



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO

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

**COMPARACIÓN DE DOS SISTEMAS NANOACARREADORES
(NANOSUSPENSIONES Y MICROEMULSIONES) PARA LA APLICACIÓN
PERCUTÁNEA DE ALENDRONATO SÓDICO**

TESIS

PARA OPTAR POR EL GRADO DE

DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA

M. en C. Norma Angélica Villanueva Martínez

Dra. Flora Adriana Ganem Rondero
Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Campo 1

Ciudad de México, Enero, 2021



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

**COMPARACIÓN DE DOS SISTEMAS NANOACARREADORES
(NANOSUSPENSIONES Y MICROEMULSIONES) PARA LA APLICACIÓN
PERCUTÁNEA DE ALENDRONATO**

**T E S I S
PARA OPTAR POR EL GRADO DE**

DOCTOR EN CIENCIAS

P R E S E N T A

M. en C. Norma Angélica Villanueva Martínez

Dra. Flora Adriana Ganem Rondero
Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Campo 1



Ciudad de México, a de 2021

AGRADECIMIENTOS

Al CONACYT por la beca otorgada (258049) para realizar mis estudios de doctorado y a los proyectos PAPIIT IN226119 y PIAPI 2021 por los recursos otorgados para la realización de este proyecto

DEDICATORIA

Presentación en congresos

Año: 2018 **Cartel:** Formulating two nanocarrier systems for the transdermal delivery of sodium alendronate, **Congreso:** Applied Nanotechnology and Nanoscience International Conference, **Lugar:** Berlín, Alemania, **Institución:** Prem C

Año: 2018 **Cartel:** Formulación de microemulsiones y nanosuspensiones para la liberación de alendronato sódico, **Congreso:** XXVI Congreso Nacional de Educación Química Farmacéutica Biológica y XXII Reunión de estudiantes de farmacia, **Lugar:** Facultad de Farmacia, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, **Institución:** Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos de México AC

Año: 2017 **Cartel:** Formulación de sistemas nanoacarreadores (nanosuspensiones y microemulsiones) para la liberación de Alendronato Sódico, **Congreso:** L Congreso Nacional de Ciencias Farmacéuticas, **Lugar:** Tequila, Jalisco, **Institución:** Asociación Farmacéutica Mexicana

CONTENIDO

ÍNDICE DE FIGURAS	ix
ÍNDICE DE TABLAS.....	xiii
ABREVIATURAS	xviii
ABSTRACT	xx
RESUMEN	xxi
1. Introducción	1
2. Marco teórico	3
2.1 Organización del hueso.....	3
2.2 Mineralización ósea	3
2.3 Remodelado óseo.....	5
2.4 Osteoporosis.....	7
2.4.1 Epidemiología en México	7
2.4.2 Patogénesis de la osteoporosis	8
2.5 Agentes farmacológicos para el tratamiento de osteoporosis	9
2.5.1 Bifosfonatos (BPs).....	10
2.5.2 Mecanismo de acción.....	12
2.5.3 Alendronato sódico.....	13
2.6 Administración transdérmica de fármacos	13
2.7 La piel	14
2.7.1 Hipodermis.....	15
2.7.2 Dermis.....	15
2.7.3 Epidermis	16
2.8 Rutas de permeación	19
2.9 Cinética de permeación.....	20
2.10 Estrategias para incrementar la absorción de fármacos a través de la piel.....	23
2.11 Nanoacarreadores.....	26
2.11.1 Microemulsiones.....	26
2.11.2 Nanosuspensiones sólido en aceite (s/o)	28
2.12 Caracterización de nanoacarreadores.....	30
2.12.1 Tamaño de partícula	30
2.12.2 Conductividad	31
2.12.3 Reología	31
2.12.4 Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR).....	31
2.12.5 Pérdida de agua transepidérmica.....	33
2.12.6 Estudios de irritabilidad de la piel	34
2.13 Evaluación de los promotores de la permeación.....	35
2.13.1 Pruebas de permeación <i>in vitro</i>	35
2.13.2 Pruebas de permeación <i>in vivo</i>	37
3. Hipótesis.....	38
4. Objetivo general	38

4.1 Objetivos particulares:.....	38
5. Metodología	39
5.1 Reactivos.....	39
5.2 Consumibles.....	40
5.3 Equipos e instrumentos.....	40
5.4 Cuantificación de ALD por espectrofotometría UV-vis	42
5.5 Cuantificación de ALD sódico por espectrofotometría de fluorescencia.....	43
5.6 Determinación de solubilidad de ALD sódico en excipientes	44
5.7 Formulación de Microemulsiones	45
5.8 Formulación de nanosuspensiones sólido en aceite (SONS)	46
5.9 Evaluación de la viscosidad, la conductividad y la carga de fármaco en las microemulsiones.....	47
5.10 Porcentaje de eficiencia del proceso (%EP) de nanosuspensiones	48
5.11 Determinación del tamaño de partícula e índice de polidispersión (IPD)	48
5.12 Estudios de estabilidad.....	48
5.13 Pérdida de agua transepidérmica (TEWL).....	49
5.14 Evaluación de la formación de eritema.....	49
5.15 Espectroscopía de infrarrojo por transformadas de Fourier (FTIR)	51
5.16 Evaluación de la liberación	51
5.17 Cinéticas de permeación <i>in vitro</i>	52
6. Resultados y discusión	55
6.1 Solubilidad de ALD sódico en excipientes	55
6.2 Diagramas pseudoternarios y caracterización de las microemulsiones.....	55
6.3 Preparación de SONS cargados con ALD	59
6.4 Caracterización de SONS	60
6.4.1 Determinación del porcentaje de eficiencia del proceso (%EP).....	60
6.4.2 Tamaño de partícula e índice de polidispersión.....	60
6.5 Estabilidad de los nanoacarreadores	63
6.6 Medición de la pérdida de agua transepidérmica.....	65
6.7 Medición del índice de eritema	66
6.8 Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier	68
6.9 Evaluación del perfil de liberación de ALD desde los nanoacarreadores	69
6.10 Cinéticas de permeación <i>in vitro</i> de ALD.....	71
7. Conclusiones.....	75
8. Perspectivas	76
9. Bibliografía	77

10. Anexos	86
Anexo 1. Validación de métodos analíticos	86
Espectroscopía UV-visible.....	86
Espectroscopía de fluorescencia.....	87
Anexo 2. Análisis estadístico.....	89
Análisis estadístico de la caracterización de los sistemas microemulsificados.....	89
Análisis estadístico del efecto del tiempo de sonicación sobre la caracterización de SONS.	91
Análisis estadístico de la condiciones de almacenamiento sobre la estabilidad de los sistemas	97
Análisis estadístico del tipo de nanosistema sobre TEWL.....	109
Análisis estadístico del tipo de nanosistema sobre la velocidad de liberación del fármaco	112
Análisis estadístico del tipo de nanosistema sobre los parámetro de permeación del fármaco a través de la membrana Strat M®.....	113
Análisis estadístico del tipo de nanosistema sobre los parámetros de permeación del fármaco a través de piel de oreja de cerdo.....	117
Anexo 3. Documentos para pruebas de índice de eritema.....	119
Anexo 4. Evaluación de permeación <i>in vivo</i> en ratas.....	128
1. Detección de ALD por HPLC-fluorimetría.....	128
2. Animales	129
3. Canulación de la vena yugular.....	129
4. Administración y toma de muestras	130
5. Extracción del fármaco del plasma	131
Anexo 5. Artículo.....	135

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Nanoacarreadores estudiados para evaluar la permeación transdérmica de ALD.....	2
Figura 2. Composición del hueso	5
Figura 3. Proceso de remodelado óseo.....	6
Figura 4. Pirámide de edad de la población mexicana en 2010 y 2050.....	7
Figura 5. Osteoporosis en México. DMO (densidad mineral ósea).....	8
Figura 6. Estructuras de pirofosfato y bifosfonatos.....	11
Figura 7. Diagrama de un corte transversal de la piel.....	15
Figura 8. Estratos de la epidermis.....	17
Figura 9. Modelo de “ladrillo y cemento” estrato córneo.....	18
Figura 10. Rutas de permeación transepidérmica.....	19
Figura 11. Descripción del flujo de fármaco a través de la piel desde la formulación.....	20
Figura 12. Perfil de permeación típico para la aplicación de una dosis infinita a una membrana de piel humana	23
Figura 13. Efectos posibles de los promotores de la permeación sobre la estructura de la bicapa lipídica.....	26
Figura 14. Estructura molecular de Plurol [®] diisosteárico.....	27
Figura 15. Estructura molecular de Labrasol [®]	28
Figura 16. Estructura molecular de isoestearato isoestearílico.....	28
Figura 17. Preparación de nanosuspensiones sólido en aceite.....	29
Figura 18. Estructura molecular de miristato de isopropilo.....	30
Figura 19. A. Tween 80, B. Span 80, C. Sesquioleato de Sorbitán.....	30
Figura 20. Espectro IR de la piel.....	32
Figura 21. Cámara abierta de la sonda del Tewameter.....	34
Figura 22. Componentes de Mexameter.....	34
Figura 23. Celda de difusión tipo Franz.....	35
Figura 24. A. Micrografía Electrónica de Barrido de la membrana Strat M [®] , B. Estructura multicapa de la membrana Strat M [®]	36
Figura 25. Reacción entre ALD y ninhidrina.....	42
Figura 26. Complejo colorido obtenido después de la derivatización de ALD con ninhidrina.....	43
Figura 27. Complejo Morin-Al ³⁺	43
Figura 28. Determinación de la solubilidad del ALD.....	44
Figura 29. Metodología utilizada para la formación de diagramas pseudoternarios.....	45
Figura 30. Proceso de formación de nanosuspensiones sólido en aceite.....	46
Figura 31. Procedimiento para la medición de TEWL.....	49
Figura 32. A. Zonas delimitadas antes de aplicar los nanosistemas. B. Papel filtro utilizado para aplicar los nanosistemas.....	50

Figura 33. Posicionamiento de la piel en la celda del espectrofotómetro FT-IR ABB MB3000.....	51
Figura 34. Esquema de la evaluación de la liberación del fármaco desde las formulaciones estudiadas.....	52
Figura 35. Sistema montado para realizar la permeación. Baño de acrílico y celdas de difusión a 37° C.....	53
Figura 36. Esquema del procedimiento utilizado para realizar los estudios de permeación.....	54
Figura 37. Diagramas pseudoternarios con la región de existencia de microemulsiones (área sombreada) conteniendo agua, isoestearato isoestearílico y A. Labrasol®: Plurol® diisoesteárico (3:1), agua e isoestearato isoestearílico; B. Labrasol®: Plurol® diisoesteárico (2:1), agua e isoestearato isoestearílico ...	56
Figura 38. Reogramas de las microemulsiones estudiadas.....	59
Figura 39. Microemulsiones elegidas.....	59
Figura 40. Efecto del ultrasonido sobre la apariencias de las nanosuspensiones...	61
Figura 41. Nanosuspensiones elegidas elegidas.....	62
Figura 42. Efecto de las formulaciones elegidas sobre TEWL (n=3).....	66
Figura 43. Espectro IR de la piel control y después del tratamiento con las formulaciones elegidas	69
Figura 44. Perfiles de liberación de ALD desde las soluciones, microemulsiones y nanosuspensiones (n = 4).....	70
Figura 45. Perfiles de permeación <i>in vitro</i> de ALD desde los diferentes sistemas a través de A. Membrana sintética Strat M®, B. Piel de oreja de cerdo.....	72
Figura 46. Correlación temporal entre la cantidad de fármaco permeado a través de la membrana Strat M y piel de oreja de cerdo; A. ME1; B. ME2.....	74
Figura 47. Curva de calibración para cuantificar ALD por espectroscopía UV-Vis.....	87
Figura 48. Barrido de excitación/emisión del complejo Al ³⁺ -Morin en la longitud de onda de 300 a 600 nm.....	88
Figura 49. Curva de calibración para cuantificar ALD por fluorimetría (Strat® M).....	88
Figura 50. Curva de calibración para cuantificar ALD por fluorimetría (piel de oreja de cerdo).....	89
Figura 51. Prueba de comparaciones múltiples para tamaño de glóbulo de microemulsiones.....	91
Figura 52. Prueba de comparaciones múltiples para cantidad de fármaco cargado en microemulsiones.....	91
Figura 53. Prueba de comparaciones múltiples para efecto del tiempo de ultrasonido sobre el tamaño de partícula de las nanosuspensiones formuladas con Span® 80.....	93

Figura 54. Prueba de comparaciones múltiples para efecto del tiempo de ultrasonido sobre el tamaño de partícula de las nanosuspensiones formuladas con Span® 80 y Tween® 80.....	94
Figura 55. Prueba de comparaciones múltiples para efecto del tiempo de ultrasonido sobre el tamaño de partícula de nanosuspensiones formuladas con Sesquioleato de Sorbitán.....	94
Figura 56. Prueba de comparaciones múltiples para efecto del tiempo de ultrasonido sobre el tamaño de partícula de nanosuspensiones formuladas con Sesquioleato de Sorbitán y Tween® 80.....	95
Figura 57. Prueba de comparaciones múltiples para efecto del tiempo de ultrasonido sobre el %EP de nanosuspensiones formuladas con Span® 80.....	96
Figura 58. Prueba de comparaciones múltiples para efecto del tiempo de ultrasonido sobre el %EP de nanosuspensiones formuladas con Span® 80 y Tween® 80.....	96
Figura 59. Prueba de comparaciones múltiples para efecto del tiempo de ultrasonido sobre el %EP de nanosuspensiones formuladas con Sesquioleato de Sorbitán.....	97
Figura 60. Prueba de comparaciones múltiples para efecto del tiempo de ultrasonido sobre el %EP de nanosuspensiones formuladas con Sesquioleato de Sorbitán y Tween® 80.....	98
Figura 61 Prueba de comparaciones múltiples para para cantidad de fármaco cargado en ME1 bajo las condiciones $40 \pm 2^{\circ}\text{C}$, 75% HR.....	98
Figura 62 Prueba de comparaciones múltiples para tamaño de glóbulo de ME1 bajo las condiciones $40 \pm 2^{\circ}\text{C}$, 75% HR.....	99
Figura 63 Prueba de comparaciones múltiples para para cantidad de fármaco cargado en ME5 bajo las condiciones $40 \pm 2^{\circ}\text{C}$, 75% HR.....	100
Figura 64. Prueba de comparaciones múltiples para tamaño de glóbulo de ME5 bajo las condiciones $40 \pm 2^{\circ}\text{C}$, 75% HR.....	100
Figura 65. Prueba de comparaciones múltiples para % eficiencia del proceso en SONS2 bajo las condiciones $40 \pm 2^{\circ}\text{C}$, 75% HR.....	101
Figura 66. Prueba de comparaciones múltiples para tamaño de partícula en SONS2 bajo las condiciones $40 \pm 2^{\circ}\text{C}$, 75% HR.....	102
Figura 67 Prueba de comparaciones múltiples para % eficiencia del proceso en SONS10 bajo las condiciones $40 \pm 2^{\circ}\text{C}$, 75% HR.....	102
Figura 68 Prueba de comparaciones múltiples para tamaño de partícula en SONS10 bajo las condiciones $40 \pm 2^{\circ}\text{C}$, 75% HR.....	103
Figura 69. Prueba de comparaciones múltiples para para cantidad de fármaco cargado en ME1 bajo las condiciones $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$, 60% HR.....	104
Figura 70. Prueba de comparaciones múltiples para tamaño de glóbulo de ME1 bajo las condiciones $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$, 60% HR.....	104
Figura 71. Prueba de comparaciones múltiples para para cantidad de fármaco cargado en ME5 bajo las condiciones $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$, 60% HR.....	105

Figura 72. Prueba de comparaciones múltiples para tamaño de glóbulo de ME5 bajo las condiciones $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$, 60% HR.....	106
Figura 73. Prueba de comparaciones múltiples para % eficiencia del proceso en SONS2 bajo las condiciones $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$, 60% HR.....	106
Figura 74. Prueba de comparaciones múltiples para tamaño de partícula en SONS2 bajo las condiciones $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$, 60% HR.....	107
Figura 75. Prueba de comparaciones múltiples para % eficiencia del proceso en SONS10 bajo las condiciones $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$, 60% HR.....	108
Figura 76. Prueba de comparaciones múltiples para tamaño de partícula en SONS10 bajo las condiciones $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$, 60% HR.....	108
Figura 77. Prueba de comparaciones múltiples para efecto del tipo de nanosistema sobre la velocidad de liberación de ALD.....	113
Figura 78. Prueba de comparaciones múltiples para efecto del tipo de nanosistema sobre el flujo de ALD a través de la membrana Strat M [®]	115
Figura 79. Prueba de comparaciones múltiples para efecto del tipo de nanosistema sobre el coeficiente de permeabilidad (kp) de ALD a través de la membrana Strat M [®]	116
Figura 80. Prueba de comparaciones múltiples para efecto del tipo de nanosistema sobre la cantidad de ALD permeada por área a través de la membrana Strat M [®]	117
Figura 81. Reacción de derivatización de ALD con FMOC.....	129
Figura 82. Rata 24 horas después de la canulación.....	131
Figura 83. Ratas administradas por vía transdérmica.....	132
Figura 84. A. Procedimiento para la extracción de fármaco a través de cartuchos Oasis WAX; B. Cartucho Oasis WAX 3cc/60; C. Cámara de vacío utilizada para la extracción; D. Concentrador de muestras usado para evaporar eluyente (Stuart CBH130D/3).....	133
Figura 85. Mecanismos de retención de los cartuchos Oasis WAX.....	134
Figura 86. Esquema del proceso de extracción.....	135

ÍNDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 1. Fármacos aprobados por la FDA para la prevención y tratamiento de la osteoporosis.....	9
Tabla 2. Evidencia de la reducción del riesgo de fractura.....	10
Tabla 3. Espesor de los estratos de la piel en roedores y humano.....	37
Tabla 4. Solubilidad de ALD en diferentes componentes.....	55
Tabla 5. Excipientes utilizados para la elaboración de los diagramas pseudoternarios.....	55
Tabla 6. Composición, fármaco cargado y propiedades fisicoquímicas de las microemulsiones preparadas (n = 3).....	58
Tabla 7. Efecto del tipo de tensoactivo y del tiempo de sonicación sobre el tamaño y el %EP de las nanosuspensiones (n = 3).....	62
Tabla 8. Estabilidad de nanosistemas cargados con ALD almacenados a 40 ± 2°C / 75% de HR durante 6 meses (n = 3).....	64
Tabla 9. Estabilidad de nanosistemas cargados con ALD almacenados a 25 ± 2°C / 60% de HR durante 6 meses (n = 3).....	65
Tabla 10. Pruebas de formación de eritema con el sistema ME1 llevadas a cabo en el antebrazo humano (n=5).....	67
Tabla 11. Pruebas de formación de eritema con el sistema SONS2 llevadas a cabo en el antebrazo humano (n=5)	67
Tabla 12. Pruebas de formación de eritema con el sistema SONS10 llevadas a cabo en el antebrazo humano (n=5)	67
Tabla 13. Número de onda del espectro ATR-FTIR de los componentes del estrato córneo después del tratamiento con los nanosistemas (n=3).....	68
Tabla 14. Modelos y cinéticas de liberación de los nanoacarreadores seleccionados.....	71
Tabla 15. Parámetros de permeación transdérmica <i>in vitro</i> de ALD obtenido de las diferentes formulaciones estudiadas.....	74
Tabla 16. Resultados de la validación parcial para cuantificar ALD por espectroscopía UV-Vis.....	87
Tabla 17. Resultados de la validación parcial para cuantificar ALD por fluorimetría (Strat® M)	89
Tabla 18. Resultados de la validación parcial para cuantificar ALD por fluorimetría (piel de oreja de cerdo)	90
Tabla 19. Resultados de la caracterización de las microemulsiones.....	90
Tabla 20. Análisis de Varianza para tamaño de glóbulo de las microemulsiones	90
Tabla 21. Prueba de Rangos Múltiples para tamaño de glóbulo de las microemulsiones.....	91
Tabla 22. Análisis de Varianza para la cantidad de fármaco cargado en las microemulsiones.....	91
Tabla 23. Prueba de Rangos Múltiples para cantidad de fármaco cargado en las microemulsiones.....	92

Tabla 24. Efecto del tiempo de sonicación sobre la talla de partícula y el %EP de las nanosuspensiones.....	92
Tabla 25. Análisis de Varianza para el tamaño de partícula de las nanosuspensiones formuladas con Span [®] 80.....	93
Tabla 26. Prueba de Rangos Múltiples para la talla de partícula de nanosuspensiones formuladas con Span [®] 80.....	93
Tabla 27. Análisis de Varianza para el tamaño de partícula de las nanosuspensiones formuladas con Span [®] 80 y Tween [®] 80	93
Tabla 28. Prueba de Rangos Múltiples para la talla de partícula de nanosuspensiones formuladas con Span [®] 80 y Tween [®] 80.....	94
Tabla 29. Análisis de Varianza para el tamaño de partícula de las nanosuspensiones formuladas con Sesquioleato de sorbitán	94
Tabla 30. Prueba de Rangos Múltiples para la talla de partícula de nanosuspensiones formuladas con Sesquioleato de sorbitán.....	95
Tabla 31. Análisis de Varianza para el tamaño de partícula de las nanosuspensiones formuladas con Sesquioleato de sorbitán y Tween [®] 80.....	95
Tabla 32. Prueba de Rangos Múltiples para la talla de partícula de nanosuspensiones formuladas con Sesquioleato de sorbitán y Tween [®] 80.....	95
Tabla 33. Análisis de Varianza para el %EP de las nanosuspensiones formuladas con Span [®] 80.....	95
Tabla 34. Prueba de Rangos Múltiples para %EP de nanosuspensiones formuladas con Span [®] 80.....	96
Tabla 35. Análisis de Varianza para el %EP de las nanosuspensiones formuladas con Span [®] 80 y Tween [®] 80.....	96
Tabla 36. Prueba de Rangos Múltiples para %EP de nanosuspensiones formuladas con Span [®] 80 y Tween [®] 80.....	97
Tabla 37. Análisis de Varianza para el %EP de las nanosuspensiones formuladas con Sesquioleato de sorbitán.....	97
Tabla 38. Prueba de Rangos Múltiples para %EP de nanosuspensiones formuladas con Sesquioleato de sorbitán.....	97
Tabla 39. Análisis de Varianza para el %EP de las nanosuspensiones formuladas con Sesquioleato de sorbitán y Tween [®] 80.....	97
Tabla 40. Prueba de Rangos Múltiples para %EP de nanosuspensiones formuladas con Sesquioleato de sorbitán y Tween [®] 80.....	98
Tabla 41 Análisis de Varianza para cantidad de fármaco cargado en ME1 bajo las condiciones $40 \pm 2^{\circ}\text{C}$, 75% HR.....	98
Tabla 42. Prueba de Rangos Múltiples para cantidad de fármaco cargado en ME1 bajo las condiciones $40 \pm 2^{\circ}\text{C}$, 75% HR.....	99
Tabla 43. Análisis de Varianza para tamaño de glóbulo de ME1 bajo las condiciones $40 \pm 2^{\circ}\text{C}$, 75% HR.....	99
Tabla 44. Prueba de Rangos Múltiples tamaño de glóbulo de ME1 bajo las condiciones $40 \pm 2^{\circ}\text{C}$, 75% HR.....	99

