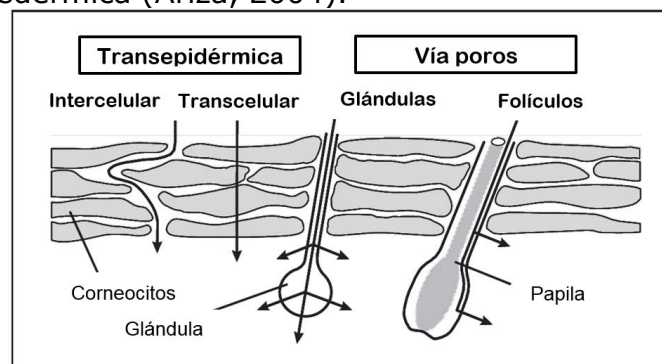


Figura 3. Vías de penetración a través de la piel (Trommer y Neubert, 2006).

En cualquier superficie cutánea la penetración de una molécula cumple la ley de Fick, que establece que el flujo es inversamente proporcional al espesor de la membrana (Allevato, 2007). La absorción ocurre por difusión pasiva siguiendo la primera "ley de Fick" (Ecuación 1), la cual indica que la transferencia o flujo (J) de la sustancia que difunde por unidad de área (x) es proporcional al gradiente de concentración (C), y se expresa como sigue:

$$J = -D \left[\frac{\Delta C}{\Delta x} \right]$$

Ecuación 1. Primera ley de Fick. (Villasmil, 2011)

El signo negativo indica que el sentido del flujo se produce de la mayor concentración a la menor concentración, es decir, se crea un gradiente negativo. D es el coeficiente de difusión. Esta ecuación describe la difusión en estado estable o estado estacionario.

La segunda ley de Fick (Ecuación 2) describe la difusión de compuestos en estado no estacionario y se expresa como:

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

Ecuación 2. Segunda ley de Fick (Villasmil 2011).

Siendo D independiente de la concentración y la dirección, y considerando la difusión unidireccional como la situación experimental más usual. Esta ecuación diferencial de difusión establece que la velocidad de difusión (dC/dt) es proporcional a la diferencia de concentración que se establece dentro del campo difusivo (Villasmil 2011).

Existen diversas técnicas "*in vitro*" para determinar la permeación de fármacos a través de la piel, entre las cuales se encuentra el método de la celda de difusión, en el que una celda clásica consistente de un compartimento donador y uno receptor separados por una membrana, la cual puede ser sintética o natural (García, 2012).

2.4 Estudios de liberación

La liberación del fármaco se refiere al proceso por el cual una molécula de fármaco migra a partir de su posición inicial en el sistema de liberación hacia el medio de liberación, posteriormente esta molécula está sujeta a los procesos farmacocinéticos y eventualmente estará disponible para su acción farmacológica. En consecuencia, la liberación del fármaco a partir del sistema de liberación influye en sus efectos farmacológicos. Así, los estudios sobre la cinética de liberación proporcionan información relevante en el desarrollo y optimización de dichos sistemas.

Para que el fármaco ejerza su acción, este debe liberarse del sistema en donde está contenido. En el caso de la administración transdérmica, la liberación puede

darse en la superficie donde el sistema se aplicó y a partir de ahí el fármaco difunde hacia el interior de la piel; o bien, puede el sistema interiorizarse en capas más profundas, donde puede absorberse o formar un depósito, desde el cual el fármaco se va liberando.

Como ya se mencionó, para estudiar la permeación de un fármaco a través de la piel, puede emplearse una celda de difusión (e.g., vertical tipo Franz), llenando el compartimento receptor con una solución fisiológica (e.g., una solución amortiguadora), en el compartimento donador se coloca la formulación con el fármaco y separando ambos compartimentos se fija la piel, la cual puede ser humana, o provenir de algún modelo animal (e.g., cerdo). En el caso de los estudios de liberación, donde lo que interesa es evaluar el perfil de liberación del fármaco a partir del sistema que lo contiene, se coloca entre ambos compartimentos una membrana sintética. La velocidad a la que se libera el fármaco a partir del sistema y el mecanismo por el cual esto ocurre, son fenómenos determinantes en el efecto buscado, es por ello, que se han propuesto distintos modelos matemáticos que ayuden a explicarlos.

Estos modelos, basados en diferentes funciones matemáticas, permiten describir el perfil de disolución. Entre los modelos más empleados, pueden mencionarse: modelos de orden cero, primer orden, Higuchi, Hixson Crowell, Korsmeyer-Peppas, Baker-Lonsdale, Weibull, Hopfenberg, Gompertz y de regresión (Aragón et al., 2009).

En el presente estudio evaluaremos los modelos de orden cero, primer orden, Higuchi y Korsmeyer-Peppas, pues son algunos de los más utilizados para analizar y describir el mecanismo mediante el cual ocurre el proceso de liberación a partir de nanoacarreadores.

El modelo cinético de orden cero nos indica que la velocidad de disolución es constante e independiente de la cantidad de fármaco disuelto, asumiendo que el área desde la que se libera el fármaco sea constante (Ecuación 3).

$$\frac{dQ}{dt} = -k$$

Ecuación 3. Modelo cinético de orden cero

En el modelo cinético de orden uno la velocidad de disolución es proporcional a la primera potencia de la concentración del fármaco disuelto (Ecuación 4).

$$\ln Q = \ln Q_0 - kt$$

Ecuación 4. Modelo cinético de primer orden.

Higuchi propuso un modelo matemático ampliamente utilizado para describir el proceso empírico de liberación de fármacos, el cual cumple con la Ley de Fick y se representa de la siguiente forma (Ecuación 5):

$$\frac{M_t}{M_\infty} = K \cdot t^{1/2}$$

Ecuación 5. Modelo matemático de difusión de Higuchi. (Aragón et.al. 2009)

dónde:

M_t/M_∞ es la fracción de fármaco liberada en un tiempo t y
 k es la constante de velocidad de liberación.

Por otro lado, Korsmeyer-Peppas propusieron un modelo matemático que es generalmente lineal para valores de $M_t/M_\infty < 0,6$. Este modelo intenta explicar mecanismos de liberación de fármacos donde se presenta erosión y/o disolución de la matriz, y no es más que una forma generalizada de la ecuación de Higuchi que se expresa como (Ecuación 6):

$$\frac{M_t}{M_\infty} = K \cdot t^n$$

Ecuación 6. Modelo matemático de difusión de Korsmeyer-Peppas. (Aragón, et al.2009)

Donde k es la constante de velocidad de liberación del sistema de liberación y n es el exponente que indica el mecanismo mediante el cual ocurre la liberación del fármaco.

2.5 Promotores o potenciadores de permeabilidad.

La tecnología de potenciadores de permeación de fármacos a través de la piel es un campo en rápido desarrollo, que aumentará significativamente el número de fármacos adecuados para la su administración transdérmica, con el resultado de que la piel se convierta en una de las principales rutas de administración. La investigación en esta área ha demostrado la utilidad de los potenciadores de la penetración en la mejora de la permeación del fármaco a través de la piel (Pathan et al., 2009).

Las posibilidades de que un fármaco penetre en la piel pueden ser nulas (dependiendo de sus propiedades fisicoquímicas) ya que la estructura de la piel no lo permite, pues esa es una de sus funciones. Así que para superar la barrera que ofrece el SC y aumentar el flujo a través de la piel, se utilizan diferentes métodos de potenciación de la penetración (Dhamecha et al., 2009). Por lo que se han desarrollado métodos físicos y químicos para promover la transferencia de sustancias a través de la piel (Escobar et al., 2012; Kumar et al., 2012).

Algunas de estas nuevas tecnologías de mejora de la permeación transdérmica incluyen: iontoforesis, electroporación, sonoforesis, ultrasonido y microagujas. Por otro lado, se ha propuesto el uso de acarreadores que además de brindar protección al fármaco y modular su liberación, promuevan su absorción. Entre ellos podemos citar a los liposomas, niosomas, microemulsiones, complejos de inclusión, nanopartículas, y vesículas elásticas tales como etosomas y Transfersomas® o liposomas elásticos (Escobar et al., 2012; Ravi et al., 2012).

Estos novedosos sistemas ofrecen interesantes ventajas terapéuticas (Allevato, 2007; Martínez et al., 2010; Villasmil, 2011):

- Evitar las variables de las condiciones de absorción y metabolismo de la terapia oral, evitando así, la degradación enzimática a nivel gastrointestinal.
- Evitar el efecto de primer paso hepático.
- Posibilidad de diseñar sistemas con fármacos de estrecho rango terapéutico y vida media corta.
- Disminución de efectos no deseados.
- Tratamiento indoloro.
- Posibilidad de administrar medicamentos, cuando no pueda emplearse el tracto gastrointestinal.
- 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.
- Permite disminuir la frecuencia de administración y la dosis de principio activo.

A su vez estos sistemas potenciadores de la penetración deben tener las siguientes características (Escobar et al., 2012; Martínez et al., 2010; *Pathan et al., 2009*):

- Deben ser no tóxicos, no irritantes y biocompatibles.
- Deben actuar con rapidez, y su actividad y la duración del efecto debe ser tanto predecible como reproducible.
- Cuando se retira, las propiedades de barrera de la piel deben recuperarse rápida y completamente.
- Debe ser compatible con excipientes y fármacos.
- Dirigir el fármaco al tejido blanco minimizando la interacción con otros órganos o tejidos.
- Proteger las moléculas con actividad biológica del medio.
- Liberar el activo de manera controlada y predecible.

Como ya se mencionó, en el presente proyecto se utilizaron dos promotores de permeación, uno físico, microagujas y uno químico, LE; los cuales se detallan a continuación.

2.5.1 Microagujas

Las microagujas son una tecnología que se ha establecido para perforar la barrera de la piel sin inducir dolor o sangrado, ya que las agujas son demasiado cortas para estimular los nervios y dañar los vasos sanguíneos de la dermis. Las agujas están hechas de silicio, vidrio, metales, polímeros o carbohidratos con tamaños que van desde sub-micras a milímetros para formar orificios microscópicos que permiten la entrega mejorada de medicamentos. Representan una alternativa segura, eficaz y controlable para aumentar la administración transdérmica de fármacos (Stahl et al., 2012).

En general, las microagujas pueden ser categorizadas como microagujas sólidas para el pretratamiento de tejidos, microagujas recubiertas de fármacos, microagujas solubles, y microagujas huecas; las cuales se detallan a continuación y pueden ser observadas en las figuras 4-7 (Kim et al., 2012):

Microagujas sólidas (figura 4). Se pueden utilizar como tratamiento previo para la formación de poros en la piel. Después de insertar y extraer las microagujas de la superficie de la piel para la formación de poros a escala, se puede aplicar una formulación de fármaco para la lenta difusión del mismo a través de los poros. Las microagujas pueden penetrar, traspasando el SC, también se puede raspar la piel con el fin de hacer los agujeros a través de los cuales los fármacos pueden ser transportados, ya sea para un efecto local en la piel o para la administración sistémica después de su absorción por los capilares de la piel. El medicamento se puede aplicar a la superficie de la piel, utilizando un parche cargado con el fármaco o la formulación, como se utiliza comúnmente en la entrega transdérmica de fármacos de manera convencional, o bien aplicando en la piel pre-tratada una formulación tópica semisólida, tal como una pomada, crema, gel o loción, como es comúnmente utilizado para otros tratamientos de la piel.

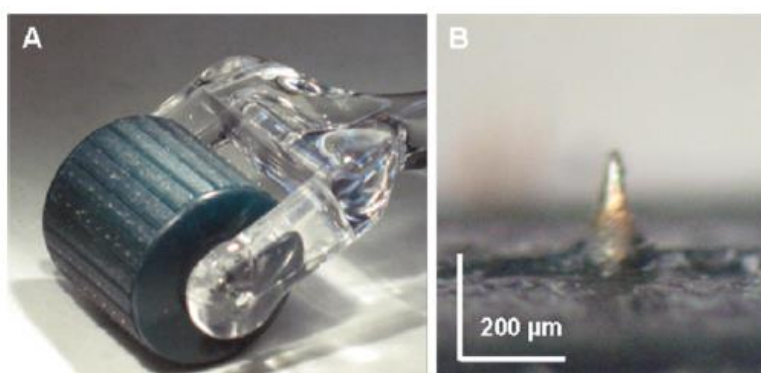


Figura 4. Microagujas sólidas. (A) Rodillo de microagujas de titanio, (B) microaguja de titanio de 200µm. (Stahl et al., 2012)

- Microagujas recubiertas con fármaco. Estas microagujas se caracterizan por tener los elementos punzantes rodeados de una cubierta formada por el fármaco y los excipientes. Después de su administración, estos agentes quedan dentro de los microporos, disolviéndose y pasando al tejido por difusión (Figura 5).

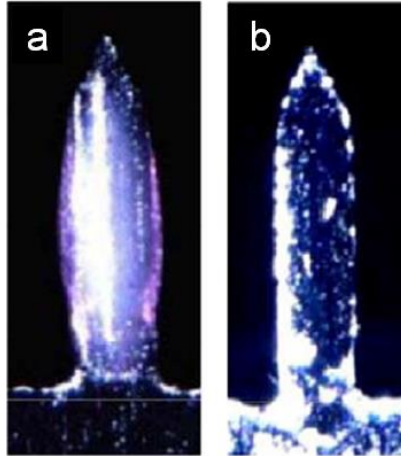


Figura 5. Microagujas recubiertas. Microagujas fabricadas de acero inoxidable de $200\mu\text{m}$ (a) después de recubrimiento con el fármaco, (b) antes de recubrimiento (Kim et al., 2010).

- Microagujas biodegradables: Estas pueden hacerse completamente de polímero soluble en agua o biodegradable que encapsula el fármaco dentro de la matriz de las mismas (Figura 6). De esta manera, las microagujas se disuelven o degradan completamente en la piel, liberando de este modo la carga útil de fármaco encapsulado y sin dejar tras de sí residuos punzantes, (esto debido a que las microagujas se han disuelto).



Figura 6. Microagujas solubles. Su tamaño es de $500\mu\text{m}$. Microagujas fabricadas por copolimerización de dos monómeros líquidos - vinilpirrolidona (VP) y ácido metacrílico (MAA) (Sullivan, 2008).

- Por último, las microagujas huecas se pueden utilizar para la infusión de formulaciones líquidas en la piel, la liberación del fármaco se realiza a través del orificio interno de la aguja. Los fármacos pueden ir incluidos en parches, jeringas, inyectores especiales o en bombas de infusión. (Figura 7).

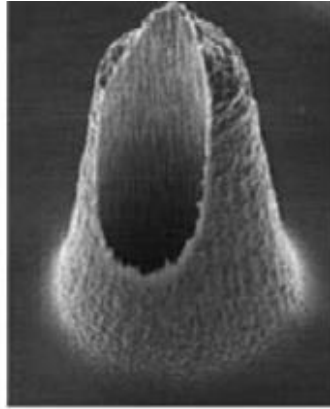


Figura 7. Microagujas huecas. Microagujas de silicón de 320 nm (Wilke et al., 2005).

El enfoque más sencillo al utilizar microagujas es emplear microagujas sólidas para formar un canal en la piel a través del cual pueden pasar los compuestos de la formulación tópica. Son posibles dos técnicas diferentes: En primer lugar, el uso de arreglos planos de microagujas sólidas que se presionan sobre la piel con el fin de insertarlas u ocasionar un raspado en la piel; y, en segundo lugar, el uso de rodillos de agujas microscópicas que se pasan sobre la piel, haciendo girar el rodillo ejerciendo cierta presión. Los poros producidos por cualquiera de los métodos son iguales, aunque los rodillos son más fáciles de usar. Exámenes *in vitro* con microagujas sólidas han favorecido la permeación de materiales a través de la piel, que van desde los nanomateriales a las proteínas (Stahl et al., 2012). A continuación, se muestran los cuatro tipos de microagujas y el método de liberación del fármaco en cada una de ellas.

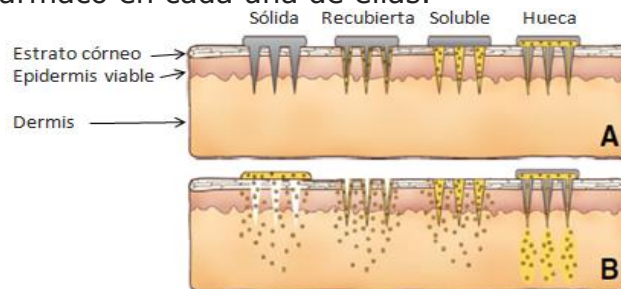


Figura 8. Métodos de liberación de fármacos usando microagujas. (A) Primero son aplicadas sobre la piel. (B) La liberación del fármaco.

En esta figura se observa la forma de liberación del fármaco a través de los poros producidos por las diferentes microagujas; las sólidas se utilizan como un tratamiento previo, después de lo cual el fármaco puede difundir a través de los orificios residuales en la piel a partir de una formulación tópica (e.g., un parche). Después de la inserción de microagujas recubiertas de fármacos en la piel, el recubrimiento del fármaco se disuelve en el ambiente acuoso de la piel. Microagujas cargadas de fármaco están hechas de materiales solubles en agua o biodegradables que contienen el fármaco que se libera en la piel tras la disolución de la microaguja soluble. Microagujas huecas se utilizan para inyectar formulaciones líquidas en la piel (Kim et al., 2012).

2.5.2 Liposomas elásticos (LE)

Los liposomas elásticos (LE) son vesículas altamente deformables constituidas de lípidos capaces de penetrar la barrera de permeabilidad de la piel de forma espontánea debido a sus características (Barry, 2001). Pueden atravesar poros de tamaño muy inferior al de ellos mismos (Benson y Heather, 2006), por lo que resultan muy atractivos como sistemas de transporte y liberación de fármacos (Clares, 2003). Los LE están constituidos principalmente por fosfolípidos y un activador de superficie (tensoactivo no-iónico). El lípido que conforma los LE es el factor de estabilidad y el tensoactivo es el factor desestabilizador. La mezcla óptima de ambos conduce a la flexibilidad de las membranas de la vesícula (Benson, 2006).

