



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

“Administración percutánea de ácido glicirricínico incluido en microemulsiones”

INFORME DE INVESTIGACIÓN

PARA OPTAR POR EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA

Q.F.B. NORMA ANGÉLICA VILLANUEVA MARTÍNEZ



TUTOR: DRA. FLORA ADRIANA GANEM RONDERO

AÑO: 2014



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.

El presente informe corresponde a las actividades realizadas para el desarrollo del proyecto de investigación intitulado **“Administración percutánea de ácido glicirricínico incluido en microemulsiones”** de la alumna Q.F.B. Norma Angélica Villanueva Martínez durante sus estudios de posgrado dentro del Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Químicas, bajo la actividad académica denominada “Trabajo de investigación”.

Dichas actividades se realizaron en el “Laboratorio de Investigación y Posgrado en Tecnología Farmacéutica” de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán bajo la asesoría de la Dra. Flora Adriana Ganem Rondero.

El trabajo fue presentado en el XLVI Congreso Nacional y V Internacional de Ciencias Farmacéuticas en la Sección de Posters.

México, 2014

CONTENIDO

1.	Introducción.....	5
2.	Marco teórico.....	5
3.	Hipótesis.....	10
4.	Objetivos.....	10
5.	Metodología.....	11
5.1	Materiales.....	11
5.2	Desarrollo de los métodos analíticos.....	11
5.3	Preparación y caracterización de MEs de GA.....	12
5.4	Cinéticas de liberación <i>in vitro</i>	12
5.5	Cinéticas de permeación <i>in vitro</i>	12
5.6	Extracción de GA remanente en piel.....	13
6.	Resultados y discusión.....	14
6.1	Desarrollo de los métodos analíticos.....	14
6.1.1	Método 1: Cuantificación de GA liberado en los estudios <i>in vitro</i>	14
6.1.2	Método 2: Cuantificación de GA permeado en los estudios <i>in vitro</i> ..	14
6.1.3	Método 3: Cuantificación de GA retenido en piel en los estudios <i>in vitro</i>	15
6.2	Preparación y caracterización de MEs de GA.....	15
6.3	Cinéticas de liberación <i>in vitro</i>	16
6.4	Cinéticas de permeación <i>in vitro</i>	16
6.5	Extracción de GA remanente en piel.....	21
7.	Conclusiones.....	23
8.	Perspectivas.....	24
9.	Bibliografía.....	24
10.	Agradecimientos.....	25

Símbolos y abreviaturas	Significado
ANOVA	Análisis de varianza
$C_{s,m}$	Solubilidad en la membrana
$C_{s,v}$	Solubilidad en el vehículo
C_v	Concentración en el vehículo
CV	Coefficiente de variación
D_m	Coefficiente de difusión en la membrana
GA	Ácido glicirricínico
HLB	Balace hidrofílico lipofílico
HSV-1	Virus del Herpes Simple tipo 1
HSV-2	Virus del Herpes Simple tipo 2
IPM	Miristato de isopropilo
J	Flujo
K	Coefficiente de partición entre el estrato córneo y el vehículo
K_p	Coefficiente de permeabilidad
L	Longitud de la ruta de difusión
$\lambda_{m\acute{a}x}$	Longitud de onda de máxima absorción
ME	Microemulsión
o/w	Aceite en agua
PBS	Solución amortiguadora de fosfatos
R^2	Coefficiente de correlación
UV-VIS	Ultravioleta-visible
w/o	Agua en aceite

1. INTRODUCCIÓN

Las infecciones causadas por la familia Herpesviridae representan la más común de las infecciones virales de la región orofacial (Samkar y Terézhalmly, 2010).

Los virus HSV-1 y HSV-2 son los principales responsables de las infecciones herpéticas mucocutáneas. HSV-1 está asociado predominantemente con infecciones orolabiales y HSV-2 con enfermedades genitales. La mayoría de las infecciones herpéticas son transmitidas de personas infectadas a otras a través del contacto directo con la lesión o con fluidos corporales infectados (exudados vesiculares, saliva y fluidos genitales) (Samkar y Terézhalmly, 2010).

Cerca del 60 al 95% de los humanos adultos son afectados por enfermedades asociadas al HSV. Éstas son incurables y persisten durante toda la vida del hospedero comúnmente de forma latente (Fatahzadeh y Schwartz, 2007).

Actualmente, el aciclovir es el fármaco más utilizado en el tratamiento de las lesiones en boca y labios, pero su uso tópico causa generalmente quemazón e irritación de la membrana de las mucosas.

El tratamiento oral tiene la desventaja de causar efectos secundarios como náusea, diarrea, cefaleas, comezón, insuficiencia renal y nefrotoxicidad.

Además, puede ocurrir resistencia al aciclovir y a los análogos de nucleósidos relacionados, debido a una mutación en la DNA polimerasa. Por esta razón, son necesarios nuevos agentes antivirales que difieran de este mecanismo de acción (Khan et al., 2005).

Diversas investigaciones han demostrado que el ácido glicirricínico (GA) tiene efecto antiviral contra los virus HSV, uniéndose a la cinasa, inactivándola y evitando así la replicación del virus (Vick et al., 2000).

Hoy en día es primordial la búsqueda de vehículos nuevos y eficientes para la liberación de moléculas activas. Una opción viable para este propósito es cargar el fármaco en un sistema acarreador submicrónico como son las microemulsiones (Kogan y Garti, 2006).

El presente trabajo de investigación se enfoca en la formulación de GA en sistemas microemulsionados o/w y w/o, evaluando su liberación a través de la piel y comparando los resultados con los obtenidos con una solución comercial (Epigen®, ácido glicirricínico 0.1%, MEDIX) con la perspectiva de mejorar el tratamiento contra el HSV.

2. MARCO TEÓRICO

Ácido glicirricínico

Glycyrrhiza glabra es un arbusto herbáceo, perenne, perteneciente a la familia Leguminosae. La planta es endémica de países del Mediterráneo, como España, Grecia y del sur de Italia, contiene saponinas triterpénicas (3-5%), principalmente ácido glicirricínico (un derivado del ácido glicirrético) y flavonoides (1-1.5%) (Paolina et al., 2005).

El ácido glicirricínico está presente principalmente en la raíz de la planta, es una molécula que consiste en una estructura triterpénica pentacíclica (la aglicona) unida a una glicona constituida por dos moléculas de ácido glucurónico (ver Figura 1) (Cirillo et al., 2011).

Se ha observado que el GA se une a la cinasa viral inactivándola. Interfiriendo así con la replicación viral en un estadio temprano (Vick et al., 2000).

El uso terapéutico de GA se ve limitado debido a sus efectos adversos como hipertensión, irritación gastrointestinal y pseudohiperaldosteronismo, cuando se administra oralmente. La liberación transdérmica ofrece una ruta alterna para la administración del GA, que evita el paso por el intestino, lo que resulta ser una forma más segura y conveniente para su liberación (Hao et al., 2010).

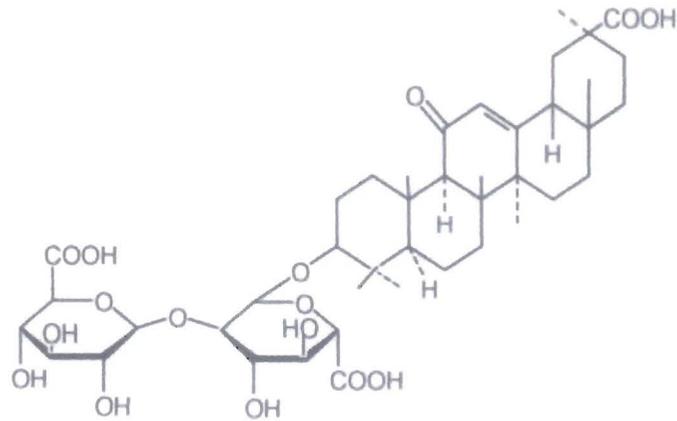


Figura 1. Estructura química del ácido glicirricínico (Sun et al., 2007).

La piel

Es el órgano más grande del cuerpo humano, se encarga de la regulación de la temperatura y del control de la pérdida de agua, además de prevenir el ingreso de microorganismos y de sustancias nocivas (Williams, 2003).

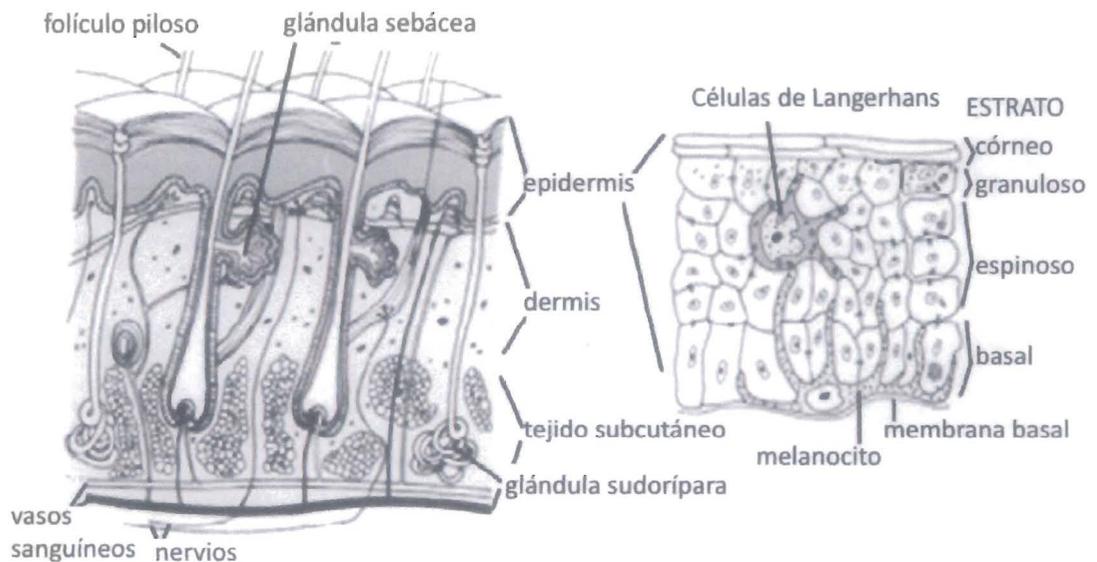


Figura 2. Estructura de la piel (Bal et al., 2010).