Tabla 45. Análisis de Varianza para cantidad de fármaco cargado en ME5 bajo las condiciones $40 \pm 2^{\circ}\text{C}$, 75% HR.....	99
Tabla 46. Prueba de Rangos Múltiples para cantidad de fármaco cargado en ME5 bajo las condiciones $40 \pm 2^{\circ}\text{C}$, 75% HR.....	100
Tabla 47. Análisis de Varianza para tamaño de glóbulo de ME5 bajo las condiciones $40 \pm 2^{\circ}\text{C}$, 75% HR.....	100
Tabla 48. Prueba de Rangos Múltiples tamaño de glóbulo de ME5 bajo las condiciones $40 \pm 2^{\circ}\text{C}$, 75% HR.....	101
Tabla 49. Análisis de Varianza para % eficiencia del proceso en SONS2 bajo las condiciones $40 \pm 2^{\circ}\text{C}$, 75% HR.....	101
Tabla 50. Prueba de Rangos Múltiples para % eficiencia del proceso en SONS2 bajo las condiciones $40 \pm 2^{\circ}\text{C}$, 75% HR.....	101
Tabla 51. Análisis de Varianza para tamaño de partícula en SONS2 bajo las condiciones $40 \pm 2^{\circ}\text{C}$, 75% HR.....	101
Tabla 52. Prueba de Rangos Múltiples para tamaño de partícula en SONS2 bajo las condiciones $40 \pm 2^{\circ}\text{C}$, 75% HR.....	102
Tabla 53. Análisis de Varianza para % eficiencia del proceso en SONS10 bajo las condiciones $40 \pm 2^{\circ}\text{C}$, 75% HR.....	102
Tabla 54. Prueba de Rangos Múltiples para % eficiencia del proceso en SONS10 bajo las $40 \pm 2^{\circ}\text{C}$, 75% HR.....	103
Tabla 55. Análisis de Varianza para tamaño de partícula en SONS10 bajo las condiciones $40 \pm 2^{\circ}\text{C}$, 75% HR.....	103
Tabla 56. Prueba de Rangos Múltiples para tamaño de partícula en SONS10 bajo las condiciones $40 \pm 2^{\circ}\text{C}$, 75% HR.....	103
Tabla 57. Análisis de Varianza para cantidad de fármaco cargado en ME1 bajo las condiciones $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$, 60% HR.....	103
Tabla 58. Prueba de Rangos Múltiples para cantidad de fármaco cargado en ME1 bajo las condiciones $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$, 60% HR.....	104
Tabla 59. Análisis de Varianza para tamaño de glóbulo de ME1 bajo las condiciones $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$, 60% HR.....	104
Tabla 60. Prueba de Rangos Múltiples tamaño de glóbulo de ME1 bajo las condiciones $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$, 60% HR.....	105
Tabla 61. Análisis de Varianza para cantidad de fármaco cargado en ME5 bajo las condiciones $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$, 60% HR.....	105
Tabla 62. Prueba de Rangos Múltiples para cantidad de fármaco cargado en ME5 bajo las condiciones $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$, 60% HR.....	105
Tabla 63. Análisis de Varianza para tamaño de glóbulo de ME5 bajo las condiciones $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$, 60% HR.....	105
Tabla 64. Prueba de Rangos Múltiples tamaño de glóbulo de ME5 bajo las condiciones $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$, 60% HR.....	106
Tabla 65. Análisis de Varianza para % eficiencia del proceso en SONS2 bajo las condiciones $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$, 60% HR.....	106

Tabla 66. Prueba de Rangos Múltiples para % eficiencia del proceso en SONS2 bajo las condiciones $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$, 60%.....	107
Tabla 67. Análisis de Varianza para tamaño de partícula en SONS2 bajo las condiciones $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$, 60% HR.....	107
Tabla 68. Prueba de Rangos Múltiples para tamaño de partícula en SONS2 bajo las condiciones $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$, 60% HR.....	107
Tabla 69. Análisis de Varianza para % eficiencia del proceso en SONS10 bajo las condiciones $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$, 60% HR.....	107
Tabla 70. Prueba de Rangos Múltiples para % eficiencia del proceso en SONS10 bajo las condiciones $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$, 60% HR.....	108
Tabla 71. Análisis de Varianza para tamaño de partícula en SONS10 bajo las condiciones $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$, 60% HR.....	108
Tabla 72. Prueba de Rangos Múltiples para tamaño de partícula en SONS10 bajo las condiciones $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$, 60% HR.....	109
Tabla 73. Prueba t para dos muestras suponiendo varianzas iguales para la diferencia de % Eficiencia del proceso con respecto al tiempo inicial para SONS2 a 6 meses bajo las distintas condiciones de almacenamiento estudiadas...	109
Tabla 74. Prueba t para dos muestras suponiendo varianzas iguales para la diferencia de tamaño de partícula con respecto al tiempo inicial para SONS2 a 6 meses bajo las distintas condiciones de almacenamiento estudiadas.....	109
Tabla 75. Prueba t para dos muestras suponiendo varianzas iguales para la diferencia de % Eficiencia del proceso con respecto al tiempo inicial para SONS10 a 6 meses bajo las distintas condiciones de almacenamiento estudiadas..	110
Tabla 76. Prueba t para dos muestras suponiendo varianzas iguales para la diferencia de tamaño de partícula con respecto al tiempo inicial para SONS10 a 6 meses bajo las distintas condiciones de almacenamiento estudiadas.....	110
Tabla 77. Resultados de TEWL antes y posterior al tratamiento con cada formulación.....	110
Tabla 78. Prueba t para medias de dos muestras emparejadas para el valor de TEWL antes y después de la aplicación de la ME1.....	111
Tabla 79. Prueba t para medias de dos muestras emparejadas para el valor de TEWL antes y después de la aplicación de la ME5.....	111
Tabla 80. Prueba t para medias de dos muestras emparejadas para el valor de TEWL antes y después de la aplicación de la SONS 2.....	112
Tabla 81. Prueba t para medias de dos muestras emparejadas para el valor de TEWL antes y después de la aplicación de la SONS 10.....	112
Tabla 82. Velocidad de liberación de ALD desde los sistemas estudiados.....	113
Tabla 83. Análisis de Varianza para la velocidad de liberación de ALD.....	113
Tabla 84. Prueba de Rangos Múltiples para la velocidad de liberación de ALD..	113
Tabla 85. Flujo de ALD obtenido con las formulaciones estudiadas a través de la membrana Strat M [®]	114
Tabla 86. Coeficiente de permeabilidad obtenido con las formulaciones estudiadas a través de la membrana Strat M [®]	114

Tabla 87. Cantidad de ALD permeada por área obtenida con las formulaciones estudiadas a través de la membrana Strat M [®]	114
Tabla 88. Análisis de Varianza para el flujo de ALD a través de la membrana Strat M [®]	114
Tabla 89. Prueba de Rangos Múltiples para el flujo de ALD a través de la membrana Strat M [®]	115
Tabla 90. Prueba t para dos muestras suponiendo varianzas iguales para los valores de J de SONS (5-168h).....	115
Tabla 91. Análisis de Varianza para el coeficiente de permeabilidad a través de la membrana Strat M [®]	116
Tabla 92. Prueba de Rangos Múltiples para el coeficiente de permeabilidad a través de la membrana Strat M [®]	116
Tabla 93. Prueba t para dos muestras suponiendo varianzas iguales para los valores de Kp de SONS (5-168h).....	116
Tabla 94. Análisis de Varianza para la cantidad permeada por área a través de la membrana Strat M [®]	117
Tabla 95. Prueba de Rangos Múltiples para la cantidad permeada por área a través de la membrana Strat M [®]	117
Tabla 96. Parámetros de permeación obtenidos con las MEs a través de piel de oreja de cerdo.....	118
Tabla 97. Prueba t para dos muestras suponiendo varianzas iguales para los valores de J de ME a través de piel de oreja de cerdo.....	118
Tabla 98. Prueba t para dos muestras suponiendo varianzas iguales para los valores de Kp de ME a través de piel de oreja de cerdo.....	118
Tabla 99. Prueba t para dos muestras suponiendo varianzas iguales para los valores de Q de ME a través de piel de oreja de cerdo.....	119
Tabla 100. Vías de administración.....	131
Tabla 101. Peso y vía de administración de animales.....	132
Tabla 102. Porcentaje de recobro obtenido después de la extracción del ALD a través del cartucho.....	135

ABREVIATURAS

Abreviatura	Significado
ALD	Alendronato
AMP	Adenosín Monofosfato
ANT	Adenin nucleótido translocasa
AppCp y Apppl	Análogo de ATP no hidrolizable
ATP	Adenosín Trifosfato
BP	Bifosfonatos
°C	Grados Celsius
Da	Daltones
DLS	Dispersión dinámica de luz
DMO	Densidad mineral ósea
%EP	Porcentaje de eficiencia del proceso
EMA	Agencia Europea de Medicamentos
FDA	Food and drug administration
FES	Facultad de estudios superiores
FMOC	9-fluorenil metil cloroformato
FPP	Farnesil pirofosfato
FPPS	Farnesil pirofosfato sintasa
FTIR	Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier
g	gramo
GGPP	Geranilgeranil difosfato
GTP	Guanosín Trifosfato
HPLC	Cromatografía de alta resolución
HR	Humedad relativa
IPD	Índice de polidispersión
IPM	Miristato de isopropilo
IPP	Isopentenil pirofosfato
IV	Administración intravenosa
J	Flujo
kg	Kilogramo
Kp	Coefficiente de permeabilidad

NBP	Bifosfonatos nitrogenados
nm	Nanómetro
ME	Microemulsión
mg	Miligramo
mL	Mililitro
µg	Microgramo
µL	Microlitro
pH	Potencial de hidrógeno
Q_T	Cantidad acumulada de fármaco permeada
rpm	Revoluciones por minuto
s	Segundo
SC	Administración subcutánea
SONS	Nanosuspensión sólido en aceite
TEWL	Pérdida de agua transepidermica
UI	Unidades internacionales
UV-vis	Ultravioleta-visible
VO	Administración oral
w/o	Agua en aceite

ABSTRACT

This work focuses on the study of the transport through the skin of a hydrophilic drug (sodium alendronate) loaded in nanosystems, microemulsions and solid-in-oil nanosuspensions intended for the osteoporosis treatment, with the aim of avoiding the oral and intravenous administration drawbacks.

Microemulsions were formulated with Labrasol[®], Plurol[®] diisostearique and isotearyl isostearate; while nanosuspensions were prepared with isopropyl myristate, Span[®] 80, sorbitan sesquiolate and Tween[®] 80. Systems were characterized by particle/globule size, polydispersity index, loading capacity, conductivity and viscosity. Formulations with the best technological characteristics were chosen to perform *in vitro* release studies and skin permeation profiles.

In vitro release studies revealed the effect of the system type on the release kinetics of the drug. The microemulsions presented higher release rates than the nanosuspension, which can be attributed to the tortuous pathways that the drug had to overcome in the case of the latter systems. *In vitro* permeation studies were carried out through the synthetic membrane Strat M[®] (microemulsions and nanosuspensions), as well as through the pigskin (microemulsions). Although all the nanosystems promoted the permeation of the drug in relation to an aqueous solution of the drug, the highest fluxes were obtained with microemulsions. The effect of nanosystems on the permeability barrier of the stratum corneum was evaluated with transdermal water loss measurements and by attenuated total reflectance-Fourier Transform infrared spectroscopy.

The safety of the nanosystems was assessed by measuring the erythema intensity produced after its removal from the skin.

The results obtained in this work suggest that microemulsions are a viable carrier for the transdermal release of alendronate in the treatment of osteoporosis.

RESUMEN

Este trabajo se enfoca en el estudio del transporte de un fármaco hidrofílico (alendronato sódico) cargado en nanosistemas (microemulsiones y nanosuspensiones sólido en aceite) a través de la piel para el tratamiento de la osteoporosis con el fin de evitar los inconvenientes de su administración oral e intravenosa.

Las microemulsiones fueron formuladas con Labrasol[®], Plurol[®] diisoesteárico e isoestearato de isoestearilo; mientras que las nanosuspensiones contenían miristato de isopropilo, Span[®] 80, Sesquioleato de sorbitán y Tween[®] 80. Los sistemas se caracterizaron por tamaño de partícula/glóbulo, índice de polidispersión, cantidad de fármaco cargado, viscosidad y conductividad. Las formulaciones cuyas características permitirían alcanzar una permeación transdérmica fueron elegidas para realizar las siguientes evaluaciones.

Las cinéticas de liberación *in vitro* del alendronato mostraron la influencia del tipo de nanosistema sobre la velocidad de liberación del fármaco. Las microemulsiones presentaron una mayor velocidad que las nanosuspensiones debido a la tortuosidad de la ruta que debe recorrer el fármaco en estos últimos sistemas.

Los estudios de permeación *in vitro* se realizaron a través de una membrana sintética Strat M[®] (microemulsiones y nanosuspensiones) y a través de piel de oreja de cerdo (microemulsiones). Todos los sistemas mejoraron la permeación de alendronato al ser comparados con una solución del fármaco. Sin embargo, las microemulsiones presentaron los mayores valores de flujo.

Se llevaron a cabo estudios de pérdida de agua transepidérmica y de espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier con el fin de conocer el efecto de los sistemas sobre la barrera que representa el estrato córneo.

La seguridad de los sistemas se evaluó con base en el grado de eritema que generaban las formulaciones placebo al contacto con la piel.

Estos resultados sugieren que la microemulsiones pueden ser un nanoacarreador transdérmico adecuado para el tratamiento de la osteoporosis.

1. Introducción

La osteoporosis es un desorden esquelético que se caracteriza por la falta de equilibrio en el proceso de remodelado óseo, donde la resorción del hueso excede la formación del mismo, generando una baja densidad ósea y una degeneración de la arquitectura del hueso lo que conlleva a una disminución de la fortaleza ósea y un aumento del riesgo de fracturas. Este desorden representa un problema de salud pública importante y creciente, el cual causa dolor, pérdida de la función motora e incremento de la mortalidad [1].

México está enfrentando una transición epidemiológica con un elevado número de personas ancianas y un incremento de la esperanza de vida. La población de 50 años o más representa actualmente 19 millones, y aumentará a 55 millones para el 2050. Debido a que la osteoporosis es una enfermedad asociada al envejecimiento, se espera que el número de fracturas osteoporóticas aumente de manera similar [2].

La principal terapia farmacológica aprobada por la FDA (Food and Drug Administration) y en México por la Secretaría de Salud para el tratamiento de la osteoporosis incluye el uso de bifosfonatos [3-4], siendo el alendronato (ALD) el más utilizado. No obstante, su administración oral se ha asociado con osteonecrosis de la mandíbula, fibrilación auricular y dolor muscoesquelético. Debe ser administrado antes del primer alimento del día. Los pacientes deben permanecer erguidos después de 30 a 60 minutos de la administración para evitar la irritación esofágica y el cáncer esofágico crónico. La suma de estos factores representa un problema debido a que la mayoría de los pacientes son de edad avanzada lo que complica la administración y deteriora la calidad de vida [4-7].

Por otro lado, bajo condiciones ideales, la biodisponibilidad oral de este fármaco es aproximadamente 0.9-1.8% debido a su alta polaridad, su carga negativa a pH fisiológico y su hidrofiliidad [4, 6, 7].

Debido a los inconvenientes mencionados el desarrollo de una ruta alterna a la oral es deseable. En este sentido, la liberación transdérmica de fármacos posee varias ventajas sobre la ruta oral: evita el metabolismo hepático, la administración es sencilla y más conveniente para el paciente, existe la posibilidad de un retiro inmediato del tratamiento si es necesario. A pesar del gran potencial de la liberación transdérmica, existen pocas formulaciones disponibles en el mercado. La principal razón es la barrera que representa el estrato córneo, una estructura compuesta por una matriz rica en lípidos

con queratinocitos embebidos, la que es considerada como el epitelio más impermeable a sustancias exógenas [8–10]. El mayor obstáculo de la liberación transdérmica de ALD es su baja lipofilia y carga negativa a pH fisiológico [12].

El uso de nanoacarreadores y promotores de la permeación son una opción para mejorar la permeación a través del estrato córneo. El objetivo de este trabajo fue investigar la habilidad de un sistema nanoacarreador para incorporar y liberar ALD de manera transdérmica con el fin de evitar los inconvenientes que conlleva la administración oral. Para este fin, se formularon, caracterizaron y evaluaron microemulsiones (ME) y nanosuspensiones sólido en aceite (SONS) (Figura 1).

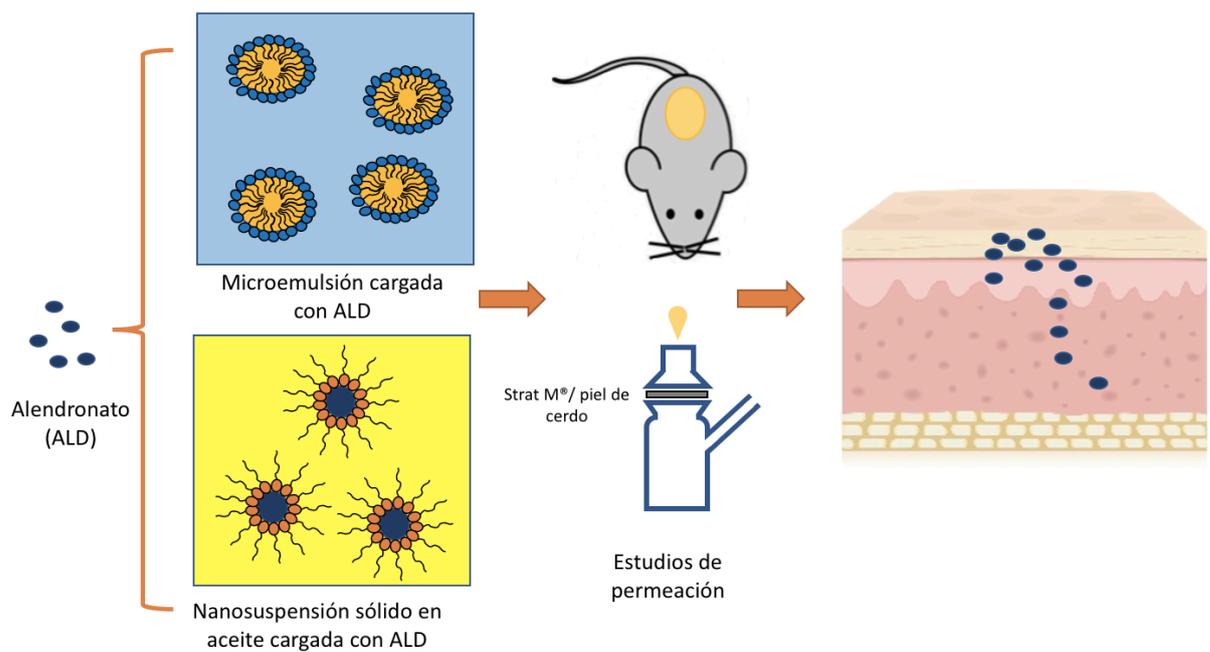


Figura 1. Nanoacarreadores estudiados para evaluar la permeación transdérmica de ALD

2. Marco teórico

2.1 Organización del hueso

El hueso es una estructura porosa mineralizada formada por células, vasos y cristales de compuestos de calcio (hidroxiapatita). Su proporción varía de acuerdo al tipo de hueso y región del cuerpo [13].

Los componentes estructurales del hueso consisten en la matriz extracelular (altamente mineralizada), colágeno, y células. El esqueleto humano está compuesto por dos tipos de hueso: cortical o compacto y trabecular (Figura 2), que son diferentes macroscópicamente y microscópicamente pero cuya composición química es idéntica. El hueso cortical compone el 80% del esqueleto, es denso y compacto, tiene una lenta velocidad de renovación y alta resistencia a la torsión, constituye la parte más externa de las estructuras esqueléticas. La mayor parte del hueso cortical está calcificado y su función es otorgar fuerza mecánica y protección, también puede participar en procesos metabólicos, en especial cuando existe una deficiencia prolongada de mineral. El hueso trabecular constituye el 20% de masa esquelética pero el 80% de la superficie del hueso. Es menos denso, más elástico y tiene una velocidad de renovación mayor que el hueso cortical por lo que posee una función metabólica mayor. Contribuye al soporte mecánico, principalmente en huesos como las vértebras, y provee el suministro inicial de mineral en estados de deficiencia aguda [13].

2.2 Mineralización ósea

La matriz ósea es la responsable de las propiedades mecánicas del hueso y está compuesta principalmente por fibras de colágeno tipo I (dos cadenas $\alpha 1$ y una cadena $\alpha 2$) y proteínas no colágenas (proteoglicanos, glicoproteínas y proteínas que contienen γ -ácido glutámico), representa aproximadamente el 90% de la composición orgánica de todo el tejido óseo; dentro de las fibras de colágeno existen cristales de hidroxiapatita que tienden a orientarse en la misma dirección que las fibras [13-14].

Los osteoblastos son las células responsables de la producción de los constituyentes de la matriz ósea. Trabajan en grupo a lo largo de la superficie del hueso, recubriendo la capa de matriz ósea que producen. El 15% de los osteoblastos maduros quedan atrapados en la matriz ósea diferenciándose en osteocitos. Otros permanecen en la superficie del hueso, convirtiéndose en células de revestimiento plano. La formación ósea se produce en tres fases sucesivas: la producción y la maduración de la matriz osteoide, seguida de la mineralización de la matriz. En un hueso adulto normal, estos

procesos ocurren a la misma velocidad, de modo que el equilibrio entre la producción de matriz y la mineralización es igual. Inicialmente, los osteoblastos producen osteoides al depositar colágeno rápidamente. A esto le sigue un aumento en la tasa de mineralización para igualar la síntesis de colágeno. En la etapa final, la tasa de síntesis de colágeno disminuye y la mineralización continúa hasta que el osteoide se mineraliza completamente [13].

Los osteoclastos son células multinucleadas gigantes derivadas de células hematopoyéticas responsables de la reabsorción ósea. Generalmente se encuentran en contacto con una superficie ósea calcificada y dentro de una laguna (lagunas de Howship) como resultado de su propia actividad de reabsorción [13].

Los osteoclastos poseen abundantes complejos de Golgi, mitocondrias y vesículas de transporte cargadas con enzimas lisosomales. Presentan pliegues profundos de la membrana plasmática en el área orientada hacia la matriz ósea (borde ondulado) y la zona circundante a la unión (zona de sellado). Las enzimas lisosomales, fosfatasa ácida resistente a tartrato y catepsina K, son sintetizadas activamente por el osteoclasto y se secretan a través del borde ondulado en el compartimento de reabsorción ósea [13].

Los osteoclastos reabsorben el hueso por acidificación y proteólisis de la matriz ósea y de los cristales de hidroxiapatita encapsulados dentro de la zona de sellado. El primer proceso durante la reabsorción de la matriz ósea es la movilización de los cristales de hidroxiapatita por digestión de su enlace con el colágeno. Luego, las fibras de colágeno residuales se digieren con catepsinas o colagenasas activadas y los residuos de estas se internalizan o transportan a través de la célula y se liberan en el dominio basolateral [13].

Como se mencionó anteriormente, los osteocitos son osteoblastos atrapados en un osteoide. La actividad metabólica del osteoblasto es menor cuando se encuentra completamente encerrado en la matriz ósea, sin embargo, todavía producen proteínas de la matriz. Los osteocitos forman una red de canalículos delgados que impregnan toda la matriz ósea [13].

La actividad funcional y estructural de los osteocitos varía según la edad celular. Un osteocito joven tiene la mayoría de las características estructurales del osteoblasto pero el volumen celular y la capacidad de síntesis de proteínas son menores. Un osteocito más antiguo presenta una disminución adicional en el volumen celular y una

acumulación de glucógeno en el citoplasma. Finalmente los osteocitos se fagocitan y digieren durante la reabsorción ósea osteoclástica [13].

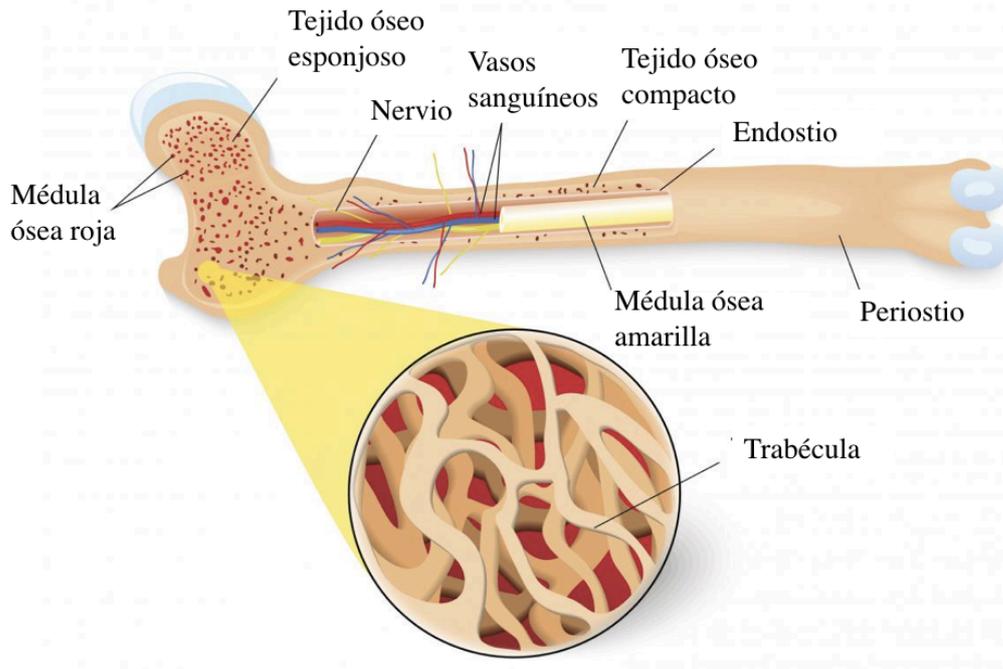


Figura 2. Composición del hueso [15]

2.3 Remodelado óseo

El esqueleto cambia constantemente a través del tiempo. Durante la niñez y la adolescencia, cambia en tamaño, forma y constitución por un proceso llamado modelado. El cambio en forma y tamaño se completa con el cierre epifisario en la pubertad, seguido de un período de consolidación que dura entre 5 a 10 años dependiendo del sitio del esqueleto hasta que un pico de masa ósea adulta es alcanzado, que usualmente ocurre en la adolescencia tardía o en los primeros 20 años [8].