Los LE son partículas coloidales llenas de líquido hidrofílico. Las paredes de estas cápsulas formadas por moléculas anfifílicas (fosfolípidos y tensoactivos) adquieren una conformación de bicapa (Figura 9). En un exceso de agua estas moléculas anfifílicas pueden organizarse en forma de vesículas, conformadas por bicapas concéntricas. De este modo, es posible incluir tanto fármacos hidrofílicos, como lipofílicos. Los fármacos hidrofílicos pueden quedar incluidos en el compartimiento interior acuoso, los lipofílicos se sitúan en las regiones hidrófobas de la vesícula, mientras que los anfifílicos normalmente se adsorben en la interfase agua-lípido. Moléculas más grandes tienden a adherirse a las vesículas mediante una combinación de varias interacciones. Por lo tanto, cualquier tipo de fármacos se puede incluir en estas vesículas.

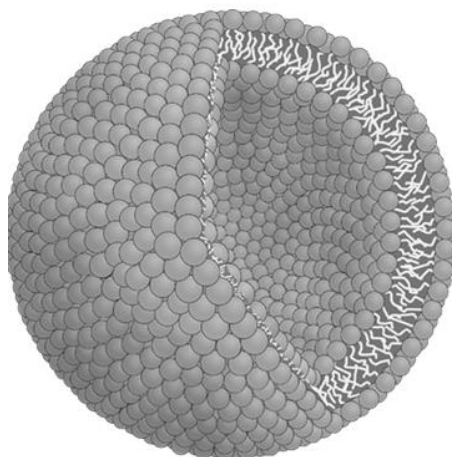


Figura 9. Representación esquemática de los liposomas (Bergstrand, 2003).

La razón de que estos acarreadores promuevan la penetración/absorción de un fármaco reside en que al estar incluidos en la vesícula, el coeficiente de partición del fármaco no juega un papel determinante en la penetración y difusión a través de la piel, por otro lado, el fármaco está protegido contra posible degradación por efecto del medio y debido a su composición anfifílica, estos sistemas pueden

fungir como promotores de absorción, y finalmente, se tiene la ventaja de que es posible conseguir una liberación prolongada.

Cevc y colaboradores propusieron que los LE siguen la ruta intercelular al pasar a través de la piel de manera intacta. Sugiriendo que los liposomas deformables penetran la capa córnea debido al gradiente de hidratación transdérmico que normalmente existe en la piel, con el subsecuente cruce de la epidermis e ingreso en la circulación sistémica. Los estudios recientes proponen que la penetración de las vesículas en la piel se debe a la combinación de los dos mecanismos, vía transepidérmica y vía poros. Dependiendo de la naturaleza de la sustancia activa (lipofílico o hidrofílico) y la composición de los LE, uno de los dos mecanismos prevalece (Pirvu, 2010).

Con el fin de mejorar la biodisponibilidad de distintos fármacos aplicados vía transdérmica, la formulación en LE se presenta como una opción interesante para favorecer la permeación a través de la piel (Villasmil, 2011). En la Tabla 1 se observan algunas ventajas y desventajas de estos sistemas de liberación de fármacos.

Tabla 1. Ventajas y desventajas de los LE (Cevc, 2004; Cevc y Blume, 1992; Betz et al., 2005; Benson-Heather, 2006; El Maghraby et al., 2008; Villasmil, 2011; Walve et al., 2011).

| Ventajas | Desventajas |
|--|---|
| <ul style="list-style-type: none"> - Pueden incluir una gran variedad de fármacos, tanto hidrofílicos como lipofílicos y anfifílicos. - En general, el porcentaje de encapsulación de los fármacos es elevado. - Protegen al fármaco de la degradación ambiental. - Son biocompatibles y biodegradables, ya que están preparados con fosfolípidos naturales. - Superficie modificable: <ul style="list-style-type: none"> Con polietilenglicoles (con lo que se evita su reconocimiento por el sistema retículo endotelial, incrementando su estancia en el organismo) Con anticuerpos (promoviendo su vectorización a sitios específicos). - Al administrarse por vía transdérmica se evita el efecto de primer paso hepático y la degradación enzimática y química a nivel gastrointestinal. Se evita el dolor propio de una administración intramuscular o subcutánea. | <ul style="list-style-type: none"> - Algunas veces son químicamente inestables debido a su predisposición a la degradación oxidativa. - La falta de pureza de los fosfolípidos naturales. - Las formulaciones son caras. |

Los LE tienen estructuras similares a las de los liposomas, encerrando un espacio acuoso central y, ocasionalmente, otros espacios interlamelares (espacio entre capas de fosfolípidos). Sobre esta estructura básica se pueden insertar otros lípidos, proteínas, anticuerpos, biomoléculas diversas marcadas con isótopos radiactivos, sustancias fluorescentes, etcétera. Esta versatilidad estructural le permite al investigador diseñar los liposomas de acuerdo con los objetivos para los que serán utilizados, como, por ejemplo, transportar sustancias quimioterapéuticas, anticancerígenas hacia órganos específicos, sin que afecten a otros órganos o tejidos corporales. Los sustratos por encapsular se ubicarán en los espacios acuosos, en la fase lipídica, o adoptarán una participación estructural comprometida en ambas fases, según sea su naturaleza (lipofílica, hidrofílica o anfifílica) (Gonzalez, 2004).

Los mecanismos mediante los cuales los liposomas se desintegran y liberan su contenido una vez que interactúan con la superficie de las células, son aún especulativos. Las moléculas pueden simplemente escapar de los liposomas y atravesar la membrana plasmática por difusión o formación de poros. De manera alternativa, estas vesículas pueden fusionarse con la membrana plasmática o pueden ser tomadas por las células mediante endocitosis o fagocitosis. En estos dos últimos eventos los liposomas pueden experimentar degradación en el entorno relativamente ácido del endosoma o fagosoma, o pudieran fusionarse directamente con la membrana endosomal o lisosomal (Lanio et al., 2009).

El uso de los liposomas como acarreadores de fármacos se ha dirigido a reducir los efectos tóxicos colaterales de los fármacos en órganos sensibles, tales como hígado, corazón y riñones, y a lograr una direccionalización a tejidos específicos tales como los tumorales. La arquitectura molecular de estas vesículas ultradeformables les permite captar una variedad de agentes activos, a través de un mecanismo relativamente específico, proporcionando una vía de transporte que lleve al fármaco al sitio de acción, a concentraciones adecuadas, con objeto de obtener la respuesta farmacológica deseada en condiciones de eficacia y seguridad, dado el carácter biodegradable, atóxico y no inmunogénico de este sistema de liberación (Lanio et al., 2009).

2.5.2.1 Mecanismo de formación de los LE

La formación de los LE sólo tiene lugar a temperaturas superiores a la crítica, a la que las cadenas acílicas grasas de los fosfolípidos son líquidas. La temperatura de transición crítica o vítrea es una propiedad característica de las bicapas lipídicas y está asociada con la transformación de un estado ordenado (gel) de las cadenas hidrocarbonadas grasas en otro más desordenado (cristal-líquido) debido a la fusión de éstas (Clares, 2003).

Además de fosfolípidos, otros compuestos pueden formar parte de la estructura de los liposomas, como es el caso del colesterol, que también es componente de la mayoría de las membranas naturales. Como componente estructural de los liposomas, el colesterol reduce la capacidad de movimiento de las cadenas hidrocarbonadas de los fosfolípidos confiriendo rigidez a las vesículas lo que

influye principalmente en su permeabilidad. Por otro lado, también se pueden incluir en la composición lipídica de los liposomas, moléculas que aporten cargas a la estructura como son el dipalmitoil-fosfatidil-glicerol, el diacetilfosfato, que confieren carga negativa; o la estearilamina, que confiere carga positiva a las vesículas. Por último, la composición del liposoma le confiere cierto grado de fluidez que depende del grado de empaquetamiento de los lípidos, lo cual viene influenciado por la temperatura de transición vítrea (T_g) de estos. De esta T_g depende la estabilidad de las vesículas (Murillo, 2001).

Los fosfolípidos son moléculas anfipáticas que tienden a agrupar sus regiones homólogas en medio acuoso. La preparación de las vesículas, generalmente se lleva a cabo por hidratación de las moléculas de lípido y agitación mecánica. El proceso de hidratación de las vesículas es un paso crítico en su formación ya que, en muchos casos, del proceso de hidratación dependerá el producto final. En general, una baja concentración del lípido, agitación vigorosa y una cierta cantidad de lípido cargado produce vesículas de pequeño tamaño, con pocas bicapas y homogéneas (Figura 10).

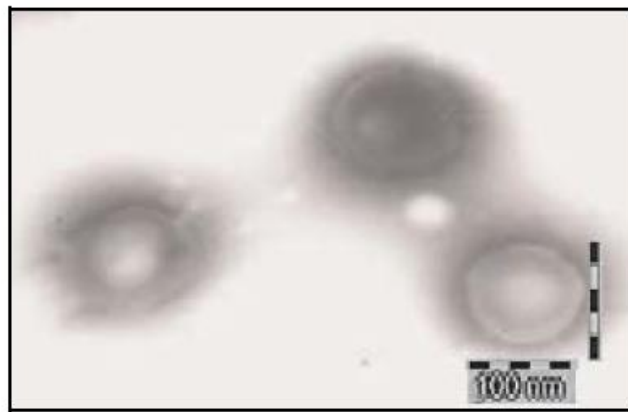


Figura 10. Visualización de liposomas elásticos por microscopía electrónica de transmisión (TEM) (Sheo et al., 2010).

Las moléculas de agua son liberadas de las colas hidrocarbonadas a medida que quedan secuestradas en el interior no polar de la bicapa; esta liberación da como resultado un gran aumento en la entropía. Los fosfolípidos se agregan para formar las vesículas, debido a la tendencia del medio acuoso circundante a adquirir el estado de máxima entropía en el que las moléculas lipídicas se disponen de forma que reducen al mínimo, el número de cadenas hidrocarbonadas expuestas al agua. De esta forma, las bicapas lipídicas tienden a cerrarse en sí mismas, de tal manera que no existan extremos con cadenas expuestas, lo que da como resultado la formación de un compartimento central acuoso. La cabeza polar del fosfolípido se orienta hacia la fase acuosa, en tanto que la región hidrófoba se sitúa fuera del contacto del agua (Clares, 2003).

2.5.2.2 Métodos de preparación de liposomas elásticos.

Actualmente se han desarrollado algunas técnicas de obtención de vesículas, que dan diferente tamaño, forma, número de bicapas lipídicas, volumen interno, marcadores de superficie, durabilidad de los mismos, permeabilidad, etcétera.

Las técnicas de preparación de vesículas son muy variadas, e incluyen no sólo diferentes métodos de obtención, sino la correspondiente selección por tamaños, clasificándose de la siguiente forma: Hidratación del fosfolípido (hidratación de película) y dispersión simple, congelación-descongelación, prensa de French, fase reversa e inyección.

El método de elección depende, en cada caso, del tipo de vesícula que se desea obtener y su tamaño. Influye también el tipo de fosfolípidos que se utilicen y la aplicación que se pretende.

Estos métodos se encuentran descritos en la Tabla 2. El tamaño de las vesículas puede reducirse y uniformarse mediante técnicas como ultrasonido y extrusión a través de membranas.

Tabla 2. Métodos de preparación de liposomas elásticos (Betz et al., 2005; Nava et al., 2011)

| Método | Descripción |
|---------------------------------|--|
| Hidratación y dispersión simple | Consta de las siguientes etapas: 1. Disolución del lípido en un disolvente orgánico. 2. Evaporación a presión reducida del disolvente con movimiento rotatorio simultáneo, hasta obtener una película delgada y perfectamente seca en las paredes del matraz. 3. Adición de la fase acuosa y formación de vesículas mediante agitación. |
| Congelación-descongelación | Modifica el proceso de hidratación para mejorar el porcentaje de encapsulación. La técnica consiste en someter una preparación de vesículas a sucesivos ciclos de congelación en nitrógeno líquido, y descongelación en un baño con temperatura controlada, formándose los FATMLV (Frozen and Thawed multi-layered vesicles). En este caso se logra una mayor eficiencia de encapsulación y una menor heterogeneidad de tamaños de vesículas. |
| Prensa de French | Consiste en la inyección de cierto volumen de suspensión de vesículas en el cilindro de una celda de presión de French y la recuperación de la muestra después de sucesivos ciclos de extrusión bajo alta presión (20 000 psi). Se obtiene un rendimiento de 70 % en la producción de vesículas. |
| Fase reversa | Este procedimiento consta básicamente de dos etapas: 1. Se forma una emulsión aceite/agua (O/W) por sonicación de una mezcla agua-éter, en la que se encuentran disueltos soluto y lípido respectivamente. |

| | |
|-----------|---|
| | 2. Después se procede a la eliminación del éter con formación de un gel estable, posteriormente ruptura del gel e inversión de la fase mediante vacío y agitación simultánea. |
| Inyección | Se basa en la formación espontánea de vesículas, mediante la inyección de una solución orgánica (éter o etanol) del lípido en un medio acuoso. En la inyección con etanol ocurre la dispersión de las moléculas de fosfolípidos instantáneamente al entrar en contacto con el agua. Cuando las vesículas se encuentran disueltas en éter se inyectan lentamente en una fase acuosa a una temperatura en la cual el disolvente orgánico se evapora durante el proceso. |

2.5.2.3 Estabilidad de los LE

Lo que hace a los LE más estables que los liposomas convencionales es su mayor hidrofilia, esto favorece un mayor hinchamiento que el de las vesículas lipídicas convencionales. La elevada hidrofilia de la membrana y flexibilidad, ayuda a los LE a evitar la agregación y la fusión, normalmente presente en los liposomas convencionales expuestos a un estrés osmótico (*IDEA AG, 2013*).

El tamaño de un LE típico es comparable con el diámetro de los liposomas utilizados en formulaciones farmacéuticas. Sin embargo, una micela mixta de lípidos, con la cual una vesícula ultradeformable puede compartir los mismos componentes básicos, es de dos a diez veces más pequeña.

La estabilidad química de los lípidos durante el almacenamiento es otro aspecto que requiere atención, especialmente lo relacionado con la hidrólisis y, en el caso de las cadenas lipídicas insaturadas, los procesos oxidativos que estas estructuras pueden experimentar. Los LE pueden ser almacenados ya bien sea congelados en suspensión o liofilizados, pero es esencial re-evaluar su distribución de tamaño, morfología y cantidad de soluto encapsulado antes de su uso. La adición de crioprotectores, tales como la trealosa, es recomendable para evitar transiciones de fase y fusión de membranas (*Carrion et al., 1997; Lanio et al., 2009*).

El control y predicción de la estabilidad de los LE es importante cuando se almacenan por un largo período de tiempo después de su preparación.

La estabilidad dependerá mucho de las características de cada formulación (composición lipídica, tipo de LE, tamaño de vesícula, potencial Z de las vesículas), de la naturaleza del material encapsulado y su interacción con los componentes de la vesícula. Durante el almacenamiento, pueden ocurrir cambios de tamaño debido a agregación o fusión de vesículas (*Gómez-Hens et al., 2006*).

3. OBJETIVOS E HIPOTESIS

Objetivo general

- Evaluar el efecto del uso de microagujas sobre el transporte a través de la piel de ketorolaco trometamina incluido en liposomas elásticos.

Objetivos particulares

- Preparar liposomas elásticos encapsulando ketorolaco trometamina (KT) como fármaco modelo.
- Realizar las pruebas de caracterización correspondientes a los liposomas elásticos, las cuales incluyen: tamaño de vesícula, potencial Z, tasa de encapsulación y flexibilidad.
- Llevar a cabo pruebas de liberación "*in vitro*" de ketorolaco trometamina incluido en liposomas elásticos.
- Llevar a cabo la permeación "*in vitro*" de ketorolaco trometamina incluido en liposomas elásticos a través de piel de oreja de cerdo intacta y pre-tratada con microagujas.
- Desarrollar métodos analíticos para la cuantificación del KT en las determinaciones de tasa de encapsulación, cinéticas de liberación y permeación "*in vitro*" y extracciones.

Hipótesis

- Si los liposomas elásticos penetran a través de la piel, entonces éstos favorecerán la permeación transdérmica del ketorolaco trometamina encapsulado. Además, si el pre-tratamiento con microagujas crea poros transitorios en la capa más externa de la piel facilitará la permeación del fármaco incorporado en los liposomas elásticos.

4. METODOLOGÍA

4.1 Reactivos y Equipos

Reactivos

- Epikuron® 200 (fosfatidilcolina de frijol de soya), pureza=95.0% (Lucas Meyer, Hamburg, FRG, Alemania)
- Ketorolaco Trometamina (Globe Chemicals, México)
- Monooleato de polioxietileno sorbitan (Tween 80) (Droguería Cosmopolita, México)
- Alcohol etílico, pureza=99.92%(Fermont, Monterrey, N.L.)
- Membranas de policarbonato, tamaño de poro= 0.1 µm y 0.05 µm (Millipore® Corp., Bedford, MA, EE. UU.)
- Sephadex G10 (Sigma, EE. UU.)
- Hidróxido de sodio GR (J.T, Baker, México)
- Fosfato monobásico de potasio (Fermont, México)
- Agua provista por el sistema de purificación Milli-Q® (Millipore® Corp., Bedford, MA, EE. UU.)
- Solución amortiguadora de fosfatos pH 7.4, preparada de acuerdo a la USP 29.

Material biológico

- Piel de oreja de cerdo recuperada del rastro antes de ser tratada con agua caliente.

Equipos

- Agitador magnético multiplaza (Barnstead International, EE. UU.)
- Balanza analítica (BBC 32, Boeco, Alemania)
- Celdas de difusión verticales tipo Franz (Taller de soplado de vidrio FES Cuautitlán)
- Contador submicrónico de partículas, nanosizer (Coulter N4 Plus, EE. UU.)
- Espectrofotómetro UV-Vis Cary IE95031003 (Varian, Australia).
- Microcentrífuga (Hettich EBA 12, Alemania)
- Potenciómetro (pHmeter 340 Corning, EE. UU.)
- Recirculador de líquidos con termostato (VWR Scientific, EE. UU.)
- Rodillo de microagujas con longitud de 500 µm (MTS-Roller, EE. UU.)
- Rotavapor (Laborota 4000, Heidolph, Alemania)
- Sonicador (Branson Branson 5210, EE. UU.)
- Ultracentrífuga. Optima LE-80k (Beckman, EE. UU.)
- Vortex (M 16715, Mixer, EE. UU.)
- Zetasizer Malvern Systems (ZEN 3600, EE. UU.)
- Material de cristalería en general

4.2 Métodos analíticos

Para cuantificar el KT en los diferentes experimentos realizados se desarrollaron cuatro métodos analíticos mediante espectrofotometría UV-VIS, estos métodos analíticos se utilizaron para: (i) Determinar la tasa de encapsulación del KT en los LE; (ii) Determinar la cantidad de KT liberado a partir de los LE; (iii) Determinar la cantidad de KT permeado a través de la piel con y sin el pre-tratamiento de microagujas; y (iv) determinar la cantidad de KT retenido en la piel después de los estudios de permeación.