La piel está compuesta por cuatro capas: la hipodermis (la capa más interna), la dermis, la epidermis viable y el estrato córneo (que es la capa epidérmica más externa y no viable) (Figura 2) (Williams, 2003).

El estrato córneo es la principal defensa contra la permeación de sustancias, incluyendo fármacos a través de la piel, está constituido por células epiteliales rígidas (corneocitos) unidas por desmosomas, embebidas en una estructura lamelar altamente organizada, formada por lípidos intercelulares; como ceramidas, colesterol y ácidos grasos. El arreglo único de esta

capa produce una barrera prácticamente impermeable que reduce el paso de moléculas (Kawasaki et al., 2012).

Formas farmacéuticas de liberación transdérmica

Por décadas, para conseguir un efecto sistémico se ha buscado una ruta de liberación alternativa a la vía oral, como la transdérmica, la que eventualmente es más aceptada que las rutas convencionales: oral y parenteral. La liberación de un fármaco a través de la piel para lograr un efecto sistémico se conoce como transdérmica. La liberación transdérmica difiere de la tópica en que esta última supone un efecto local (Tapash et al., 1997).

Las formas transdérmicas tienen varias ventajas sobre las formas de dosificación orales: evitan el metabolismo de primer paso hepático y la posible degradación por efecto del pH o por acción de las enzimas presentes en el tracto gastrointestinal; se evitan los efectos del alimento que intervengan con el proceso de absorción oral; es una opción de dosificación amigable para el paciente; se puede usar en situaciones con una mínima cooperación por parte del mismo, además existe la posibilidad de una interrupción inmediata del tratamiento si es necesario (Kogan y Garti, 2006).

Rutas a través de la piel

La permeación del fármaco a través de la piel tiene varias rutas: la transcelular, la intercelular y la de los apéndices (a través de glándulas ecrinas o folículos pilosos). Debido a que los apéndices ocupan un área superficial muy pequeña, este medio de permeación es menos significativo bajo condiciones normales (Figura 3)(Kogan y Garti, 2006).

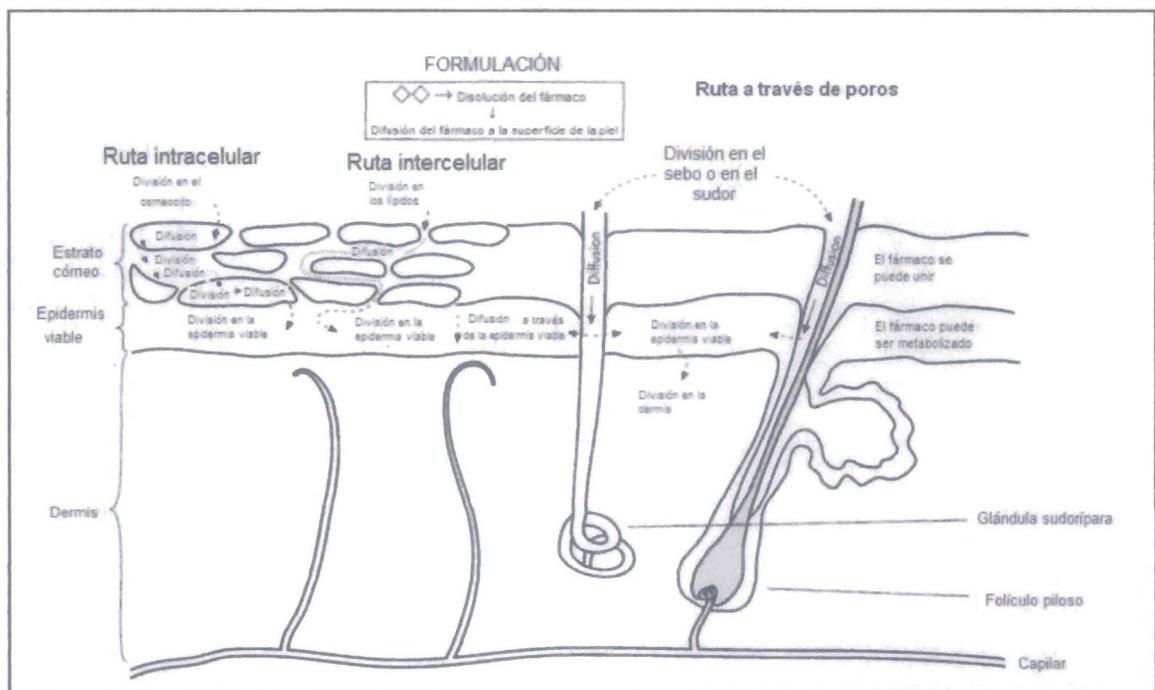


Figura 3. Rutas de transporte a través de piel (Williams, 2003)

El flujo J de un fármaco a través del estrato córneo puede ser descrito por la primera ley de Fick (Ecuación 1):

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

Ecuación 1. Primera ley de Fick

Donde D_m representa el coeficiente de difusión del fármaco en la membrana, $c_{s,m}$ es su solubilidad en la membrana, L es la longitud de la ruta de permeación a través de la membrana, c_v la concentración del fármaco disuelto en el vehículo y $c_{s,v}$ la solubilidad del fármaco en el vehículo (Moser et al., 2000).

Diseño experimental

Durante las técnicas *in vitro* para determinar la permeación de un fármaco a través de piel es difícil hacer las pruebas en piel humana, ya que su disponibilidad está a veces limitada, por lo que la piel animal se utiliza con frecuencia. El modelo animal más utilizado es el cerdo, debido a que sus propiedades bioquímicas e histológicas han mostrado ser similares a las de la piel humana. La piel de orejas de cerdo es apropiada para los estudios de permeación y da resultados comparables con los de la piel humana (Moser et al., 2000).

El grado de permeación del fármaco a través de la piel se ha medido utilizando diferentes modelos de permeación *in vitro*. Éstos incluyen la celda de difusión de Franz (Figura 4) que es un sistema de permeación a través de piel de tipo vertical. La celda está compuesta por dos compartimentos: donador y receptor. El buffer de difusión se agita continuamente por una barra magnética. La temperatura del sistema se mantiene a través de un termostato que controla la temperatura del agua que rodea el compartimento receptor (El-Kattan et al., 2000).

El uso de la celda de Franz necesita del mantenimiento de gradientes de concentración apropiados y de la solubilidad del fármaco en el buffer receptor (El-Kattan et al., 2000).

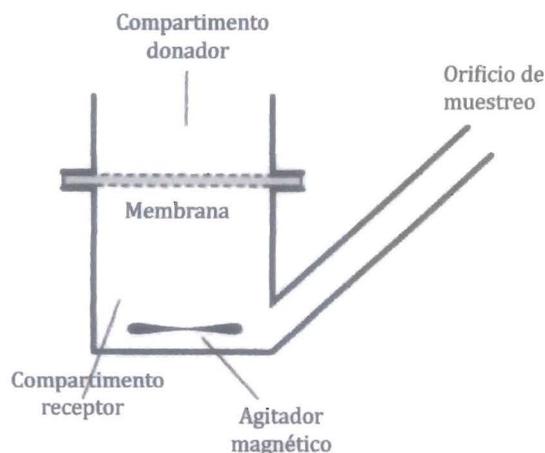


Figura 4. Celda de difusión tipo Franz (Williams, 2003).

Con este modelo y conforme a la ley de difusión de Fick, en el caso de una dosis infinita en la solución donadora (concentración del fármaco en el vehículo, c_v =constante), al graficar la cantidad de fármaco acumulado permeado contra el tiempo, se puede determinar el J al calcular la pendiente de la parte lineal (Ecuación 2) (Moser et al., 2000)

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

Ecuación 2. Primera Ley de difusión de Fick.

Donde D_m es el coeficiente de difusión del fármaco en la membrana, K es el coeficiente de partición del fármaco entre el estrato córneo y el vehículo, y L es la longitud de la ruta de difusión en la membrana. Con este enfoque es posible determinar el coeficiente de permeabilidad, K_p (Ecuación 3) (Moser et al., 2000).

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

Ecuación 3. Coeficiente de permeabilidad

Microemulsiones

Una microemulsión (ME) se define como una dispersión única, ópticamente isotrópica, compuesta de una fase oleosa, una fase acuosa, un tensoactivo y un cosurfactante (Pakpayat et al, 2009).

Dependiendo de la concentración de los componentes existen tres tipos de MEs que tienen mayor probabilidad de formarse. MEs aceite en agua (o/w), agua en aceite (w/o) y bicontinuas (Figura 5). En cada una de ellas existe una monocapa interfacial de tensoactivo que separa los dominios aceite y agua. Las MEs w/o son más probables cuando el volumen de la fase acuosa es menor, mientras que cuando existe un volumen de fase oleosa menor las MEs o/w serán las más probables. En los sistemas en los que las cantidades de agua y aceite son similares, se formará una ME bicontinua (Lawrence y Rees, 2012).

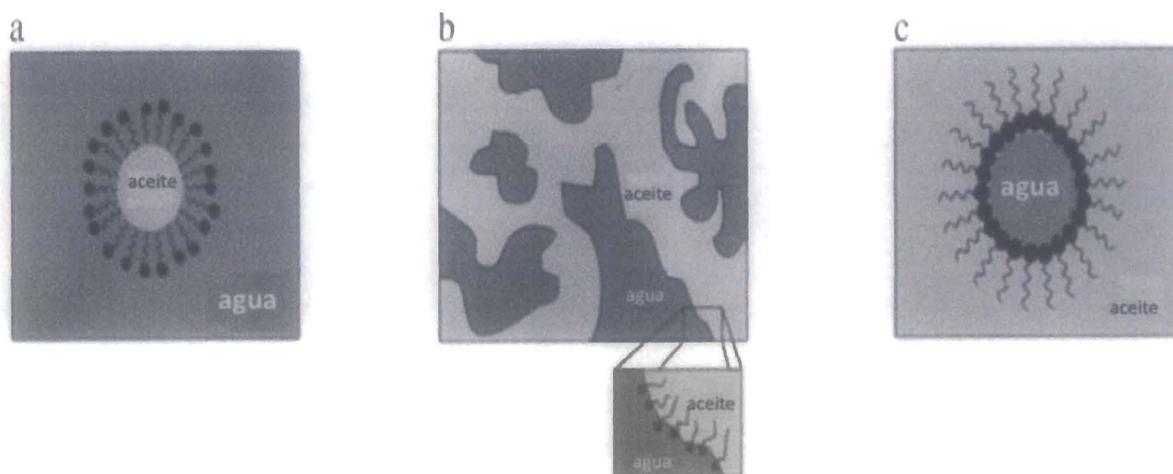


Figura 5. Representación esquemática de las microestructuras más comunes encontradas en MEs: (a) aceite en agua, (b) bicontinua (c) agua en aceite (Lawrence y Rees, 2012).