Una vez que el pico de masa ósea se alcanzó, toma lugar el proceso llamado remodelado óseo, durante el cual, el hueso viejo se reemplaza por nuevo. El remodelado está gobernado por la acción de los osteoclastos que reabsorben el hueso viejo y los osteoblastos que producen hueso nuevo [8].

Defectos como microfracturas pueden ser reparadas gracias a este acoplamiento. En un equilibrio homeostático, la resorción y la formación se equilibra de manera que el hueso viejo se reemplaza continuamente por tejido nuevo para que se adapte a la carga mecánica y la tensión [13].

Los osteoclastos y los osteoblastos colaboran estrechamente en el proceso de remodelado. La organización en el hueso cortical y trabecular difiere, pero las

diferencias son principalmente morfológicas más que biológicas. En el hueso cortical se forma un canal cilíndrico de aproximadamente 2,000 μm de largo y 150-200 μm de ancho y penetra gradualmente en el hueso con una velocidad de 20-40 $\mu\text{m}/\text{día}$. Durante un ciclo, 10 osteoclastos cavan un túnel circular en la dirección de carga dominante y son seguidos por varios miles de osteoblastos que llenan el túnel. De esta manera, entre el 2 y el 5% del hueso cortical se remodela cada año. El hueso trabecular se remodela de manera más activa que el hueso cortical debido a la mayor relación superficie/volumen. Los osteoclastos viajan a una velocidad de aproximadamente 25 $\mu\text{m}/\text{día}$, cavando una zanja con 40-60 μm de profundidad [13].

El ciclo de remodelación consta de tres fases consecutivas: reabsorción, reversa y formación (Figura 3). La reabsorción comienza con la migración de preosteoclastos mononucleares parcialmente diferenciados a la superficie ósea, donde forman osteoclastos multinucleados. Después de completar la reabsorción osteoclástica, hay una fase de reversión cuando aparecen células mononucleares en la superficie ósea. Estas células preparan la superficie para que los nuevos osteoblastos comiencen la formación ósea y proporcionen señales para la diferenciación y migración de los osteoblastos. La fase de formación continúa con los osteoblastos que depositan el hueso hasta que el hueso reabsorbido se reemplaza por completo por el nuevo. Cuando se completa esta fase, la superficie se cubre con células aplanadas hasta que se inicia un nuevo ciclo de remodelación [13].

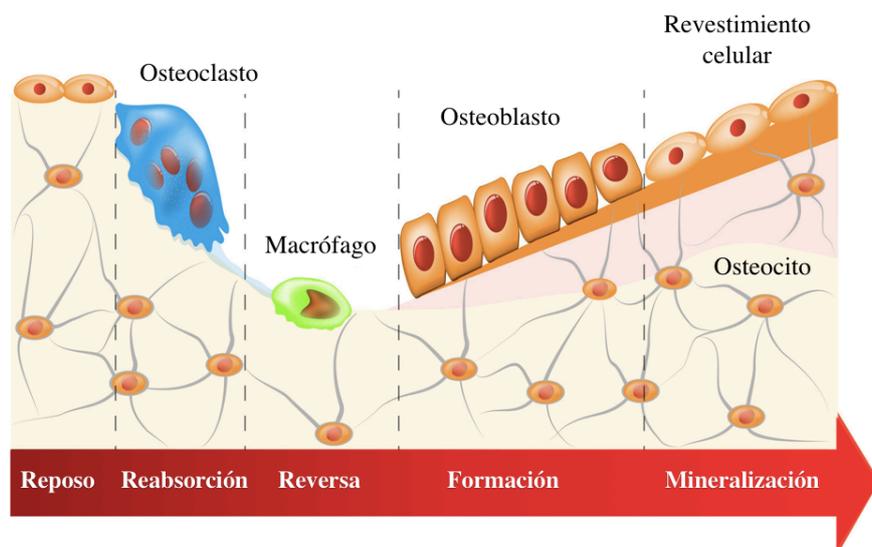


Figura 3. Proceso de remodelado óseo [16]

2.4 Osteoporosis

La osteoporosis es un trastorno óseo silencioso que aumenta el riesgo de fractura en una persona debido a la baja densidad mineral ósea y/o a la disminución de la resistencia ósea. Esta condición es asintomática, a menudo permanece sin diagnosticar hasta que se manifiesta como una fractura por cadera, columna vertebral, húmero, pelvis y/o muñeca [1].

Las fracturas osteoporóticas se asocian con un mayor riesgo de discapacidad, colocación en un hogar de ancianos y lesiones que pueden complicarse causando incluso la muerte. El riesgo de osteoporosis aumenta con la edad, y su impacto aumentará a medida que envejezca la población [17].

2.4.1 Epidemiología en México

Consistentemente con las tendencias en otras regiones del mundo, México se enfrenta a una transición epidemiológica con un número creciente de personas ancianas y un incremento en la esperanza de vida. La esperanza de vida al nacimiento ha aumentado casi 39 años en promedio en las últimas siete décadas (de 36.2 a 75 años) [2]. La población mayor de 60 años se triplicará de 6.3 % del total de la población en 2010 a casi 23% en 2050 (Figura 4) [18].

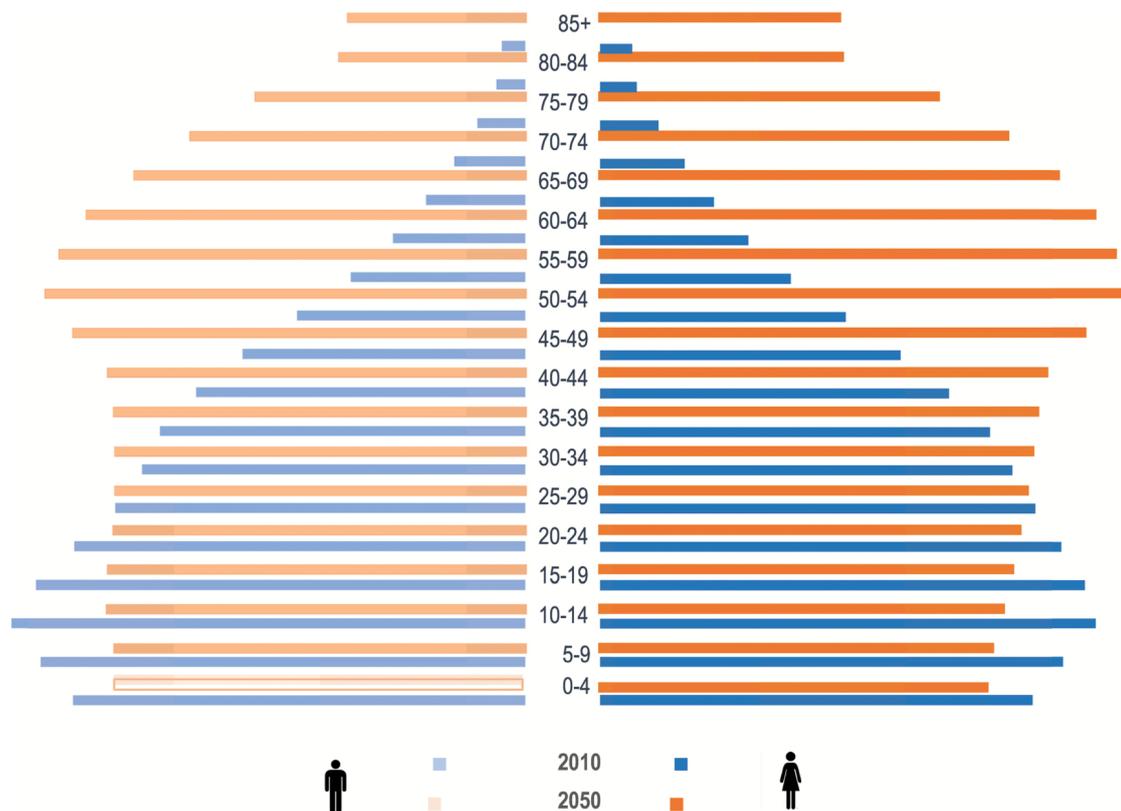


Figura 4. Pirámide de edad de la población mexicana en 2010 y 2050 [19]

En México la prevalencia de osteoporosis en hombres y mujeres mayores a 50 años de edad es de 17 y 9% en el área lumbar de la columna, respectivamente y de 16 y 6% en fémur, respectivamente (Figura 5). El número de fracturas de cadera se incrementa drásticamente con la edad tanto en hombres como en mujeres. El riesgo de fractura de cadera a lo largo de la vida es de 8.5% en mujeres y 3.8% en hombres [2].

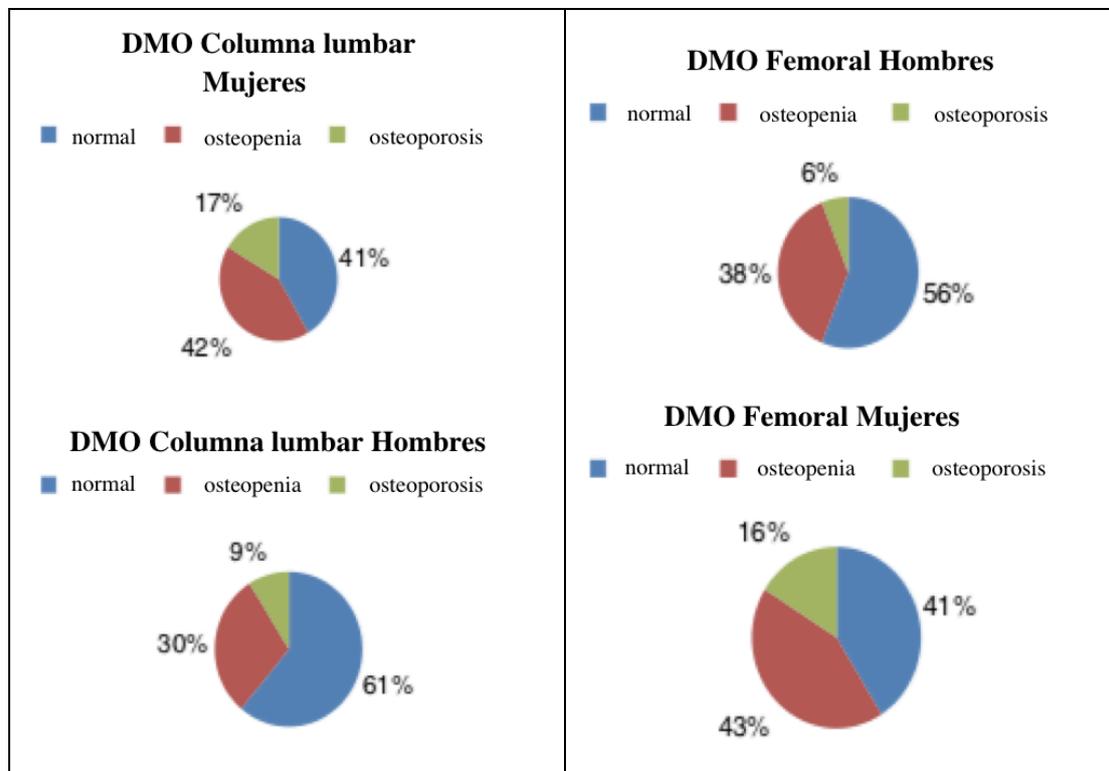


Figura 5. Osteoporosis en México. DMO (densidad mineral ósea) [2]

2.4.2 Patogénesis de la osteoporosis

La baja densidad y fragilidad ósea en adultos puede ser el resultado de un bajo pico de masa ósea en la adultez temprana, de una excesiva pérdida de hueso en edades avanzadas o de ambas [8].

El proceso de remodelado óseo se encuentra en equilibrio (la velocidad de formación de hueso es igual a la velocidad de resorción de hueso) al menos hasta la quinta década de vida. Durante este período existe generalmente una ganancia o pérdida neta de hueso pequeña [8].

En mujeres, los cambios hormonales que ocurren en la perimenopausia y en la postmenopausia inmediata conllevan a una pérdida de hueso acelerada debido a un desequilibrio en el proceso de remodelado. Durante este período hay una pérdida de aproximadamente de 1% de hueso por año, o aproximadamente 10% durante la transición menopáusica [8].

Aunado a este detrimento de masa ósea asociada a la menopausia, la pérdida de hueso relacionada a la edad comienza en la sexta década de la vida tanto en hombres como en mujeres y mantiene una velocidad de pérdida de cerca de 0.5% por año [8].

Asimismo, la calidad del hueso a lo largo de la vida sufre cambios que incluyen alteraciones en elementos de la microarquitectura del hueso esponjoso, expansión de la cubierta perióstica, adelgazamiento cortical, decremento en la mineralización de elementos individuales del esqueleto, entre otros [8].

2.5 Agentes farmacológicos para el tratamiento de osteoporosis

Existen varios medicamentos aprobados por la FDA (Food and Drug Administration) para la prevención y el tratamiento de osteoporosis (Tabla 1) [20].

Tabla 1. Fármacos aprobados por la FDA para la prevención y tratamiento de la osteoporosis [20-21]

Fármaco	Prevención	Tratamiento
Abaloparatida (Tymlos)	_____	80 µg SC por día
Alendronato (Fosamax)	5 mg VO por día 35 mg VO semanal	10 mg VO por día* 70 mg VO semanal* 70 mg + D
Calcitonina (Miacalcin, Fortical)	_____	200 UI intranasalmente por día, o 100 UI SC cada dos días
Denosumab (Prolia)	_____	60 mg SC cada 6 meses*
Estrógenos (múltiples formulaciones)	Múltiples regímenes	_____
Ibandronato (Boniva, forma genérica)	2.5 mg VO por día 150 mg VO mensualmente	2.5 mg VO por día 150 mg VO mensualmente* 3 mg IV cada 3 meses
Raloxifeno (Evista)	60 mg VO por día*	60 mg VO por día*
Risedronato (Actonel, Atelvia, forma genérica)	5 mg VO por día 35 mg VO semanal 150 mg VO por mes	5 mg VO por día* 35 mg VO semanal* 150 mg VO por mes
Romozosumab (Evenity)	_____	210 mg SC por mes
Teriparatida (Forteo)	_____	20 µg SC por día*
Zoledronato (Reclast, infusión genérica)	5 mg IV cada 2 años	5 mg IV cada año*
<p>Abreviaciones: VO: Administración oral, UI: Unidades Internacionales, SC: Administración Subcutánea, IV: Administración intravenosa ·Fosamax 70 mg está disponible como tableta y como dosis líquida única ·Fosamax Plus D es una tableta con 70 mg de Alendronato y 2,800 IU o 5,600 UI de vitamina D para administración semanal *Tratamientos aprobados por la Secretaría de Salud de los Estados Unidos Mexicanos [4]</p>		

No hay ensayos comparativos con un punto final preplaneado de fracturas que comparen un fármaco con otro [21].

Cuatro agentes (alendronato, risedronato, ácido zoledrónico y denosumab) tienen evidencia de la eficacia antifractura de “amplio espectro” (espina dorsal, cadera y reducción del riesgo de fractura no vertebral) y generalmente se consideran como opciones iniciales para la mayoría de pacientes candidatos a tratamiento (Tabla 2). Los pacientes con riesgo bajo o moderado de fractura pueden empezar con administración oral. Los agentes inyectables son considerados como terapia inicial para aquellos pacientes con alto riesgo de fractura, con problemas en tracto gastrointestinal superior que no pueden tolerar la medicación oral o con problemas del tracto gastrointestinal inferior que no les permitan absorber medicaciones orales. Ibandronato y raloxifeno pueden ser apropiados para pacientes con alto riesgo de fractura de espina dorsal pero sin riesgo de fractura en cadera y fracturas no vertebrales [21].

Denosumab es el fármaco de elección para pacientes con insuficiencia renal, pero no es recomendado para pacientes con diálisis o aquellos con enfermedad renal etapa 5 debido al alto riesgo de hipocalcemia [21].

Tabla 2. Evidencia de la reducción del riesgo de fractura [20]

Fármaco	Fractura		
	Vertebral	No vertebral	Cadera
Abaloparatida (Tymlos)	Sí	Sí	Sin efectos demostrados
Alendronato (Fosamax)	Sí	Sí	Sí
Calcitonina (Miacalcin, Fortical)	Sí	Sin efectos demostrados	Sin efectos demostrados
Denosumab (Prolia)	Sí	Sí	Sí
Ibandronato (Boniva)	Sí	Sin efectos demostrados	Sin efectos demostrados
Raloxifeno (Evista)	Sí	Sin efectos demostrados	Sin efectos demostrados
Risedronato (Actonel, Atelvia)	Sí	Sí	Sí
Romozosumab (Evenity)	Sí	*	*
Teriparatida (Forteo)	Sí	Sí	Sin efectos demostrados
Zoledronato (Reclast)	Sí	Sí	Sí

*Se obtuvo reducción de las fracturas no vertebrales y de cadera en el mes 24 para pacientes que recibieron 12 meses de romozosumab seguidos por 12 meses de alendronato comparados con pacientes que recibieron 24 meses de alendronato.

2.5.1 Bifosfonatos (BPs)

Los bifosfonatos son compuestos derivados químicamente de los pirofosfatos que inhiben la precipitación del carbonato de calcio. Están clasificados en dos grupos: los que contienen y los que no contienen nitrógeno. Los bifosfonatos poseen una gran afinidad al hueso y se usan de forma rutinaria para el tratamiento de la resorción ósea, osteoporosis y tumores inducidos por osteólisis [22].

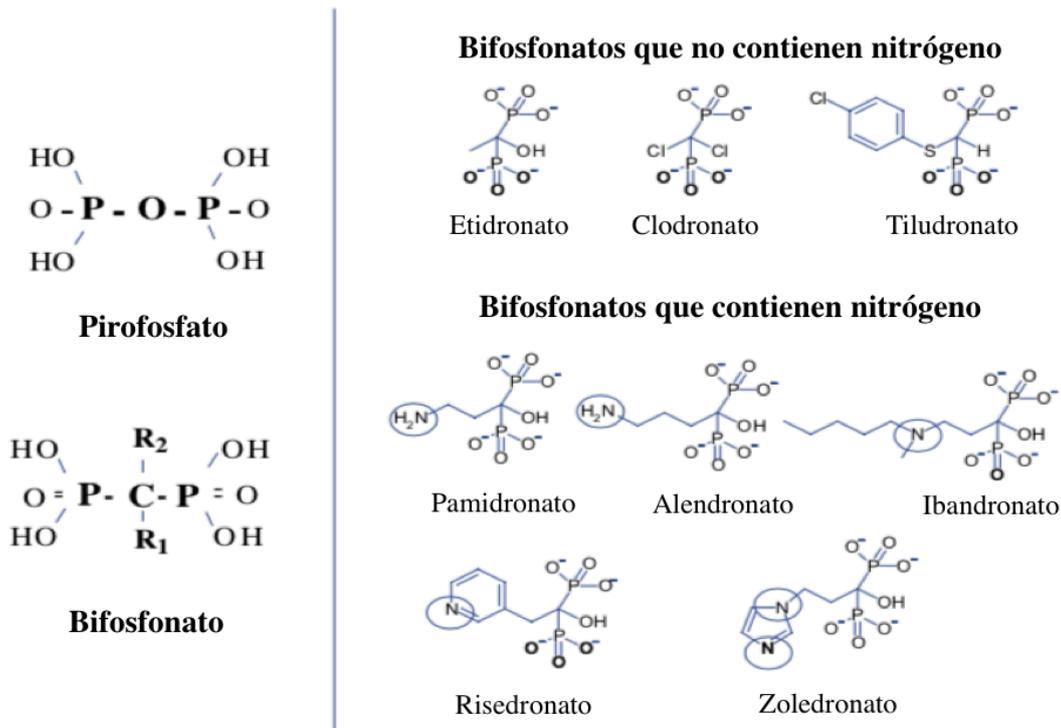


Figura 6. Estructuras de pirofosfato y bifosfonatos [23]

Los bifosfonatos poseen una gran afinidad por los huesos, el hueso es el único tejido que absorbe bifosfonatos. Esto se debe a dos propiedades; 1) afinidad por los cristales de hidroxiapatita que están expuestos como consecuencia de la resorción ósea osteoclástica y 2) captación por osteoclastos e inhibición de la resorción ósea [24].

Los bifosfonatos son inhibidores efectivos de la resorción ósea dependiente de la dosis. Estos fármacos poseen una molécula formada por un átomo de carbono central (C) unido a dos átomos de fosfato (P) más dos cadenas (R1 y R2). La presencia de estas cadenas laterales permite la síntesis de numerosos compuestos con distintas propiedades, la estructura básica permite un gran número de variaciones. En general, la sustitución de un grupo hidroxilo en R1 mejora la afinidad de los BPs hacia cristales de calcio, mientras que la presencia de un átomo de nitrógeno en R2 mejora su potencia y determina su mecanismos de acción (Figura 6). Los BPs que contienen nitrógeno en su estructura se llaman BPs nitrogenados (NBPs) e incluyen al alendronato, pamidronato, risedronato, ibandronato y zoledronato. Los BPs simples o BPs no nitrogenados no poseen nitrógeno en su composición, e incluyen al etidronato y al clodronato, fueron los primeros probados en animales y clínicamente utilizados [25].

2.5.2 Mecanismo de acción

Una vez que los bifosfonatos son absorbidos en las superficies óseas, entran en contacto extracelular con osteoclastos, osteoblastos y osteocitos. El proceso de resorción ósea promovido por los osteoclastos causa la disociación de los bifosfonatos de la superficie ósea seguida por la captura intracelular dentro de los osteoclastos mediante endocitosis [25].

Dentro de los osteoclastos, los BP nitrogenados y no nitrogenados presentan diferentes mecanismos de acción. Los no nitrogenados pueden ser incorporados en el ATP en lugar de pirofosfato β , γ , produciendo un tipo de análogo de ATP no hidrolizable: AppCp. Esta incorporación ocurre debido a la similitud de lo BP no nitrogenados al pirofosfato, lo que conlleva a su acomodo en el sitio activo de la ligasa aminoacil-tRNA clase II en lugar del pirofosfato. Esto permite una reacción de condensación de BP no nitrogenado con AMP resultando en AppCp, que interfiere con la ruta intracelular dependiente de ATP produciendo la apoptosis de los osteoclastos. Los BP nitrogenados son más potentes inhibiendo la resorción ósea. Son capaces de bloquear la formación de intermediarios a lo largo de la ruta de biosíntesis de mevalonato que conlleva a la síntesis de colesterol y otros esteroides. Específicamente, inhibe la farnesil pirofosfato sintasa (FPPS), una enzima clave en la ruta del mevalonato que genera los lípidos isoprenoides utilizados en la síntesis de esteroides y en la modificación postraduccional de pequeñas proteínas unidas a GTP esenciales para la función de los osteoclastos. La inhibición de FPPS genera la acumulación de isopentenil pirofosfato (IPP), el metabolito inmediato anterior a la FPPS en la ruta del mevalonato. Esta acumulación produce una respuesta aguda inflamatoria justo después de la administración intravenosa del fármaco y conlleva a la producción de Apppl (análogo no hidrolizable de ATP), que inhibe la adenin nucleótido translocasa (ANT) mitocondrial y produce la apoptosis. Los lípidos isoprenoides como farnesil pirofosfato (FPP) y geranylgeranyl difosfato (GGPP), generados por la ruta de mevalonato, son requeridos para la modificación postraduccional de proteínas (prenilación). La prenilación de las proteínas pequeñas unidas a GTP es esencial para la función de los osteoclastos. La inhibición de FPPS perjudica el proceso de prenilación, causando alteraciones en funciones importantes de los osteoclastos, incluyendo arreglos en el citoesqueleto, tránsito de vesículas intracelulares y apoptosis [25].