Se realizaron espectros de absorción para determinar las longitudes de onda (λ) de máxima absorción de KT mediante un barrido de 200 a 400 nm en los siguientes medios que corresponden en orden a los métodos mencionados en el párrafo anterior: (i) etanol; (ii) solución amortiguadora de fosfatos pH 7.4; (iii) solución amortiguadora de fosfatos pH 7.4 en contacto con piel durante 1 h a 37°C, bajo agitación constante; y (iv) solución de hidróxido de sodio 0.1N en contacto con piel durante 24 h, bajo agitación constante.

4.2.1 Obtención de la longitud de onda máxima

Para determinar la longitud de onda máxima del fármaco se prepararon soluciones del mismo a una concentración de 20 $\mu\text{g/mL}$ en los diferentes medios ya mencionados y se realizó un barrido en un espectrofotómetro UV-VIS a una longitud de onda de 200 a 400 nm, utilizando como blanco el medio correspondiente.

Una vez obtenida la longitud de onda máxima en los diferentes medios, se procedió a desarrollar los métodos analíticos. Los parámetros evaluados fueron: linealidad, exactitud, precisión (reproducibilidad y repetibilidad); estos se validaron de forma parcial de acuerdo a la guía de validación de métodos bioanalíticos de la FDA (2001); a la guía de validación de procedimientos analíticos ICH, Q2 (R1) (1994) y a los Criterios para la Validación de Métodos Físicoquímicos de la Secretaría de Salud (2011).

4.2.2 Linealidad

Se prepararon seis puntos a diferentes concentraciones de ketorolaco trometamina en los diferentes medios en un rango de concentración de 5 -30 $\mu\text{g/mL}$, cada punto se hizo por triplicado y se leyeron en un espectrofotómetro a la longitud de onda de máxima absorción obtenida previamente (320 nm para etanol, 325 nm para solución amortiguadora de fosfatos, 324 nm para solución amortiguadora de fosfatos en contacto con piel y 320 nm para NaOH 0.1 N en contacto con piel). A los resultados se les efectuó un análisis de regresión lineal calculando la ordenada al origen, la pendiente, el coeficiente de determinación y el coeficiente de variación.

4.2.3 Precisión

Se evaluó la repetibilidad y reproducibilidad. Se determinó el coeficiente de variación (CV) de tres concentraciones diferentes repetidas por sextuplicado en los diferentes medios estudiados en dos días diferentes.

4.2.4 Exactitud

Para evaluar la exactitud, se prepararon tres concentraciones diferentes de la curva de calibración por sextuplicado en los diferentes medios estudiados y se determinó la concentración real interpolando los datos en la curva de calibración correspondiente y calculándose el porcentaje recuperado respecto a la concentración teórica, posteriormente se determinó el CV.

4.3 Método de preparación y caracterización de los LE con KT

4.3.1 Preparación de LE con KT

Los liposomas elásticos se prepararon por el método de hidratación de película descrito por Cevc y Blume (1992), el cual consiste en los siguientes pasos:

1. Pesar en un vaso de precipitados la cantidad requerida de fosfatidilcolina (PC) y agente tensioactivo (Tween® 80), de tal forma que por mililitro se encuentren en la siguiente proporción: 86% de PC y 14% de Tween® 80. El KT se adicionó en este punto a una concentración de 2 mg/mL.
2. Disolver los componentes anteriores en 25 mL de etanol.
3. Evaporar el disolvente en un rotavapor a presión reducida a 30°C y 30 rpm.
4. Secar a vacío la película formada en el punto anterior durante 12 horas en un desecador.
5. Suspender la película en una solución de etanol al 7% (v/v), agitando con vórtex durante 15 minutos. La cantidad de etanol al 7% deberá ser tal, que la concentración final de fosfatidilcolina sea del 5% (p/v).
6. Dejar hidratar la suspensión formada en el punto anterior durante dos horas.
7. Someter la suspensión a ultrasonido (40 kHz) durante 10 minutos.
8. Excluir dos veces la suspensión a través de una membrana de policarbonato con tamaño de poro de 100 nm y 11 mm de diámetro.

4.3.2 Caracterización de los LE

Los liposomas elásticos obtenidos, se caracterizaron evaluando su tamaño, potencial zeta, eficiencia de encapsulamiento y elasticidad.

4.3.2.1 Determinación del tamaño de vesícula

La determinación del tamaño promedio de los liposomas elásticos y la distribución del tamaño (índice de polidispersión, IP) se realizó con la ayuda del equipo Nanosizer Coulter, utilizando 4 gotas de la muestra de LE y diluyendo con agua destilada, directamente en la celda de vidrio en que se realiza la lectura; considerando cumplir con las condiciones del equipo que son ajustar a un ángulo de 90°, y cumplir con el rango establecido de intensidad de la muestra ($5e^{+4} - 1e^{+6}$ ct/seg).

4.3.2.2 Determinación del potencial Z

El potencial zeta se determinó con ayuda de un Zetasizer (Malvern systems ZEN 3600, EE. UU.), a la viscosidad y constante dieléctrica del agua, 150 volts de corriente eléctrica, a una temperatura de 25 °C utilizando una celda de capilar doblado. El medio de dispersión fue agua desionizada. Cada determinación se realizó por triplicado.

4.3.2.3 Eficiencia de encapsulamiento del fármaco en los LE

Para determinar la eficiencia de encapsulamiento, el fármaco libre, el cual no está en el interior de las vesículas, se separó de las mismas por cromatografía de permeación en gel, en columnas de Sephadex® G-10, usando el método de centrifugación en minicolumna. De manera general, el Sephadex® G-10 se hidrató y se dejó hinchar en agua destilada a temperatura ambiente, con agitación ocasional, durante al menos seis horas. El gel obtenido se almacenó a 4 °C.

Las minicolumnas se prepararon colocando un papel filtro en la base de jeringas de 3 mL, posteriormente se llenaron con el gel. El exceso de agua se removió por centrifugación a 1500 rpm durante tres minutos.

Se agregó una cantidad de 100 µl de suspensión de LE y se centrifugó a 1500 rpm durante 2 minutos, posteriormente se hicieron tres lavados a la misma velocidad y tiempo con 200 µl de agua cada uno para eluir completamente los LE. Se colectaron los LE cargados con fármaco (el fármaco libre queda retenido en la columna), se rompieron las vesículas con etanol absoluto y se llevó a un volumen de aforo de 10 ml. La solución obtenida se leyó en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 320 nm.

Se lavó el Sephadex centrifugándolo con agua destilada aproximadamente 9-10 veces a la misma velocidad y tiempo, para recuperarlo y poder seguir utilizándolo.

Para esta prueba se prepararon tres lotes bajo las mismas condiciones. El porcentaje de eficiencia de encapsulación de fármaco (% EE) se calculó mediante la siguiente ecuación (Begum et al., 2012):

$$EE (\%) = \frac{\text{Cantidad de fármaco incluido en LE}}{\text{Cantidad inicial de fármaco}} \times 100$$

Ecuación 7. Porcentaje de eficiencia de encapsulación.

4.3.2.4 Prueba de elasticidad

La elasticidad de las vesículas fue determinada midiendo el tamaño de las mismas antes y después de ser extruidas manualmente a través de membranas de policarbonato con un tamaño de poro de 50 nm. El experimento fue llevado a cabo por triplicado.

4.4 Estudio de liberación "in vitro" de KT a partir de los LE

Las pruebas de liberación "in vitro" se llevaron a cabo empleando membranas de diálisis con un peso molecular de corte de 8000 Da. Las membranas se hidrataron toda la noche con solución amortiguadora de fosfatos pH= 7.4 (preparada conforme lo indica la USP 29).

Las membranas se colocaron entre el compartimiento donador y el receptor de las celdas de Franz (Figura 11), la parte receptora se llenó con solución amortiguadora de fosfatos pH 7.4, de las cuales el volumen receptor osciló entre 17 y 21 mL dependiendo de cada celda (el volumen se midió de manera individual y se consideró para los cálculos) y se colocó 1 mL de suspensión de LE en la parte donadora. Las celdas se mantuvieron a 32°C en un baño de agua y se tomaron muestras de 4 mL del medio receptor a los 30, 45, 60, 90, 120, 150, 180, 210, 250, 280, 310 y 350 min. Para cada toma de muestra se repuso el mismo volumen con solución amortiguadora de fosfatos pH 7.4. Las muestras se analizaron espectrofotométricamente a 325 nm.

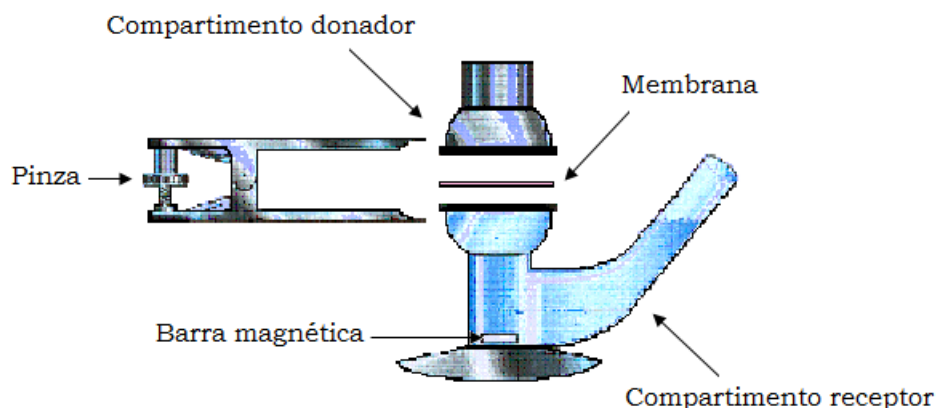


Figura 11. Celda de difusión tipo Franz

Para determinar la cinética y el mecanismo de liberación del fármaco a partir de los LE, se emplearon los modelos matemáticos de orden cero, primer orden, Higuchi y Korsmeyer-Peppas.

4.5 Prueba de permeación “*in vitro*” de KT formulado en LE a través de piel de oreja de cerdo intacta y pre-tratada con microagujas

Preparación de la piel

Se utilizó piel de la parte externa de la oreja de cerdo, limpiándola y separándola del cartílago cuidadosamente para no provocar incisiones en ella, se quitó el exceso de grasa de la oreja y se cortó el exceso de pelo con tijeras. Las muestras de piel se guardaron en el congelador a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta ser utilizadas en los estudios de permeación.

En el caso de la piel intacta, ésta se utilizó tal cual, una vez separada del cartílago y limpia. En el caso de la piel pre-tratada con microagujas, se utilizó un rodillo con microagujas de $500\text{ }\mu\text{m}$ de longitud (MTS-Roller, USA). Este rodillo se pasó sobre la piel, en cuatro diferentes direcciones, de acuerdo a lo mostrado en la Figura 12, manteniendo un ángulo y presión firme; esto con la finalidad de tener perforaciones que atravesaran el SC y facilitar la permeación de los LE.

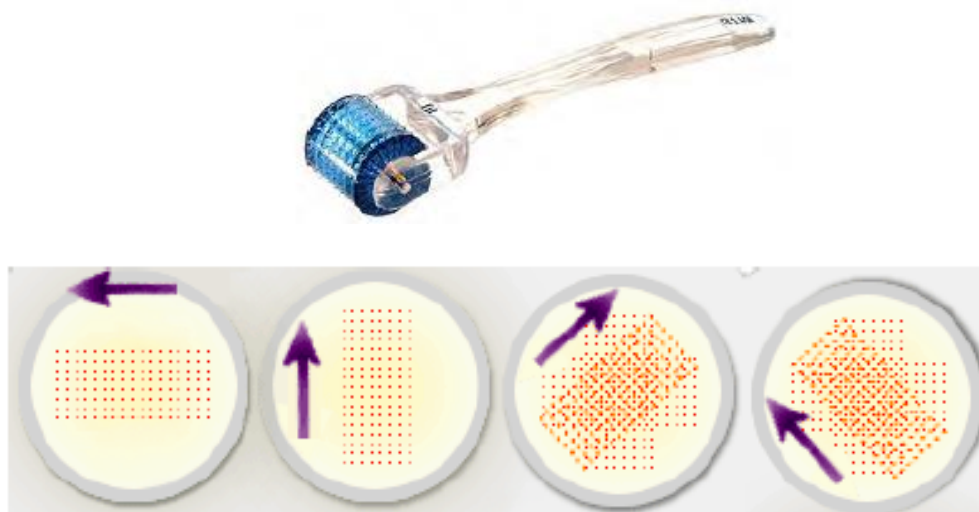


Figura 12. Rodillo de microagujas ($500\text{ }\mu\text{m}$) MTS-Roller, EE.UU. Y direcciones para las microperforaciones. (García, 2012)

Para las pruebas de permeación “*in vitro*” se utilizaron celdas de difusión tipo Franz, en las cuales se colocó la piel de cerdo (ya sea intacta o pre-tratada con las microagujas) entre el compartimento donador y el receptor. Se colocó 1 mL de suspensión de LE con KT en la parte donadora y solución amortiguadora de fosfatos pH 7.4 en la parte receptora, los volúmenes variaron entre 17 y 21 mL en el caso de cada celda; se colocaron en un baño de agua, para mantener la

temperatura del medio receptor a 37 °C, con agitación constante por un tiempo de 8 h, tomando una muestra de 2 mL del receptor cada hora y reponiendo este volumen extraído con solución amortiguadora de fosfatos pH 7.4. Estas muestras se leyeron en un espectrofotómetro UV-VIS a 324 nm.

4.6 Extracción del fármaco retenido en la piel al final de las permeaciones

Al finalizar las permeaciones se colectó la piel utilizada, limpiando la superficie para eliminar el exceso de formulación y se cortó en trozos pequeños. La piel de cada celda se colocó en 20 mL de NaOH 0.1N, dejándolo en agitación por 24 horas. Pasado este tiempo se filtraron a través de papel filtro una vez y por membrana de policarbonato con tamaño de poro de 0.45 μm , dos veces. Las muestras filtradas se leyeron en un espectrofotómetro UV-VIS a 320 nm.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Preparación de los LE

El método para la preparación de los LE se basó en el reporte de Nava et al. (2011), modificando únicamente las veces que se sometió a extrusión la suspensión de liposomas (dos veces en lugar de tres); esto porque al pasarlo dos veces a través de una membrana de 0.1 μm , el tamaño de las vesículas era uniforme, sin diferencia entre dos y tres extrusiones en cuanto a tamaño y uniformidad, además, porque el proceso de extrusión es difícil, por la presión que hay que ejercer para hacer pasar la suspensión de liposomas a través de la membrana (a pesar de ser elásticos).

5.2 Caracterización de los LE

5.2.1 Tamaño de vesícula

El tamaño de los LE está dado por el procedimiento de elaboración de los mismos; para controlar el diámetro de vesícula y también la homogeneidad del tamaño es posible aplicar a la suspensión determinado tiempo de sonicación, es por eso que al aumentar el tiempo de sonicación se espera disminuya el tamaño. En este caso, 10 minutos fueron suficientes, sin que hubiera diferencia en el tamaño con tiempos de sonicación mayores.

El procedimiento de extrusión de la suspensión de vesículas también es un factor importante, siendo el tamaño de poro y el número de veces que se repita esta operación, aspectos que determinan el tamaño y la homogeneidad de tamaño de la suspensión final de LE (Simard et al., 2007).

Por lo comentado acerca de los LE podemos decir que se espera que, por tratarse de vesículas deformables, la filtración repetida de las mismas no tuviera efecto en su tamaño; de acuerdo a lo reportado en la bibliografía, el tamaño de los LE antes y después de atravesar los poros es prácticamente el mismo, a menos que dicho tamaño sea muy grande ($\geq 200\text{-}300$ nm). La razón de que las vesículas grandes se fragmenten durante la extrusión no es que a un máximo tamaño de partícula dejen de ser deformables, sino que presentan una tendencia inherente a ser pequeñas (aproximadamente 100 nm) (Gamboa, 2006).

La disminución del tamaño de vesícula puede ser además debido a la formación de una estructura de micelas en lugar de las vesículas, que son relativamente más pequeñas en tamaño. Estos resultados están de acuerdo con los hallazgos de otros autores que llegaron a la conclusión de que la reducción en los tamaños de vesículas se debe a la concentración de fosfolípido decreciente y creciente concentración de tensioactivo (Sheo et al., 2010).

El tamaño que se determinó en los LE fue de aproximadamente 85 nm con un IP de 0.39 ± 0.03 el cual es adecuado (Ver Anexo 1). Comparado con los tamaños reportados en la bibliografía los obtenidos en este estudio resultan ser más pequeños, la razón es que el procedimiento de elaboración difiere en el tiempo de sonicación y el número de extrusiones a las que la suspensión de liposomas fue sometida.

El tamaño de los LE está relacionado con el grado de penetración en la piel; ya que a menor tamaño la penetración será facilitada.

5.2.2 Potencial Zeta

Al tratarse de una suspensión, un factor muy importante es la estabilidad de la misma y el potencial Zeta nos permite hacer una predicción acerca de la estabilidad de las dispersiones coloidales como los liposomas. Usualmente la agregación entre partículas se considera menos probable para partículas con potencial Z alto (>30 mV ya sea positivo o negativo) debido al efecto de repulsión entre cargas (García, 2012).

Todas las formulaciones mostraron un potencial zeta negativo (-16.99 mV con una desviación de -1.54 mV, ver Anexo 2), esta carga es atribuida a la fosfatidilcolina. A pesar de presentar un potencial Zeta relativamente bajo, reportes previos han demostrado que los LE a los cuales se les ha adicionado Tween® 80 como activador de superficie son estables físicamente (no hay modificación en el tamaño, ni en el potencial zeta) por largos periodos de tiempo atribuido a un efecto de estabilización estérica dada por este tensioactivo (Nava et al., 2011).

Actualmente, el mecanismo del Tween® 80 sobre la estabilidad de los liposomas es desconocido. Se especula que la cadena hidrocarbonada del Tween® 80 podría ser capaz de penetrar en la bicapa lipídica, dejando así a los grupos de óxido de polietileno en la superficie de los liposomas, introduciendo de este modo una barrera estérica en la superficie de los liposomas. (Yang et al., 2007).