La absorción preferencial del agente de superficie permite la modificación de las propiedades de la interfase debido a su naturaleza anfifílica. La concentración de surfactante en las emulsiones es aproximadamente 0.1% en peso, mientras que en las microemulsiones su concentración es de al menos 10% debido al incremento en el área interfacial entre las fases acuosa y oleosa (Vandamme, 2002).

Se prefiere el uso de tensoactivos no iónicos ya que los iónicos son generalmente muy tóxicos. Uno de los tensoactivos más utilizados es el Polisorbato 80 (Tween® 80), el que posee un alto balance hidrofílico/lipofílico (HLB = 15) y una baja viscosidad (Vandamme, 2002).

El cosurfactante tiene tres funciones: (a) proveer una tensión interfacial muy baja requerida para la formación de la microemulsión y para su estabilidad termodinámica, (b) modificar la curvatura de la interfase por efecto de los grupos apolares en su estructura, (c) modificar la fluidez de la película interfacial (Vandamme, 2002).

Los cosurfactantes utilizados consisten en moléculas pequeñas, generalmente alcoholes de bajo peso molecular como el éter monoetílico de dietilenglicol (Transcutol®) (Figura 6), el que es reconocido como un promotor de la permeación transdérmica debido a su biocompatibilidad con la piel, a su inocuidad y a su miscibilidad en solventes polares y apolares (Godwin et al., 2002).



Figura 6. Estructura química del Transcutol (Lane, 2013).

Las fases orgánicas más utilizadas consisten en aceites vegetales y triglicéridos en los cuales el 95% de los ácidos grasos están compuestos de 8 a 10 átomos de carbono, ésteres de ácidos grasos, entre éstos se encuentra el miristato de isopropilo (Figura 7) (Vandamme, 2002).

Las microemulsiones parecen ser los vehículos líquidos ideales para la liberación de fármacos ya que ofrecen todos los requerimientos de un sistema líquido incluyendo una estabilidad termodinámica (gran vida de anaquel), una fabricación sencilla (formación casi espontánea), baja viscosidad con un comportamiento Newtoniano, una gran área superficial (gran capacidad de solubilización), y un tamaño de glóbulo muy pequeño. Los glóbulos pequeños tienen siempre una mayor oportunidad de adherirse a las membranas y de transportar moléculas bioactivas de una forma más controlada (Kogan y Garti, 2006).

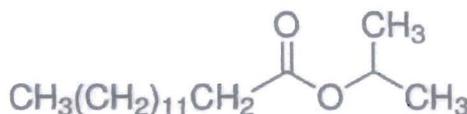


Figura 7. Estructura química del miristato de isopropilo (Lane, 2013).

3. HIPÓTESIS

La formulación de ácido glicirricínico en una microemulsión incrementará su transporte a través de piel *in vitro* en relación con una solución comercial.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo General

Evaluar la permeación transdérmica del ácido glicirricínico formulado en microemulsiones y compararla con la de una solución comercial que contiene el fármaco.

4.2 Objetivos Particulares

Preparar y caracterizar microemulsiones o/w y w/o conteniendo ácido glicirricínico.

Desarrollar métodos por espectrofotometría UV-VIS para la cuantificación de ácido glicirricínico en los estudios de permeación, liberación y extracción.

Realizar estudios de liberación *in vitro* con los sistemas preparados, a través de una membrana comercial de celulosa para diálisis

Realizar estudios de permeación con los sistemas preparados, a través de piel de cerdo *in vitro* y comparar los resultados con los obtenidos con una solución comercial.

5. METODOLOGÍA

5.1 Materiales

Reactivos

- Sal de amonio del ácido glicirricínico al 95% (Fluka Analytical, China)
- Miristato de isopropilo (Droguería Cosmopolita, S.A. de C.V., México)
- Transcutol® CG (Gattefossé, Francia)
- Tween® 80 (Merck, México)
- Fosfato monobásico de potasio (Fermont, Méxcio)
- Hidróxido de sodio QP (Fermont, México)
- Agua obtenida de un sistema MilliQ® academic (MILLIPORE®, Alemania)

Material biológico

- Piel de oreja de cerdo obtenida directamente del rastro antes de ser sometida a tratamientos con agua caliente o vapor.

5.2 Desarrollo de los métodos analíticos

Se desarrollaron 3 métodos analíticos mediante espectrofotometría UV-VIS (Espectrofotómetro UV-VIS Cary 50 Conc Varian) para cuantificar el GA liberado a través de membranas de diálisis (Método 1), el GA permeado a través de piel (Método 2) y el GA retenido en piel al final de los estudios de permeación (Método 3).

Los medios de disolución utilizados fueron:

- Método 1: PBS pH 7.4
- Método 2: PBS pH 7.4 en contacto con la cara interna de piel de cerdo. La piel se mantuvo en contacto con la solución de PBS durante 24 h con agitación constante, posteriormente se filtró por gravedad y se centrifugó (centrífuga Hettich EBA 12) a 6000 rpm durante 40 minutos.
- Método 3: PBS pH 7.4 en contacto con porciones de piel. Se colocaron trozos de piel de oreja de cerdo en PBS pH 7.4 durante 24 h con agitación constante, concluido este tiempo, el fluido se filtró por gravedad, centrifugó a 6000 rpm por 40 minutos y filtró a través de una membrana de 0.45 µm.

Las longitudes de onda de máxima absorción para el GA se determinaron en los tres diferentes medios de disolución.

Se prepararon soluciones stock con una concentración de 400 µg/mL y a partir de éstas se tomaron alícuotas para tener una gama de concentraciones adecuada. Cada curva se preparó por triplicado, presentando selectividad, linealidad y repetibilidad de acuerdo a la guía ICH, Q2 (R1) Validation of analytical Procedures: Text and methodology (ICH Harmonised Tripartite Guideline, 1994).

5.3 Preparación y caracterización de MEs de GA

Se prepararon microemulsiones aceite en agua y agua en aceite con dos distintas concentraciones de principio activo, que corresponden a la cantidad máxima de GA que puede ser incluida en el sistema (ME1 y ME2) y la equivalente a la concentración de GA en la solución comercial (ME3 y ME4). Su composición se presenta en el cuadro 1.

Cuadro 1. Formulación de las MEs preparadas con GA.

Componentes	o/w (% w/w)	w/o (% w/w)
Miristato de isopropilo (IPM)	10.00	40.00
Tween®80	41.00	41.65
Agua	34.80	9.70
Transcutol®	14.00	8.35
Ácido glicirricínico	0.8 (ME1)/0.1 (ME3)	0.8 (ME2)/0.1 (ME4)

El principio activo se disolvió en el Transcutol®, esta solución se adicionó a la fase acuosa (agua y Tween®80) y, finalmente, se adicionó la fase orgánica (miristato de isopropilo). La mezcla obtenida se agitó usando un vórtex hasta lograr una apariencia translúcida homogénea.

Las MEs obtenidas fueron caracterizadas mediante tamaño de glóbulo (Zetasizer® Malvern Systems ZEN 3600) y viscosidad (Viscosímetro Brookfield CAP 2000) a 25 °C, 50 rpm, con aguja # 1.

5.4 Cinéticas de liberación *in vitro*

Se realizaron por sextuplicado estudios *in vitro* de la cinética de liberación de GA para la ME1 y la ME2 utilizando una membrana comercial de celulosa para diálisis (SIGMA-ALDRICH MW10113). Para realizar las liberaciones, se cortaron pequeños fragmentos de la membrana de celulosa, los que fueron cerrados con hilo por un extremo, se adicionaron 0.2 g de ME y se cerraron por el otro extremo de la misma forma. Los experimentos se llevaron a cabo en vasos de precipitados de 30 mL que contenían como medio 15 mL de una solución de PBS pH 7.4, mantenida a 37 °C y agitación constante durante todo el estudio (24 h). Esto se logró utilizando un recirculador de líquidos con termostato (PolyScience) y un agitador magnético multiplaza (IKA R015 power S1). El grupo control para cada formulación consistió en una ME placebo.

La liberación se siguió durante 24 h continuas, durante las cuales se tomaron muestras (3 mL) del medio a diferentes tiempos (0.25, 0.5, 0.75, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 y 24 h), el volumen retirado fue repuesto con el mismo volumen de solución de PBS pH 7.4

Las muestras obtenidas fueron analizadas por UV-VIS a la longitud de onda de máxima absorción ($\lambda_{\max} = 260 \text{ nm}$).

5.5 Cinéticas de permeación *in vitro*

Se realizaron por sextuplicado los estudios *in vitro* de la cinética de permeación de GA en celdas de difusión tipo Franz para cada formulación (ME1, ME2, ME3, ME4, solución comercial), se utilizó como membrana piel de oreja de cerdo. La piel se limpió quitando el exceso de tejido adiposo y muscular. Esta membrana se colocó entre los compartimentos donador y receptor de la celda, con un área expuesta de 2.84 cm² (ME1 y ME2) y 0.64 cm² (ME3, ME4 y solución) y un volumen de medio receptor de 10 mL y 2 mL, respectivamente. El medio receptor consistió en una solución de PBS pH 7.4, mantenida a 37 °C y con agitación constante durante todo el estudio (24 h).

Antes de iniciar el estudio la cara interna de la piel se hidrató con el medio receptor durante 20 minutos, este medio se retiró y se colocó medio fresco. Se adicionó la cantidad de formulación de GA a evaluar: 0.2 g (ME1 y ME2), 0.1 g (ME3 y ME4) y 120 µL (solución de Epigen®, ácido

glicirricínico 0.1 %, MEDIX), en el compartimento donador, sobre la superficie de la piel. El grupo control para cada formulación fue una ME placebo y en el caso de la solución se utilizó PBS pH 7.4. Las permeaciones se realizaron en celdas de difusión verticales tipo Franz (fabricadas por el Sr. Draucin Jiménez, Taller de soplado de vidrio FES-Cuautitlán), manteniendo las celdas en un baño de agua a temperatura constante de 37 °C y agitación en el medio receptor.