2.5.3 Alendronato sódico

El Alendronato (4-amino-1-hidroxi-1,1-bisfosfonato sódico trihidratado) (Figura 6), forma parte de los bifosfonatos nitrogenados y es el más utilizado para la prevención y tratamiento de la osteoporosis [5]. Posee dos grupos fosfonatos que le otorgan un carácter iónico y aumentan su polaridad. Adicionalmente, no posee un grupo cromóforo o fluoróforo, por lo que su cuantificación se lleva a cabo por un método indirecto o requiere la derivatización del analito antes de la medición final [26].

Es un fármaco hidrofílico que incrementa la formación de hueso y aumenta la proliferación y la maduración de los osteoblastos y conlleva a la inhibición de la apoptosis de osteoblastos [27].

En la Clasificación Biofarmacéutica, el ALD es un fármaco clase III (alta solubilidad, baja permeabilidad), y su biodisponibilidad oral es del 0.9-1.8%. El ALD puede ser administrado tanto oral como intravenosamente. La administración oral es ampliamente usada debido a la comodidad de los pacientes Sin embargo, dicha vía ha presentado varios inconvenientes. En primer lugar, el fármaco está asociado a efectos secundarios incluyendo osteonecrosis de la mandíbula, fibrilación auricular, irritación del esófago y dolor musculoesquelético. Para esta vía de administración el ALD debe ser ingerido antes del desayuno, con un vaso de agua, los pacientes deben permanecer erguidos durante 30 minutos para evitar la irritación esofágica y el cáncer esofágico crónico. Además, el ALD es absorbido en la parte superior del intestino delgado, principalmente a través de la ruta paracelular más que la ruta transcelular. Y es afectado por las comidas, bebidas y el pH gástrico de manera significativa. El ALD es pobremente absorbido después de la administración debido a su alta hidrofiliidad [6].

Por otra parte, la vía intravenosa puede incrementar el riesgo de nefrotoxicidad [28]. Además de las inherentes desventajas de esta vía de administración: es un método invasivo, doloroso, de baja aceptación por parte de los pacientes y requiere de una persona capacitada para su administración.

Dichos inconvenientes pueden ser superados utilizando una vía de administración alternativa, como lo es la administración transdérmica.

2.6 Administración transdérmica de fármacos

Es un método indoloro para la liberación sistémica de fármacos por medio de la aplicación de un sistema farmacéutico sobre la piel intacta y sana. Inicialmente el fármaco atraviesa el estrato córneo, pasa a través de la epidermis más profunda y la

dermis, una vez ahí, se encuentra disponible para la absorción sistémica a través de la microcirculación cutánea [29].

Algunas de las ventajas que presenta esta ruta de administración sobre otras rutas son: es una alternativa no invasiva, evita los inconvenientes de las fobias a las agujas, posee una gran área de aplicación de fácil acceso, es adecuada para pacientes inconscientes o con vómito, evita el metabolismo de primer paso y puede autoadministrarse sin mayor dificultad. Además, cuando se formulan sistemas de liberación controlada, se presentan perfiles farmacocinéticos más uniformes con menos picos, sin fluctuaciones importantes en la concentración plasmática minimizando el riesgo de llegar a niveles tóxicos[29].

2.7 La piel

La piel es un órgano de ingeniería única que permite la vida humana en la tierra mediante la regulación de la pérdida de calor y agua del cuerpo, la prevención del ingreso de sustancias y microorganismos nocivos. Es el órgano más grande del cuerpo humano, aportando cerca del 10% de la masa corporal en una persona promedio, cubre un área de 1.8 m² aproximadamente. Dicho órgano tan grande y de fácil acceso aparente parece ofrecer un lugar ideal para la aplicación de agentes terapéuticos tanto locales como sistémicos [30].

Estructura de la piel

Para fines de liberación transdérmica, la estructura de la piel se puede clasificar en 3 capas (Figura 7):

1. La hipodermis, capa subcutánea más interna
2. La dermis
3. La epidermis:
 - Epidermis viable
 - Estrato córneo o epidermis no viable, capa más externa del tejido

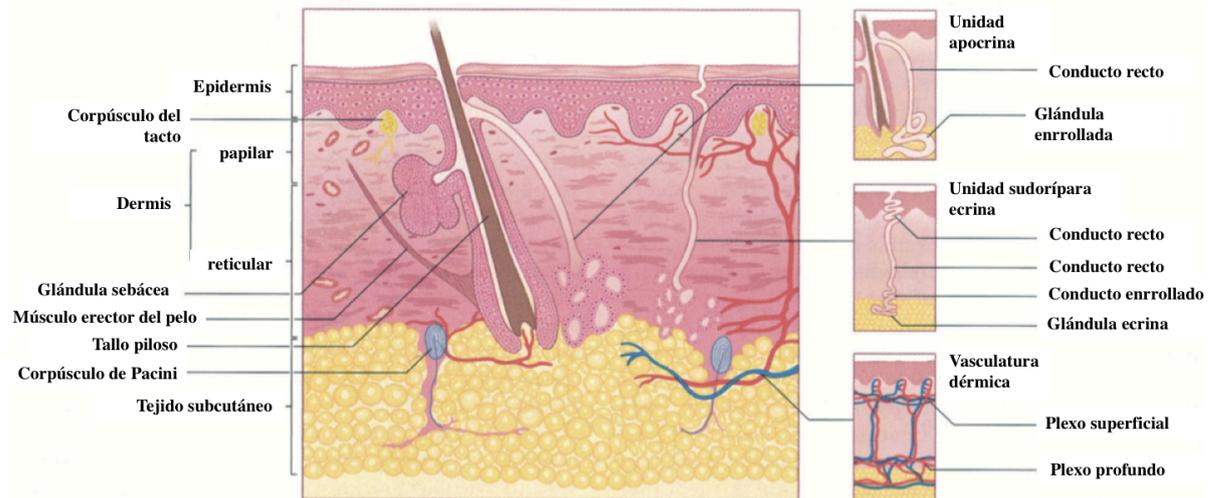


Figura 7. Diagrama de un corte transversal de la piel [31]

2.7.1 Hipodermis

Es una capa gruesa, de varios milímetros. Está compuesta por una cadena de células grasas. Constituye un puente entre la dermis y los componentes subyacentes del cuerpo como músculos y huesos. Por lo que la función principal de la hipodermis es la de proteger de golpes externos, aislar del calor y conducir las señales vasculares y neuronales de la piel [29].

2.7.2 Dermis

Tiene un espesor de 3-5 mm. Está compuesta por una red de tejido conectivo, predominantemente fibras de colágeno que dan soporte, y tejido elástico que provee flexibilidad, embebidas en un gel de mucopolisacárido [30].

En términos de liberación transdérmica, esta capa es vista como acuosa, por lo que la barrera hacia los fármacos polares es mínima, y es significativa para moléculas lipofílicas. La dermis posee numerosas estructuras dentro de ella, sangre y vasos linfáticos, terminaciones nerviosas, unidades pilosebáceas (folículos pilosos y glándulas sebáceas), y glándulas sudoríparas (ecrinas y apocrinas) [30].

Posee una extensa vasculatura esencial para la regulación de la temperatura corporal y la entrega de oxígeno y nutrientes al tejido, así como para eliminar toxinas [30].

Existen tres principales apéndices encontrados en la superficie de la piel que se originan en la dermis: los folículos pilosos están sobre toda la superficie de la piel exceptuando las palmas de las manos y las plantas de los pies; las glándulas sebáceas asociadas al folículo piloso secretan sebo, compuesto por ácidos grasos, ceras y triglicéridos que

lubrican la superficie de la piel y ayudan a mantener el pH alrededor de 5; las glándulas eccrinas se encuentran sobre la mayor parte de la superficie corporal, a una densidad de 100-200 por cm² de la piel, secretan sudor (solución diluida de sal a un pH cercano a 5), estas glándulas son estimuladas por calor y estrés. Las glándulas apocrinas se localizan cerca de la capa dermo-epidermal pero se limitan a ciertas áreas que incluyen la axila, los pezones y las regiones genitales [30].

2.7.3 Epidermis

Es una membrana compleja con múltiples capas. No posee vasos sanguíneos, por lo que los nutrientes y productos de desecho deben difundir a través de la capa dermo-epidermal para mantener la integridad del tejido [30].

La epidermis contiene 5 capas histológicamente distintas (Figura 8):

- Estrato basal (el más interno)
- Estrato espinoso
- Estrato granuloso
- Estrato lúcido
- Estrato córneo (Epidermis no viable)

Estrato basal: Las células que lo componen contienen organelos como mitocondria y ribosomas, son metabólicamente activas. Posee las únicas células (queratinocitos) dentro de la epidermis que llevan a cabo la división celular (mitosis). Una vez replicadas, una célula hija se mantiene en la capa basal mientras que las otras migran hacia arriba a través de la epidermis hacia la superficie de la piel [30].

El estrato basal contiene melanocitos que sintetizan melanina a partir de tirosina. Existen también células de Langerhans derivadas de la médula ósea y reconocidas como las mejores células presentadoras de antígenos de la piel [30].

Estrato espinoso

Está compuesto por seis filas de queratinocitos que cambian de morfología columnar a poligonal. Dentro de este estrato los queratinocitos comienzan a diferenciarse y a sintetizar queratina que se agrega para formar tonofilamentos [30].

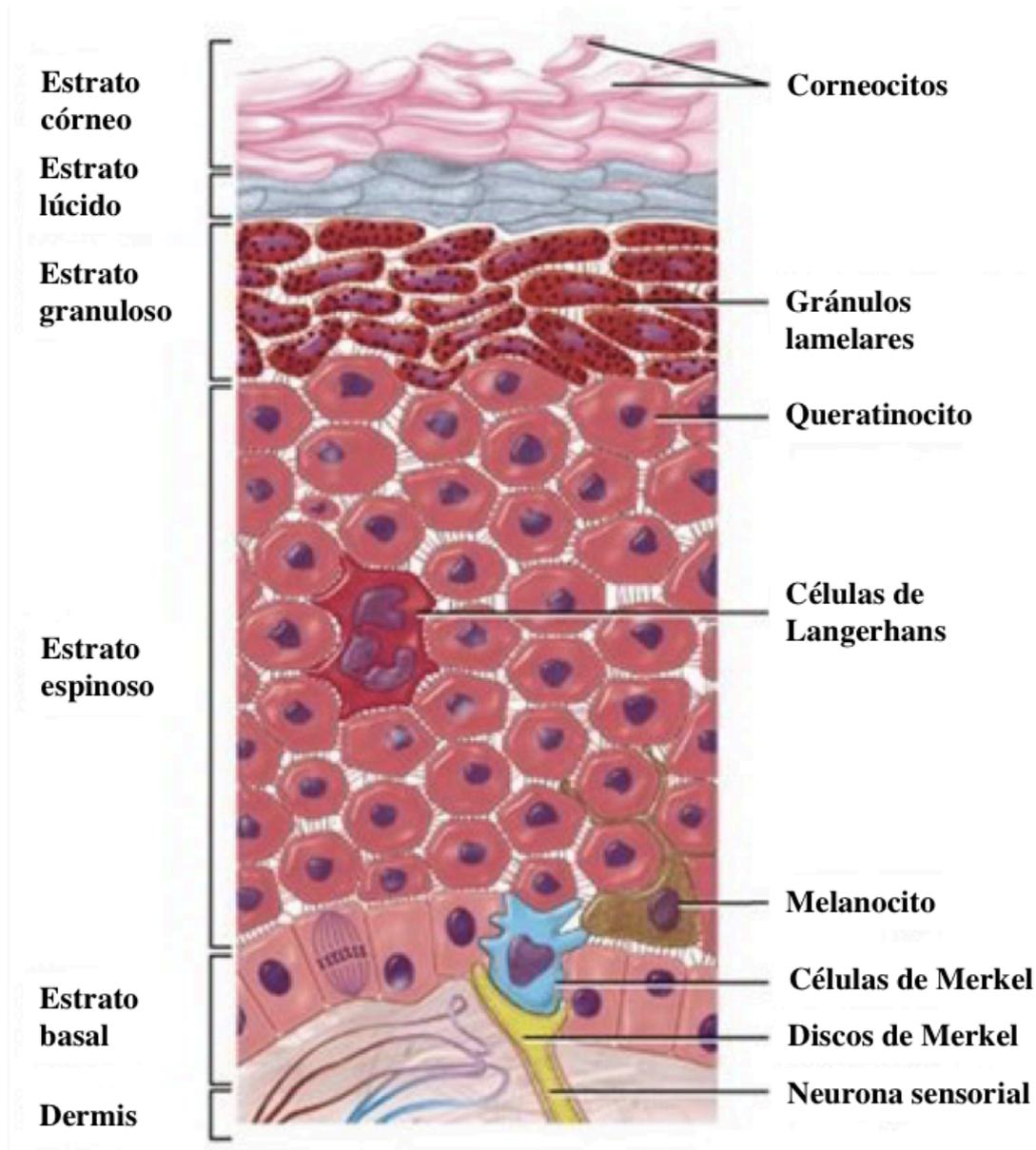


Figura 8. Estratos de la epidermis [32]

Estrato granuloso

Los queratinocitos siguen diferenciándose en este estrato, sintetizan queratina y comienzan a aplanarse [30].

Contiene enzimas que comienzan la degradación de los componentes celulares viables como los núcleos y organelos. Se llaman células granulares ya que empiezan a adquirir estructuras granulares. En el aparato de Golgi y en el retículo endoplásmico de las células se empieza a sintetizar un recubrimiento que envuelve a los gránulos y contiene los precursores para la formación de la capa lipídica intercelular del estrato córneo [30].

Estrato lúcido

Es la capa en la que el núcleo celular se desintegra y hay un aumento de queratinización de las células con un cambio de morfología a células completamente aplanadas [30]

Estrato córneo

También llamado capa córnea es el producto final de la diferenciación celular epidermal. Usualmente está compuesto por 10-15 capas de células y posee un grosor de 10 μm (seco). Es más grueso en las palmas de las manos y en las plantas de los pies y menos grueso en los labios. Está compuesto por células muertas, anucleadas, queratinizadas (corneocitos) embebidas en una matriz lipídica.

El estrato córneo ha sido representado por el modelo de “ladrillos y cemento” en el que las células queratinizadas se encuentran embebidas en una bicapa de lípidos (Figura 9) [30]. Esta capa es considerada la principal barrera para la liberación de fármacos a través de la piel [33].

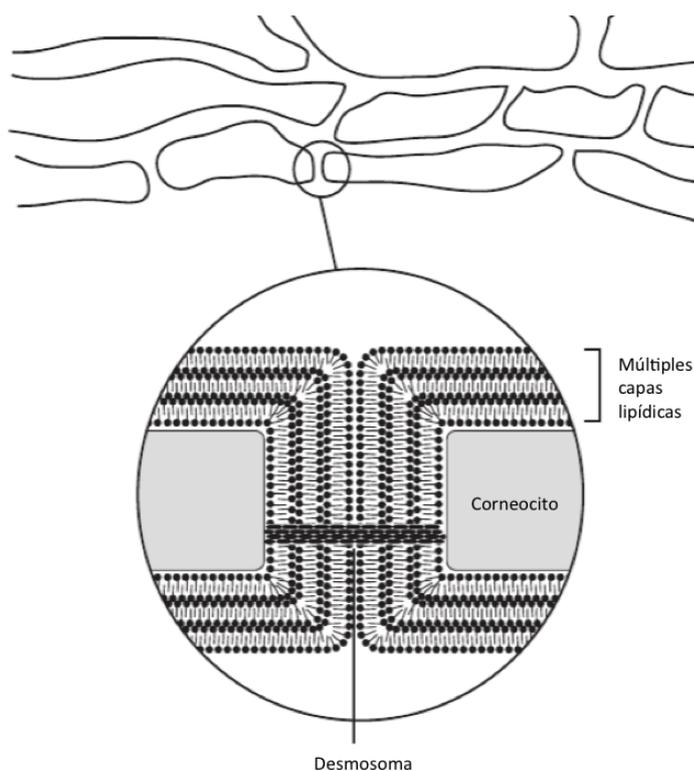


Figura 9. Modelo de “ladrillo y cemento” para el estrato córneo [34]

2.8 Rutas de permeación

Una molécula puede permear a través de la piel por difusión a través de tres vías: ruta de los folículos o apéndices que consiste en folículos pilosos y glándulas sudoríparas asociadas, y la ruta transepidermal, que se subdivide en ruta transcelular e intercelular a través del estrato córneo. Los apéndices de la piel forman una ruta a través de la epidermis y cubren menos del 0.1% de la superficie de la piel humana. Las unidades pilosebáceas están conectadas con una gran cantidad de capilares sanguíneos debajo de los cuales no hay estrato córneo. Por lo que los fármacos que siguen esta ruta de permeación entran directamente a los tejidos circundantes, y a través de una red de capilares sanguíneos, llegan a la circulación sistémica, evitando la barrera del estrato córneo. La ruta folicular es favorable para fármacos hidrofílicos de alto peso molecular [35], así como para nanoacarreadores [34,35].

La ruta transcelular requiere que el permeante atraviese las capas alternadas de células y de matriz extracelular. Esto involucra una secuencia de particiones y difusiones en dominios hidrofílicos y lipofílicos. El interior de las células es generalmente más hidrofílico que la matriz extracelular. En la ruta intercelular, la permeación de fármacos ocurre a través de la matriz lipídica presente entre los corneocitos (Figura 10). Las moléculas pequeñas e hidrofílicas generalmente atraviesan por la ruta transcelular y las lipofílicas por la ruta intercelular [38].

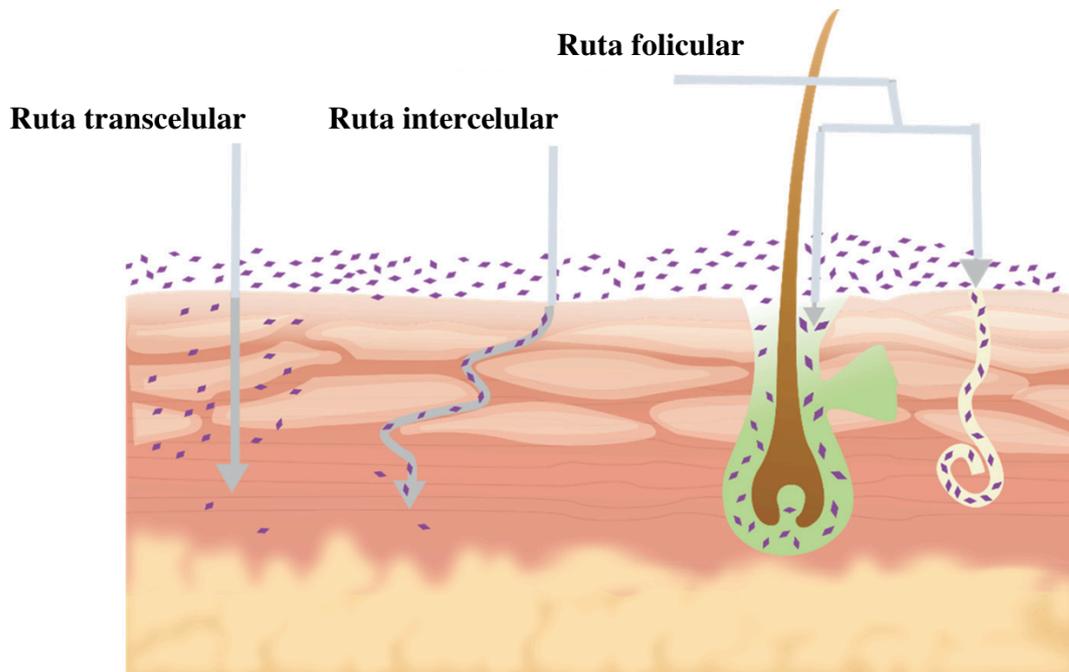


Figura 10. Rutas de permeación transepidermica [39]

2.9 Cinética de permeación

La absorción percutánea es la penetración de sustancias dentro de varias capas de la piel y la permeación a través de la piel hasta la circulación sistémica. Dicha absorción comprende los siguientes pasos [29]:

1. Penetración: La entrada de una sustancia dentro de una capa particular de la piel
2. División desde el estrato córneo dentro de la epidermis viable
3. Difusión a través de la epidermis viable y dentro de la dermis superior
4. Permeación: La penetración de moléculas desde una capa a otra, las que difieren en funcionalidad y estructura
5. Absorción: La llegada de la sustancia a la circulación sistémica

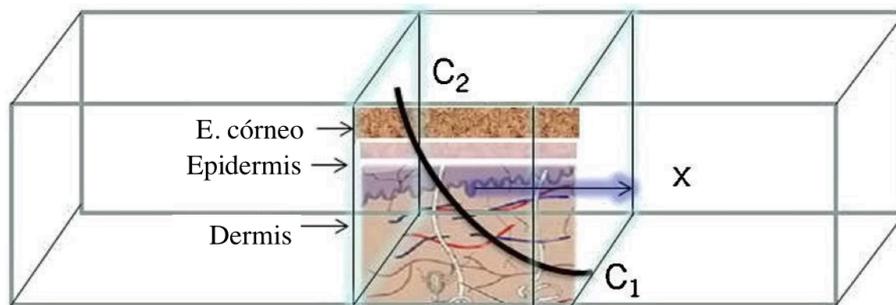


Figura 11. Descripción del flujo de fármaco a través de la piel desde la formulación. C_2 , concentración del fármaco en la formulación; C_1 , concentración del fármaco en el cuerpo [29].

En un sistema transdérmico, la cantidad de material que pasa a través de una unidad de área por unidad de tiempo ($\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$) se llama flujo (Figura 11). Las moléculas se mueven en respuesta a una fuerza termodinámica originada por un gradiente de concentración. La primera ley de difusión de Fick establece que la velocidad de transferencia de una sustancia por unidad de área en una sección es proporcional al gradiente de concentración [34]:

$$J = -D \frac{dc}{dx} \quad \text{Ecuación 1}$$

Donde J es el flujo del permeante, D es el coeficiente de difusión del permeante y dc/dx es el gradiente de concentración (c es la concentración, x es el espacio medido).

La segunda ley de difusión de Fick se deriva de la Ecuación 1. Cuando un permeante es aplicado tópicamente, se asume que la difusión es unidireccional; el gradiente de

concentración va de la superficie exterior hacia el tejido. Matemáticamente, la segunda ley de Fick se expresa [34]:

$$\frac{\delta c}{\delta t} = D \frac{\delta^2 c}{\delta x^2} \quad \text{Ecuación 2}$$

Donde t es el tiempo. De esta forma, la velocidad de cambio en la concentración con el tiempo en cierto punto dentro del campo difusional es proporcional a la velocidad de cambio en el gradiente de concentración en ese punto [34].

El diseño *in vitro* más común utilizado para evaluar la permeación transdérmica utiliza una membrana que separa dos compartimentos. Un compartimento contiene el permeante en un vehículo (donador), y el otro compartimento contiene una solución receptora que provee condiciones sink. Después del tiempo suficiente, se llega a un estado de equilibrio de permeación a través de la membrana cuando el gradiente de concentración del permeante a través de la membrana es constante. Bajo estas condiciones, la Ecuación 2 puede ser simplificada [34]:

$$\frac{dM}{dt} = \frac{DC_0}{h} \quad \text{Ecuación 3}$$

donde M es la masa acumulada del permeante que pasa a través de una unidad de área de la membrana en tiempo t, C_0 es la concentración del permeante en la primera capa de la membrana (en la superficie de la piel, en contacto con la solución donadora) y h es el grosor de la membrana [34].

La medición de C_0 es difícil ya que la obtención de la capa externa es problemática y la contaminación debida a la solución donadora es inevitable. Sin embargo, la concentración del permeante en el vehículo (solución donadora) que cubre la membrana de la piel (C_v) es usualmente conocida o puede ser determinada fácilmente. C_0 y C_v están relacionadas de la siguiente manera [34]:

$$P = C_0 / C_v \quad \text{entonces} \quad C_0 = PC_v \quad \text{Ecuación 4}$$

donde P es el coeficiente de partición del permeante entre la membrana y el vehículo. Sustituyendo la Ecuación 4 en la Ecuación 3 [34]:

$$\frac{dM}{dt} = \frac{DPC_v}{h} \quad \text{Ecuación 5}$$

La Ecuación 5 puede ser arreglada de la siguiente manera

$$D = \frac{dM/dt h}{PC_v} = \frac{Jh}{PC_v} \quad \text{Ecuación 6}$$

donde dM/dt es la velocidad del cambio de masa acumulada del permeante que pasa a través de una unidad de área a través de la membrana, usualmente llamado flujo (J) del permeante.