Se debe mencionar que independientemente de la concentración de KT, este no influye ni en el valor del tamaño de partícula ni en el potencial zeta (Uchinio et al., 2011).

5.2.3 Determinación de la eficiencia de encapsulamiento

Como ya se mencionó en el punto 4.4 de la metodología, una vez separado el fármaco libre al pasar la suspensión por las columnas de Sephadex, al romper las vesículas, el medio de disolución final fue etanol, en el cual se disolvieron tanto los fosfolípidos como el fármaco presente.

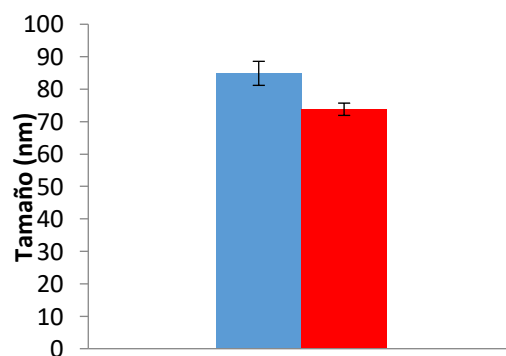
Una vez seguido el procedimiento ya expuesto en la metodología, se obtuvo en promedio de los tres lotes preparados un porcentaje de encapsulación de

54.85%, con una desviación estándar de 3.71% (Ver Anexo 3). Respecto a las referencias encontradas, este valor puede considerarse bajo ya que se reportan valores de aproximadamente el 80% de KT encapsulado (Nava et al., 2011). Esto se justifica contemplando el valor del tamaño de las vesículas: El valor de tamaño reportado por Nava et al., es de aproximadamente 120 nm, mientras que los liposomas obtenidos en el presente trabajo tienen un tamaño promedio de 85 nm. Al ser estos más pequeños, la cantidad de fármaco encapsulada es menor, como el KT es hidrosoluble, este se encontraría encapsulado en el compartimento acuoso de las vesículas, al ser estas más pequeñas, el volumen acuoso también es menor y por lo tanto la cantidad de fármaco encapsulada también, pero en proporción, la cantidad de fármaco encapsulado es aproximadamente la misma en relación al tamaño. Además, el hecho de encontrar aproximadamente cantidades iguales de fármaco dentro y fuera de los liposomas, refleja el equilibrio que se establece en el sistema.

5.2.4 Prueba de elasticidad

Los LE deben ser deformables de modo que puedan pasar fácilmente a través de los diminutos poros presentes en la epidermis. Es por ello, que las formulaciones liposomales preparadas se sometieron a un estudio de deformabilidad por medición del cambio de tamaño al ser extruidos a través de una membrana con un tamaño de poro menor al tamaño promedio de las vesículas, en este caso se usaron membranas con un tamaño de poro de 50 nm.

Por su naturaleza, las vesículas tienen tendencia a ser pequeñas debido a la presencia del tensioactivo, el cual influye tanto en su tamaño como en su elasticidad, estas propiedades son dependientes de la cantidad y tipo de tensioactivo agregado a la formulación (Sheo et al., 2010). Con el fin de evaluar el grado de elasticidad de las vesículas, estas se hicieron pasar por una membrana de 0.05 μm (un tamaño mucho menor al de las mismas). En teoría, el tamaño de las vesículas no debe verse afectado al pasar por la membrana, o bien la reducción del tamaño debe ser mínima, pues estas son deformables; en este trabajo se encontró que el tamaño disminuye en aproximadamente 13 % (Ver Anexo 4), obteniendo un tamaño promedio de 74 nm (Gráfica 1). El tamaño inicial de las vesículas fue de aproximadamente 85 nm.



Gráfica 1. Diferencia de tamaño entre los LE antes (barra azul) y después de ser extruidos a través de una membrana de policarbonato de 0.05 μm (barra roja).

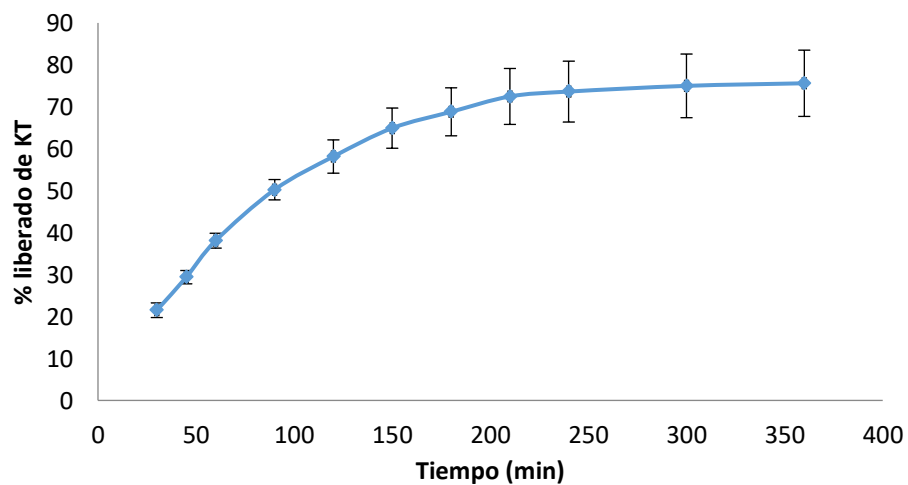
Cabe mencionar que, aunque el tensioactivo provee de elasticidad a los LE, no puede agregarse en mayor cantidad con finalidad de hacerlas más flexibles, pues puede provocar la formación de micelas (Sheo et al., 2010). Independientemente de la reducción en tamaño, las vesículas demostraron ser flexibles, pues lograron pasar a través de la membrana. En un estudio previo (Nava et al., 2011) demostró que una dispersión liposomal (vesículas sin surfactante y por tanto no flexibles) definitivamente no eran capaces de pasar a través de la membrana.

5.3 Estudios de liberación “*in vitro*” de KT a partir de LE.

El estudio de liberación del fármaco a partir de los liposomas se realizó utilizando una membrana de diálisis montada en una celda de difusión tipo Franz, estos estudios se realizaron a 32 °C, pues es la temperatura de la superficie de la piel, y cuidando las condiciones como área superficial constante de la membrana de diálisis, cantidad constante de suspensión liposomal y condiciones sink en el medio receptor.

El perfil de liberación del KT a partir de los LE con respecto al tiempo se muestra en la Gráfica 2.

Un punto esencial en la evaluación de sistemas para el suministro de fármacos es la velocidad a la que se libera el fármaco desde el sistema portador, en este caso los liposomas. Aunque los ensayos de liberación “*in vitro*” se utilizan generalmente en el control de calidad de formulaciones de fármacos, también se utilizan para predecir su comportamiento “*in vivo*”. Para sistemas liposomales de suministro de fármacos tópicos, los perfiles de liberación “*in vitro*” no siempre reflejan el comportamiento “*in vivo*” (Nounou et al., 2006).



Gráfica 2. Perfil de liberación “*in vitro*” de KT a partir de los LE.

Se puede observar que la cantidad de KT liberado en función del tiempo fue aumentando hasta alcanzar un porcentaje de liberación constante; cabe mencionar que se empleó la formulación completa (los LE con KT encapsulado y el fármaco libre que no quedó encapsulado). En la dispersión liposomal se genera un equilibrio entre el fármaco incluido en las vesículas y el fármaco en el medio acuoso externo, sobre todo en el caso del KT de naturaleza hidrofílica. Conforme el fármaco libre atraviesa la membrana de diálisis y sale al medio de disolución, se genera un gradiente de concentración que favorece que el KT salga de los liposomas. Como puede observarse en la Gráfica 2, la velocidad de liberación tiende a ir disminuyendo a partir de los 120 min, en donde se ha liberado aproximadamente el 55 % del fármaco (Ver Anexo 5). Esto se atribuye, como ya se mencionó, al equilibrio que se establece entre: (i) el fármaco encapsulado y el medio de dispersión de los liposomas; (ii) el fármaco libre en el medio de dispersión y el medio de disolución fuera de la membrana de diálisis.

La liberación *in vitro* se utiliza como un método indirecto para determinar la disponibilidad de fármacos para fines de control de calidad y para selección y/o ajuste de la formulación. Además, la correlación "*in vitro*"/"*in vivo*" se busca a menudo para reducir el tiempo de desarrollo de una formulación optimizada (Shazly et al., 2008).

Para analizar la liberación del KT a partir de los LE, los datos fueron ajustados a diferentes modelos matemáticos: orden cero, primer orden, Higuchi y Peppas y así determinar el probable mecanismo de liberación.

Los valores del coeficiente de correlación (R^2) obtenidos al ajustar los datos a los modelos matemáticos se muestran en la tabla 3. La liberación de KT a partir de los LE siguió una cinética de primer orden con una R^2 de 0.9957. Que sea de primer orden significa que la velocidad de liberación disminuye con el tiempo. La liberación del fármaco es proporcional a la cantidad de fármaco que permanece en la forma de dosificación y, por tanto, la liberación depende de la concentración del fármaco.

Para conocer el mecanismo de liberación del fármaco, se aplicaron las ecuaciones de Higuchi y la de Peppas a los datos de liberación (Dash et al., 2009, Domínguez M. 2014), obteniéndose valores altos de coeficientes de correlación para ambos modelos. Pero, se puede observar que el modelo de Higuchi es el más adecuado para describir el mecanismo de liberación de KT a partir de los liposomas ($R^2=0.9961$), lo que puede suponer que el mecanismo preponderante de la liberación del fármaco a partir de los liposomas es la difusión. El ajuste a los diferentes modelos se encuentra en el anexo 5.

Tabla 3. Coeficientes de correlación y constantes de los modelos matemáticos.

| <i>Modelo matemático</i> | <i>Coefficiente de correlación (R^2)</i> | <i>Constantes (K)</i> |
|--------------------------|---|-----------------------|
| <i>Orden cero</i> | 0.9792 | 8.1877 |
| <i>Primer orden</i> | 0.9957 | 0.0071 |
| <i>Higuchi</i> | 0.9961 | 0.0073 |
| <i>Korsmeyer-Peppas</i> | 0.9932 | 0.7292 |

5.4 Estudios de permeación de KT formulado en LE a través de piel intacta y extracción del fármaco remanente en la piel.

Las características de las vesículas influyen en su capacidad de penetración en la piel, una de estas es el estado termodinámico de la bicapa, es decir la bicapa puede estar en un estado líquido-cristalino o en una fase-gel. Por imágenes de microscopía confocal se ha demostrado que los liposomas cuya bicapa se encuentra en fase-gel, no penetran a capas profundas de la piel como los liposomas en un estado líquido-cristalino (Bouwstra et al., 2003). Otras propiedades fisicoquímicas tales como tamaño, carga, y la elasticidad también pueden influir en la eficacia de las vesículas como vehículo de administración transdérmica (Uchino et al., 2011).

Dos tipos de interacciones entre la piel y las vesículas pueden inducir el efecto potenciador de estas últimas sobre la administración transdérmica de fármacos: (1) Adsorción y fusión de las vesículas cargadas con el fármaco sobre la superficie de la piel, lo que conduce a un gradiente termodinámico de alta actividad en la interfase fármaco-SC; y (2) las vesículas pueden causar cambios en el SC, disminuyendo las propiedades de barrera del mismo (Fang et al., 2001).

Los liposomas elásticos superan la dificultad de penetrar en la piel, posiblemente, extruyéndose a sí mismos a lo largo de los lípidos intercelulares de la capa córnea. La razón de esto es la alta deformabilidad de las vesículas, lo que les permite responder a la tensión mecánica que las rodea de una manera autoadaptable. Estos LE contienen una mezcla de lípidos de membrana y activadores de superficie biocompatibles. La mezcla óptima conduce a la flexibilidad de las membranas de los liposomas haciendo posible su penetración a través de canales de la piel (Sheo et al., 2010). La fuerza impulsora para la penetración en la piel de los LE es el "gradiente de hidratación transdérmico" causado por la diferencia en el contenido de agua entre la superficie de la piel relativamente deshidratado (aproximadamente 20 % de agua) y la epidermis viable acuosa (cerca de 80 %); entonces el transporte de LE es impulsado por el gradiente osmótico a través de la piel (Lakshmi et al., 2012). Los fosfolípidos tienen una alta afinidad por las membranas biológicas, por lo que la mezcla de fosfolípidos del sistema de soporte con el lípido de la piel de las capas

intercelulares también puede contribuir a incrementar la permeabilidad de la piel a las vesículas de lípidos (Gupta et al., 2005).

Para las permeaciones realizadas sin la aplicación de microagujas, esto es, con piel intacta, los resultados muestran que el fármaco incluido en los LE no fue capaz de permear hacia el medio receptor o bien que la cantidad permeada fue tan poca, que no se encontró una respuesta analítica para ninguna de las muestras, a pesar que se tienen liposomas flexibles (en estado líquido cristalino). Estos resultados se atribuyen a la naturaleza lipídica del SC, el cual constituye la principal barrera de permeabilidad de la piel y a las propiedades fisicoquímicas del fármaco (Puglia et al., 2006).

Estudios previos han demostrado que no solo el SC presenta cierta impermeabilidad ante moléculas, sino también la epidermis completa, es decir la epidermis viable plantea una barrera significativa a la difusión transdérmica tanto a pequeñas moléculas como a macromoléculas, convirtiéndose en la etapa limitante de la velocidad de permeación (Andrews et al., 2013).

Tomando en cuenta que la suspensión liposomal incluye tanto fármaco incluido en las vesículas como fármaco libre (aproximadamente 50 %), la naturaleza hidrofílica del KT dificulta su paso a través del SC en su forma libre; y, por otro lado, el incluido en los LE, aunque flexibles, no penetraron en la piel.

Probablemente tiempos de contacto más prolongados, hubieran permitido detectar fármaco en el compartimento receptor.

En general, según la ley de Fick, la cantidad de fármaco que es capaz de absorberse a través de la piel, por unidad de tiempo y superficie, es proporcional a la concentración del mismo en el vehículo. Sin embargo, esto no es siempre así, porque cuando la concentración del penetrante es muy elevada produce modificaciones en la membrana, o se modifica el coeficiente de reparto entre el vehículo y la barrera cutánea.

Estudios de permeación de una solución hidroalcohólica de KT en piel (Nava et al., 2011), indican que el paso del fármaco a través de la piel sin utilizar microagujas es insignificante, esto nos lleva a que la cantidad de KT libre presente en la formulación de LE no permeará y, por lo tanto, es otra razón por la que no existirá la presencia de fármaco en el medio receptor. A diferencia de estudios previos en los que se utiliza piel de un determinado grosor (alrededor de 500-750 μm), en este estudio se utilizó piel completa, siendo otro factor a tomar en cuenta.

Tampoco se encontró fármaco retenido en la piel después de los estudios de permeación. Por lo que se puede decir que los LE no fueron capaces de penetrar a través del SC y difundir a capas profundas de la piel.

El KT libre que no está encapsulado está en forma ionizada ya que el pKa que presenta el KT es de 3.5, y al tratarse de un ácido débil en un medio de pH mayor, la molécula se encuentra ionizada, por lo cual le es más difícil penetrar las membranas biológicas y por lo tanto el paso hacia el medio receptor.

La piel es muy eficaz como barrera de penetración selectiva. La absorción percutánea implica el paso de la molécula de fármaco desde la superficie de la piel en el SC bajo la influencia de un gradiente de concentración y su posterior difusión a través del SC y la epidermis subyacente, a través de la dermis, y a la circulación sanguínea. La piel se comporta como una barrera pasiva a la molécula penetrante. El SC proporciona la mayor resistencia a la penetración, y es la etapa limitante en la absorción percutánea (Sinha et al., 2000). Es por esta razón que la permeación sin microagujas no fue satisfactoria y los LE no pudieron pasar a través de la piel, esto se justifica tanto por las propiedades fisicoquímicas del SC, como por las del fármaco.

5.5 Estudios de permeación “*in vitro*” de KT a través de piel tratada con microagujas y extracción del fármaco remanente en la piel

El paso de los LE a través de la piel se vio favorecido con el pretratamiento con microagujas, observándose presencia de KT en la fase receptora.

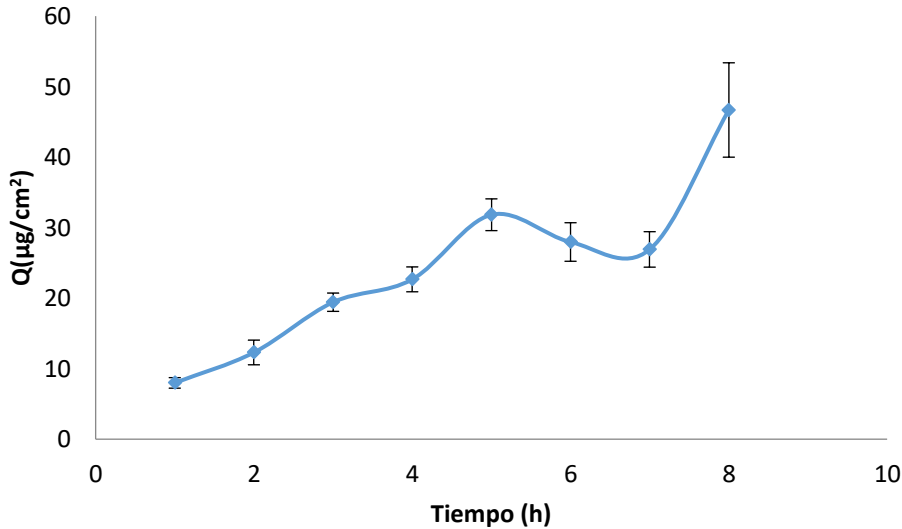
La penetración de los LE se atribuye a los canales formados por las microagujas, la sinergia de los LE y las microagujas se complementa para dar lugar a la permeación.

En la gráfica 3 se observa la cinética de permeación, que es la cantidad de KT permeada por unidad de área de la piel ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) a la cual estuvieron expuestos los LE en función del tiempo (h). De la pendiente de la gráfica se puede obtener la velocidad a la cual una sustancia difunde a través de la piel (flujo; $\mu\text{g}/\text{cm}^2\cdot\text{h}$).

En la gráfica se puede observar que el proceso de permeación del KT a través de la piel pre-tratada con microagujas es bifásico, observándose en el perfil de permeación dos pendientes y por lo tanto dos flujos, el primer flujo corresponde a las primeras cinco horas (J_1) y la segunda pendiente donde hay un cambio en el comportamiento de la permeación es el flujo final (J_2) y comprende las últimas dos horas del estudio. El segundo flujo como se puede observar en la tabla 4 es mayor que el primero, esto se atribuye a que el KT presente en los LE que se encuentran en los espacios provocados por las microagujas, se queda formando un depósito y pasado el tiempo este sigue difundiendo, lo cual se ve reflejado en la pendiente del segundo flujo.