La permeación se siguió durante 24 h continuas, en las cuales se tomaron muestras (3 mL para ME1 y ME2, 2 mL para ME3, ME4 y solución) del compartimento receptor a diferentes tiempos (0.25, 0.5, 0.75, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 y 24 h), el volumen fue repuesto con PBS pH 7.4.

Las muestras obtenidas fueron analizadas por UV-VIS a la longitud de onda de máxima absorción ($\lambda_{\text{max}} = 255 \text{ nm}$).

5.6 Extracción de GA remanente en piel

Después de terminar los estudios de permeación, la piel se lavó con agua destilada para eliminar el exceso de formulación, la piel se cortó en pequeños trozos y se mantuvo en agitación en una solución de PBS pH 7.4 (12 mL para ME1 y ME2, 1.5 mL para ME3, ME4 y solución) a temperatura ambiente durante 24 horas.

Al concluir las 24 horas se procedió a filtrar el fluido por gravedad para eliminar los trozos de piel, posteriormente se centrifugó a 6000 rpm durante 40 minutos para eliminar los restos de piel y finalmente se filtró por una membrana de 0.45 μm y se analizó por UV-VIS a la longitud de máxima absorción ($\lambda_{\text{max}} = 255 \text{ nm}$).

Para determinar el porcentaje (%) de recobro del método de extracción, se disolvió una cantidad conocida de GA en un solvente volátil, esta solución se aplicó sobre una membrana de piel de cerdo previamente montada en una celda de Franz. Se dejó evaporar el disolvente y se extrajo el GA utilizando PBS pH 7.4. El porcentaje de recobro fue calculado con la siguiente ecuación:

$$\% \text{recobro} = \frac{GA_{\text{extraído}}}{GA_{\text{inicial}}} * 100$$

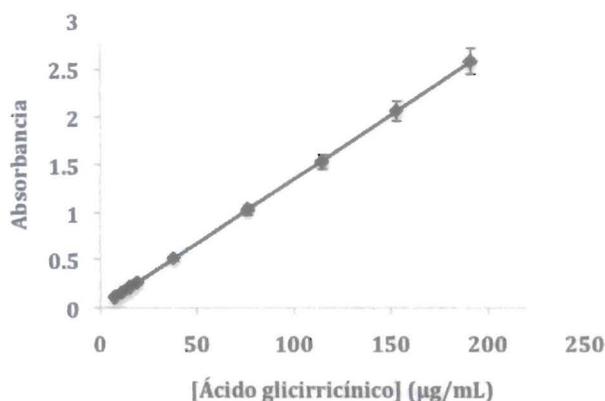
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Desarrollo de los métodos analíticos

6.1.1 Método 1: Cuantificación de GA liberado en los estudios *in vitro*

El medio de disolución consistió en PBS pH 7.4, en el cual el GA es soluble.

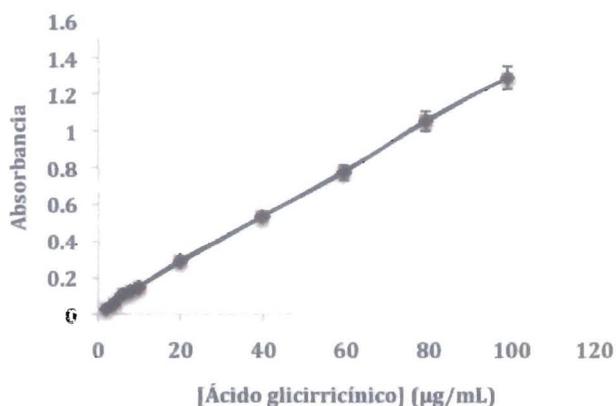
Se realizó un barrido de 240 a 400 nm del medio de disolución y del GA disuelto en dicho medio y no se encontraron interferencias a las condiciones del estudio, por lo que el método es selectivo. La λ_{\max} se encontró a 260 nm. El método demostró ser lineal en un intervalo de 7 a 200 $\mu\text{g/mL}$ ($\text{CV} = 1.898$) ($R^2 = 0.999$) (Gráfica 1). El método mostró ser repetible ($\text{CV} = 1.821$). El LOQ fue de 0.202 $\mu\text{g/mL}$.



Gráfica 1. Curva de calibración de GA
 $\text{Absorbancia} = 0.013 \cdot \text{GA}(\mu\text{g/mL}) + 0.012$

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

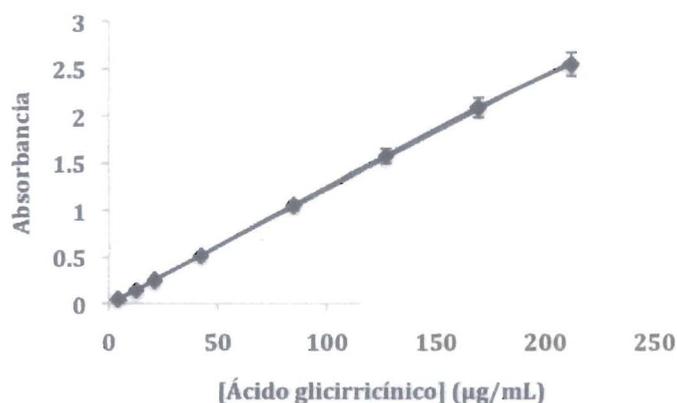
El medio de disolución consistió en una matriz biológica, una solución de PBS pH 7.4 en contacto con piel de oreja de cerdo. El método demostró ser selectivo a través de un barrido de 240 a 400 nm para el GA disuelto en el medio de disolución, encontrándose la λ_{\max} a 255 nm. El método fue lineal en un intervalo de 2 a 100 $\mu\text{g/mL}$ ($\text{CV} = 13.043$) ($R^2 = 0.996$) (Gráfica 2). El método mostró repetibilidad ($\text{CV} = 6.593$). El LOQ fue de 0.177 $\mu\text{g/mL}$.



Gráfica 2. Curva de calibración de GA
 $\text{Absorbancia} = 0.012 \cdot \text{GA}(\mu\text{g/mL}) + 0.023$

6.1.3 Método 3: Cuantificación de GA retenido en piel en los estudios *in vitro*

En este caso, el medio de disolución fue también una matriz biológica, solución de PBS pH 7.4 en contacto con pequeños trozos de piel de oreja de cerdo. Se realizó un barrido de 240 a 400 nm para el GA disuelto en la matriz biológica, y no se encontraron interferencias con ningún componente de la misma, por lo que el método es selectivo. La λ_{\max} se encontró a 255 nm. El método presentó linealidad en un intervalo de 2 a 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ($\text{CV} = 5.870$) ($R^2 = 0.999$) (Gráfica 3). El método mostró ser repetible ($\text{CV} = 5.382$). El LOQ fue de 0.254 $\mu\text{g}/\text{mL}$.



Gráfica 3. Curva de calibración de GA
 $\text{Absorbancia} = 0.012 * \text{GA}(\mu\text{g}/\text{mL}) - 0.003$

6.2 Preparación y caracterización de ME de GA

Se prepararon 4 tipos de ME (ME1: 0.8% GA o/w, ME2: 0.8% GA w/o, ME3: 0.1% GA o/w y ME4: 0.1% GA w/o), las cuales contenían agua, miristato de isopropilo como fase oleosa, Tween®80 como surfactante y Transcutol® como cosurfactante.

Las ME obtenidas fueron estables, transparentes, de una sola fase y de color amarillo. Los resultados de la caracterización de las ME con 0.8 % de GA, con 0.1 % de GA y sin fármaco se presentan en los cuadros 2 y 3.

Cuadro 2. Valores de viscosidad de las ME.

Sistema	ME1 placebo	ME1 0.8% GA	ME3 0.1% GA
Viscosidad (cP)	2071.3±82.6	740.0±34.2	1940±145.6
Sistema	ME2 placebo	ME2 0.8% GA	ME4 0.1% GA
Viscosidad (cP)	101.3±49.1	122.3±33.5	134±9.6

La ME1 presentó mayor viscosidad lo que podría indicar que se trata de una ME w/o, que al aumentar el contenido de agua en el sistema cambia su microestructura (se encuentra en el umbral de percolación), aumentando el volumen de las gotas y creando canales acuosos (Djordjevic et al, 2004), lo que da origen a interacciones más fuertes entre las membranas interfaciales aumentando la viscosidad (Sintov y Shapiro, 2004).

La viscosidad de la ME1 se vio afectada al adicionar el principio activo, es probable que al tener una estructura similar a la del colesterol pueda dividirse parcialmente en la membrana reduciendo la tensión interfacial entre fases (Marianecchi et al, 2012), ayudando a la formación de una ME bicontinua o de glóbulos de fase oleosa para formar la ME o/w (Fanun, 2007).

Una parte del fármaco debe encontrarse disuelta en la fase acuosa, los pH de la ME1 y la ME3 son 4.8 y 5.22 respectivamente; y el GA al ser un ácido débil ($\text{pka} = 4.71$), existe en mayor porcentaje en su forma ionizada (Niu et al, 2005), lo que puede provocar interacciones repulsivas entre las moléculas disminuyendo así la viscosidad del sistema.

Cuadro 3. Tamaño de glóbulo promedio de las ME.