El coeficiente de permeabilidad (k_p) de un permeante a través de una membrana puede ser definido como:

$$k_p = \frac{PD}{h} \quad \text{Ecuación 7}$$

que puede ser sustituida en la Ecuación 5:

$$J = \frac{PDC_v}{h} = k_p C_v \quad \text{Ecuación 8}$$

El flujo en el estado pseudoequilibrado es obtenido utilizando la porción lineal del perfil de permeación (Figura 12), y si la concentración del permeante en el vehículo aplicado es conocida entonces el coeficiente de permeabilidad se puede calcular [34].

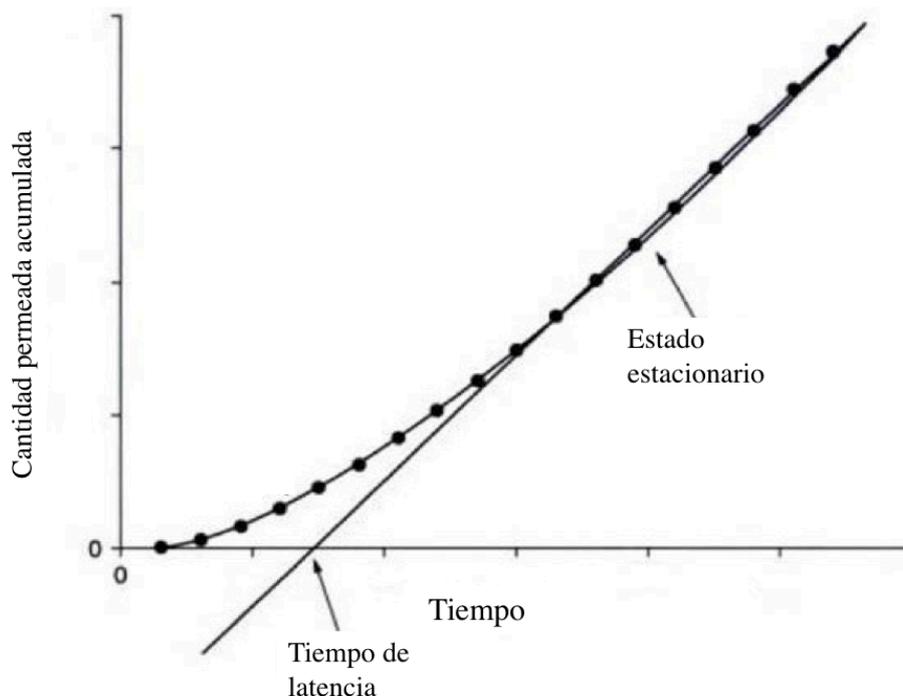


Figura 12. Perfil de permeación típico para la aplicación de una dosis infinita a una membrana de piel humana [29]

Los sistemas farmacéuticos deben ser formulados procurando proveer la máxima actividad termodinámica para la difusión pasiva a través de la piel.

Un número limitado de moléculas poseen las propiedades fisicoquímicas y farmacológicas adecuadas para facilitar la permeación en piel: bajo peso molecular ($PM < 500$ Da), una lipofiliidad balanceada ($\log P = 1-3$), alta potencia farmacológica. Con el fin de mejorar la permeación en piel, se han ideado métodos físicos y químicos, los cuales se presentan a continuación.

2.10 Estrategias para incrementar la absorción de fármacos a través de la piel

Las tecnologías utilizadas para modificar las propiedades de barrera del estrato córneo se pueden dividir en químicas/pasivas o físicas/activas. Los métodos pasivos promueven la interacción del vehículo con el estrato córneo con el fin de modificar su estructura, ej. sustancias químicas que promueven la permeación, nanoacarreadores. Los métodos activos involucran el uso de una energía externa para mejorar el transporte de fármacos a través de la membrana. Entre ellos se encuentran: sonoforesis, iontoforesis, electroporación, inyectores de jet, etc [29].

Los promotores pasivos poseen ciertas ventajas sobre los promotores activos como son la flexibilidad del diseño, facilidad de aplicación, posibilidad de autoadministrarse, comodidad del paciente y poder ser incorporados en formulaciones simples y económicas [40].

Compuestos químicos que actúan como promotores de la permeación

Son agentes que interactúan con componentes del estrato córneo, incrementando la permeabilidad de la piel de manera temporal y reversible [40].

Un promotor químico “ideal” debe cubrir los siguientes criterios [40]:

1. No ser irritante a la piel, ni tóxico, ni alergénico
2. Debe poseer un efecto rápido, reproducible predecible y reversible
3. No debe tener actividad farmacológica
4. Debe funcionar unidireccionalmente, mejorar la penetración del fármaco dentro de la piel previniendo la pérdida de material endógeno del cuerpo.
5. Una vez retirado, una recuperación de la piel debe ser rápida y completa
6. Debe ser incoloro, inodoro
7. Debe ser compatible con el resto de los componentes de la formulación
8. Debe ser aceptable cosméticamente cuando se aplica en la piel

La mayoría de sustancias cumplen algunos, pero no todos los criterios anteriores. A pesar de mostrar ciertas limitaciones, un grupo consistente de compuestos químicos han sido ocupados para la liberación transdérmica eficaz y segura [40].

Los promotores de la permeación usualmente funcionan mejor cuando se usan en conjunto, muestran efectos sinérgicos aumentando la penetración del fármaco dentro de la piel [40].

Barry y colaboradores [41], postularon el concepto de división lípido-proteína que ayuda a categorizar a los promotores de la permeación y describe cómo alteran la permeación de la piel (Figura 13) Esta teoría sugiere tres posibles caminos por los que la permeabilidad puede ser alterada permitiendo el transporte de fármacos [40]:

1. Desarreglo de la bicapa lipídica intercelular (modificación lipídica)

Los promotores modifican la organización estructural de los lípidos de la bicapa, el estrato córneo se vuelve más permeable y el coeficiente de difusión del fármaco aumenta. Las moléculas promotoras forman microcavidades dentro de la bicapa

lipídica, de esta manera incrementan el volumen disponible para la difusión del fármaco. Este desacomodo de los lípidos puede ser homogéneo cuando las moléculas del promotor se encuentran dispersas uniformemente a través de los lípidos o heterogéneo formando “lagunas” con menor resistencia a la penetración dentro de los dominios de la bicapa.

Los promotores interactúan con la bicapa principalmente en tres sitios:

- i. Con las cabezas polares de los lípidos a través de puentes de hidrógeno o fuerzas iónicas que desarreglan las esferas de hidratación de la bicapa modificando el empaquetamiento, lo que conlleva a una fluidización de los lípidos intercelulares así como al aumento del volumen de agua entre las capas lipídicas, disminuyendo la resistencia a la difusión.
- ii. Interacción en el dominio acuoso de la bicapa lipídica, que incrementa la solubilidad del fármaco en el sitio provocando un aumento en el reparto del fármaco desde el vehículo hacia el estrato córneo
- iii. Interacción con la cadena alquílica, el promotor se inserta entre las colas hidrofóbicas de los lípidos intercelulares causando desorden en el empaquetamiento de estos, aumentando así la fluidización de los mismos.

2. Interacción con las proteínas intracelulares del estrato córneo (modificación proteica)

Los promotores se unen a la queratina en los corneocitos, causando un cambio conformacional en las proteínas, alterando el orden en los corneocitos; la queratina puede ser desnaturalizada o modificar su conformación, produciendo la formación de vacuolas e incrementando la difusión del fármaco

3. Aumento del reparto de fármaco, copromotor o cosolvente dentro del estrato córneo

Algunos disolventes pueden penetrar dentro del estrato córneo y cambiar sus propiedades químicas y por lo tanto sus propiedades de disolvente. Lo que permite un aumento en el reparto del fármaco dentro del estrato córneo.

Los compuestos promotores de la permeación actúan usualmente a través de uno o más de los mecanismos de acción mencionados.

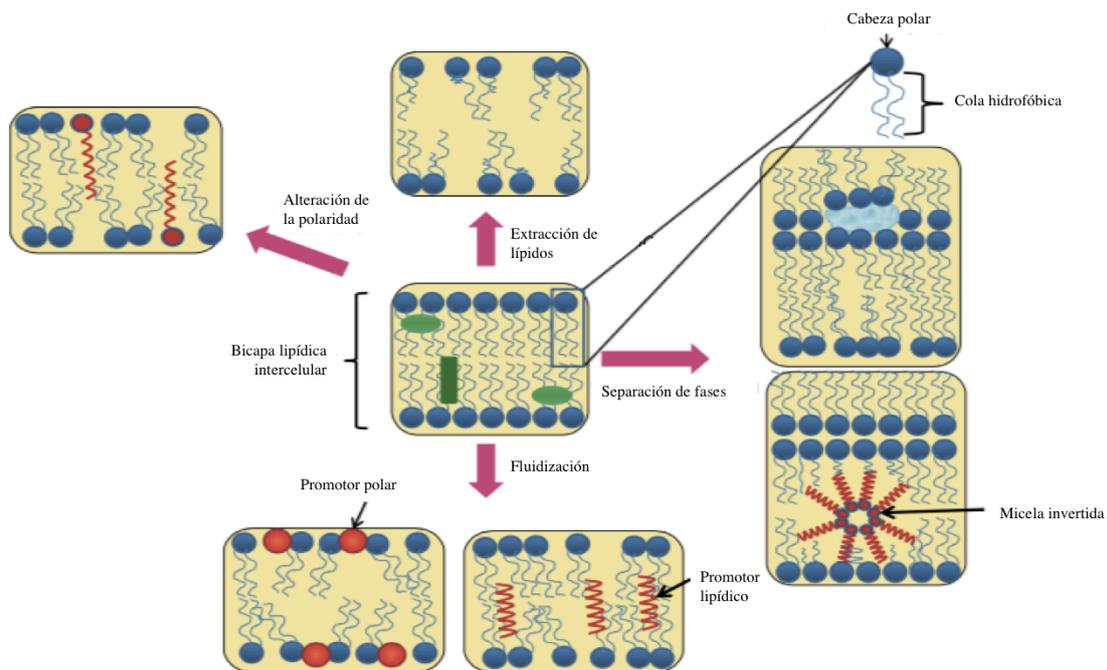


Figura 13. Efectos posibles de los promotores de la permeación sobre la estructura de la bicapa lipídica [40].

2.11 Nanoacarreadores

Los nanoacarreadores son sistemas coloidales que poseen estructuras de tamaños debajo de los 500 nm [42]. Dichas nanoestructuras han sido utilizadas para superar la barrera que supone el estrato córneo. Los nanosistemas brindan oportunidades de liberar y permear el agente terapéutico en cantidades significativas sin comprometer la barrera de la piel. Varios nanoacarreadores han demostrado mejorar la permeación transdérmica, entre ellos se encuentran las microemulsiones y las nanosuspensiones.

2.11.1 Microemulsiones

Las microemulsiones son sistemas fluidos, transparentes y ópticamente isotrópicos. Típicamente compuestos por componentes hidrofílicos y lipofílicos, tensoactivos y cotensoactivos. Son termodinámicamente estables y se forman espontáneamente. La espontaneidad de la formación se puede explicar con base en la energía libre negativa requerida para la formación de la microemulsión, tomando en consideración la Ecuación de Gibbs-Helhholtz:

$$\Delta G = \gamma\Delta A - T\Delta S \quad \text{Ecuación 9}$$

Donde ΔG es la energía libre de formación, γ la tensión interfacial, ΔA el cambio de área interfacial durante el proceso de formación, T es la temperatura absoluta y ΔS el cambio en entropía del sistema. El proceso de microemulsificación involucra una reducción significativa de la tensión interfacial (γ) resultando en una dispersión fina de un líquido inmisible en otro. Lo que produce un incremento en el área interfacial (ΔA). Este proceso es muy dinámico y aleatorio, resultando en un incremento significativo de la entropía (ΔS). Tomando estos parámetros en consideración, el sistema tendrá una energía libre negativa. Lo que explica la formación espontánea de la microemulsión y otorga al sistema una gran estabilidad termodinámica [43].

Las microemulsiones han ganado un interés potencial como nanoacarreadores debido a varias características benéficas, como la facilidad de preparación, estabilidad, capacidad de solubilización de fármacos hidrofílicos e hidrofóbicos y mejora en la liberación de fármacos. Como se mencionó anteriormente, la formación de las microemulsiones depende en gran parte de la capacidad del tensoactivo para reducir la tensión interfacial entre los componentes hidrofílicos y lipofílicos. Usualmente, un solo tensoactivo no es suficiente para asegurar la estabilidad física de la mezcla. La adición de cotensoactivos reduce aún más la tensión interfacial lo que facilita la formación de la microemulsión [43]. Tensoactivos no iónicos, tales como diisoestearato de poliglicerilo (Plurol[®] diisoesteárico, Gattefossé, Co., France), isoestearato de poliglicerilo (Plurol[®] isoesteárico, Gattefossé, Co., France), monoetil éter de dietilenglicol (Transcutol[®] P, Gattefossé, Co., France), y glicéridos de caprilcaproil macrogol (Labrasol[®], Gattefossé, Co., France) (Figuras 14, 15), son usualmente considerados como seguros para la aplicación en piel humana y menos irritantes que los tensoactivos iónicos. Ejemplos de cotensoactivos son alcoholes de cadena corta o media como etanol, isopropanol y butanol. Miristato de isopropilo, palmitato de isopropilo, oleato de etilo, isoestearato de isoestearilo (Figura 16) y ácido oleico han sido usados como fases lipofílicas.

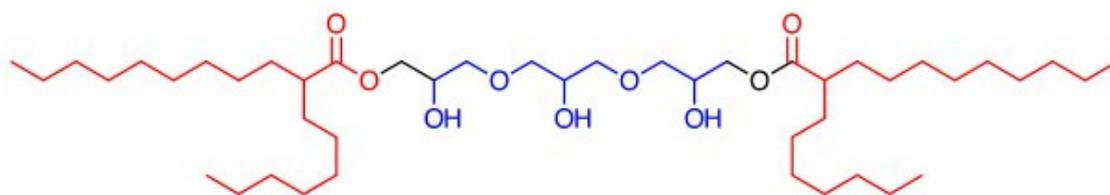


Figura 14. Estructura molecular de Plurol[®] diisoesteárico

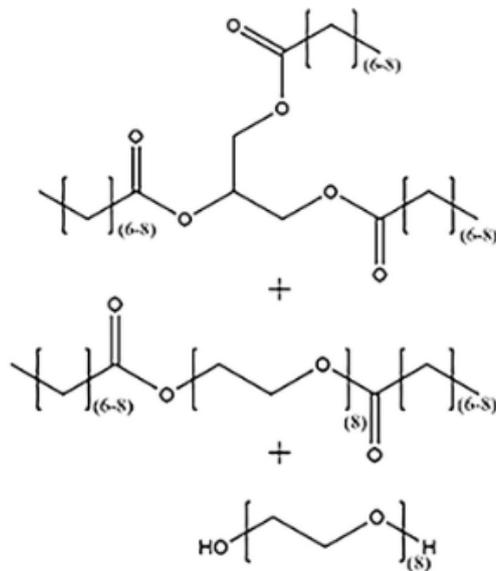


Figura 15. Estructura molecular de Labrasol®

Una de las mayores preocupaciones sobre la aplicación de microemulsiones es la irritación de la piel debido al alto contenido de tensoactivos y cotensoactivos [44].

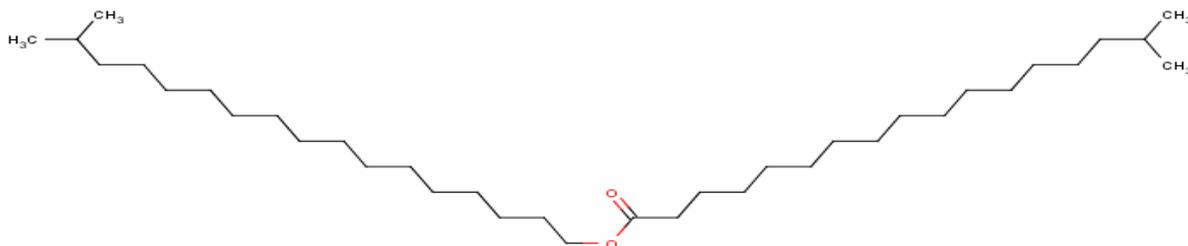


Figura 16. Estructura molecular de isoestearato isoestearílico

2.11.2 Nanosuspensiones sólido en aceite (s/o)

Las nanosuspensiones s/o (SONS) son dispersiones con base oleosa de polvos sólidos de moléculas hidrofílicas. Son preparadas eliminando el agua y un disolvente orgánico de emulsiones agua en aceite (w/o) por medio de liofilización, y la redispersión del complejo fármaco-tensoactivo en otro vehículo oleoso (Figura 17). Preferentemente, el vehículo oleoso posee propiedades para mejorar la penetración de sustancias en la piel. Las partículas dispersas tienden a agregarse; sin embargo, son fácilmente redispersadas con agitación o ultrasonido. La remoción de las moléculas de agua reduce la probabilidad de hidrólisis de las moléculas internas [45].

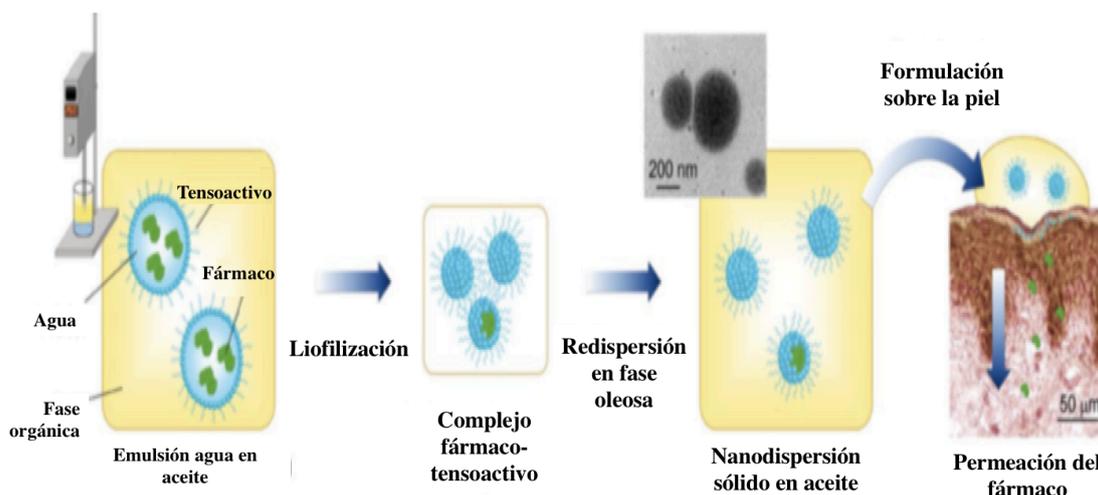


Figura 17. Preparación de nanosuspensiones sólido en aceite [45]

La eficiencia de la liberación a través de la piel está influenciada por la formulación (concentración y tipo de tensoactivos, vehículos oleosos, y relación fármaco-tensoactivos). El vehículo oleoso más utilizado en nanodispersiones s/o es el miristato de isopropilo (Figura 18), ya que mejora la permeación del fármaco a través del estrato córneo gracias a su habilidad de interactuar con los lípidos del mismo. Además, es seguro y ampliamente usado en productos farmacéuticos y cosméticos. Las emulsiones w/o precursoras de las SONS, son preparadas homogenizando el fármaco en agua y los tensoactivos en un fase orgánica volátil. El uso de ciclohexano es adecuado debido a que su punto de congelación de 6.5°C se encuentra cercano al del agua, permitiendo que las fases se congelen simultáneamente. Adicionalmente, gracias a su alta presión de vapor el ciclohexano permite la rápida eliminación durante la liofilización [45]. Los tensoactivos no iónicos, tales como el Tween® 80, el Span® 80 y el sesquioleato de sorbitán (Figura 19), son los más usados debido a su seguridad, dichos compuestos ofrecen también medios para mejorar la permeación a través de la piel; los tensoactivos pueden penetrar dentro de las regiones intercelulares del estrato córneo, aumentando la fluidez y eventualmente solubilizando y extrayendo los componentes lipídicos, de igual forma pueden interactuar con los filamentos de queratina produciendo desorden dentro del corneocito [46].

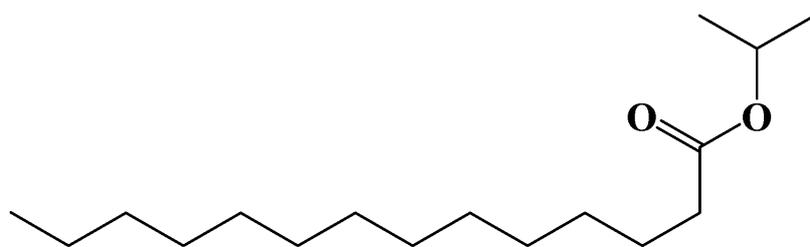


Figura 18. Estructura molecular de miristato de isopropilo

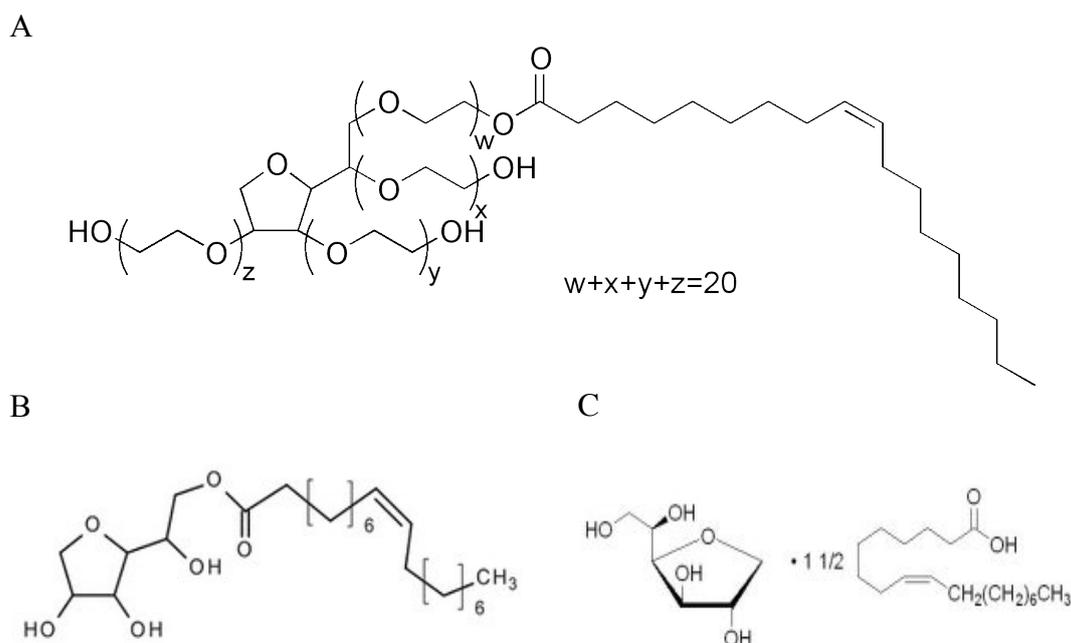


Figura 19. A. Tween[®] 80, B. Span[®] 80, C. Sesquioleato de Sorbitán

2.12 Caracterización de nanoacarreadores

Los materiales de tamaño nanométrico utilizados para liberación de fármacos poseen diferentes propiedades al ser comparados con sus contrapartes convencionales en términos de talla, propiedades de superficie, forma, composición, solubilidad, estabilidad. La caracterización de dichos materiales es esencial para asegurar su calidad y seguridad [47].

2.12.1 Tamaño de partícula

El tamaño de partícula de coloides es un factor clave para determinar las propiedades del sistema. La dispersión dinámica de luz (DLS, por sus siglas en inglés), es una de las técnicas más ampliamente utilizadas para medir el tamaño de partícula en dispersiones y conocer la distribución de talla. Se basa en las fluctuaciones causadas

por el movimiento Browniano de partículas esféricas, donde dicho movimiento está relacionado con el diámetro hidrodinámico equivalente. El equipo emite un haz de luz láser sobre la dispersión, un detector de fotones mide la intensidad de desplazamiento de la radiación incidente, que depende del tiempo de las fluctuaciones. La Ecuación de Stokes-Einstein, que relaciona la escala de tiempo de la difusión de partículas con el diámetro hidrodinámico equivalente de la partícula, se usa para calcular el tamaño de partícula [47].

2.12.2 Conductividad

La conductividad eléctrica es una técnica simple y económica para la caracterización de microemulsiones. Principalmente evidencia si la fase acuosa, la fase oleosa o si ambas fases son continuas. También es capaz de determinar los límites de las fases como resultado de cambios en composición [48].