El tiempo de latencia (t_L), se obtuvo gráficamente de la cinética de permeación mediante la extrapolación cuando la concentración permeada es cero. Este es el tiempo que el fármaco tarda en permear hasta el medio receptor. Se observa un tiempo de latencia de aproximadamente -0.25 h el cual puede considerarse como cero. El tiempo es negativo ya que al estar en contacto el fármaco con la

piel pre-tratada con microagujas, este empieza inmediatamente a permear. El paso de KT a través de la piel se atribuye sin duda a los canales formados por las microagujas, los cuales facilitaron enormemente el paso del KT (libre e incluido en los liposomas).



Gráfica 3. Permeación a través de piel de oreja de cerdo de KT incluido en LE.

Tabla 4. Parámetros de la cinética de permeación.

| Parámetro | Resultado |
|---|----------------|
| Primer flujo (J_1) $\mu\text{g}/\text{cm}^2 \cdot \text{h}$ | 5.81 +/- 0.41 |
| Segundo flujo (J_2) $\mu\text{g}/\text{cm}^2 \cdot \text{h}$ | 20.08 +/- 6.18 |
| Tiempo de latencia(h) | 0 |

El tamaño pequeño de los LE cargados con KT pudo facilitar su difusión a través de los microcanales creados en la piel por la inserción del arreglo de microagujas, extendiéndose hacia la epidermis viable. Sin embargo, sería difícil que las vesículas intactas penetraran más allá de los microconductos creados por el pre-tratamiento con microagujas y el fármaco tendría que ser liberado de las vesículas y depositarse en la piel, desde donde podría difundir a la dermis. La combinación de LE y microagujas podría proveer mayores y más estables grados de liberación transdérmica de fármacos sin las limitaciones de la difusión pasiva tradicional, como el tamaño molecular y la solubilidad (Qiu et al., 2008).

El comportamiento bifásico de la permeación puede atribuirse a que en primera instancia penetra el fármaco libre junto con los LE (Figura 13), estos últimos podrían formar un depósito en el fondo de las perforaciones de la piel provocadas por las microagujas, originando la segunda parte de la curva. La permeación del fármaco libre pudo haberse facilitado por encontrarse en el área de la dermis de la piel y a su naturaleza hidrofílica (primera fase de la curva) y posteriormente

el fármaco se libera a partir de los liposomas acumulados en la base de las perforaciones producidas por las microagujas, dando la segunda fase de la curva, la cual se ve reflejada en la gráfica 3 a partir de la séptima hora de permeación.

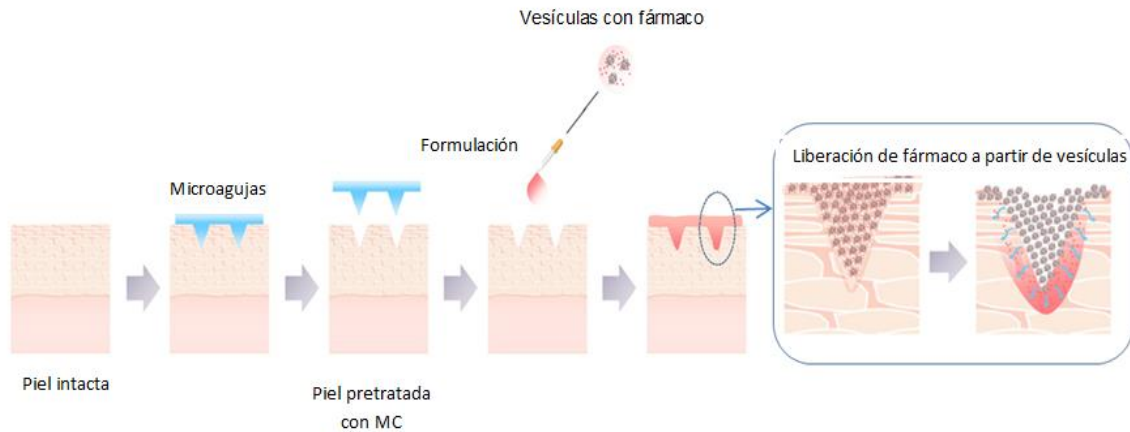
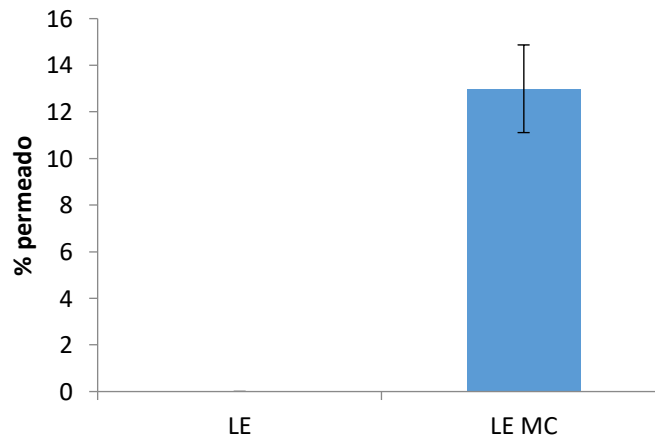


Figura 13. Proceso de permeación de LE con KT empleando microagujas (Modificada de Rattanapak et al., 2013).

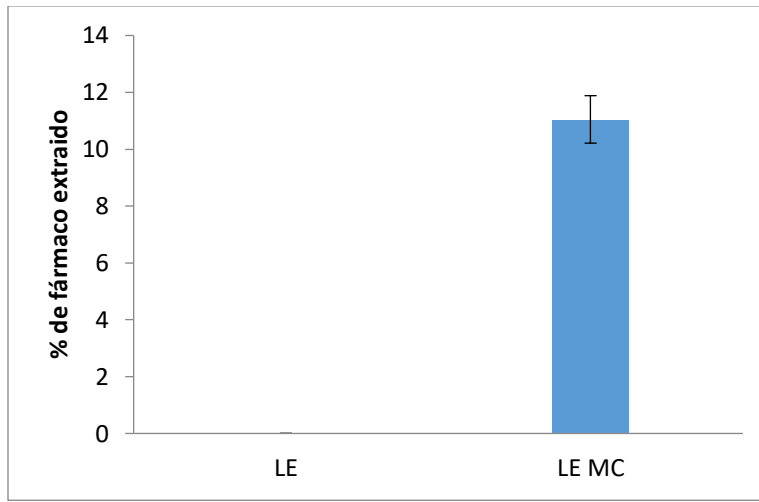
De acuerdo a los resultados, el pretratamiento con microagujas permitió el paso del 12.99 % del KT total en la formulación, después de 8 horas; esto es $265.07\mu\text{g} \pm 38.34 \mu\text{g}$ (Ver Anexo 6). En la gráfica 4 se observa que el uso de las microagujas, favorece la permeación del KT formulado en LE, sin que se haya encontrado KT en el medio receptor al utilizar piel intacta



Gráfica 4. Porcentaje de KT formulado en LE que pasó a través de la piel en los estudios de permeación a través de piel intacta (LE) y al tratar la piel con microagujas (LE MC).

La cantidad de fármaco retenida en piel después de la permeación fue de un $11.05\% \pm 0.83\%$, esto es $224.91\mu\text{g}$ de fármaco al pretratar con microagujas

(Ver Anexo 7). El KT al estar en un medio básico, se encuentra en forma ionizada y por lo tanto soluble.



Gráfica 5. Porcentaje de KT extraído de la piel al final de los estudios de permeación en piel intacta (LE) y piel tratada con microagujas (LE MC).

Los resultados (gráfica 5) muestran que el pre-tratamiento de la piel con microagujas permite la acumulación de KT formulado en liposomas en la piel, así como su liberación transdérmica con respecto a la aplicación de los LE en piel intacta. Resultados de diferentes estudios han demostrado que los LE solo promueven la deposición en la piel de algunos fármacos. Se cree que el gradiente osmótico provee la fuerza impulsora para la penetración de los LE, facilitada también por la elasticidad de su membrana. En el estrato granuloso de la epidermis el nivel de agua aumenta con respecto al SC, por lo que el proceso de penetración se detiene. Esto implica que los LE permanecen confinados en el SC donde el fármaco permanece asociado a ellos y posteriormente se podría dar su liberación hacia capas más profundas de la piel. Esta liberación puede ser afectada por: a) la afinidad del fármaco con las vesículas y b) la solubilidad del fármaco en los lípidos del SC. La liberación del fármaco a partir de las vesículas en el SC es un factor importante que afecta el flujo transdérmico, y si como en este caso el fármaco es hidrofílico puede resultar en una liberación lenta en el SC, donde los fosfolípidos pueden formar una barrera lipídica extra, disminuyendo la permeación del fármaco. Esto podría explicar los resultados obtenidos, en los que no se logró la liberación transdérmica del KT formulado en LE en piel intacta (Honeywell-Nguyen y Bouwstra, 2005). Por el contrario, el tratamiento con microagujas permitió que el fármaco libre penetrara a zonas de la piel con elevado contenido acuoso y que los LE formaran un depósito en la base de los microcanales formados por las microagujas donde el fármaco puede seguir liberándose, lo cual explica el flujo transdérmico y la deposición del fármaco en la piel (Gupta et al., 2011; Rattanapak et al., 2013).

6. CONCLUSIONES

- Se prepararon liposomas elásticos mediante el método de hidratación de película, los liposomas obtenidos presentaron un tamaño promedio de 85 nm, un potencial Zeta de -17 mV y una eficiencia de encapsulamiento del 55%.
- La prueba de elasticidad demuestra que el tamaño de los LE disminuye en aproximadamente un 13% después de ser extruidos a través de una membrana de 50 nm.
- Las pruebas de liberación "*in vitro*" y la aplicación de los modelos matemáticos permitieron determinar que la liberación es de tipo anómala, y que sigue una cinética de primer orden.
- Se demostró que la suspensión de LE, conteniendo KT incluido en las vesículas y en forma libre, no es capaz de permear a través de piel intacta.
- El pretratamiento de la piel con un arreglo de microagujas con longitud de 500 μm , permitió el paso de la suspensión de LE conteniendo KT, determinando un 24 % de fármaco permeado: 13 % en la fase receptora y un 11 % retenido en la piel.
- Los métodos utilizados para la cuantificación de KT por medio de espectrofotometría UV-VIS fueron parcialmente validados, demostrando ser lineales, precisos y exactos.
- Se encapsuló KT en una forma farmacéutica diferente a las tradicionales (LE), ofreciendo una alternativa a la administración de fármacos por vía oral, evitando así los problemas ocasionados por este fármaco en el tracto gastrointestinal.

7. PERSPECTIVAS

1. Seguir las pruebas de permeación "*in vitro*" por tiempos más prolongados (e.g., 24 h) para poder contar con más elementos que permitan inferir el comportamiento del sistema.
2. Observar por microscopía confocal la distribución de los LE en piel intacta y piel pretratada con microagujas, verificando si al emplear microagujas estos pueden formar un depósito en los microcanales formados.
3. Realizar pruebas de estabilidad para evaluar esta forma farmacéutica.
4. Llevar a cabo pruebas "*in vivo*" para conocer a nivel sistémico los efectos de la formulación de KT en LE, y comparar con formulaciones comerciales tópicas que incluyan KT.
5. Considerar el uso de microagujas en parches que contengan LE y evaluar su uso como sistemas de liberación sostenida.

REFERENCIAS

- Allevalo M., (2007.) "Sistemas Terapeuticos transdérmicos" Actualizaciones Terapéuticas Dermatológicas. 30: 154-166
- Alsarra A., Bosela A., Ahmed S., Mahrous G., (2005). "Proniosomes as a drug carrier for transdermal delivery of ketorolac" European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics. 59:485-490
- Andrews S., Jeong E., Prausnitz M., (2013). "Transdermal Delivery of Molecules is Limited by Full Epidermis, Not Just Stratum Corneum" Pharmaceutical Research. 30:1099-1109
- Aragón J., González R., Brizuela N., Oliver L. (2009) "Estudio cinético de liberación in vitro en un biomaterial compuesto por HAP-200/POVIAC/CaCO₃". Revista Iberoamericana de Polímeros. Vol. 10(2) 119-130.
- Ariza A., (2004). "Sistemas transdérmicos: influencia del tipo de membrana en la transferencia del ácido salicílico a través de la piel". Tesis doctoral Universidad Complutense de Madrid. Facultad de Farmacia. 6-28
- Barry B.W., (2001). "Novel mechanisms and devices to enable successful transdermal drug delivery" European Journal of Pharmaceutical Sciences. 14:101-114
- Begum M., Shaik M., Abbulu K., Sudhakar M., (2012). "Ketorolac Tromethamine Loaded Liposomes of Long Alkyl Chain Lipids: Development, Characterization and In Vitro Performance" International Journal of PharmTech. 4(1):218-225
- Benson-Heather AE. (2006). "Transfersomes for transdermal drug delivery" Expert Opinion on Drug Delivery. 3(6):727-737
- Betz G., Aeppli A., Menshutina N., Leuenberg H., (2005). "In vivo comparison of various liposome formulation for cosmetic application." International Journal of Pharmaceutics. 296: 44-54.
- Bergstrand, N. (2003). "Liposomes for Drug Delivery: from Physico-chemical Studies to Applications." Acta Universitatis Upsaliensis. Comprehensive Summaries of Uppsala Dissertation form the Faculty of Science and Technology. 826:1-11
- Carrión E., de la Maza A., Parra J.L., (1997). "La influencia de la fuerza iónica y la carga de la bicapa lipídica en la estabilidad de liposomas" Boletín INTEXTER (U.P.C.). 111: 21-31
- Bouwstra, J.A., Honeywell-Nguyen, P.L, Gooris, G.S., Ponec, M., (2003). "Structure of the skin barrier and its modulation by vesicular formulations" Progress in Lipid Research. 42: 1-36.
- Cevc G., Blume G., (1992). "Lipid vesicles penetrate into intact skin owing to the transdermal osmotic gradients and hydration force" Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes. 1104: 226-232.
- Cevc, G., D. Gebauer, A. Schätzlein, and G. Blume. (1998). "Ultraflexible vesicles, Transfersomes, have an extremely low permeation resistance

- and transport therapeutic amounts of insulin across the intact mammalian skin*" Biochimica et Biophysica Acta. 1368: 201-215.
- Cevc G., (2004). "*Lipid vesicles and other colloids as drug carriers on the skin*" Advanced Drug Delivery Reviews. 56: 675-711.
 - Clares B. (2003). "*Sistemas de transporte y liberación de fármacos de aplicación tópica: liposomas multilaminares portadores de acetonido de triamcinolona*" Tesis Doctoral. Granada. 10-20.
 - Dash S., Murthy P., Nath L., Chowdhury P. (2010) "*Kinetic modeling on drug release from controlled drug delivery systems*". Acta Poloniae Pharmaceutica ñ Drug Research, Vol. 67 No. 3 pp. 217-223.
 - Dhamecha D., Rathi A , Saifee M , Lahoti S. , Mohd. Dehghan H., (2009). "*Drug vehicle based approaches of penetration enhancement*" International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences. 1(1): 24-46
 - Domínguez C. (2014) "*Estudio del transporte a través de piel in vivo de triclosán, incluido en una dispersión de nanopartículas poliméricas*" Tesis Doctoral. Universidad Nacional Autónoma de México. 71-73
 - El Maghraby G.M., Barry B.W., Williams A.C., (2008). "*Liposomes and skin: From drug delivery to model membranes*", European Journal of Pharmaceutical Sciences. 34: 203-222.
 - Escobar-Chávez J., Rodríguez I., Domínguez C., (2012). "*Chemical and Physical Enhancers for Transdermal Drug Delivery*", Pharmacology, Dr. Luca Gallelli (Ed). 397-434 InTech, DOI: 10.5772/33194. ISBN: 978-953-51-0222-9
 - Fang J., Hong C., Chiu W., Wang Y., (2001). "*Effect of liposomes and niosomes on skin permeation of enoxacin*" International Journal of Pharmaceutics. 219: 61-72
 - Gamboa E., (2005), "*Influencia del peso molecular y la solubilidad en la eficiencia de atrapamiento de tres principios activos hidrosolubles en vesículas lipídicas ultraflexibles (transfersomas)*" Tesis de licenciatura, FES Cuautitlán, UNAM. Mexico, pp. 26-39
 - García P., (2012) "*Liberación transdérmica de piroxicam empleando microagujas*" Tesis de maestría en ciencias químicas, UNAM. pp. 18, 24.
 - Gomez-Hens A., Fernandez-Romero J.M., (2006). "*Analytical methods for the control of liposomal delivery systems*", TrAC Trends in Analytical Chemistry. 25: 167-178.
 - González M. (2004). "*Los liposomas: usos y perspectivas*" Revista Cubana de Química. 16(1): 8-32.
 - Gupta P., Mishra V., Rawat A., Dubey P., Mahor., Jain S., Chatterji., Vyas S. (2005). "*Non-invasive vaccine delivery in transfersomes, niosomes and liposomes: a comparative study*". International Journal of Pharmaceutics. 293: 73-82
 - Gupta J., Gill H., Andrews S., Prausnitz M., (2011). "*Kinetics of skin resealing after insertion of microneedles in human.*" Journal Control Release. 154 (2): 148-155.
 - <http://www.idea-ag.de/web/en/about-us/index.html> Año de consulta: 2013; Institucion IDEA-AG.