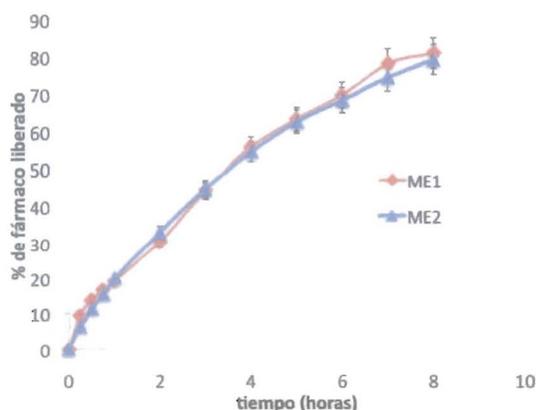
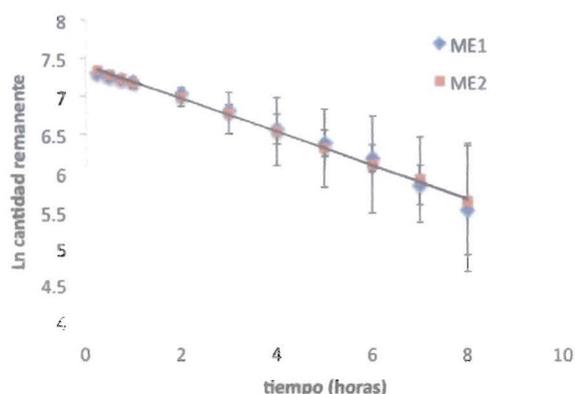
Sistema	Tamaño de glóbulo (nm)			Índice de Polidispersión
	Población 1	Población 2	Población 3	
ME1 placebo	252.1±38.2 (45.9±1.1%)	42.0±3.9 (37.1±1.1%)	5.12±0.3 (16.3±1.2%)	0.831±0.069
ME1 0.8% GA	240.3±120.9 (36.6±4.1%)	40.1±8.3 (43.5±3.4%)	5.5±1.1 (16.2±1.4%)	0.761±0.36

Se encontraron tres poblaciones diferentes de tamaño de glóbulo, esto se puede deber a la presencia temporal de agregados de glóbulos en las ME. Los glóbulos con mayor diámetro (> 100 nm) corresponden a los agregados. Los diámetros más pequeños están relacionados a los glóbulos independientes (Baroli et al., 2000). Esto se puede deber al agrupamiento de los glóbulos como resultado del aumento de las interacciones en el umbral de percolación (Podlogar et al, 2004).

6.3 Cinéticas de liberación *in vitro*

Las cinéticas de liberación se realizaron durante 24 h, tiempo al cual el 100% del fármaco había sido liberado en ambas ME (ME1 y ME2) (Gráfica 4). Ambas formulaciones presentan una cinética de primer orden ($y = -0.218x + 7.413$, $R^2 = 0.987$ y $y = -0.214x + 7.4$, $R^2 = 0.998$ para ME1 y ME2, respectivamente) (Gráfica 5), indicando que el proceso de liberación es directamente proporcional a la concentración de fármaco en el sistema. Las velocidades de liberación fueron comparadas utilizando una prueba de t ($t_{\text{crítico}} = 2.3060$, $t_{\text{calculado}} = 0.0721$, $\alpha = 0.05$) y no se observó diferencia significativa entre ellas.

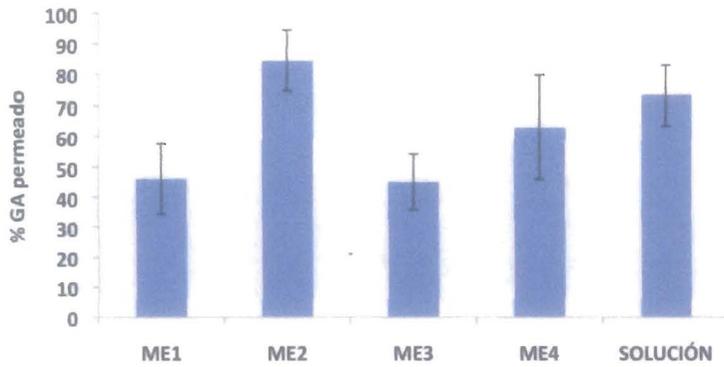
Las cinéticas fueron ajustadas también al modelo de Higuchi, las gráficas de la fracción liberada contra la raíz cuadrada del tiempo mostraron ser lineales ($y = 0.320x - 0.101$, $R^2 = 0.982$ y $y = 0.337x - 0.126$, $R^2 = 0.997$ para ME1 y ME2, respectivamente) indicando que el mecanismo de liberación desde las MEs es por difusión.

Gráfica 4. Cinéticas de liberación *in vitro* de la ME1 y la ME2

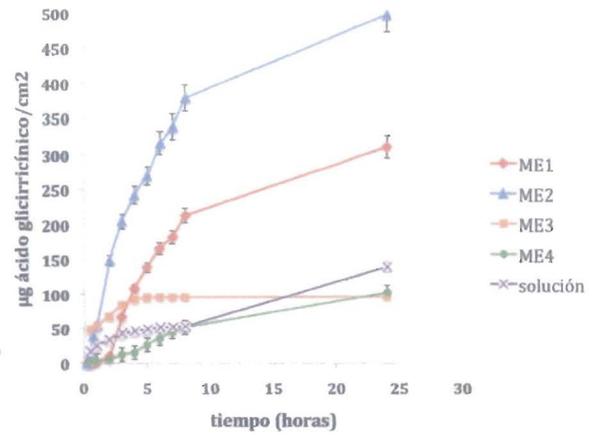
Gráfica 5. Perfiles de liberación de primer orden de la ME1 y la ME2

6.4 Cinéticas de permeación *in vitro*

La gráfica 6 muestra el porcentaje total permeado de GA en las pruebas de permeación. Con los datos obtenidos se construyeron las gráficas de GA permeado por unidad de área expuesta en función del tiempo (h) (Gráfica 7), con el fin de obtener el flujo (J) de GA desde los sistemas hacia el medio receptor (Cuadro 4).



Gráfica 6. Porcentaje total de GA permeado a partir de los sistemas estudiados.



Gráfica 7. Cinéticas de permeación de GA a través de piel *in vitro*.

También, se obtuvieron los coeficientes de permeabilidad (Kp) al dividir los flujos obtenidos entre la concentración de fármaco aplicada (Cuadro 4).

Cuadro 4. Porcentaje de GA permeado, flujo (J) y coeficiente de permeabilidad (Kp) para las cuatro MEs y la solución comercial.

	% GA permeado	J ($\mu\text{g cm}^{-2}\text{h}^{-1}$)	Kp (cm h^{-1})
ME1	46.11±11.51	32.87±7.23 (8h*)	0.0041±0.0009
ME2	84.42±10.05	48.79±5.17 (8h*)	0.0061±0.0006
ME3	45.07±9.20	12.88±4.58 (4h*)	0.0127±0.0045
ME4	62.79±16.81	6.15±2.75 (6h*)	0.0061±0.0027
Solución	73.14±9.74	10.12±4.99 (3h*)	0.0101±0.0050

*tiempo al que se determinaron los flujos

Los resultados de % permeado, J y Kp de todos los sistemas fueron comparados utilizando una prueba de ANOVA simple (cuadros 5, 8 y 11) para determinar si existían diferencias significativas entre los sistemas, se encontraron diferencias significativas y subsecuentemente se realizaron pruebas de rangos múltiples para definir entre que muestras existía una diferencia significativa (Cuadros 6, 9 y 12; Gráficas 8-10).

Cuadro 5. Prueba de ANOVA simple para % de GA permeado por tipo de sistema

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	6687.29	3	1671.82	12.36	0.0000
Intra grupos	3110.98	23	135.26		
Total (corregido)	9798.28	27			

Cuadro 6. Prueba de Rangos Múltiples para % de GA permeado por tipo de sistema, 95.0% HSD-Tukey

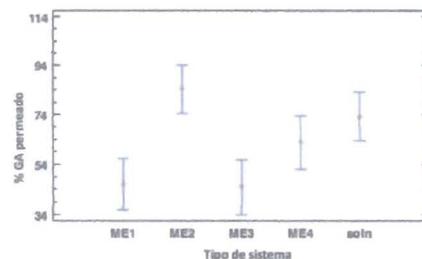
Sistema	Casos	Media LS	Grupos Homogéneos
ME3	5	45.0775	X
ME1	6	46.1107	X
ME4	5	62.7916	X
Solución	6	73.1412	XX
ME2	6	84.4192	X

Medias y 95.0% de Tukey HSD

Cuadro 7. Contrastes para % de GA permeado por tipo de sistema

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
ME1 - ME2	*	-38.3085	13.8904
ME1 - ME3		1.03319	14.5683
ME1 - ME4	*	-16.6809	14.5683
ME1 - solución	*	-27.0305	13.8904
ME2 - ME3	*	39.3417	14.5683
ME2 - ME4	*	21.6276	14.5683
ME2 - solución		11.278	13.8904
ME3 - ME4	*	-17.7141	15.2161
ME3 - solución	*	-28.0637	14.5683
ME4 - solución		-10.3496	14.5683

*indica una diferencia significativa



Gráfica 8. Comparación de % de GA permeado por tipo de sistema, prueba HSD-Tukey

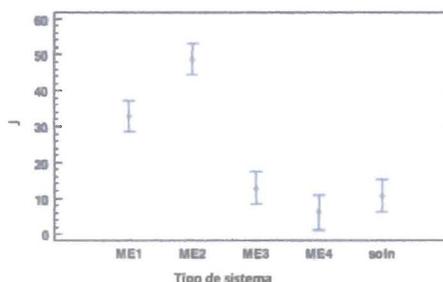
Cuadro 8. Prueba de ANOVA simple para J por tipo de sistema

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	7514.57	4	1878.64	70.41	0.0000
Intra grupos	640.395	24	26.6831		
Total (corregido)	8154.96	28			

Cuadro 9. Prueba de Rangos Múltiples para J por tipo de sistema, 95.0% HSD-Tukey

Sistema	Casos	Media LS	Grupos Homogéneos
ME4	5	6.1554	X
Solución	6	10.7172	X
ME3	6	12.878	X
ME1	6	32.8733	X
ME2	6	48.7933	X

Medias y 95.0% de Tukey HSD



Gráfica 9. Comparación de valores de flujo de los sistemas, prueba HSD-Tukey

Cuadro 10. Contrastes para J por tipo de sistema

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
ME1 - ME2	*	-15.92	8.78811
ME1 - ME3	*	19.9953	8.78811
ME1 - ME4	*	26.7179	9.21704
ME1 - solución	*	22.1562	8.78811
ME2 - ME3	*	35.9153	8.78811
ME2 - ME4	*	42.6379	9.21704
ME2 - solución	*	38.0762	8.78811
ME3 - ME4		6.7226	9.21704
ME3 - solución		2.16083	8.78811
ME4 - solución		-4.56177	9.21704