2.12.3 Reología

Las propiedades reológicas de las microemulsiones dependen del tipo, forma y número de agregados presentes, así como de la interacción entre ellos. Por lo que cambios microestructurales como transiciones de un sistema discontinuo a uno bicontinuo pueden verse reflejadas en la reología de la microemulsión. Las microemulsiones bicontinuas exhiben un comportamiento Newtoniano (viscosidad constante) a bajas o medias velocidades de corte pero se observa una disminución de la viscosidad a altas velocidades de corte, probablemente debido a la fragmentación de la estructura bicontinua. Por otra parte, la microemulsiones discontinuas muestran un comportamiento Newtoniano a través de un intervalo mayor de velocidades de corte [48].

2.12.4 Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR)

Es una técnica no invasiva que permite la caracterización rápida del tejido al detectar cambios, incluso muy sutiles, a nivel molecular [49]. Por lo que mediante esta técnica se evaluó la piel antes y después de tratarla con los nanoacarreadores para determinar si estos ocasionaban alguna modificación en su estructura.

Un espectro típico de IR de la piel se muestra en la Figura 20. En dicho espectro se observan bandas características de lípidos, proteínas y agua. La absorción más intensa en la región de $3800-2600\text{ cm}^{-1}$ es debida al estiramiento vibracional del grupo -OH de

las moléculas de agua. La forma y posición de estas bandas indican que las moléculas de agua están involucradas en el medio a través de fuertes puentes de hidrógeno. Los puentes de hidrógeno de grupos -OH involucrados en interacciones agua-agua absorben por debajo de 3400 cm^{-1} , mientras que los puentes de hidrógeno más débiles formado con grupos polares de proteínas aparecen por arriba de 3400 cm^{-1} [49].

En el intervalo entre $3000\text{-}2800\text{ cm}^{-1}$ se observan dos bandas atribuidas a la absorbancia de los fosfolípidos y los ácidos grasos. Son resultado de los estiramientos simétricos y asimétricos de los grupos $-\text{CH}_3$ y $-\text{CH}_2$ de las cadenas alquílicas [49].

De 2800 a 1800 cm^{-1} no existe ninguna absorción significativa ni de proteínas ni de lípidos

Aproximadamente en 1745 cm^{-1} se muestra una banda que indica la presencia de grupos carbonilo de triglicéridos y fosfolípidos

En el intervalo entre $1700\text{-}1500\text{ cm}^{-1}$ se observan las bandas de amida I y amida II que son reconocidas como marcadores de péptidos y proteínas [49].

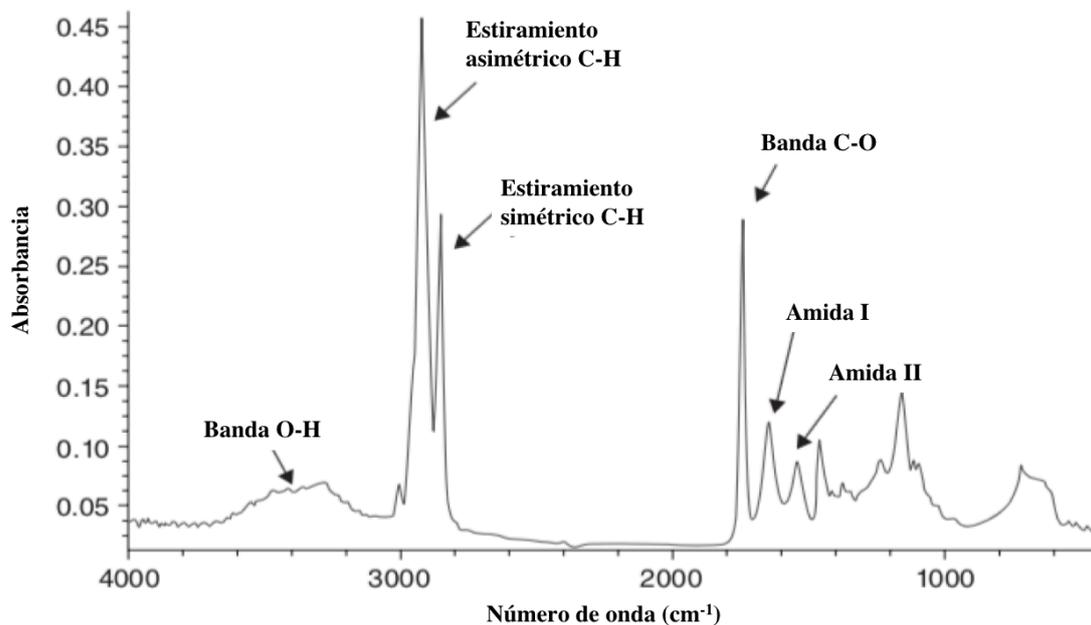


Figura 20. Espectro IR de la piel [50]

2.12.5 Pérdida de agua transepidérmica

La pérdida de agua transepidérmica (TEWL, por sus siglas en inglés) es un flujo de agua pasivo que tiene lugar desde las capas más profundas, dermis y epidermis altamente hidratadas, hacia las capas más superficiales del estrato córneo, el que posee relativamente bajo contenido de agua. Este valor puede ser medido de manera no invasiva, a través de métodos biofísicos [51].

Parte del agua que difunde es evaporada en la superficie del estrato córneo, dependiendo de las condiciones climatológicas, y otra parte es retenida en esta capa por la presencia de factores humectantes naturales que poseen un papel crucial en la hidratación de la piel. La integridad de la piel posee una gran importancia, ya que cuando la barrera está dañada, el agua puede escapar fácilmente, incrementando el valor de TEWL [51].

La medición de TEWL es una herramienta útil para la evaluación de la eficiencia de la piel como barrera protectora. En piel intacta, los valores de TEWL son bajos, mientras que la piel dañada se presenta un incremento en los valores [52].

El Tewameter® es un instrumento capaz de medir la TEWL basado en un método de gradiente de evaporación en una cámara abierta. En este instrumento, el gradiente de evaporación, emitido desde la superficie de la piel, es medido a través de una sonda que se coloca perpendicularmente sobre el sitio de la piel a ser estudiado. La sonda está compuesta por un contenedor cilíndrico abierto y dos higrosensores acoplados con dos termorresistores colocados a diferentes distancias de la superficie de la piel (Figura 21) [51]. En ambos puntos, la humedad relativa local y la temperatura son medidas y la presión de vapor correspondientes es calculada. La diferencia entre la presión de vapor en ambos puntos a lo largo del gradiente está directamente relacionada con la velocidad de pérdida de agua evaporada a través de ese sitio particular de la piel [51].

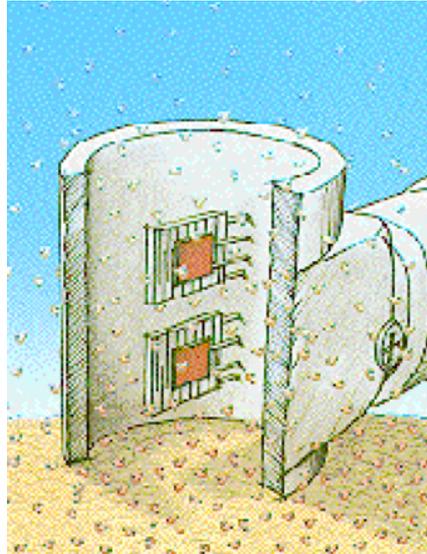


Figura 21. Cámara abierta de la sonda del Tewameter [53]

2.12.6 Estudios de irritabilidad de la piel

Con el fin de descartar un incremento en la sensibilidad de la piel después del uso de un producto aplicado por vía tópica se lleva a cabo la medición de eritema antes y después del uso de una formulación.

La medición de eritema se puede llevar cabo utilizando un instrumento llamado Mexameter® (Figura 22) basado en la absorción/reflexión de la luz desde la piel. En este dispositivo, 16 diodos emisores de luz arreglados circularmente emiten luz a tres longitudes de onda específicas. Un fotodetector mide la luz reflejada por la piel. Como la cantidad de luz emitida es definida, la cantidad de luz absorbida por la piel puede ser calculada. El Mexameter proporciona la medición de luz absorbida y reflejada a longitudes de onda en el verde y el rojo para hemoglobina. El cálculo del índice de eritema se realiza a partir de la intensidad de la luz absorbida y reflejada a 568 y 660 nm, respectivamente [54].

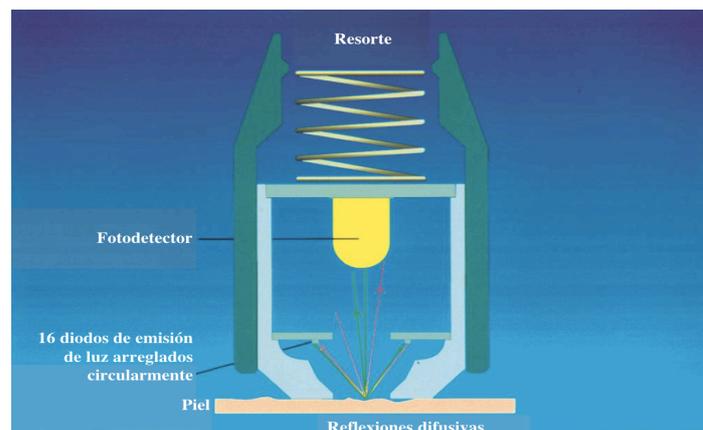


Figura 22. Componentes de Mexameter [53]

2.13 Evaluación de los promotores de la permeación

La eficiencia terapéutica de un sistema de liberación transdérmico depende de su desempeño, que involucra dos pasos principales: la liberación del fármaco del sistema, y la permeación y difusión a través del estrato córneo, epidermis y dermis hasta alcanzar la circulación sistémica. Por consiguiente, la eficacia de los sistemas transdérmicos debe ser evaluada a través de pruebas *in vitro* reproducibles y confiables que sean capaces de medir la liberación y permeación del fármaco desde la forma farmacéutica [55].

2.13.1 Pruebas de permeación *in vitro*

Las celdas de difusión estáticas o de flujo continuo son recomendadas por guías internacionales para llevar a cabo la medición de la liberación y permeación del fármaco [56], [57]. Las celdas de difusión más comunes son las celdas de Franz (Figura 23), consisten en dos compartimentos, donador y receptor, que deben ser separados por una membrana [55].

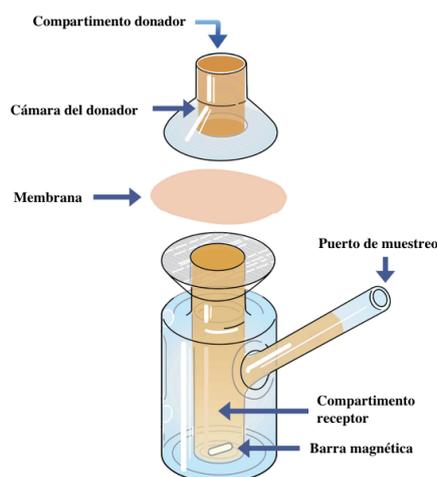


Figura 23. Celda de difusión tipo Franz [58]

La piel de humano es sin duda la mejor opción en experimentos para la determinación de permeabilidad. Sin embargo, existen varios problemas asociados con el uso de piel humana: dificultad de obtención, suministro limitado y ciertas consideraciones regulatorias. Además, las mediciones de permeabilidad obtenidas en muestras humanas de piel varían entre individuos y en muestras de diferentes sitios anatómicos dentro del mismo individuo [59]. Debido a estas dificultades, se prefiere el uso de membranas

sintéticas que simulen el comportamiento de barrera de la piel en términos de permeación.

La membrana sintética Strat-M[®] (Merck Millipore) se encuentra comercialmente disponible como una membrana artificial que mimetiza a la piel. Esta membrana posee un grosor de 300 μm . Está compuesta por una capa superior soportada por dos capas de poliéter sulfonas sobre una capa de poliolefina (Figura 24). Las capas de la membrana se vuelven más porosas y gruesas para mimetizar las diferentes capas de la piel. Estas múltiples capas de la membrana crean una morfología similar a la piel humana. La membrana porosa es tratada con una mezcla de lípidos sintéticos (ceramidas, colesterol, ácido grasos) en una relación similar a la que se encuentra en la piel humana [60].

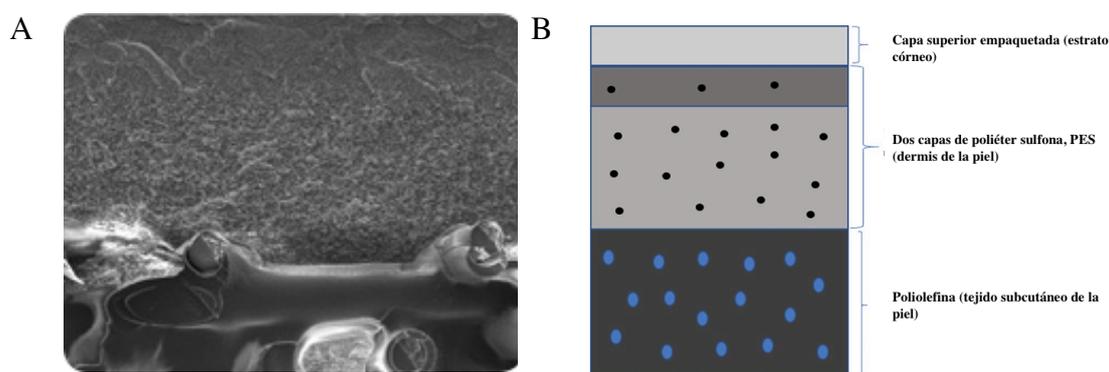


Figura 24. A. Micrografía Electrónica de Barrido de la membrana Strat M[®] [61] B. Estructura multicapa de la membrana Strat M[®] [60]

Otra alternativa al uso del tejido humano es la piel de oreja de cerdo ya que es similar histológicamente, con un espesor comparable al estrato córneo humano (21-26 μm). Además, la densidad promedio de folículos pilosos es 20/cm² comparada con 14-32/cm² en la frente humana [62].

Tanto en el estrato córneo humano como en el de cerdo, las principales clases de lípidos son ceramidas, colesterol, y ácidos grasos libres, estos lípidos se encuentran en una relación aproximadamente equimolar [62].

La permeación a través de piel de oreja de cerdo ha demostrado ser similar a aquella obtenida en piel humana, tanto para moléculas hidrofílicas como lipofílicas [62]. Los efectos causados por promotores de la absorción han presentado también buenas predicciones al usar este modelo de membrana [34].

2.13.2 Pruebas de permeación *in vivo*

El uso de modelos animales para evaluar la absorción percutánea es usado frecuentemente con el fin de comprender mejor el mecanismo de acción de los sistemas nanoacarreadores, así como para determinar si se alcanzaron las concentraciones de fármaco requeridas en plasma después de la administración transdérmica de una formulación [61,62].

La piel de roedores (ratones, ratas y cuyos) es la más comúnmente usada debido a su talla pequeña, manejo poco complicado y relativo bajo costo.

Las diferencias en la permeabilidad entre las diferentes especies están relacionadas con las características estructurales de la piel así como con el grosor de las capas de la misma. Entre los roedores, la piel de rata es la más similar estructuralmente a la piel humana (Tabla 3) [65].

Tabla 3. Espesor de los estratos de la piel en roedores y humano [65]

Especie	Estrato córneo (μm)	Epidermis (μm)	Piel completa (mm)
Humano	18.2 ± 3.3	51.2 ± 12.2	2.58 ± 0.07
Cobayo	18.6 ± 1.2	20.8 ± 1.4	1.15 ± 0.07
Ratón	5	13	0.8
Rata	18	32	2.09

3. Hipótesis

- ◆ Si el alendronato sódico es cargado en microemulsiones y nanosuspensiones sólido en aceite formuladas con promotores de la permeación, la liberación transdérmica de dicho fármaco se verá favorecida

4. Objetivo general

- ◆ Preparar y caracterizar microemulsiones y nanosuspensiones sólido en aceite cargados con alendronato sódico capaces de mejorar la permeación del fármaco a través de piel.

4.1 Objetivos particulares:

- ◆ Construir diagramas pseudoternarios para conocer el área de formación de microemulsiones.
- ◆ Optimizar el método de preparación de nanosuspensiones sólido en aceite, modificando el tiempo de sonicación y el tipo de tensoactivo utilizado.
- ◆ A partir de las condiciones óptimas encontradas, preparar microemulsiones y nanosuspensiones conteniendo alendronato sódico.
- ◆ Caracterizar los nanosistemas en función de tamaño, índice de polidispersión (IPD) y cantidad de fármaco cargado; y elegir los sistemas con las mejores características nanotecnológicas.
- ◆ Evaluar la liberación y permeación transdérmica *in vitro* del fármaco a partir de los sistemas seleccionados.
- ◆ Investigar a través de la técnica de IR y TEWL el mecanismo por el cual el nanoacarreador mejora la permeación.
- ◆ Evaluar la posible irritación causada por los componentes de los sistemas elegidos mediante la medición del grado de eritema.
- ◆ Estudiar en ratas la permeación transdérmica *in vivo* del fármaco utilizando el sistema que haya presentado las mejores características.
- ◆ Desarrollar los métodos analíticos para la cuantificación del alendronato sódico en los diferentes experimentos realizados.

5. Metodología

5.1 Reactivos

Acetato de sodio trihidratado (J.T. Baker, México)

Acetona (Química Suastes, México)

Acetonitrilo (VWR Chemicals, Francia)

Ácido acético (Química Suastes, México)

Ácido cítrico monohidratado (Scharlau, Sharbab S. L. Sentmenat, España)

Ácido clorhídrico (VWR Chemicals, Francia)

Alcohol isopropílico (Química Suastes, México)

Alendronato sódico trihidratado (Moléculas finas de México, S.A de C.V)

Amoniaco (Merck, Alemania)

Bicarbonato de sodio (Química Suastes, México)

Caprilcaproil polioxil-8 glicérido, Labrasol® (Químicos Lyontec-Gattefossé, México)

Carbonato de Sodio (Merck, Alemania)

Ciclohexano (Química Suastes, México)

Dietilenglicol monoetil éter, Transcutol® P (Químicos Lyontec-Gattefossé, México)

Etanol (Química Suastes, México)

9-fluorenil metil cloroformato, Fmoc (Sigma-Aldrich, Alemania)

Fosfato de sodio di-básico para análisis (Panreac, España)

Fosfato monobásico de potasio (J.T. Baker, México)

Heparina sódica 1% solución inyectable 5000 UI/5mL (Hospira, España)

Heparina sódica 5% solución inyectable 25000 UI/5mL (Hospira, España)

Hidróxido de sodio (J.T. Baker, México)

Isoestearato de isoestearilo (Químicos Lyontec-Gattefossé, México)

Isoflurano 1000 mg/g (Laboratorios Karizoo, España)

Metanol (Química Suastes, México)

Metanol (VWR Chemicals, Francia)

Miristato de isopropilo (Droguería cosmopolita, México)

Monooleato de sorbitán, Span® 80 (Sigma-Aldrich, Alemania)

Morin (2',3,4',5,7-pentahidroxi-flavona) (Sigma-Aldrich, Alemania)

Ninhidrina (Sigma-Aldrich, Alemania)

Nitrato de aluminio (Sigma-Aldrich, Alemania)

Poligliceril-3 diisoestearato, Plurol[®] Diisoesteárico CG (Químicos Lyontec-Gattefossé, México)

Polisorbato 80, Tween[®] 80 (Merck KGaA, Alemania)

Sesquioleato de sorbitán (Sigma-Aldrich, EE. UU.)

Suero fisiológico isotónico estéril (Braun, España)

Tartrato de butorfanol 10 mg/mL solución inyectable para caballos (Pfizer, España)

Triglicéridos de cadena media, Labrafac[®] lipophile WL 1349 (Químicos Lyontec-Gattefossé, México)

5.2 Consumibles

Cartuchos Oasis WAX 3cc/60 mg (Waters Corporation, EE. UU.)

Celda vertical tipo Franz de vidrio (Taller de vidrio soplado, FES-Cuautitlán, Sr. Draucín Jiménez, México)

Celda de vidrio para tamaño de partícula

Columna C18, de 150 x 4,6 mm, partícula de 5µm de tamaño (Teknokroma, Brisa LC2, España).

Membrana de diálisis MWCO 6,000 – 8,000 Da (Spectrum Biotech, EE. UU.)

Membrana Strat M[®] (Merck Millipore, Irlanda)

5.3 Equipos e instrumentos

Agitador magnético multiplaza R105 (IKA, Alemania)

Balanza analítica A TX224 (Shimadzu, Japón)

Baño de acrílico (Casa acrílicos, México)

Baño de ultrasonido 8891 (Cole-Parmer, EE. UU.)

Bomba de perfusión (Harvard apparatus 11, España)

Caja de acrílico

Cámara de estabilidad IF75 (Mettler Alemania)

Cámara de vacío (Waters Corporation, EE. UU.)

Centrífuga Z326 (Hermle, Alemania)

Centrífuga Heraeus Fresco 17 (Thermo electron corporation, EE. UU.)

Cromatógrafo de alta resolución con detector de fluorescencia Series 200 (Perkin Elmer, Reino Unido)

Concentrador de muestras SBH130D/3 (Stuart, Reino Unido)

Dermatoma eléctrico (Zimmer, EE. UU.)
Equipo de ultrasonido UP50H (Hielscher, Alemania)
Espectrofotómetro de absorción infrarrojo con transformada de Fourier (ABB MB3000, Canadá)
Espectrofotómetro U-5100 (Hitachi, Japón)
Liofilizadora Freezone 2.5 (Labconco, EE. UU.)
Mexameter® 18 (Courage Khazaka, Alemania)
Potenciómetro 479 SevenExcellence™ (Mettler Toledo, Suiza)
Termostato (Polyscience, EE. UU.)
Tewameter® TM 300 (Courage Khazaka, Alemania)
Ultraturrax T18, Digital (IKA, Alemania)
Viscosímetro CAP 2000 (Brookfield, EE. UU.)
Zetasizer-ZS90 (Malvern Instruments, Reino Unido)

5.4 Cuantificación de ALD por espectrofotometría UV-vis

Las muestras obtenidas a partir de los estudios de solubilidad del fármaco, carga del sistema, liberación y estabilidad se evaluaron utilizando un método de espectroscopía UV-Vis.

Para la cuantificación del fármaco se llevó a cabo una reacción específica para aminas (Figura 25), el ALD se hizo reaccionar con ninhidrina en presencia de bicarbonato de sodio a través de una oxidación desaminación del grupo amino primario seguido por la condensación de la ninhidrina para formar un producto color púrpura (púrpura de Ruhemann's) (Figura 26) [64, 65].

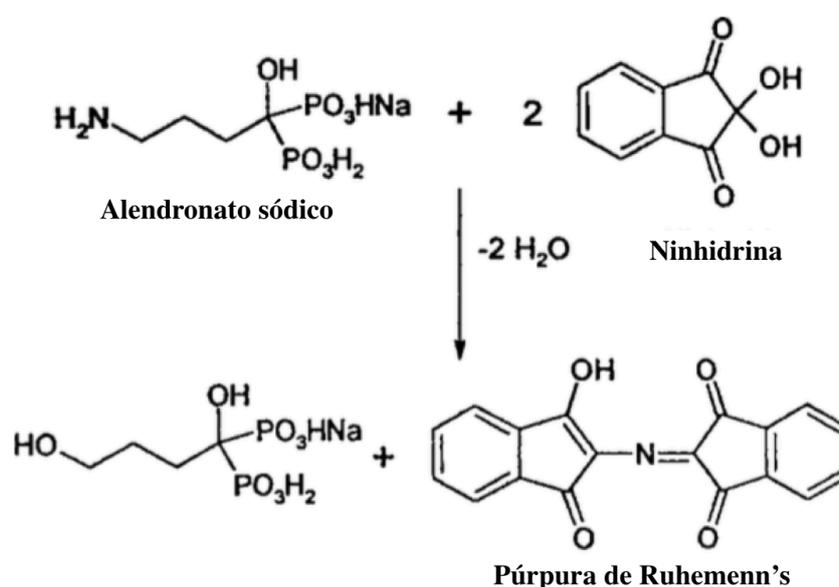


Figura 25. Reacción entre ALD y ninhidrina [67]

Las muestras fueron colocadas en tubos eppendorf de 2 mL, se les adicionó 1 mL de solución de ninhidrina:bicarbonato de sodio, se colocaron en un baño maría a 92°C durante 60 minutos, posteriormente se tomó una alícuota de 0.5 mL y se aforó a 5 mL con metanol, la solución obtenida se midió a 569 nm.