- Honeywell-Nguyen P., Bouwstra, (2005). "Vesicles as a tool for transdermal and dermal delivery" Drug Discovery Today: Technologies | Drug delivery/formulation and nanotechnology. 2(1): 67-74
- Kim Y., Park J., Prausnitz M., (2012). "Microneedles for drug and vaccine delivery" Advanced Drug Delivery Reviews. 64: 1547-1568
- Kim Y., Quan F., Compans R., Kang S., Prausnitz M., (2010) "Formulation and coating of microneedles with inactivated influenza virus to improve vaccine stability and immunogenicity" Journal Control Release. 142: 187-195.
- Kumar P., Biswas K., 2012 "Microneedle: An Advanced Technology of transdermal application" International Journal of Pharmaceutical Research and Development. 4 (1): 57-66
- Lakshmana S., Shirwaikar A., Shirwaikar A., Kumar A., Jacob A.; 2008 "Diseño y evaluación de matrices de difusión controlada en parches transdérmicos de clorhidrato de Diltiazem" Ars Pharmaceutica; 49 (3): 211-227
- Lakshmi P., Prasanthi D., (2012). "Vesicles - mechanism of transdermal permeation: A Review" Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research. 5(1): 18-25.
- Lanio M., Luzardo M., Laborde R., Sánchez O., Cruz Y., Pazos F., Tejuca M., Valle A., Alonso M., Fernández L., Alvarez C. (2009). "Las vesículas liposomales: obtención, propiedades y aplicaciones potenciales en la biomedicina" Revista Cubana de Física. 26(1): 23-30
- Li Z. Peng S., Chen X., Zhu Y., Zou L., Liu W., Liu C. (2018) "Pluronic modified liposomes for curcumin encapsulation: Sustained release, stability and bioaccessibility". Food Research International 108, 246-253
- Martínez B., Della A., Nacucchino M., (2010). "Nuevos sistemas para la administración de activos a la dermis." Revista Argentina de Dermatología. 91(3): 3-5.
- Murillo M., Espuelas S., Prior S., I. Vitas A., J. Renedo M., M. Goñi M., M. Irache J., Gamazo C. (2001). "Liberación controlada de principios activos mediante el empleo de formulaciones galénicas" Revista de Medicina de la Universidad de Navarra. 45(4): 19-34
- Nava G., Piñón E., Mendoza L., Mendoza N., Quintanar D., Ganem A., (2011). "Formulation and in Vitro, ex Vivo and in Vivo Evaluation of Elastic Liposomes for Transdermal Delivery of Ketorolac Tromethamine" Pharmaceutics. 3: 954-970.
- Nounou M., El-Khordagui L., Khalafallah N., Khalil S., (2006) "In vitro release of hydrophilic and hydrophobic drugs from liposomal dispersions and gels" Acta Pharmaceutica. 56: 311-324.
- Patel R., Singh S., Singh S., Sheth N., Gendle R. (2009). "Development and Characterization of Curcumin Loaded Transfersome for Transdermal Delivery" Journal of Pharmaceutical Sciences and Research. 1(4): .1-80
- Pathan I., Setty C., (2009). "Chemical penetration enhancers for transdermal drug delivery systems" Tropical Journal of Pharmaceutical Research. 8(2): 173-179
- Pirvu C., Hlevca C., Ortan A., Prisada R. (2010). "Elastic Vesicles as Drugs Carriers Through the Skin". Farmacia. 58(2): 128-135.

- Prajapati Patel C., Patel C., (2011). "Transfersomes: A Vesicular Carrier System For Transdermal Drug Delivery" Asian Journal of Biochemical and Pharmaceutical Research. 1(2): 507-524
- Puglia C, Filosa R., Peduto A., de Caprariis P., Rizza L., Bonina F., Blasi P. (2006). "Evaluation of alternative Strategies to optimize ketorolac transdermal delivery" American Association of Pharmaceutical Scientists PharmSciTech 7 (3): 1-9.
- Qiu Y., Gao Y., Hu K., Li F., (2008). "Enhancement of skin permeation of docetaxel: A novel approach combining microneedle and elastic liposomes" Journal of Controlled Release. 129: 144-150
- Rattanapak T., Birchall J., Young K., Ishii M., Meglinski I., Rades T., Hook S. (2013). "Transcutaneous immunization using microneedles and cubosomes: Mechanistic investigations using Optical Coherence Tomography and Two-Photon Microscopy" Journal of Controlled Release. 172(3): 894-903
- Ravi K., Singh M. Bala R., Seth N., Rana A., (2012). "Transfersomes: A novel approach for transdermal drug delivery" International Research Journal of Pharmacy. 3 (1): 20-24.
- Shazly G., Nawroth T., Langguth P., (2008). "Comparison of dialysis and dispersion methods for in vitro release determination of drugs from multilamellar liposomes" Department of Pharmaceutical Technology and Biopharmaceutics, Institute of Pharmacy, Johannes Gutenberg-University Mainz, Germany 1: 7-10
- Sheo M., Shweta A., Ram D., Ghanshyam M., Girish K., Sunil P. (2010). "Transfersomes- a Novel Vesicular Carrier for Enhanced Transdermal Delivery of Stavudine: Development, Characterization and Performance Evaluation" Journal of Scientific Speculations and Research. 1(1): 30-36
- Sheo M., Shweta A., Vijay T., Ram D., Aklavya S., Ghanshyam M. (2010). "Enhanced transdermal delivery of indinavir sulfate via transfersomes" Pharmacie Globale (IJCP), 1(1): 1-7.
- Simard, P., Leroux, J.C., Allen, C., Meyer, O. (2007). "Liposomes for drug delivery. En Nanoparticles for Pharmaceutical Applications". Domb AJ, Tabata Y, Ravi Kumar MNV (eds). American Scientific Publishers, Stevenson Ranch California, 1-62.
- Sinha V., Kaur M., (2000). "Permeation Enhancers for Transdermal Drug Delivery". Drug Development and Industrial Pharmacy. 26(11): 1131-1140
- Stahl J., Wohlert M., Kietzmann M., (2012). "Microneedle pretreatment enhances the percutaneous permeation of hydrophilic compounds with high melting points" BMC Pharmacology and Toxicology, 13: 1-7
- Sullivan S., Murthy N., Prausnitz M., (2008). "Minimally invasive protein delivery with rapidly dissolving polymer microneedles" Advanced Materials 20: 933-938.
- Trommer H., Neubert R., (2006). "Overcoming the Stratum Corneum: The Modulation of Skin Penetration" Skin Pharmacology and Physiology. 19: 106-121

- Uchino T., Lefeber F., Gooris G., Bouwstra J., (2011). "*Psicochemical characterization of drug-loaded rigid and elastic vesicles*" International Journal of Pharmaceutics. 412: 142–147.
- Villarino N. (2006). "*Administración transdérmica de fármacos: Una alternativa terapéutica*" Analecta Veterinaria.26 (1): 28-37.
- Villasmil S., (2011). "*Pasaje transdérmico*" Cuaderno FIRP S370A. Módulo de enseñanza en fenómenos interfaciales. Universidad de los Andes. Venezuela. Version 1. pp.1-7,
- Vinod K, Suneel M., Anbazhagan S., Sandhya S., Saikumar P., Rohit R.T., Banji D., (2012). "*Critical issues related to transfersomes– novel vesicular system*". Acta scientiarum polonorum. Technologia Alimentaria 1(11): 67-82.
- Walve J., Bakliwal S., Rane B., Pawar S., (2011). "*Transfersomes: a surrogated carrier for transdermal drug delivery system*" International Journal of Applied Biology and Pharmaceutical Technology. 2 (1): 204-213.
- Wilke N., Hibert C., O´Brien J., Morrisey A., (2005). "*Silicon microneedle electrode array with temperature monitoring for electroporation.*" Sensors and Actuators A: Physical, vol. Volumes 123-124, p. 319-325
- Yang T., Cui F., Choi M., Cho J., Chung S., Shim C., Kim., (2007). "*Enhanced solubility and stability of PEGylated liposomal paclitaxel: In vitro and in vivo evaluation*" International Journal of Pharmaceutics. 338: 317–326
- Zavaleta M., Rosete A., Jiménez N., Zavala-García C. (2007). "*Ketorolaco*" Medigraphic Vol. 4 (1): 14-20.

ANEXOS

Anexo 1. Tamaño de vesícula

A continuación, se muestran los resultados obtenidos en la prueba de tamaño de vesícula, realizada a tres lotes de LE con KT.

Tabla 5. Datos del Tamaño de los liposomas elásticos de tres lotes diferentes.

| Muestra | Tamaño (nm) | Desviación Estándar | Índice de polidispersión |
|-----------------------|--------------------|----------------------------|---------------------------------|
| L1 | 81.4 | 32.2 | 0.415 |
| L1 | 82.4 | 32.2 | 0.394 |
| L1 | 82.3 | 31.9 | 0.374 |
| L2 | 88.4 | 34.3 | 0.379 |
| L2 | 89.1 | 34.9 | 0.397 |
| L2 | 89.8 | 35 | 0.388 |
| L3 | 82.8 | 32.5 | 0.402 |
| L3 | 82.7 | 32.8 | 0.424 |
| L3 | 85.5 | 32.4 | 0.336 |
| Desv. Estandar | 3.330 | 1.238 | 0.0257 |
| <i>Media</i> | 84.876 | 33.113 | 0.389 |

Anexo 2. Potencial Z.

A continuación, se muestran los resultados obtenidos en la prueba de potencial Z, realizada a tres lotes de LE con KT.

Tabla 6. Valores de Potencial Z en tres lotes diferentes.

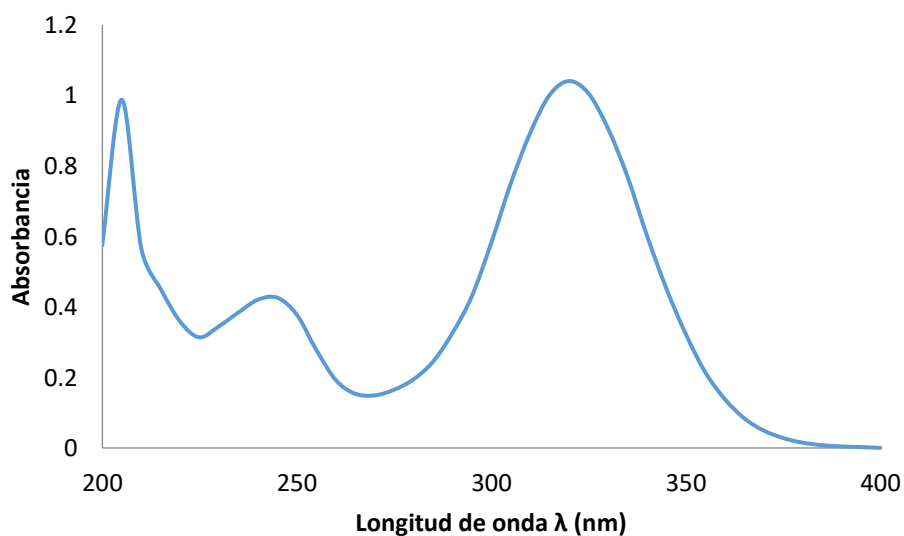
| <i>Potencial Z</i> | |
|----------------------------|---------------------|
| <i>Muestra</i> | potencial Z (mV) |
| <i>L1</i> | -18.3 |
| <i>L1</i> | -18.1 |
| <i>L1</i> | -17.4 |
| <i>L2</i> | -16.2 |
| <i>L2</i> | -19.5 |
| <i>L2</i> | -14.2 |
| <i>L3</i> | -15.9 |
| <i>L3</i> | -17.3 |
| <i>L3</i> | -17.2 |
| <i>Media</i> | -16.99 |
| <i>Desviación Estándar</i> | 1.54 |

Anexo 3. Eficiencia de encapsulamiento

Método analítico para la determinación de la eficiencia de encapsulamiento

Se desarrolló un método espectrofotométrico para evaluar la eficiencia de encapsulamiento de KT en LE, empleando como medio etanol.

Al realizar un barrido de 200-400 nm, utilizando como blanco etanol (Gráfica 6), se observa que el KT en etanol presenta dos máximos de absorbanza, eligiéndose la de 319.9 nm para desarrollar el método analítico.



Gráfica 6. Espectro de absorción de KT en etanol.

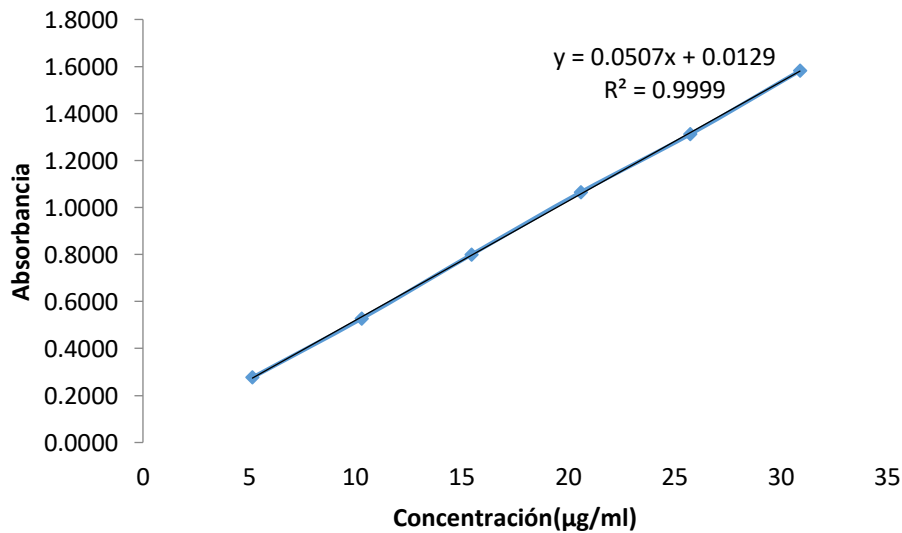
Los datos (Tabla 7) y la curva de calibración utilizada para cuantificar el fármaco incluido en los LE se muestra en la Gráfica 7. La Tabla 8 muestra los parámetros evaluados a la curva de calibración. Como puede verse, la curva muestra un coeficiente de determinación superior a 0.99 por lo que podemos decir que la curva es lineal; se determinó un coeficiente de variación de 1.90%, el cual es menor al 2% requerido.

Tabla 7. Datos de curva de calibración de KT en etanol, para la prueba de cuantificación de % eficiencia de encapsulamiento.

| C ($\mu\text{g/ml}$) | Abs | Abs/C |
|---------------------------|--------|---------|
| 5.15 | 0.2742 | 0.05324 |
| 5.15 | 0.2779 | 0.05396 |
| 5.15 | 0.2786 | 0.05410 |
| 10.3 | 0.5288 | 0.05134 |
| 10.3 | 0.5273 | 0.05119 |
| 10.3 | 0.5272 | 0.05118 |
| 15.45 | 0.7916 | 0.05124 |
| 15.45 | 0.8056 | 0.05214 |
| 15.45 | 0.8012 | 0.05186 |
| 20.6 | 1.0827 | 0.05256 |
| 20.6 | 1.0733 | 0.05210 |
| 20.6 | 1.0807 | 0.05246 |
| 25.75 | 1.3121 | 0.05096 |
| 25.75 | 1.3123 | 0.05096 |
| 25.75 | 1.3115 | 0.05093 |
| 30.9 | 1.5922 | 0.05153 |
| 30.9 | 1.5933 | 0.05156 |
| 30.9 | 1.5899 | 0.05145 |

Tabla 8. Parámetros de la curva de KT en etanol.

| Parámetros | |
|---------------------|---------|
| Media | 0.05192 |
| Desviación estándar | 0.00098 |
| C.V. | 1.90506 |
| r^2 | 0.9995 |



Gráfica 7. Curva de calibración de ketorolaco trometamina en etanol

Reproducibilidad y Repetibilidad

Se realizaron determinaciones en dos días de tres concentraciones de KT en etanol por sextuplicado (Tabla 9) determinando un C.V. menor al 2%, y realizando una prueba de t obteniendo un valor de t calculado menor al valor de t de tablas, no habiendo diferencia significativa, por lo que el método es reproducible y repetible.

Tabla 9. Datos de reproducibilidad y repetibilidad del método de cuantificación del % de encapsulamiento.

| <i>Día 1</i> | | | |
|-------------------|--|---------------|---------------|
| <i>Repetición</i> | Concentración($\mu\text{g}/\text{mL}$) | | |
| | 5 | 20 | 30 |
| 1 | 0.2731 | 1.0848 | 1.6209 |
| 2 | 0.2689 | 1.0847 | 1.6103 |
| 3 | 0.2751 | 1.0843 | 1.6167 |
| 4 | 0.2708 | 1.0869 | 1.6123 |
| 5 | 0.2693 | 1.0862 | 1.6199 |
| 6 | 0.2684 | 1.0854 | 1.6139 |
| <i>Media</i> | 0.2709 | 1.0854 | 1.6157 |
| <i>SD</i> | 0.0027 | 0.0010 | 0.0042 |
| CV | 0.9807 | 0.0917 | 0.2621 |
| <i>Día 2</i> | | | |
| <i>Repetición</i> | Concentración($\mu\text{g}/\text{mL}$) | | |
| | 5 | 20 | 30 |
| 1 | 0.2732 | 1.0895 | 1.6199 |
| 2 | 0.2741 | 1.0842 | 1.6163 |
| 3 | 0.2766 | 1.0856 | 1.6116 |
| 4 | 0.2728 | 1.0876 | 1.6109 |
| 5 | 0.2719 | 1.0892 | 1.6112 |
| 6 | 0.2718 | 1.0902 | 1.6147 |
| <i>Media</i> | 0.2734 | 1.0877 | 1.6141 |
| <i>SD</i> | 0.0018 | 0.0024 | 0.0036 |
| CV | 0.6531 | 0.2191 | 0.2212 |

En la tabla anterior se observa que todos cumplen $CV \leq 2\%$, entonces se puede decir que el método es reproducible y repetible.

Exactitud

Para determinar exactitud se prepararon tres concentraciones diferentes de la curva y se realizaron por sextuplicado, se determinó la concentración real interpolando en los datos de la curva de calibración correspondiente y se calculó el porcentaje respecto a la concentración teórica, posteriormente se midió el CV, se observa en la tabla 10 que se obtuvo un CV menor al 2%, lo cual quiere decir que se comprobó exactitud en el método.