*indica una diferencia significativa

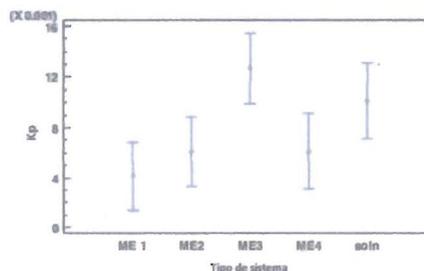
Cuadro 11. Prueba de ANOVA simple para Kp por tipo de sistema

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	0.000282885	4	0.0000707211	6.86	0.0009
Intra grupos	0.000237206	23	0.0000103133		
Total (corregido)	0.000520091	27			

Cuadro 12. Prueba de Rangos Múltiples para Kp por tipo de sistema, 95.0% HSD-Tukey

Sistema	Casos	Media LS	Grupos Homogéneos
ME1	6	0.00412463	X
ME2	6	0.00607638	XX
ME4	5	0.00610655	XX
Solución	5	0.0101266	XX
ME3	6	0.0126752	X

Medias y 95.0% de Tukey HSD



Gráfica 10. Comparación de valores Kp por tipo de sistema, prueba HSD-Tukey

Cuadro 13. Contrastes para Kp por tipo de sistema

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
ME1 - ME2		-0.00195175	0.00548219
ME1 - ME3	*	-0.00855056	0.00548219
ME1 - ME4		-0.00198191	0.00574977
ME1 - solución	*	-0.00600197	0.00574977
ME2 - ME3	*	-0.00659882	0.00548219
ME2 - ME4		-0.0000301673	0.00574977
ME2 - solución	*	-0.00405022	0.00574977
ME3 - ME4	*	0.00656865	0.00574977
ME3 - solución		0.0025486	0.00574977
ME4 - solución		-0.00402005	0.00600544

*indica una diferencia significativa

Se realizaron también pruebas de ANOVA multifactoriales para conocer si el tipo de formulación y la concentración de fármaco cargado tenían efecto significativo sobre el % de GA permeado, el J y el Kp (Cuadros 14, 19 y 24). Subsecuentemente se realizaron pruebas de rangos múltiples, HSD-Tukey, para conocer entre que sistemas existía una diferencia estadísticamente significativa (Cuadros 15, 16, 20, 21, 25 y 26; gráficas 11-16).

Cuadro 14. Prueba de ANOVA multifactorial para % de GA permeado

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A: Concentración	700.244	1	700.244	4.56	0.0432
B: Formulación	5992.09	2	2996.05	19.49	0.0000
Residuos	3689.34	24	153.723		
Total (corregido)	9798.28	27			

Cuadro 15. Prueba de Rangos Múltiples para % de GA permeado por concentración, 95.0% HSD-Tukey

Concentración	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
Baja (0.1 %)	16	60.3368	3.11108	X
Alta (0.8 %)	12	71.6672	4.16713	X

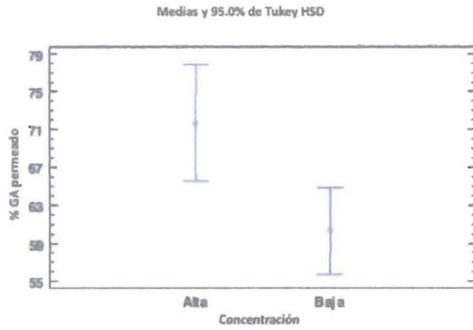
Cuadro 16. Prueba de Rangos Múltiples para % de GA permeado por formulación 95.0% HSD-Tukey

Formulación	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
ME o/w	11	45.1261	3.74607	X
ME w/o	11	74.0735	3.74607	X
Solución	6	78.8064	5.71542	X

Cuadro 17. Contrastes para % de GA permeado por concentración

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
Alta-Baja	*	11.3304	10.9567

*indica una diferencia significativa

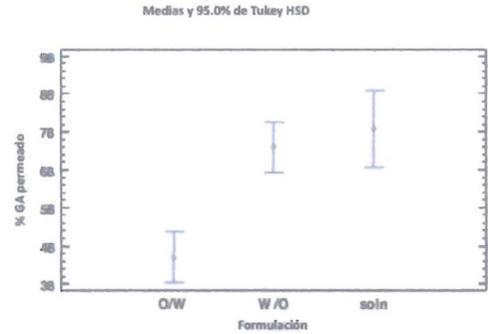


Gráfica 11. Comparación de % de GA permeado dependiendo de la concentración de los sistemas, prueba HSD-Tukey

Cuadro 18. Contrastes para % de GA permeado por formulación

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
ME o/w-MEw/o	*	-28.9474	13.2067
ME o/w-solución	*	-33.6803	17.3037
ME w/o-solución		-4.73292	17.3037

*indica una diferencia significativa



Gráfica 12. Comparación de % de GA permeado dependiendo de la formulación de los sistemas, prueba HSD-Tukey

Cuadro 19. Prueba de ANOVA multifactorial para J

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFECTOS PRINCIPALES					
A: Concentración	5425.19	1	5425.19	98.80	0.0000
B: Formulación	154.292	2	77.1462	1.40	0.2641
Residuos	1372.81	25	54.9122		
Total (corregido)	8154.96	28			

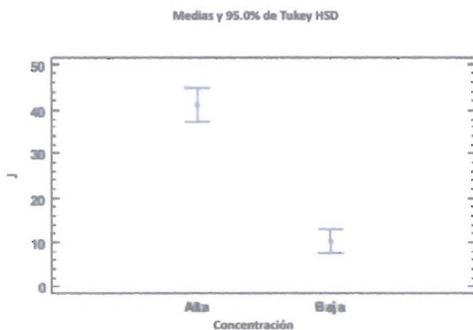
Cuadro 20. Prueba de Rangos Múltiples para J por concentración, 95.0% Tukey HSD

Concentración	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
Baja (0.1 %)	17	10.2763	1.80121	X
Alta (0.8 %)	12	41.0538	2.47988	X

Cuadro 22. Contrastes para J por concentración

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
Alta-Baja	*	30.7775	6.37722

*indica una diferencia significativa



Gráfica 13. Comparación de valores de J dependiendo de la concentración de los sistemas, prueba HSD-Tukey

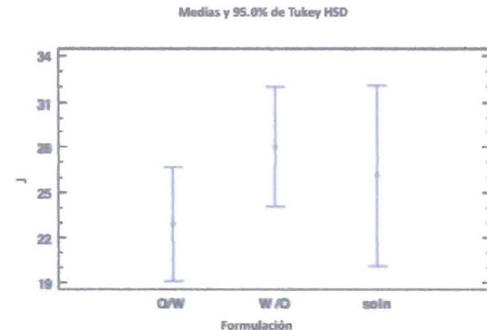
Cuadro 21. Prueba de Rangos Múltiples para J por formulación, 95.0% HSD-Tukey

Formulación	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
ME o/w	12	22.8757	2.13916	X
Solución	6	26.1059	3.39838	X
ME w/o	11	28.0135	2.23871	X

Cuadro 23. Contrastes para J por formulación

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
ME o/w-MEw/o		-5.13781	7.715
ME o/w-solución		-3.23026	10.0052
ME w/o-solución		1.90755	10.272

*indica una diferencia significativa



Gráfica 14. Comparación de valores de J dependiendo de la formulación de los sistemas, prueba HSD-Tukey

Cuadro 24. Prueba de ANOVA multifactorial para Kp

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFECTOS PRINCIPALES					
A: Concentración	0.000115629	1	0.000115629	8.14	0.0088
B: Formulación	0.0000260487	2	0.0000130244	0.92	0.4133
Residuos	0.000340917	24	0.0000142049		
Total (corregido)	0.000520091	27			

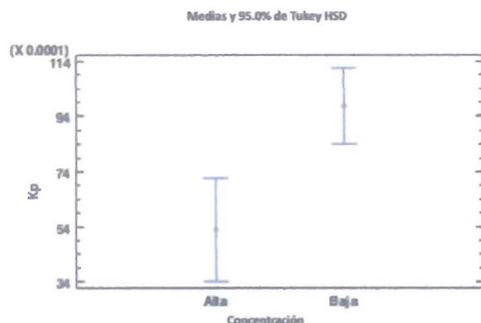
Cuadro 25. Prueba de Rangos Múltiples para Kp por concentración, 95.0% HSD-Tukey

Concentración	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
Alta (0.8 %)	12	0.00527813	0.00128197	X
Baja (0.1 %)	16	0.00977136	0.000944391	X

Cuadro 27. Contrastes para Kp por concentración

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
Alta-Baja	*	-0.00449323	0.00325038

*indica una diferencia significativa



Gráfica 15. Comparación de valores de Kp dependiendo de la concentración de los sistemas, prueba HSD-Tukey

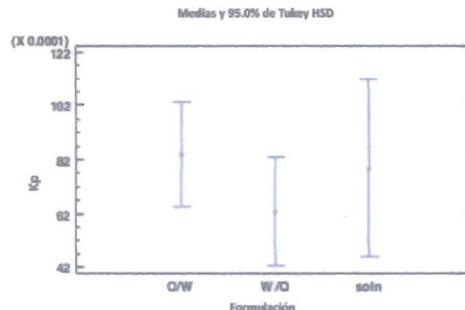
Cuadro 26. Prueba de Rangos Múltiples para Kp por formulación, 95.0% HSD-Tukey

Formulación	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
ME w/o	11	0.00629433	0.00113863	X
Solución	5	0.00787998	0.00186038	X
ME o/w	12	-	0.001088	X

Cuadro 28. Contrastes para Kp por formulación

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
ME o/w-MEw/o		0.00210559	0.00393416
ME o/w-solución		0.000519931	0.0053838
ME w/o-solución		-0.00158565	0.00551293

*indica una diferencia significativa



Gráfica 16. Comparación de valores de Kp dependiendo de la formulación de los sistemas, prueba HSD-Tukey

Con respecto al % de GA permeado, se observa que tanto la cantidad de fármaco cargado, como el tipo de formulación tienen un efecto significativo sobre este valor.

La ME w/o presentan mayor % de GA permeado que las ME o/w, esta diferencia se atribuye por una parte a la composición de las formulaciones.