Se validó parcialmente el método evaluando los siguientes parámetros: linealidad del sistema, precisión del sistema, linealidad del método, exactitud, límite de detección y límite de cuantificación (Ver Anexo 1).



Figura 26. Complejo colorido obtenido después de la derivatización de ALD con ninhidrina

5.5 Cuantificación de ALD sódico por espectrofotometría de fluorescencia

El fármaco contenido en las muestras obtenidas de los estudios de permeación *in vitro* se determinó a través de la cuantificación indirecta del complejo fluorescente formado entre Morin (un flavonol) y Al^{3+} (Figura 27), dicho complejo permite la detección de iones metálicos. Cuando se adicionan iones fosfato a la solución del complejo Morin- Al^{3+} , la molécula de Morin se libera al formarse un complejo más fuerte entre el fosfato y el Al^{3+} provocando un decremento de la fluorescencia. Por lo que la intensidad de fluorescencia es inversamente proporcional a la concentración de fármaco [68].

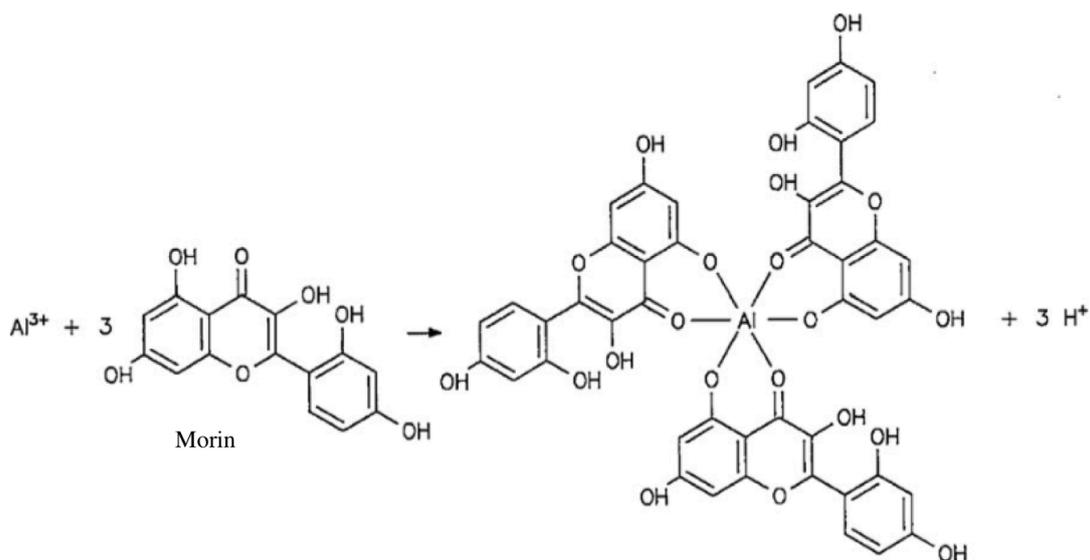


Figura 27. Complejo Morin- Al^{3+} [68]

Para la formación del complejo, una solución de Morin disuelta en una mezcla de etanol:agua (4:1) y una solución de nitrato de aluminio en agua se mezclaron y aforaron en agua destilada, obteniendo una concentración de $2 \mu M$ de Al^{3+} y $10 \mu M$ de Morin, posteriormente el pH se ajustó a 4.5 utilizando una solución amortiguadora de acetatos,

el complejo se almacenó durante 24 horas, al término de ese tiempo se adicionó 1 mL de complejo a cada mL de muestra y se leyó a 410/495 nm utilizando un espectrofotómetro de fluorescencia Hitachi F-7000.

Se validó parcialmente el método evaluando los siguientes parámetros: linealidad del sistema, precisión del sistema (CV), exactitud, límite de detección y límite de cuantificación (Ver Anexo1).

5.6 Determinación de solubilidad de ALD sódico en excipientes

Se evaluó la solubilidad del fármaco en distintos tensoactivos (Labrasol[®], Tween[®] 80, Plurol[®] Diisostéarico CG), cotensoactivos (Transcutol[®] P, alcohol isopropílico, etanol) y fases oleosas (Miristato de isopropilo, Labrafac[®] lipophile WL, Isoestearato de isoestearilo). Se adicionó un exceso de fármaco a viales que contenían 5 mL de los vehículos seleccionados, los sistemas se colocaron dentro de un baño de ultrasonido durante 20 minutos, posteriormente fueron centrifugados a 12,000 rpm durante 60 minutos. La concentración del sobrenadante se determinó utilizando un método espectrofotométrico UV-vis (Figura 28).

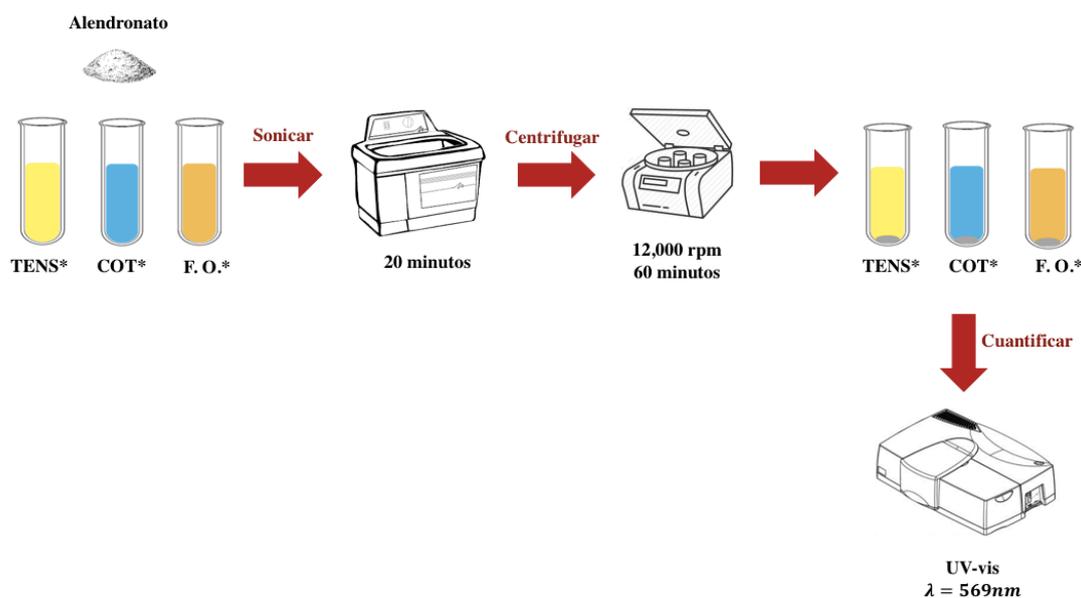


Figura 28. Determinación de la solubilidad de ALD, *TENS, tensoactivos; COT, cotensoactivos; F.O., fases oleosas

5.7 Formulación de Microemulsiones

Se construyeron los diagramas pseudoternarios para establecer las proporciones de los componentes en donde se forma la microemulsión a través del método de titulación con agua. Isoestearato de isoestearilo se utilizó como fase oleosa; Labrasol® y Plurol® Diisoesteárico como tensoactivos. Estos componentes se seleccionaron con base en la solubilidad del activo.

Se hicieron mezclas de Labrasol®:Plurol® Diisoesteárico, utilizando las proporciones 2:1 y 3:1 p/p, las cuales se adicionaron a la fase oleosa seleccionada en proporciones de 10:90 hasta 90:10 p/p. Estas mezclas fueron tituladas gota a gota con agua destilada, bajo agitación moderada. Los sistemas fueron evaluados visualmente. Las muestras que permanecieron transparentes y homogéneas fueron asignadas como áreas de formación de microemulsión en el diagrama de fases. La aparición de turbidez se consideró como ruptura del sistema. Para la construcción de los diagramas se utilizó el software Prosim Ternary diagram (Figura 29).

La preparación de las microemulsiones a estudiar se llevó a cabo de la siguiente manera: el fármaco se disolvió en agua destilada (con base en la máxima cantidad de fármaco que se podía cargar en las microemulsiones), para la ME1 se adicionaron 7 mg de fármaco por cada 600 mg de fase acuosa, mientras que para la ME5 se añadieron 9 mg por cada 650 mg de fase acuosa; después de la completa solubilización, se adicionaron el resto de los componentes (tensoactivos y fase oleosa) y se agitó a $\cong 200$ rpm durante 20 minutos hasta obtener un sistema homogéneo y translúcido.

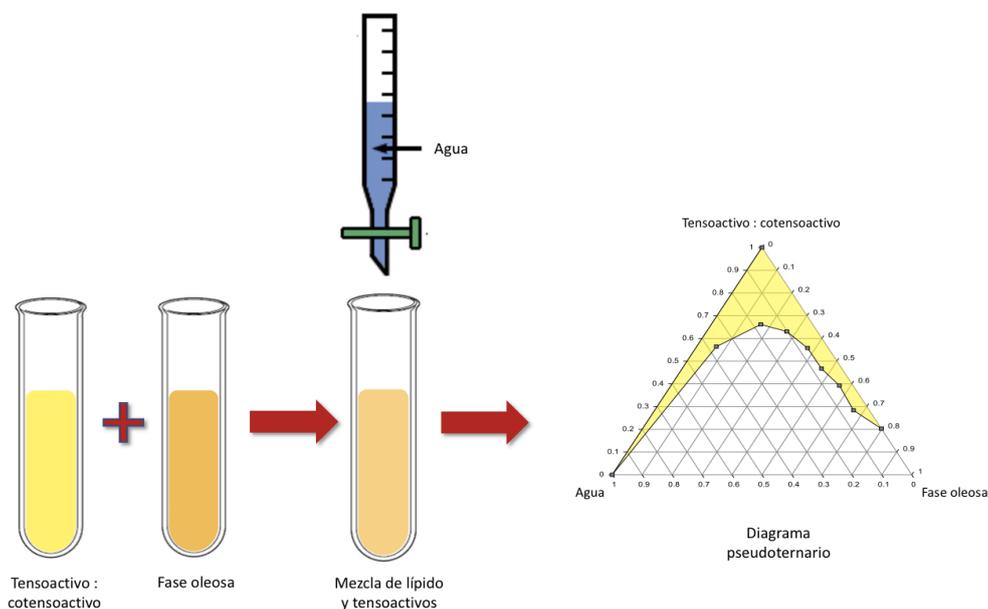


Figura 29. Metodología utilizada para la formación de diagramas pseudoternarios

5.8 Formulación de nanosuspensiones sólido en aceite (SONS)

Las nanosuspensiones fueron preparadas por el método de emulsificación-liofilización descrito por Piao y col. [69], con ligeras modificaciones (Figura 30). Se estudió el efecto de la adición de un tensoactivo lipofílico, así como la adición de la combinación de tensoactivos (hidrofílico y lipofílico). Una solución acuosa del fármaco de concentración 4mg ALD/mL (5 mL) y Tween® 80 (en los casos que aplicaba), y una solución de ciclohexano (10 mL) que contenía Span® 80 o sesquioleato de sorbitán se colocaron en un tubo de ensayo y se mezclaron a 22,000 rpm durante 5 minutos utilizando un homogenizador estator-rotor (Ultraturrax T18, IKA), para formar una emulsión w/o. Los sistemas obtenidos se congelaron inmediatamente sumergiéndolos en un baño de hielo seco en acetona durante 10 minutos, posteriormente fueron secados al vacío utilizando una liofilizadora Labconco (Freezone, 2.5) durante 24 horas. Los productos obtenidos se dispersaron en 2 mL de miristato de isopropilo, se sonicaron utilizando un sonotrodo MS3 operado a 460 W/cm² (Hielscher UP50). El tamaño de partícula, el índice de polidispersión y el porcentaje de eficiencia del proceso (fármaco que fue posible suspender con respecto a la cantidad inicial que se disolvió en la fase acuosa de la emulsión expresada en porciento) (%EP) fueron evaluados en función al tipo de tensoactivo (Span® 80, Span® 80-Tween® 80, Sesquioleato de sorbitán, Sesquioleato de sorbitán-Tween® 80) y al tiempo de sonicación (0, 5, 10, 15 minutos) con el fin de evaluar las mejores condiciones para su formación.

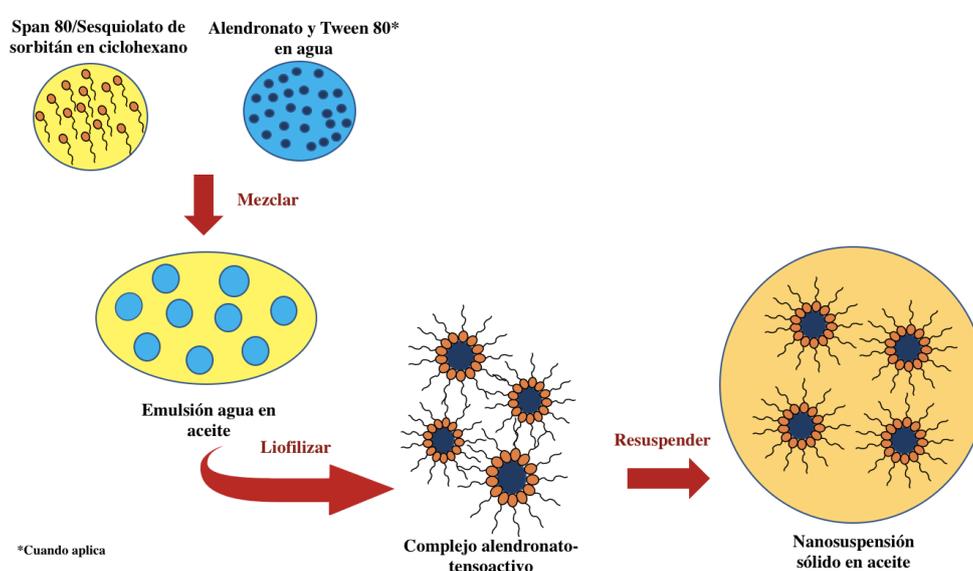


Figura 30. Proceso de formación de nanosuspensiones sólido en aceite

5.9 Evaluación de la viscosidad, la conductividad y la carga de fármaco en las microemulsiones

La viscosidad se determinó por triplicado a 25°C, utilizando un viscosímetro Brookfield CAP 2000 (aguja 1).

Se estudió la reología de los sistemas midiendo el esfuerzo cortante en función de una velocidad de corte creciente, en el intervalo de 2.67×10^3 – $1.87 \times 10^4 \text{ s}^{-1}$, posteriormente se construyeron los reogramas para determinar el comportamiento reológico de las muestras.

La conductividad eléctrica se midió tres veces con un potenciómetro S479 SevenExcellence™ Mettler Toledo. Un electrodo calibrado se sumergió directamente dentro de la dispersión.

Para conocer la cantidad de fármaco cargado, se pesaron aproximadamente 50 mg de microemulsión se adicionó solución amortiguadora de fosfatos pH 7.4, se homogenizó con ayuda de un agitador vórtex durante un minuto y sonicó durante 10 minutos en el baño de ultrasonido (8891 Cole-Parmer). Posteriormente se adicionó 1 mL de solución de Ninhidrina: Bicarbonato, se formó un complejo y cuantificó por espectroscopía UV-visible.

5.10 Porcentaje de eficiencia del proceso (%EP) de nanosuspensiones

50 µL del sistema se colocaron en tubos para centrífuga y se centrifugaron durante 2 horas a 12,000 rpm (Hermle Z326), el sobrenadante fue eliminado y el sedimento resuspendido en 0.5 mL de solución amortiguadora de fosfatos pH 7.4 en un baño de ultrasonido durante 10 minutos. Posteriormente se formó un complejo con ninhidrina, adicionando 1 mL solución de ninhidrina:bicarbonato de sodio ([Ninhidrina] = 2.17mg/mL, [Bicarbonato de sodio] = 0.67mg/mL) y se cuantificó por espectroscopía UV-visible con una longitud de onda de máxima absorbancia a 569 nm. El %EP fue calculado utilizando la siguiente Ecuación:

$$\%EP = \frac{Q1}{Q0} \times 100$$

Donde Q1 es la cantidad de fármaco en la nanosuspensión resultante, y Q0 el la cantidad de fármaco solubilizado en la fase acuosa. Las determinaciones se realizaron por triplicado

5.11 Determinación del tamaño de partícula e índice de polidispersión (IPD)

El tamaño de partícula/glóbulo y el IPD fueron determinados a través de la técnica de dispersión dinámica de luz usando un equipo Zetasizer (Nano-ZS90, Malvern Instruments). Las microemulsiones se colocaron directamente en la celda, las nanosuspensiones fueron diluidas previamente en miristato de isopropilo (100µL de sistema en 900µL de miristato).

5.12 Estudios de estabilidad

Se llevaron a cabo los estudios de estabilidad a dos condiciones distintas:

- Temperatura de $40 \pm 2^{\circ}\text{C}$ y una humedad relativa de $75 \pm 5\%$, en una cámara de estabilidad (Memmert IF75)
- Temperatura de $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ y una humedad relativa de $60 \pm 5\%$, en una cámara de estabilidad (Memmert IF75)

Se almacenaron 3 lotes de cada sistema en un vial de 10 mL bien sellado. Se evaluó la talla, IPD, %EP/fármaco cargado en los sistemas a los 0, 3 y 6 meses.

5.13 Pérdida de agua transdérmica (TEWL)

Se utilizó piel de oreja de cerdo obtenida de un rastro después del sacrificio de los animales, previo al tratamiento con agua caliente. La piel se retiró de la oreja utilizando un bisturí, el tejido graso fue eliminado con tijeras y la piel se cortó con un dermatoma Zimmer a un grosor aproximado de 750 μm , se enjuagó con solución salina y se seccionó en piezas de tamaño requerido y se mantuvieron en congelación (-20°C) hasta su uso.

El valor de TEWL se determinó con un Tewameter[®] TM 300 conectado a un adaptador multisonda MPA 5 Courage und Khazaka. Cada sistema fue evaluado por triplicado. Los trozos de piel fueron colocados sobre el compartimento receptor de una celda de difusión con el estrato córneo hacia el compartimento donador, se adicionaron 2 mL de solución amortiguadora de fosfatos pH 7.4 dentro del receptor, los sistemas montados se mantuvieron 30 minutos dentro de una caja de acrílico durante 30 minutos para asegurar un microclima aislado que permitiera medir un valor de TEWL independiente a los movimientos de aire del ambiente, después de este período se midió el valor de TEWL basal de cada sistema. Subsecuentemente, 50 μL del nanosistema se depositaron en la piel, se mantuvieron dentro de la caja de acrílico durante 2 horas [70], al término de este tiempo se retiró la formulación de la piel utilizando una gasa, se esperó 20 minutos y se midió el valor de TEWL final (Figura 31).

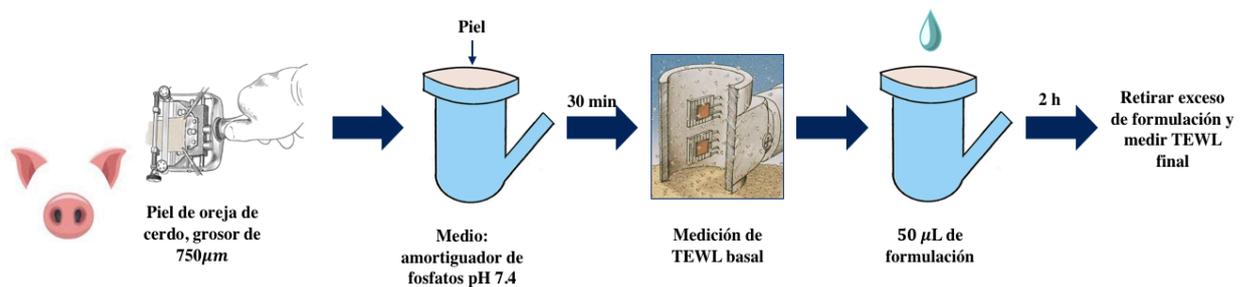


Figura 31. Procedimiento para la medición de TEWL

5.14 Evaluación de la formación de eritema

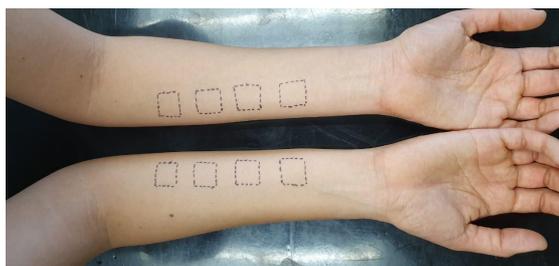
Para evaluar la formación de eritema, se utilizó un equipo Mexameter[®] 18 conectado a un adaptador Multisonda MPA 5 Courage und Khazaka.

Los protocolos experimentales y las cartas de consentimiento fueron leídos y firmados por los voluntarios. Un ejemplo de estos se proporciona en el Anexo 3.

Seis voluntarios de ambos sexos, en un intervalo de edad entre 29 y 50 años participaron en la evaluación. Ninguno de los sujetos tenía historial de enfermedades tóxicas. Los antebrazos fueron limpiados y se solicitó no aplicarse previamente ningún producto cosmético sobre ellos. Todos los voluntarios permanecieron en reposo al menos 30 minutos antes de los procedimientos experimentales. Se procuró realizar las mediciones evitando la luz directa de las lámparas en el laboratorio o la luz solar directa.

Para el tratamiento, la parte interna del antebrazo fue limpiada usando un gasa impregnada con agua destilada y secada con una gasa seca. Se delimitó la zona con un plumón de punto fino y se utilizaron cuatro piezas de papel filtro con un área de 2.25 cm² donde se colocó la formulación a estudiar para cada antebrazo (Figura 32). El antebrazo derecho se utilizó como control, depositando 100µL de agua destilada en cada trozo de papel; en el antebrazo izquierdo, se colocaron 100 µL del nanoacarreador en cada pieza de papel filtro. El índice de eritema se midió a 0, 30, 60, 90 y 120 minutos después de la aplicación de la formulaciones (la remoción del papel filtro y la medición se realizó al azar). La medición se realizó colocando la sonda Mexameter sobre la superficie de la piel aplicando una presión constante. Para cada tiempo, se realizaron cinco mediciones en cada área específica estudiada.

A.



B.

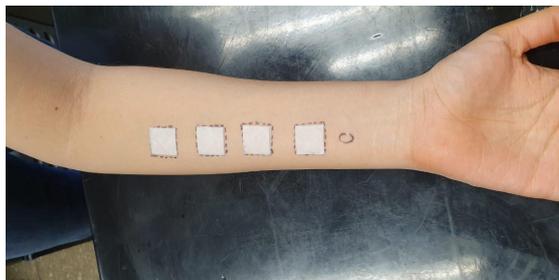


Figura 32. A. Zonas delimitadas antes de aplicar los nanosistemas. B. Papel filtro utilizado para aplicar los nanosistemas

5.15 Espectroscopía de infrarrojo por transformadas de Fourier (FTIR)

Se utilizó piel de oreja de cerdo, se procesó como se indica en el apartado 5.14 para la determinación de TEWL, se cortó con un dermatoma a un grosor aproximado de 750 μm , posteriormente se dividió en secciones de tamaño adecuado que se colocaron en celdas de difusión con un área de 0.64 cm^2 . Posteriormente se adicionaron 50 μL de formulación en el compartimento donador de las celdas, el compartimento receptor se llenó con 2 mL de amortiguador de fosfatos pH 7.4, las celdas fueron colocadas dentro de un Baño maría a una temperatura de $37 \pm 2^\circ\text{C}$ con agitación constante. Cada formulación se estudió por triplicado. Después de 24 horas bajo estas condiciones, se retiró el exceso del nanoacarreador, se lavó la piel con agua desionizada. Para la obtención del espectro infrarrojo se utilizó un espectrofotómetro FT-IR ABB MB3000 (Figura 33), se realizaron 150 barridos por espectro, con una resolución de 2 cm^{-1} , en la región de $500 \text{ a } 4000 \text{ cm}^{-1}$. Como control se utilizó piel sin tratar.