Tabla 10. Datos para el parámetro de exactitud para el método de eficiencia de encapsulamiento.

| <i>Repetición</i> | <i>%Recuperado</i> | | |
|-------------------|--------------------|---------------|---------------|
| | 5µg/mL | 20µg/mL | 30µg/mL |
| 1 | 99.79 | 102.06 | 101.99 |
| 2 | 98.19 | 102.05 | 101.32 |
| 3 | 100.55 | 102.01 | 101.72 |
| 4 | 98.91 | 102.26 | 101.44 |
| 5 | 98.34 | 102.19 | 101.93 |
| 6 | 98.00 | 102.11 | 101.55 |
| <i>Media</i> | 98.9577 | 102.1111 | 101.6575 |
| <i>SD</i> | 1.0096 | 0.0945 | 0.2681 |
| CV | 1.0202 | 0.0926 | 0.2638 |

Resultados de la prueba de permeación con piel pre-tratada con microagujas

Tabla 11. Datos obtenidos en la prueba de permeación en piel tratada con microagujas.

| <i>Muestra</i> | <i>Absorbancia</i> | <i>Concentración. (µg/ml)</i> | <i>µg en 10ml Etanol</i> | <i>µg totales muestra</i> | <i>% encapsulado</i> |
|----------------|--------------------|-------------------------------|--------------------------|---------------------------|----------------------|
| <i>Lote 1</i> | 0.5891 | 11.365 | 113.649 | 203.3 | 55.90 |
| <i>Lote 1</i> | 0.5856 | 11.296 | 112.959 | 203.3 | 55.56 |
| <i>Lote 1</i> | 0.5458 | 10.511 | 105.108 | 203.3 | 51.70 |
| <i>Lote 2</i> | 0.5834 | 11.252 | 112.525 | 200 | 56.26 |
| <i>Lote 2</i> | 0.6235 | 12.043 | 120.434 | 200 | 60.22 |
| <i>Lote 2</i> | 0.6244 | 12.061 | 120.611 | 200 | 60.31 |
| <i>Lote 3</i> | 0.5485 | 10.564 | 105.641 | 200 | 52.82 |
| <i>Lote 3</i> | 0.5154 | 9.911 | 99.112 | 200 | 49.56 |
| <i>Lote 3</i> | 0.5434 | 10.464 | 104.635 | 200 | 52.32 |
| | | | | media | 54.849 |
| | | | | desv. Std | 3.717 |

Anexo 4. Prueba elasticidad

A continuación, se muestran los resultados obtenidos en la prueba de elasticidad realizada a tres lotes de LE con KT.

Tabla 12. Datos de tamaño de vesícula para la prueba de elasticidad.

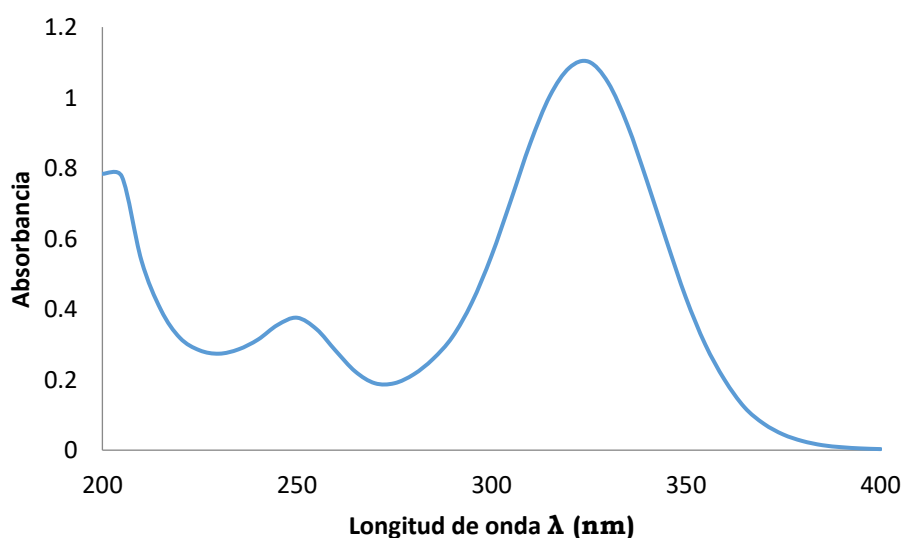
| <i>muestra</i> | <i>tamaño</i> | <i>Desviación estándar</i> | <i>Índice de polidispersión</i> |
|---------------------------------------|---------------|--------------------------------|-------------------------------------|
| <i>Lote 1</i> | 72.3 | 31.4 | 0.761 |
| <i>Lote 1</i> | 73.2 | 28.7 | 0.4 |
| <i>Lote 1</i> | 73.1 | 31.7 | 0.754 |
| <i>Lote 2</i> | 73.6 | 32.8 | 0.564 |
| <i>Lote 2</i> | 77.5 | 28.3 | 0.286 |
| <i>Lote 2</i> | 77 | 18.2 | 0.072 |
| <i>Lote 3</i> | 70.3 | 30.6 | 0.704 |
| <i>Lote 3</i> | 72 | 29.5 | 0.509 |
| <i>Lote 3</i> | 75.6 | 35.5 | 0.884 |
| <i>Desviación estándar</i> | 2.3922 | 2.3922 | 4.8238 |
| <i>Media</i> | 73.8101 | 29.2069 | 0.4555 |

Anexo 5. Liberación “*in vitro*” del KT formulado en LE

Método analítico para evaluar la liberación “*in vitro*” del KT formulado en LE

Para evaluar la liberación del KT a partir de los liposomas se desarrolló un método espectrofotométrico empleando como disolvente el medio que se utilizó en dicha prueba el cual es solución amortiguadora de fosfatos pH 7.4.

El espectro de absorción obtenido de una solución de KT en la solución amortiguadora presenta dos máximos de absorbancia (Gráfica 8), eligiéndose para desarrollar el método la longitud de onda de 325 nm.



Gráfica 8. Espectro de absorción de KT en solución amortiguadora de fosfatos pH 7.4.

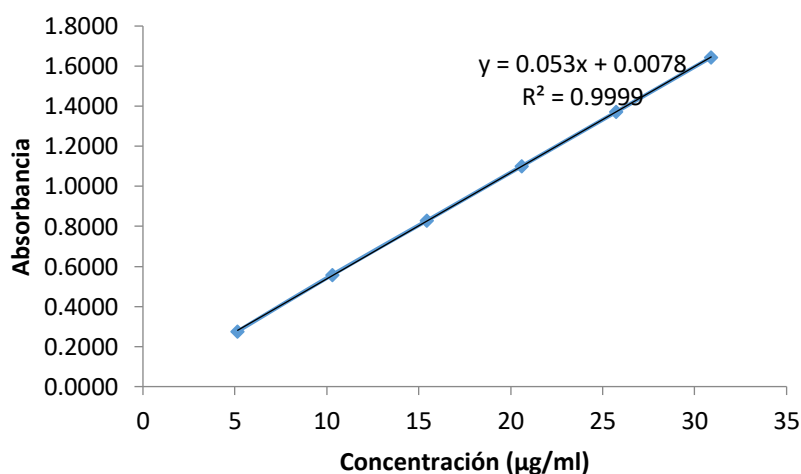
Los datos y la curva de calibración utilizada para la cuantificación del fármaco liberado se muestran en la gráfica 9 y en la tabla 13. Los parámetros evaluados de la curva se muestran en la tabla 14. Como puede verse, esta curva presenta un coeficiente de determinación de 0.9999, y esto nos dice que es lineal, se determinó un coeficiente de variación de 1.16%, el cual es menor al 2%.

Tabla 13. Datos de curva de calibración de KT en solución amortiguadora de fosfatos pH 7.4, para la prueba "in vitro" de liberación de KT en TFS.

| C (µg/ml) | Abs | A/C |
|----------------------------|------------|------------|
| 5.15 | 0.2819 | 0.05474 |
| 5.15 | 0.2845 | 0.05524 |
| 5.15 | 0.2804 | 0.05445 |
| 10.3 | 0.557 | 0.05408 |
| 10.3 | 0.5559 | 0.05397 |
| 10.3 | 0.5629 | 0.05465 |
| 15.45 | 0.8256 | 0.05344 |
| 15.45 | 0.8278 | 0.05358 |
| 15.45 | 0.8334 | 0.05394 |
| 20.6 | 1.1005 | 0.05342 |
| 20.6 | 1.1004 | 0.05342 |
| 20.6 | 1.1009 | 0.05344 |
| 25.75 | 1.3736 | 0.05334 |
| 25.75 | 1.3706 | 0.05323 |
| 25.75 | 1.3718 | 0.05327 |
| 30.9 | 1.6413 | 0.05312 |
| 30.9 | 1.6434 | 0.05318 |
| 30.9 | 1.6473 | 0.05331 |

Tabla 14. Parámetros de la curva de KT en solución amortiguadora de fosfatos pH 7.4

| <i>Parámetros</i> | |
|----------------------------|---------|
| <i>Media</i> | 0.05376 |
| <i>Desviación estándar</i> | 0.00062 |
| <i>C.V.</i> | 1.16826 |
| <i>r²</i> | 0.9999 |



Gráfica 9. Curva de calibración de ketorolaco trometamina en solución amortiguadora de fosfatos pH 7.4.

Reproducibilidad y repetibilidad.

Se analizaron en dos días tres concentraciones por sextuplicado determinando un C.V. menor al 2%, por lo que el método es reproducible y repetible (Tabla 15).

Como se expresa la precisión bajo las mismas condiciones de operación durante un intervalo de tiempo, el método se considera repetible.

Tabla 15. Datos para reproducibilidad y repetibilidad del método de liberaciones de KT en LE.

| <i>Día 1</i> | | | |
|-------------------|------------------------------------|---------------|---------------|
| <i>Repetición</i> | Concentración $\mu\text{g/mL}$ | | |
| | 5 | 20 | 30 |
| 1 | 0.2801 | 1.1055 | 1.6454 |
| 2 | 0.2826 | 1.1033 | 1.6446 |
| 3 | 0.2808 | 1.1012 | 1.6455 |
| 4 | 0.2805 | 1.1010 | 1.6440 |
| 5 | 0.2850 | 1.1019 | 1.6492 |
| 6 | 0.2832 | 1.1021 | 1.6501 |
| <i>Media</i> | 0.2820 | 1.1025 | 1.6465 |
| <i>SD</i> | 0.0019 | 0.0017 | 0.0025 |
| CV | 0.6745 | 0.1523 | 0.1544 |
| <i>Día 2</i> | | | |
| <i>Repetición</i> | Concentración ($\mu\text{g/mL}$) | | |
| | 5 | 20 | 30 |
| 1 | 0.2807 | 1.0985 | 1.6416 |
| 2 | 0.2801 | 1.1017 | 1.6502 |
| 3 | 0.2782 | 1.0996 | 1.6507 |
| 4 | 0.2798 | 1.1011 | 1.6448 |
| 5 | 0.2826 | 1.0980 | 1.6507 |
| 6 | 0.2808 | 1.1031 | 1.6488 |
| <i>Media</i> | 0.2804 | 1.1003 | 1.6478 |
| <i>SD</i> | 0.0014 | 0.0020 | 0.0038 |
| CV | 0.5138 | 0.1793 | 0.2287 |

Exactitud

Se prepararon tres concentraciones diferentes de la curva y se realizaron por sextuplicado, se determinó la concentración real interpolando en los datos de la curva de calibración correspondiente y se calculó el % respecto a la concentración teórica, posteriormente se midió el CV, se observa en la tabla que se obtuvo un CV menor al 2%, lo cual quiere decir que se comprobó exactitud en el método (Tabla 16).

Tabla 16. Exactitud para el método de cuantificación de liberaciones de KT en LE.

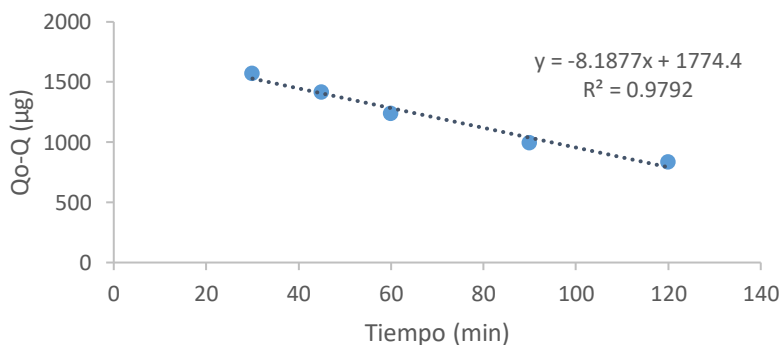
| Repetición | %Recuperado | | |
|------------|-------------|-------------|-------------|
| | 5µg/ml | 20µg/ml | 30µg/ml |
| 1 | 98.48 | 100.51 | 100.10 |
| 2 | 99.40 | 100.31 | 100.05 |
| 3 | 98.74 | 100.11 | 100.10 |
| 4 | 98.63 | 100.09 | 100.01 |
| 5 | 100.29 | 100.18 | 100.33 |
| 6 | 99.62 | 100.19 | 100.38 |
| Media | 99.19 | 100.23 | 100.16 |
| SD | 0.70 | 0.15 | 0.16 |
| CV | 0.71 | 0.15 | 0.16 |

Resultados de la prueba de liberación in vitro del KT a partir de los liposomas elásticos

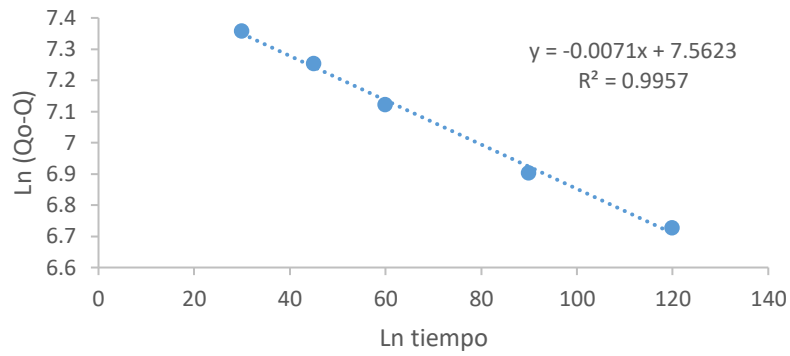
Tabla 17. Datos obtenidos de la prueba de liberación de KT en LE.

| Tiempo (min) | % liberados de KT | | | | | Media |
|--------------|-------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|--------|
| | % celda 1 | % celda 2 | % celda 3 | % celda 4 | % celda 5 | |
| 30 | 19.143 | 21.059 | 23.272 | 21.072 | 23.247 | 21.502 |
| 45 | 27.788 | 28.300 | 31.095 | 28.751 | 31.152 | 29.383 |
| 60 | 36.224 | 36.962 | 39.747 | 37.428 | 40.240 | 38.087 |
| 90 | 48.716 | 47.427 | 52.203 | 49.765 | 53.282 | 50.232 |
| 120 | 56.618 | 52.466 | 61.868 | 58.382 | 61.943 | 58.145 |
| 150 | 62.385 | 58.221 | 69.757 | 66.011 | 68.948 | 64.920 |
| 180 | 66.372 | 60.349 | 74.402 | 70.751 | 73.117 | 68.801 |
| 210 | 70.698 | 61.978 | 78.494 | 75.762 | 76.704 | 72.469 |
| 240 | 70.382 | 62.822 | 80.193 | 78.218 | 78.049 | 73.634 |
| 300 | 71.377 | 63.814 | 81.724 | 80.503 | 79.170 | 74.996 |
| 360 | 71.716 | 64.054 | 82.457 | 81.620 | 79.946 | 75.613 |

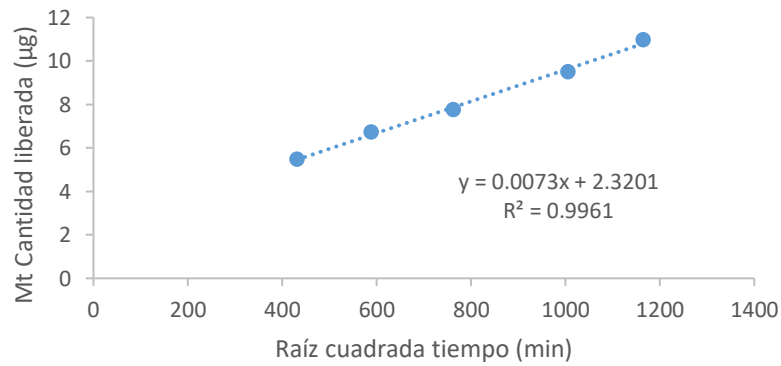
Modelos cinéticos para conocer el tipo de difusión.



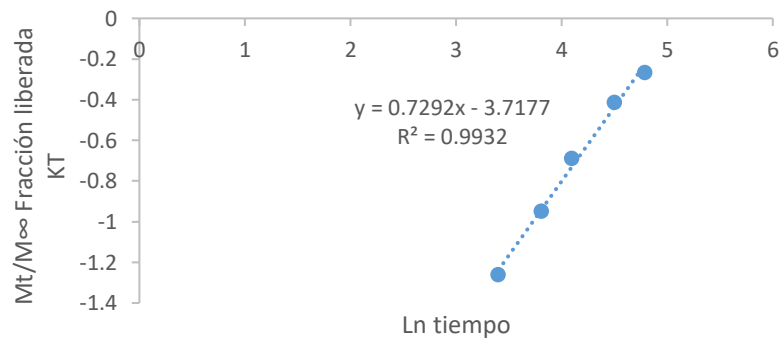
Gráfica 10. Modelo matemático de orden cero.



Gráfica 11. Modelo matemático de Primer orden.



Gráfica 12. Modelo matemático Higuchi.



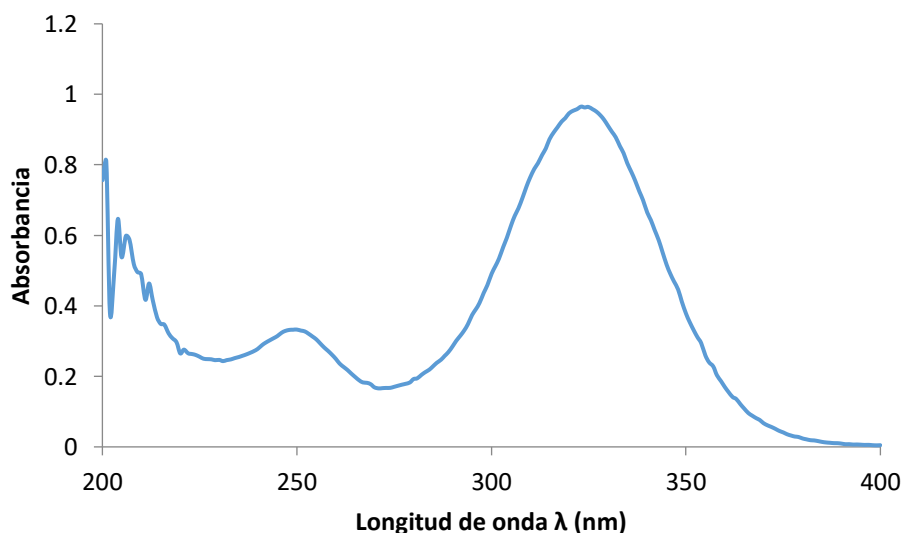
Gráfica 13. Modelo matemático Korsmeyer-Peppas

Anexo 6. Permeación de KT en LE a través de la piel tratada con microagujas

Método analítico para evaluar la cantidad de KT permeado a través de la piel

El medio receptor empleado para las permeaciones fue una solución amortiguadora de fosfatos pH 7.4 a 37°C. Para preparar el medio para este método analítico lo que se hizo fue poner piel de oreja de cerdo en contacto con la solución amortiguadora a 37°C con agitación constante durante una hora, posteriormente esta solución se filtró y se utilizó para desarrollar el método.