Las ME w/o contienen una mayor cantidad de IPM, el cual puede entrar en la capa lipídica del estrato córneo disminuyendo el empaquetamiento de los ácidos grasos. Además se ha sugerido que el IPM puede interactuar con los lípidos anclando su grupo isopropilo en la región polar de la capa. Lo que produce un aumento en la fluidez de los lípidos, una disminución en la resistencia a la permeación y un aumento en la difusión del fármaco (Hirata et al, 2013).

Además el IPM puede solubilizar el colesterol en cantidades considerables, desestabilizando la membrana y promoviendo la migración del fármaco a través de la ruta intercelular (Arellano et al, 1998).

Hay que considerar también que la viscosidad de las ME w/o es menor lo que facilita la difusión de la misma a través de la piel, y el transporte de GA a través de la formulación.

Las MEs w/o contienen también mayor cantidad, aunque en un pequeño porcentaje, de Tween®80 que actúa como promotor de permeación penetrando dentro de la región intercelular del estrato córneo, aumentando la fluidez y eventualmente solubilizando y extrayendo los componentes lipídicos. También, puede penetrar dentro de la matriz intercelular, interactuando con los filamentos de queratina lo que provoca alteraciones dentro de los corneocitos (Shokri et al, 2001).

Es probable también que las MEs w/o formen una capa oclusiva sobre la piel, generando altas cantidades de agua en el estrato córneo y causando subsecuentemente una desorganización en los dominios de lípidos debida a un aumento de volumen de las regiones polares (cabezas polares) de las bicapas.

En la comparación de todos los sistemas (gráfica 8, cuadro 7), se observa que no hay diferencia significativa en el % de GA permeado entre la ME2 y la solución comercial, esto podría deberse a

que la solución comercial tuviera en su formulación algún promotor de la permeación. Sin embargo, la ME2 al contener un porcentaje de fármaco cargado mayor que la solución, la cantidad de GA que permeará a través de la piel será mayor.

Los valores de J presentaron diferencias significativas debidas a la concentración del fármaco cargado (gráfica 13); a mayor concentración, mayor J. Esto puede ser atribuido al gradiente de actividad termodinámica a través del estrato córneo. En la comparación dependiendo del tipo de sistema (gráfica 9) se observa que existe una diferencia estadísticamente significativa entre la ME1 y la ME2, que aunque posean la misma concentración de fármaco, la ME2 presenta un flujo mayor. Esto pudo haber ocurrido ya que la solubilidad del ácido glicirricínico en IPM es menor a su solubilidad acuosa. Por lo que es probable que en el sistema con mayor cantidad de GA, mayor cantidad de IPM y menor cantidad de agua (ME2), la solubilidad del fármaco disminuya, obteniéndose un sistema que exhibe una actividad termodinámica mayor (Singh et al, 2005).

En cuanto a los valores de Kp, éstos presentan diferencias significativas debidas a la concentración de GA cargado (gráfica 15).

Los sistemas con 0.1 % de fármaco presentaron un valor de Kp mayor, aunque los valores de flujo para los sistemas con una concentración alta de fármaco son significativamente más grandes, al realizar el cálculo del Kp (J dividido por la concentración de fármaco en el sistema) el valor de concentración para la ME1 y la ME2 es mucho mayor por lo que el valor de Kp obtenido es menor, lo que indica que la velocidad de permeabilidad (Kp) de los sistemas con el nivel bajo de fármaco cargado es mayor. No obstante, la cantidad de GA que permea desde los sistemas con un alto nivel de fármaco cargado es mayor.

6.5 Extracción de GA remanente en piel

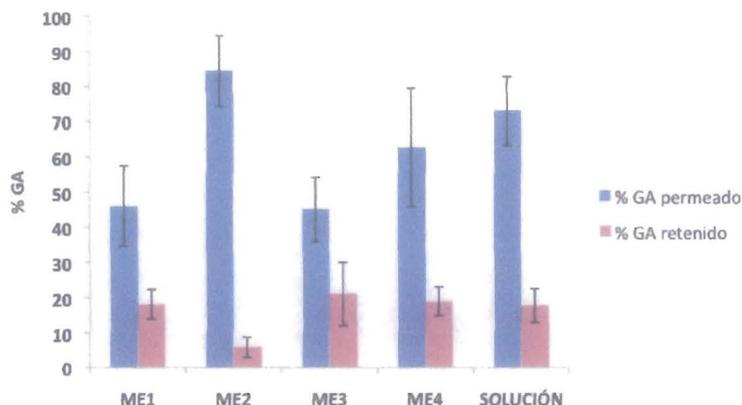
Después de realizar las pruebas de permeación, se llevó a cabo la extracción de fármaco remanente en la piel. El porcentaje de recobro obtenido con una cantidad conocida de GA fue de 73% de acuerdo a lo expuesto en el punto 5.6 de la metodología. Los datos fueron corregidos con este porcentaje de recobro, utilizando la siguiente ecuación:

$$\%F_retenido_corregido = \frac{\%F_retenido}{\%_recobro} * 100$$

Los datos obtenidos se calcularon en porcentaje y se llevó a cabo la comparación de todos los sistemas.

Cuadro 29. Porcentajes de fármaco en piel y en receptor al final de la permeación, para los diferentes sistemas

	% GA en piel	% GA en receptor
ME1	18.12±4.28	46.11±11.51
ME2	5.89±2.92	84.42±10.05
ME3	20.99±9.02	45.07±9.20
ME4	18.98±4.08	62.79±16.81
Solución	17.73±4.84	73.14±9.74



Gráfica 17. Porcentaje de GA retenido y permeado en los estudios *in vitro*.

Se realizó una prueba ANOVA simple (cuadro 30) para analizar los resultados de porcentaje de fármaco retenido en piel, se encontró que existía diferencia estadísticamente significativa entre ellos. Posteriormente, se llevó a cabo una prueba de Tukey (cuadro 31, gráfica 18) para definir entre que muestras existía una diferencia estadísticamente significativa.

Cuadro 30. Prueba de ANOVA simple para % de GA retenido por tipo de sistema

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	996.635	4	249.159	11.15	0.0000
Intra grupos	491.507	22	22.3412		
Total (corregido)	1488.14	26			

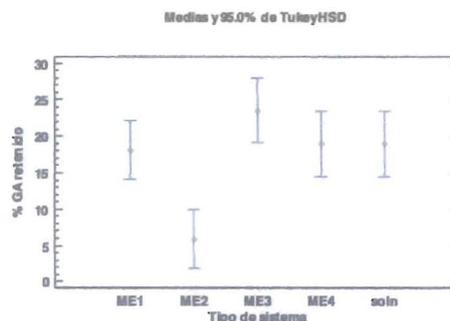
Cuadro 31. Prueba de Rangos Múltiples para % de GA retenido por tipo de sistema, 95.0% HSD-Tukey

Sistema	Casos	Media LS	Grupos Homogéneos
ME2	6	5.88825	X
ME1	6	18.1265	X
Solución	5	18.9384	X
ME4	5	18.9793	X
ME3	5	23.5123	X

Cuadro 32. Contrastes para % de de GA retenido por tipo de sistema

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
ME1 - ME2	*	12.2382	8.09883
ME1 - ME3		-5.38587	8.49413
ME1 - ME4		-0.85288	8.49413
ME1 - solución		-0.811893	8.49413
ME2 - ME3	*	-17.6241	8.49413
ME2 - ME4	*	-13.0911	8.49413
ME2 - solución	*	-13.0501	8.49413
ME3 - ME4		4.53299	8.87183
ME3 - solución		4.57397	8.87183
ME4 - solución		0.0409875	8.87183

*indica una diferencia significativa



Gráfica 18. Comparación de % de GA retenido entre los sistemas, prueba HSD-Tukey

Se realizaron también una prueba de ANOVA multifactorial (cuadro 33) para conocer el efecto del tipo de formulación y de la concentración de fármaco cargado sobre el % de GA retenido.

Según los resultados arrojados por esta prueba, ambos factores tienen un efecto significativo sobre el % de fármaco retenido. Posteriormente se llevó a cabo una prueba de múltiples rangos, HSD-Tukey, para conocer entre que sistemas existía una diferencia significativa (cuadros 34 y 35, gráficas 19 y 20).

Cuadro 33. Prueba de ANOVA multifactorial para % GA retenido

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A: Concentración	465.543	1	465.543	18.70	0.0003
B: Formulación	437.48	2	218.74	8.79	0.0015
Residuos	572.467	23	24.8899		
Total (corregido)	1488.14	26			

Cuadro 34. Prueba de Rangos Múltiples para % de GA retenido por concentración. 95.0% Tukey HSD

Concentración	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
Alta (0.8 %)	12	11.2382	1.70406	X
Baja (0.1 %)	15	20.4767	1.28815	X

Cuadro 36. Contrastes para % de GA retenido por concentración

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
Alta-Baja	*	-9.23848	4.41897

*indica una diferencia significativa

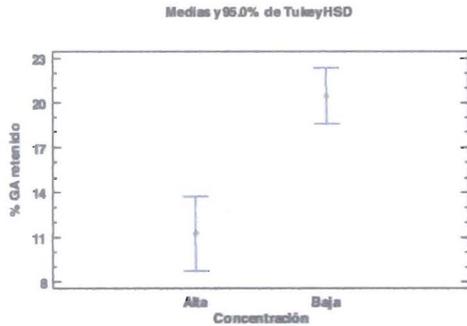
Cuadro 35. Prueba de Rangos Múltiples para % de GA retenido por formulación. 95.0% HSD-Tukey

Formulación	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
ME w/o	11	12.2587	1.50736	X
Solución	5	14.3191	2.47361	XX
ME o/w	11	20.9945	1.50736	X

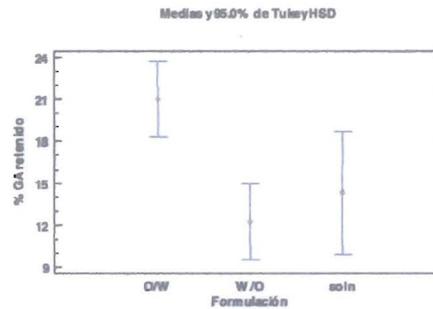
Cuadro 37. Contrastes para % de GA retenido por formulación

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
ME o/w-MEw/o	*	8.73584	5.32929
ME o/w-solución		6.6754	7.34592
ME w/o-solución		-2.06044	7.34592

*indica una diferencia significativa



Gráfica 19. Comparación de % de GA retenido dependiendo de la concentración de los sistemas, prueba HSD-Tukey



Gráfica 20. Comparación de % de GA retenido dependiendo de la formulación de los sistemas, prueba HSD-Tukey

Se observó que el porcentaje de GA en piel de la ME2 es significativamente menor al de los otros 4 sistemas (Gráfica 18).