En el espectro de absorción (Gráfica 14), se puede observar que la λ_{\max} para el KT en solución amortiguadora de fosfatos pH 7.4 en contacto con piel fue de 324 nm. A esta longitud de onda se leyeron las soluciones de la curva de calibración utilizada para cuantificar el KT permeado (Gráfica 15).



Gráfica 14. Espectro de absorción de KT en una solución amortiguadora de fosfatos pH 7.4 en contacto con piel.

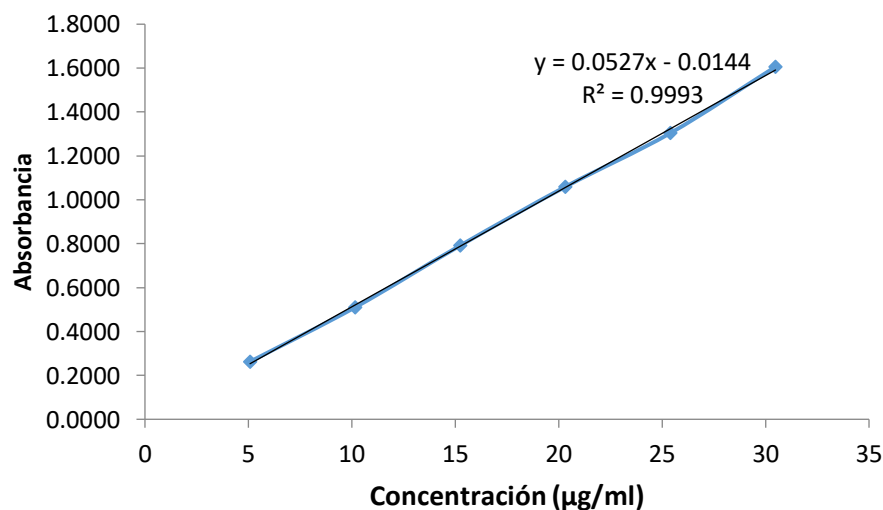
En la Tabla 18 se muestran los datos obtenidos para construir la curva de calibración y en la gráfica 15 se muestra la curva obtenida. En la tabla 19 se muestran los parámetros evaluados a dicha curva, se puede observar que la curva es lineal con un coeficiente de determinación de 0.9993 y un coeficiente de variación de 1.56%, el cual es menor al 15% requerido para métodos biológicos.

Tabla 18. Datos de curva de calibración de KT en solución amortiguadora de fosfatos pH 7.4 en contacto con piel.

| Concentración ($\mu\text{g/ml}$) | Abs | A/C |
|---------------------------------------|--------|---------|
| 5.08 | 0.2638 | 0.05193 |
| 5.08 | 0.2614 | 0.05146 |
| 5.08 | 0.2625 | 0.05167 |
| 10.16 | 0.5102 | 0.05022 |
| 10.16 | 0.5106 | 0.05026 |
| 10.16 | 0.5096 | 0.05016 |
| 15.24 | 0.7958 | 0.05222 |
| 15.24 | 0.7918 | 0.05196 |
| 15.24 | 0.7872 | 0.05165 |
| 20.32 | 1.0589 | 0.05211 |
| 20.32 | 1.0549 | 0.05191 |
| 20.32 | 1.0635 | 0.05234 |
| 25.4 | 1.3063 | 0.05143 |
| 25.4 | 1.303 | 0.05130 |
| 25.4 | 1.3027 | 0.05129 |
| 30.48 | 1.6023 | 0.05257 |
| 30.48 | 1.6028 | 0.05259 |
| 30.48 | 1.6125 | 0.05290 |

Tabla 19. Parámetros de la curva de calibración de KT en buffer de fosfatos pH 7.4 en contacto con piel.

| <i>Parámetros</i> | |
|----------------------------|---------|
| <i>Media</i> | 0.05165 |
| <i>Desviación estándar</i> | 0.00080 |
| <i>C.V.</i> | 1.56445 |
| <i>r²</i> | 0.9993 |



Gráfica 15. Curva de calibración de ketorolaco trometamina en solución amortiguadora de fosfatos pH 7.4 en contacto con piel.

Podemos observar que el coeficiente de variación no pasa el 15% requerido para pruebas con matriz biológica (Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation(U.S DEpartment of Health Human Service, Food and Drug Administration, 2001).

Reproducibilidad y repetibilidad.

Se analizaron en dos distintos días tres concentraciones de KT en solución amortiguadora de fosfatos pH 7.4 en contacto con piel, por sextuplicado determinando un C.V. menor al 15%, por lo que el método es reproducible y repetible (Tabla 20).

Como se expresa la precisión bajo las mismas condiciones de operación durante un intervalo de tiempo, el método se considera repetible.

Tabla 20. Reproducibilidad y repetibilidad del método de cuantificación.

| <i>Día 1</i> | | | |
|-------------------|--|---------------|---------------|
| <i>Repetición</i> | Concentración($\mu\text{g}/\text{mL}$) | | |
| | 5 | 20 | 30 |
| 1 | 0.2583 | 1.0668 | 1.5893 |
| 2 | 0.2646 | 1.0611 | 1.5966 |
| 3 | 0.2698 | 1.0612 | 1.5999 |
| 4 | 0.2691 | 1.0634 | 1.6036 |
| 5 | 0.2655 | 1.0638 | 1.613 |
| 6 | 0.2599 | 1.0642 | 1.5905 |
| <i>Media</i> | 0.2645 | 1.0634 | 1.5988 |
| <i>SD</i> | 0.0047 | 0.0021 | 0.0088 |
| CV | 1.7721 | 0.1994 | 0.5523 |
| <i>Día 2</i> | | | |
| <i>Repetición</i> | Concentración($\mu\text{g}/\text{mL}$) | | |
| | 5 | 20 | 30 |
| 1 | 0.2623 | 1.0698 | 1.6123 |
| 2 | 0.2655 | 1.068 | 1.6028 |
| 3 | 0.268 | 1.0685 | 1.6132 |
| 4 | 0.2652 | 1.0568 | 1.6027 |
| 5 | 0.2654 | 1.0654 | 1.6061 |
| 6 | 0.2684 | 1.0605 | 1.6011 |
| <i>Media</i> | 0.2658 | 1.0648 | 1.6064 |
| <i>SD</i> | 0.0022 | 0.0051 | 0.0052 |
| CV | 0.8322 | 0.4821 | 0.3245 |

Se observa que todos cumplen $CV \leq 15\%$, entonces se puede decir que el método es reproducible y repetible.

Exactitud

Se prepararon tres concentraciones diferentes de la curva y se realizaron por sextuplicado, se determinó la concentración real interpolando en los datos de la curva de calibración correspondiente y se calculó el % respecto a la concentración teórica, posteriormente se midió el CV, se observa en la tabla 21

que se obtuvo un CV menor al 15%, lo cual quiere decir que se comprobó exactitud en el método.

Tabla 21. Exactitud del método.

| <i>Repetición</i> | <i>%Recuperado</i> | | |
|-------------------|--------------------|-------------|-------------|
| | 5µg/ml | 20µg/ml | 30µg/ml |
| 1 | 101.86 | 100.97 | 99.84 |
| 2 | 104.21 | 100.43 | 100.29 |
| 3 | 106.16 | 100.44 | 100.50 |
| 4 | 105.90 | 100.65 | 100.73 |
| 5 | 104.55 | 100.69 | 101.31 |
| 6 | 102.46 | 100.72 | 99.91 |
| <i>Media</i> | 104.18 | 100.65 | 100.43 |
| <i>SD</i> | 1.75 | 0.20 | 0.55 |
| CV | 1.68 | 0.20 | 0.55 |

Resultados de la prueba de permeación de KT incluido en LE en piel pre-tratada con microagujas (500 µm)

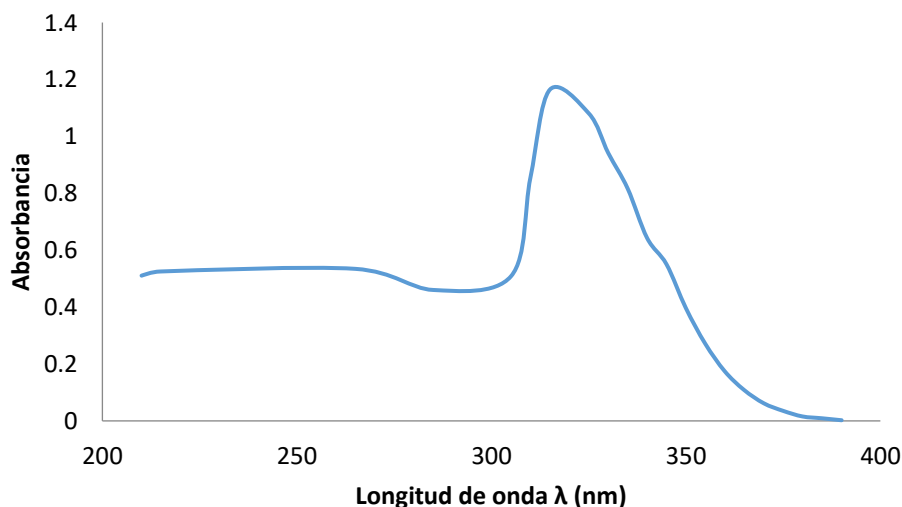
Tabla 22. Datos obtenidos para la prueba de permeación de KT en LE en piel tratada con microagujas.

| <i>Tiempo (horas)</i> | <i>Muestra 1 (µg/cm²)</i> | <i>Muestra 2 (µg/cm²)</i> | <i>Muestra 3 (µg/cm²)</i> | <i>Muestra 4 (µg/cm²)</i> | <i>Q(µg/cm²)</i> |
|-----------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|-----------------------------|
| 1 | 7.473 | 9.113 | 7.702 | 7.748 | 7.984 |
| 2 | 10.920 | 13.272 | 10.941 | 14.435 | 12.300 |
| 3 | 18.224 | 21.288 | 19.051 | 19.275 | 19.428 |
| 4 | 21.776 | 25.295 | 21.436 | 22.353 | 22.666 |
| 5 | 30.661 | 35.182 | 30.264 | 31.439 | 31.829 |
| 6 | 26.761 | 31.979 | 27.744 | 25.763 | 27.966 |
| 7 | 27.059 | 30.397 | 26.125 | 24.425 | 26.916 |
| 8 | 49.701 | 51.991 | 37.193 | 49.441 | 46.689 |

Anexo 7. Extracciones de KT retenido en la piel

Método analítico para evaluar la cantidad de KT retenido en la piel

Para las extracciones del fármaco retenido en la piel al final de la permeación se utilizó NaOH 0.1N, por lo que las condiciones para obtener el espectro de absorción (Gráfica 16) y la curva de calibración (Gráfica 17) fueron KT en una solución de NaOH 0.1N en contacto con piel, encontrando una λ_{\max} de 315 nm.



Gráfica 16. Espectro de absorción de KT en NaOH 0.1N, en contacto con piel.

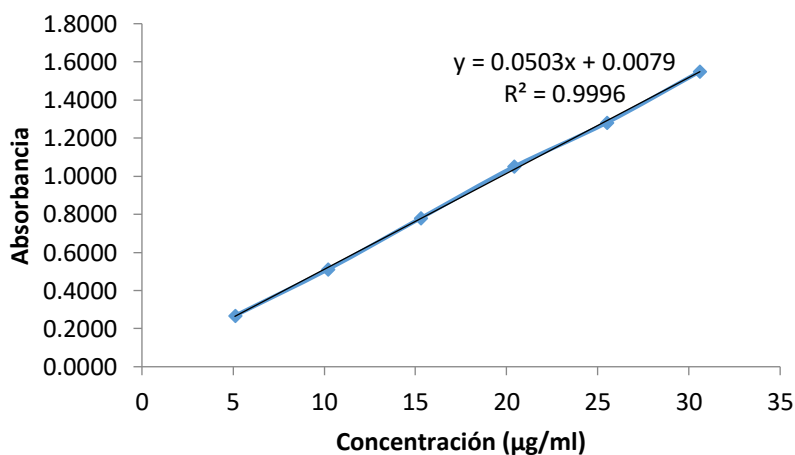
La tabla 23 muestra los datos que se obtuvieron para construir la curva de calibración (gráfica 17). La tabla 24 muestra los parámetros evaluados a la curva obtenida. Puede observarse que, la curva muestra un coeficiente de determinación de 0.9996 por lo que podemos decir que la curva es lineal; se determinó un coeficiente de variación de 2.10%, el cual es menor al 15% requerido.

Tabla 23. Datos de curva de calibración de KT en NaOH 0.1N en contacto con piel.

| Concentración (µg/ml) | Abs | A/C |
|-----------------------|--------|---------|
| 5.1 | 0.2643 | 0.05182 |
| 5.1 | 0.268 | 0.05255 |
| 5.1 | 0.2713 | 0.05320 |
| 10.2 | 0.5129 | 0.05028 |
| 10.2 | 0.5039 | 0.04940 |
| 10.2 | 0.5154 | 0.05053 |
| 15.3 | 0.7879 | 0.05150 |
| 15.3 | 0.7812 | 0.05106 |
| 15.3 | 0.7727 | 0.05050 |
| 20.4 | 1.0533 | 0.05163 |
| 20.4 | 1.0487 | 0.05141 |
| 20.4 | 1.0464 | 0.05129 |
| 25.5 | 1.2934 | 0.05072 |
| 25.5 | 1.2715 | 0.04986 |
| 25.5 | 1.2771 | 0.05008 |
| 30.6 | 1.6029 | 0.05238 |
| 30.6 | 1.5153 | 0.04952 |
| 30.6 | 1.532 | 0.05007 |

Tabla 24. Parámetros de la curva de calibración de KT en NaOH 0.1N en contacto con piel.

| Parámetros | |
|---------------------|---------|
| Media | 0.05097 |
| Desviación estándar | 0.0010 |
| C.V. | 2.1021 |
| r^2 | 0.9996 |



Gráfica 17. Curva de calibración de ketorolaco trometamina en NaOH 0.1N-piel.

Podemos observar que el coeficiente de variación no pasa el 15% requerido, entonces podemos considerar precisión del método.

Reproducibilidad y repetibilidad.

Se analizaron en dos días diferentes tres concentraciones por sextuplicado determinando un C.V. menor al 15%, por lo que el método es reproducible y repetible (Tabla 25)

Como se expresa la precisión bajo las mismas condiciones de operación durante un intervalo de tiempo, el método se considera repetible.

Tabla 25. Reproducibilidad y repetibilidad del método.

| <i>Día 1</i> | | | |
|-------------------|-----------------------------|---------------|---------------|
| <i>Repetición</i> | <i>Concentración(µg/mL)</i> | | |
| | 5 | 20 | 30 |
| 1 | 0.2583 | 1.0668 | 1.5893 |
| 2 | 0.2646 | 1.0611 | 1.5966 |
| 3 | 0.2698 | 1.0612 | 1.5999 |
| 4 | 0.2691 | 1.0634 | 1.6036 |
| 5 | 0.2655 | 1.0638 | 1.613 |
| 6 | 0.2599 | 1.0642 | 1.5905 |
| <i>Media</i> | 0.2645 | 1.0634 | 1.5988 |
| <i>SD</i> | 0.0047 | 0.0021 | 0.0088 |
| <i>CV</i> | 1.7721 | 0.1994 | 0.5523 |
| <i>Día 2</i> | | | |
| <i>Repetición</i> | <i>Concentración(µg/mL)</i> | | |
| | 5 | 20 | 30 |
| 1 | 0.2623 | 1.0698 | 1.6123 |
| 2 | 0.2655 | 1.068 | 1.6028 |
| 3 | 0.268 | 1.0685 | 1.6132 |
| 4 | 0.2652 | 1.0568 | 1.6027 |
| 5 | 0.2654 | 1.0654 | 1.6061 |
| 6 | 0.2684 | 1.0605 | 1.6011 |
| <i>Media</i> | 0.2658 | 1.0648 | 1.6064 |
| <i>SD</i> | 0.0022 | 0.0051 | 0.0052 |
| <i>CV</i> | 0.8322 | 0.4821 | 0.3245 |

Se observa que todos cumplen $CV \leq 15\%$, entonces se puede decir que el método es reproducible y repetible.

Exactitud

Se prepararon tres concentraciones diferentes de la curva y se realizaron por sextuplicado, se determinó la concentración real interpolando en los datos de la curva de calibración correspondiente y se calculó el % respecto a la concentración teórica, posteriormente se midió el CV, se observa en la tabla 26 que se obtuvo un CV menor al 15%, lo cual quiere decir que se comprobó exactitud en el método.

Tabla 26. Exactitud para el método.

| No. de veces | % Recuperado | | |
|--------------|--------------|-------------|-------------|
| | 5µg/ml | 20µg/ml | 30µg/ml |
| 1 | 97.61 | 103.19 | 102.74 |
| 2 | 100.07 | 102.64 | 103.22 |
| 3 | 102.09 | 102.65 | 103.43 |
| 4 | 101.82 | 102.86 | 103.67 |
| 5 | 100.42 | 102.90 | 104.28 |
| 6 | 98.23 | 102.94 | 102.82 |
| Media | 100.03 | 102.86 | 103.36 |
| SD | 1.83 | 0.21 | 0.57 |
| CV | 1.83 | 0.20 | 0.56 |

Resultados de la prueba de extracción del KT en piel

Tabla 27. Datos obtenidos de la prueba de extracción de KT en piel de prueba de permeación tratada con microagujas.

| Muestra | Absorbancia | interpolando | | 2.04mg/ml |
|---------|-------------|--------------|------------|------------|
| | | (µg/ml) | µg en 20ml | % extraído |
| 1 | 0.522 | 10.382 | 207.658 | 10.179 |
| 2 | 0.6179 | 12.336 | 246.721 | 12.094 |
| 3 | 0.5461 | 10.873 | 217.475 | 10.661 |
| 4 | 0.5808 | 11.580 | 231.609 | 11.353 |
| | | media | 224.913 | |
| | | | Media | 11.048 |
| | | | S.D. | 0.835 |