Estos resultados se atribuyen a la cantidad de IPM en la ME2, el que al aumentar la fluidez de los lípidos de la membrana permite que el fármaco difunda más fácilmente que en la ME1, la ME3 y solución.

En lo que respecta a la diferencia de % de fármaco retenido entre la ME2 y la ME4 es debido a la baja cantidad de fármaco cargado en el sistema con 0.1% de GA, lo que disminuye el flujo transdérmico y por lo tanto el fármaco no es capaz de atravesar la membrana de piel, quedándose retenido en ella.

7. CONCLUSIONES

Se lograron obtener dos microemulsiones; una aceite en agua (o/w) y otra agua en aceite (w/o) conteniendo ácido glicirricínico con el fin de ser aplicadas por vía transdérmica.

Los métodos espectrofotométricos para la cuantificación de ácido glicirricínico liberado de las microemulsiones, permeado a través de la piel y retenido en piel, mostraron ser lineales dentro del intervalo de concentraciones señalado, selectivos y repetibles.

La microemulsión 2 (w/o) favoreció el paso de una mayor cantidad de fármaco a través de piel que el resto de los sistemas estudiados. Las diferencias encontradas se atribuyen a: (i) La composición de las diferentes formulaciones. La ME2 presenta un efecto promotor importante por su alto contenido en miristato de isopropilo y Tween®80, además de que pudiera formar una película oclusiva, lo que incrementaría el grado de hidratación de la piel, y (ii) A la concentración del fármaco en el sistema.

Se encontró que la inclusión de ácido glicirricínico en este tipo de formulación presenta una mejor permeación transdérmica que la solución comercial. Con ello se demuestra que es factible utilizar estas formulaciones para facilitar la administración de fármacos a través de piel.

8. PERSPECTIVAS

- Realizar estudios de permeación en un modelo *in vivo* con el fin de hacer una correlación entre métodos.
- Determinar la eficacia de las ME como tratamiento de HSV mediante pruebas en cultivos celulares.
- Realizar pruebas de toxicidad e irritación de la piel con las ME

9. BIBLIOGRAFÍA

- Arellano, A., Santoyo, S., Martín, C. y Ygartua, P. (1998). Influence of propylene glycol and isopropyl myristate on the *in vitro* percutaneous penetration of diclofenac sodium from carbopol gels. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 7, 129–135.
- Bal, S., Ding, Z., Riet, E., Jiskoot, W. y Bouwstra, J. (2010). Advances in transcutaneous vaccine delivery: Do all ways lead to Rome? *Journal of Controlled Release* 148, 266–282.
- Baroli, B., López-Quintela, M., Delgado-Charro, M., Fadda, A. y Blanco-Méndez, J. (2000). Microemulsions for topical delivery of 8-methoxsalen. *Journal of Controlled Release*, 69, 209-218.
- Cirillo, G., Curcio, M., Parisi, O., Puoci, F., Iemma, F., Spizzirri, U., Restuccia, D. & Picci, N. (2011). Molecularly imprinted polymers for the selective extraction of glycyrrhizic acid from liquorice roots. *Food Chemistry*, 125, 1058-1063.
- Djordjevic, L., Primorac, M., Stupar, M. y Krajisnik, D. (2004). Characterization of caprylocaproyl macrogolglycerides based microemulsion drug delivery vehicles for an amphiphilic drug. *International Journal of Pharmaceutics*, 271, 11–19.
- El-Kattan, A., Asbill, C. y Haidar, S., (2000). Transdermal testing: practical aspects and methods. *Research focus*, 3, 426-430.
- Fanun, M. (2007). Conductivity, viscosity, NMR and diclofenac solubilization capacity studies of mixed nonionic surfactants microemulsions. *Journal of Molecular Liquids* 135, 5–13.
- Fatahzadeh, M. y Schwartz, R. (2007) Human herpes simplex virus infections: Epidemiology, pathogenesis, symptomatology, diagnosis, and management. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 57, 737-763.
- Godwin, D., Kim, N. y Felton, L. (2002). Influence of Transcutol® CG on the skin accumulation and transdermal permeation of ultraviolet absorbers. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 53, 23–27.
- Hao, J., Sun, Y., Wang, Q., Tong, X., Zhang, H. y Zhang, Q. (2010). Effect and mechanism of penetration enhancement of organic base and alcohol on Glycyrrhetic acid *in vitro*. *International Journal of Pharmaceutics*, 399, 102-108.
- Hennell, J., Lee, S., Khoo, C., Gray, M. y Bensoussan, A. (2008). The determination of glycyrrhizic acid in *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. ex DC. (Zhi Gan Cao) root and the dried aqueous extract by LC-DAD. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 47, 494–500.
- Hirata, K., Helal, F., Hadgraft, J. y Lane, M. (2013). Formulation of carbenoxolone for delivery to the skin. *International Journal of Pharmaceutics* 448, 360–365.
- Kawasaki, H., Nagao, K., Kubo, A., Hata T., Shimizu, A., Mizuno, H., Yamada, T. y Amagai, M. (2012). Altered stratum corneum barrier and enhanced percutaneous immune responses in filaggrin-null mice. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 129, 1538-1546.
- Khan, M., Ather, A., Thompson K. y Gambari, R. (2005). Extracts and molecules from medicinal plants against herpes simplex viruses, *Antiviral Research*, 67, 107–119.
- Kogan, A. y Garti, N. (2006). Microemulsions as transdermal drug delivery. *Advances in Colloid and Interface Science*, 123-126, 369-385.
- Lane, M. (2013). Skin penetration enhancers. *International Journal of Pharmaceutics*, 447, 12-21.
- Lawrence, M. y Rees, G. (2012). Microemulsion-based media as novel drug delivery systems. *Advanced Drug Delivery Reviews* 64, 175–193.

- Marianecchi, C., Rinaldi, F., Mastriota, M., Pieretti, S., Traspaso, E., Paolino, D. y Carafa, M. (2012). Anti-inflammatory activity of novel ammonium glycyrrhizinate/niosomes delivery system: Human and murine models. *Journal of Controlled Release* 164, 17-25.
- Moser, K., Kiwret, K., Naik, A., Kalia, Y. y Guy, R. (2000). Passive skin penetration enhancement and its quantification in vitro. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 52, 103-112.
- Neubert, R. (2011). Potentials of new nanocarriers for dermal and transdermal drug delivery. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 77, 1-2.
- Niu, G., Xie, Y., Lou, J. y Liu, H. (2005). Isolation and purification of glycyrrhizic acid with solvent extraction. *Separation and Purification Technology*, 44, 189-196.
- Paolina, D., Lucania, G., Mardente, D., Alhaique, F. y Fresta, M. (2005). Ethosomes for skin delivery of ammonium glycyrrhizinate: In Vitro percutaneous permeation through human skin and in vivo anti-inflammatory activity on human volunteers. *Journal of Controlled Release*, 106, 99-110.
- Pakpayat, N., Nielloud, F., Fortuné, R., Tourne-Peteilh, C., Villarreal, A., Grillo, I. y Bataille, B. (2009). Formulation of ascorbic acid microemulsions with alkyl polyglycosides. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 72, 444-452.
- Peltola, S., Saarien-Savolainen, P., Kiesvara, J., Suhonen, T. y Urtti, A. (2003). Microemulsions for topical delivery of estradiol. *International Journal of Pharmaceutics*, 254, 99-107.
- Podlogar, F., Gasperlin, M., Tomsic, M., Jamnik, A. y Bester, M. (2004). Structural characterisation of water-Tween 40®/Imwitor 308®-isopropyl myristate microemulsions using different experimental methods. *International Journal of Pharmaceutics* 276, 115-128.
- Samkar, V. y Terézhalmy, G. (2010). Herpetic Infections: Etiology, Epidemiology, Clinical Manifestations, Diagnosis, and Treatment. Continuing the Care That Starts in Your Chair. <http://dental.case.edu/students/grad/550/Herpes.pdf>
- Singh, B., Singh, R. Y Singh, J. (2005). Effects of ionization and penetration enhancers on the transdermal delivery of 5-fluorouracil through excised human stratum corneum. *International Journal of Pharmaceutics* 298, 98-107.
- Sintov, A. y Shapiro, L. (2004). New microemulsion vehicle facilitates percutaneous penetration in vitro and cutaneous drug bioavailability in vivo. *Journal of Controlled Release*, 95, 173-183.
- Shokri, J., Nokhodchi, A., Dashbolaghi, A., Hassan-Zadeh, D., Ghafourian, T. y Barzegar, M. (2001). The effect of surfactants on the skin penetration of diazepam. *International Journal of Pharmaceutics*, 228, 99-107.
- Sun, C., Xie, Y., Tian, Q. Y Liu, H. (2007). Separation of glycyrrhizic acid and liquiritin from licorice root by aqueous nonionic surfactant mediated extraction. *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects*, 305, 42-47.
- Tapash Ghosh, William Pfister, Su Il Yum, (1997). Transdermal and topical drug delivery systems. Interpharm press, primera edición, 139-140.
- Vandamme, T. (2002). Microemulsions as ocular drug delivery systems: recent developments and future challenges. *Progress in Retinal and Eye Research*, 21, 15-34.
- Vick, R., Hidalgo, Hilda, Zenón, C. y Martínez, S. (2000). Uso tópico del ácido glicirricínico en herpes genital. *Revista del Hospital General Dr. Manuel Gea González*, 3, 141-144.
- Williams, A. (2003). Transdermal and Topical Drug Delivery. Pharmaceutical Press, primera edición, 1-2.

10. AGRADECIMIENTOS

La alumna agradece al CONACYT (Número CVU/Becario: 409450/258049 y proyecto 129320) y al PAPIIT (clave de proyecto: IN216313) por la beca y los recursos otorgados para realización de este proyecto.

Se agradece al Sr. Draucin Jiménez del Taller de Vidrio Soplado de la FESC por la fabricación de las celdas de difusión.