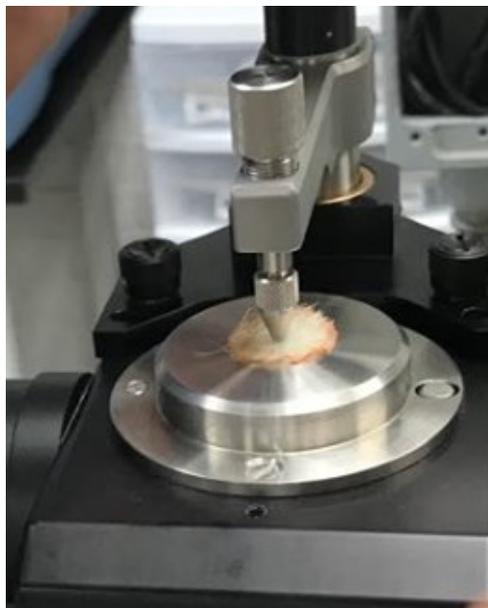


Figura 33. Posicionamiento de la piel en la celda del espectrofotómetro FT-IR ABB MB3000

5.16 Evaluación de la liberación

Los perfiles de liberación de las formulaciones seleccionadas se realizaron utilizando el método de las bolsas de diálisis, utilizando una membrana con un punto de corte de 6,000-8,000 Da. Se colocaron dentro de la membrana 500 μL de los sistemas con ALD ([ME1] = 7.33 mg/g; [ME5] = 9.29 mg/g; [SONS2] = 9.11 mg/g; [SONS10] = 7.15 mg/g), ambos extremos del tubo se cerraron con una pinza para evitar cualquier fuga.

Las bolsas se sumergieron dentro de un vial de vidrio de 10 mL, conteniendo 7 mL de solución amortiguadora de fosfatos pH 7.4 como medio receptor.

Todos los sistemas se mantuvieron dentro de un baño de agua a 37 ± 2 °C, con agitación constante. Se tomaron alícuotas de 500 μ L del medio receptor a intervalos de tiempo predeterminados, reemplazando el volumen con solución amortiguadora. Para las MEs el estudio se monitoreó durante 24 horas, mientras que para las SONS se siguió durante una semana. La concentración de fármaco en la solución receptora se midió después de formar el complejo con ninhidrina, a una absorbancia de 569 nm (Figura 34). Las liberaciones se siguieron para su comparación con dos soluciones del fármaco: S1, con una concentración equivalente a la ME1 y a SONS10 ([S1] = 7.0 mg/g); y S2 con una concentración equivalente a la ME5 y a SONS2 ([S2] = 9.1 mg/g).

Los experimentos se realizaron por triplicado. El porcentaje de fármaco liberado se calculó con base en la cantidad inicial de ALD en las bolsas de diálisis.

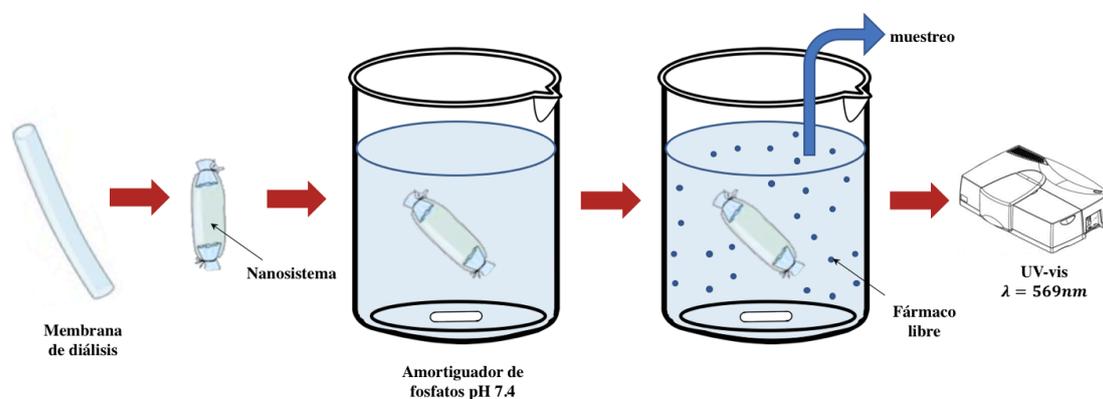


Figura 34. Esquema de la evaluación de la liberación del fármaco desde las formulaciones estudiadas

5.17 Cinéticas de permeación *in vitro*

Se llevó a cabo la permeación transdérmica *in vitro* para las formulaciones seleccionadas, para este propósito se utilizaron celdas verticales de difusión. La prueba se siguió por 24 horas en el caso de las MEs y durante 168 horas (1 semana) para las SONS. Una membrana sintética Strat M[®] se colocó entre el compartimento donador y el receptor de una celda de difusión. Para las MEs la prueba también se llevó a cabo a través de piel de oreja de cerdo procesada como se indicó previamente para la prueba de TEWL (apartado 5.14). El área efectiva de permeación de la celda de difusión fue de 0.64 cm². El compartimento receptor contenía 1.8 mL y 2.0 mL de agua desionizada (para evitar cualquier interferencia de iones) para las MEs y para las SONS,

respectivamente. Todas las celdas se colocaron dentro de un baño con agua, manteniendo la temperatura de los compartimentos donadores a 32 °C y agitación constante (Figura 35). En el donador se cargaron 50 µL de las formulaciones (MEs o SONS) ([ME1]= 6.99 mg/g; [ME5]= 8.79 mg/g; [SONS2]= 8.91 mg/g; [SONS10]= 7.61 mg/g), y el compartimento se mantuvo cerrado durante la prueba. Todo el medio receptor fue retirado a través del puerto de muestreo a tiempos predeterminados, reponiendo el volumen con agua desionizada. Esta prueba se llevó a cabo a la par con soluciones de ALD sódico en agua desionizada ([S1] = 7.10 mg/g, [S2] = 9.02 mg/g); (utilizado como control). Cada muestra se analizó usando un método fluorimétrico, descrito en la sección 5.5 (Figura 36). La cantidad permeada acumulada por unidad de área se graficó contra el tiempo, y el flujo (J) se determinó calculando la pendiente en el estado estacionario. El coeficiente de permeabilidad (Kp) se calculó como la relación del flujo y la concentración de fármaco en cada formulación. La cantidad acumulada de ALD que permeó al final del estudio se reportó como Q_t .

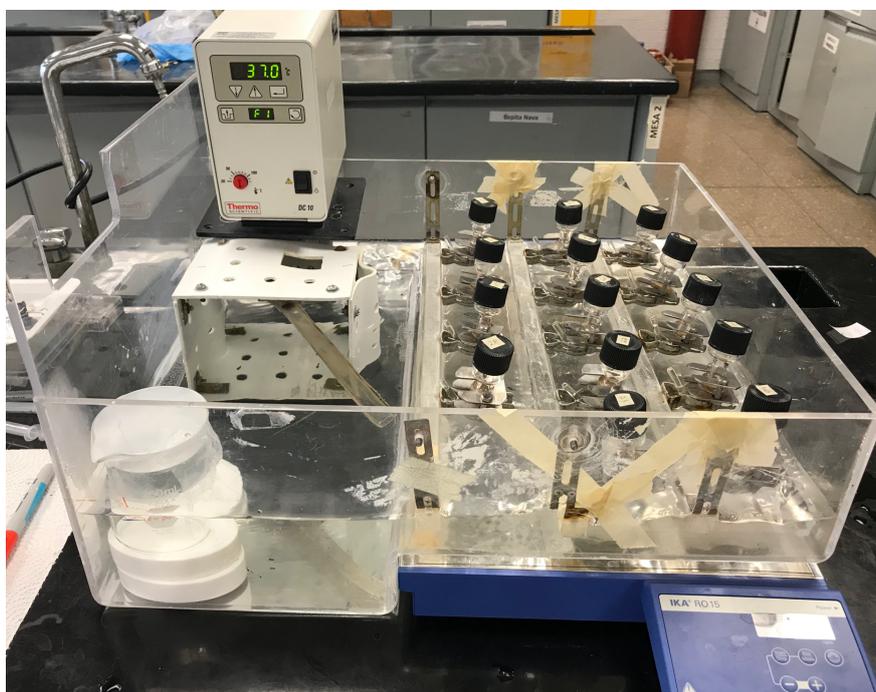


Figura 35. Sistema montado para realizar la permeación. Baño de acrílico y celdas de difusión a 37° C

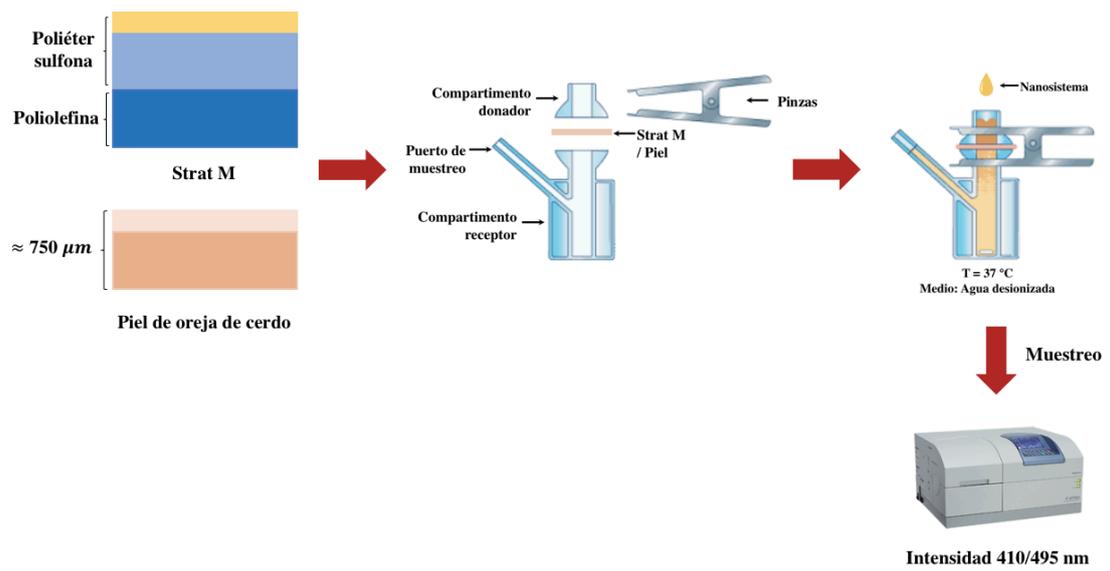


Figura 36. Esquema del procedimiento utilizado para realizar los estudios de permeación

6. Resultados y discusión

6.1 Solubilidad de ALD sódico en excipientes

La selección de los componentes para la evaluación de la solubilidad se realizó con base en la inocuidad y en la capacidad para mejorar la permeación de los mismos. Los excipientes seleccionados según los resultados obtenidos (Tabla 4) fueron: Isoestearato de Isoestearilo, Labrasol® y Plurol® Diisoesteárico (tensoactivos).

Tabla 4. Solubilidad de ALD en diferentes componentes

Tipo de excipiente	Disolvente	Solubilidad ($\mu\text{g/g}$)
Fase acuosa	Agua	3513.9 \pm 2.02
Fase oleosa	Miristato de Isopropilo	332.2 \pm 1.05
	Isoestearato de Isoestearilo	1286.28 \pm 4.73
	Labrafac®	510.41 \pm 0.78
Tensoactivos	Labrasol®	1008.19 \pm 1.40
	Plurol® Diisoesteárico	2631.29 \pm 4.96
	Tween® 80	466.41 \pm 3.20
Cotensoactivos	Etanol	378.77 \pm 1.32
	Transcutol®	475.36 \pm 1.39
	Isopropanol	353.34 \pm 0.53

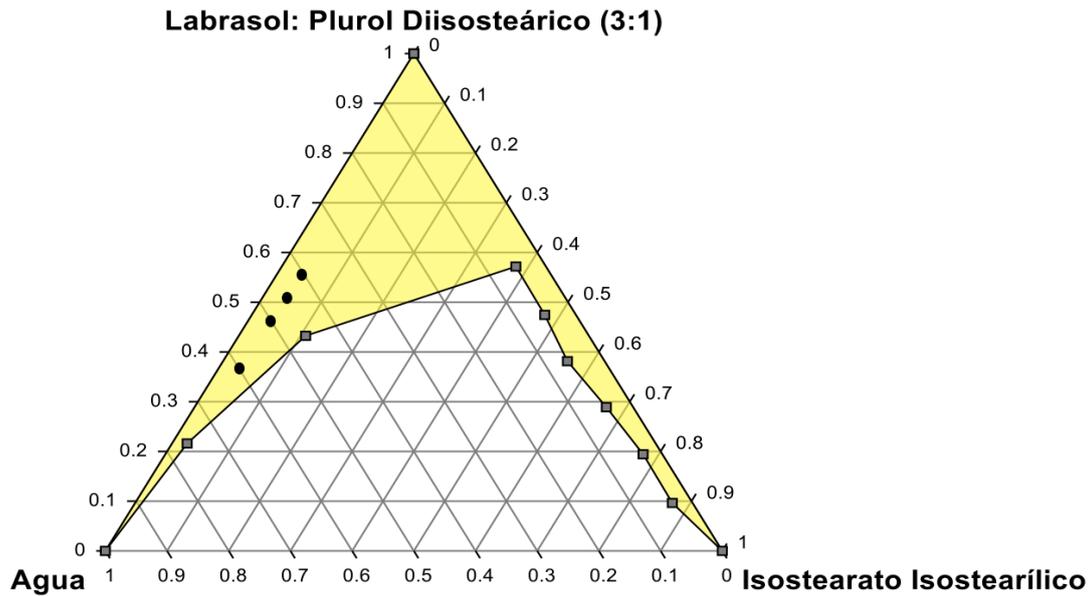
6.2 Diagramas pseudoternarios y caracterización de las microemulsiones

Una vez seleccionados los componentes en los que el fármaco poseía la mayor solubilidad, se desarrollaron los diagramas pseudoternarios utilizando las combinaciones de componentes mostradas en la Tabla 5.

Tabla 5. Excipientes utilizados para la elaboración de los diagramas pseudoternarios

Tensoactivo	Fase oleosa
Labrasol®	Isoestearato de isoestearilo
Plurol® Diisoesteárico	

A



B

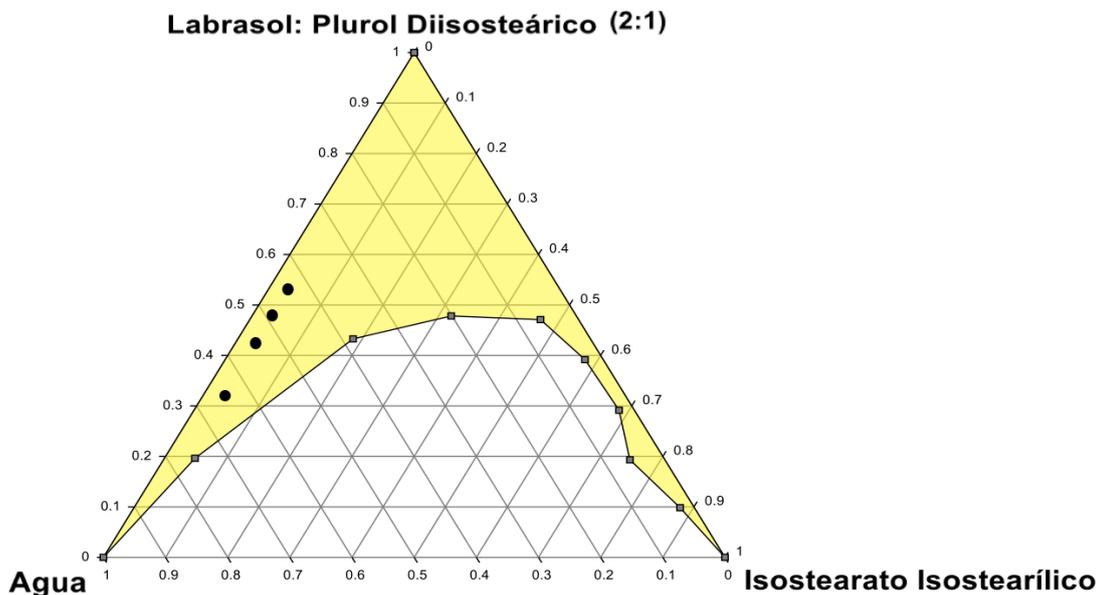


Figura 37. Diagramas pseudoternarios con la región de existencia de microemulsiones (área sombreada) conteniendo A. Labrasol[®]: Plurol[®] diisosteárico (3:1), agua e isoestearato isoestearílico; B. Labrasol[®]: Plurol[®] diisosteárico (2:1), agua e isoestearato isoestearílico

La Figura 37 se muestran los diagramas pseudoternarios que dieron los mejores resultados, que presentaron mayores áreas de formación y donde el fármaco fue más soluble. El área sombreada corresponde a la región de formación de microemulsiones; la solubilidad del fármaco en los cotensoactivos estudiados fue muy baja, por lo que se

decidió trabajar con sistemas con dos tensoactivos a diferentes proporciones (Plurol® diisoesteárico y Labrasol®) e Isoestearato de isoestearilo como fase oleosa.

En los diagramas pseudoternarios (Figura 37) se observa que el aumento en la proporción de Plurol® diisoesteárico se reflejó en un incremento de la región de formación de las microemulsiones. Se seleccionaron cuatro puntos conforme al principio del máximo porcentaje de agua incorporado en las formulaciones, cada sistema se caracterizó por cantidad de fármaco cargado, tamaño de glóbulo, índice de polidispersión (IPD), viscosidad y conductividad, los resultados se muestran en la Tabla 6.

Todos los sistemas presentaron un tamaño de glóbulo en la escala nanométrica, siendo los sistemas ME1 y ME5 los que exhibieron la menor talla y la máxima capacidad de carga de fármaco. El valor de la conductividad se incrementa al aumentar el contenido de agua y de fármaco en las formulaciones.

El estudio del comportamiento reológico de las MEs es útil para predecir la estructura de los sistemas. Los reogramas mostrados en la Figura 38 confirman la obtención de fluidos Newtonianos, presentando una relación lineal entre la velocidad de corte y el esfuerzo cortante, que es una característica de las MEs discontinuas [48]. Conforme a los resultados obtenidos, se decidió continuar con los estudios de caracterización de las ME1 y ME5.

Las ME son sistemas muy fluidos por lo que se puede pensar en la adición de un agente reológico para mejorar su retención en piel. Sin embargo, la modificación de la reología tendría impacto en la cinética de liberación y permeación de las formulaciones por lo que la evaluación de dichos parámetros tendría que realizarse nuevamente.

Tabla 6. Composición, fármaco cargado y propiedades fisicoquímicas de las microemulsiones preparadas (n = 3)

Sistema	Cantidad de fase acuosa (%)	Cantidad de tensoactivos (%)	Cantidad de fase oleosa (%)	Relación Labrasol:Pluro I	Fármaco cargado (µg/g)	Talla de glóbulo (nm)	Índice de polidispersión	Conductividad (µS/cm)	Viscosidad (cP)
ME1	60	37	3	(3:1)	6362.56 ± 106.37	36.90 ± 0.74	0.494 ± 0.004	424.9 ± 2.5	65 ± 1
ME2	50	47	3	(3:1)	5076.21 ± 115.11	43.85 ± 2.76	0.487 ± 0.005	173.1 ± 1.4	100 ± 2
ME3	45	52	3	(3:1)	4361.05 ± 22.90	45.32 ± 1.26	0.483 ± 0.10	126.9 ± 1.3	106 ± 1
ME4	40	57	3	(3:1)	3735.42 ± 58.63	34.86 ± 2.04	0.435 ± 0.019	78.3 ± 2.5	92 ± 1
ME5	65	30	5	(2:1)	8798.14 ± 124.19	33.54 ± 1.84	0.492 ± 0.020	667.3 ± 12.7	71 ± 7
ME6	55	40	5	(2:1)	6276.54 ± 170.54	48.70 ± 2.91	0.624 ± 0.125	201.4 ± 6.7	114 ± 3
ME7	50	45	5	(2:1)	6170.19 ± 241.35	83.33 ± 4.10	0.386 ± 0.004	137.1 ± 3.2	135 ± 2
ME8	45	50	5	(2:1)	3098.47 ± 108.15	76.28 ± 4.17	0.414 ± 0.015	91.5 ± 4.9	139 ± 3

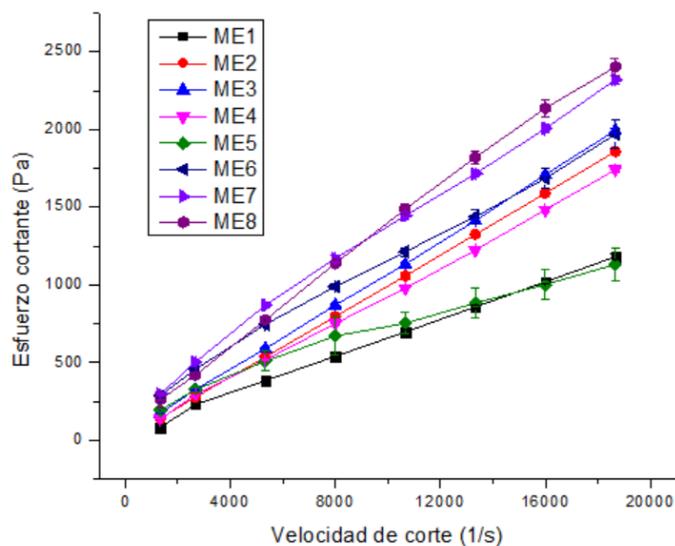


Figura 38. Reogramas de las microemulsiones estudiadas

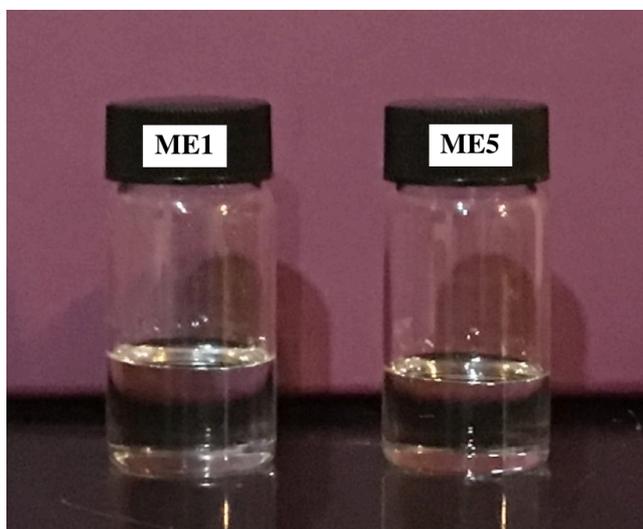


Figura 39. Microemulsiones elegidas

6.3 Preparación de SONS cargados con ALD

Las SONS se prepararon eliminando el agua y el ciclohexano de la emulsión w/o a través de liofilización, y la redispersión del complejo fármaco-tensoactivo no iónico en un promotor de la permeación (miristato de isopropilo). Con el fin de conocer la influencia del tiempo de sonicación y la estructura del tensioactivo en la formación de los sistemas, Span® 80, sesquioleato de sorbitán y Tween® 80 se emplearon de manera independiente o como mezclas, y el tiempo de sonicación se varió de 0 a 15 minutos.

Se utilizaron tensoactivos no iónicos debido a su baja irritabilidad en piel. El sesquioleato de sorbitán y el Span[®] 80 se usaron como emulsificantes hidrofóbicos con valores de HLB de 4.3 y 3.7, respectivamente. Mientras que el Tween[®] 80 se usó como emulsificante hidrofílico (HLB = 15.0). El ciclohexano fue el disolvente volátil utilizado debido a su punto de congelación de 6.5 °C que permitió que ambas fases de la emulsión se congelaran simultáneamente en un baño de hielo seco con acetona, sublimándose posteriormente durante el proceso de liofilización.

6.4 Caracterización de SONS

6.4.1 Determinación del porcentaje de eficiencia del proceso (%EP)

Como se muestra en la Tabla 7, las SONS que contenían Tween[®] 80 presentaron el menor porcentaje de eficiencia del proceso, mientras que los sistemas formulados con solamente un tensoactivo hidrofóbico mostraron un %EP mayor al 60% en la mayoría de los casos. Esto se atribuye a la afinidad limitada del Tween[®] 80 hacia la fase orgánica, lo que da lugar a un sistema no estable, generando una capacidad de acarreamiento menor [45].

6.4.2 Tamaño de partícula e índice de polidispersión

Para la formulación de las SONS se emplearon dos tensoactivos lipofílicos no iónicos solubles en ciclohexano (Sesquioleato de sorbitán y Span[®] 80), así como la combinación con un tensoactivo hidrofílico no iónico (Tween[®] 80) para determinar el efecto del tipo de tensoactivo y de la longitud de la cadena hidrocarbonada en la estabilidad y el desempeño de las formulaciones. Los sistemas formulados solo con un tensoactivo lipofílico mostraron tamaños del complejo ALD-tensoactivo menores a 400 nm. Por otro lado, los sistemas cuya formulación contenía una mezcla de tensoactivos presentaron complejos más grandes debido a la baja solubilidad del Tween[®] 80 en ciclohexano [45].

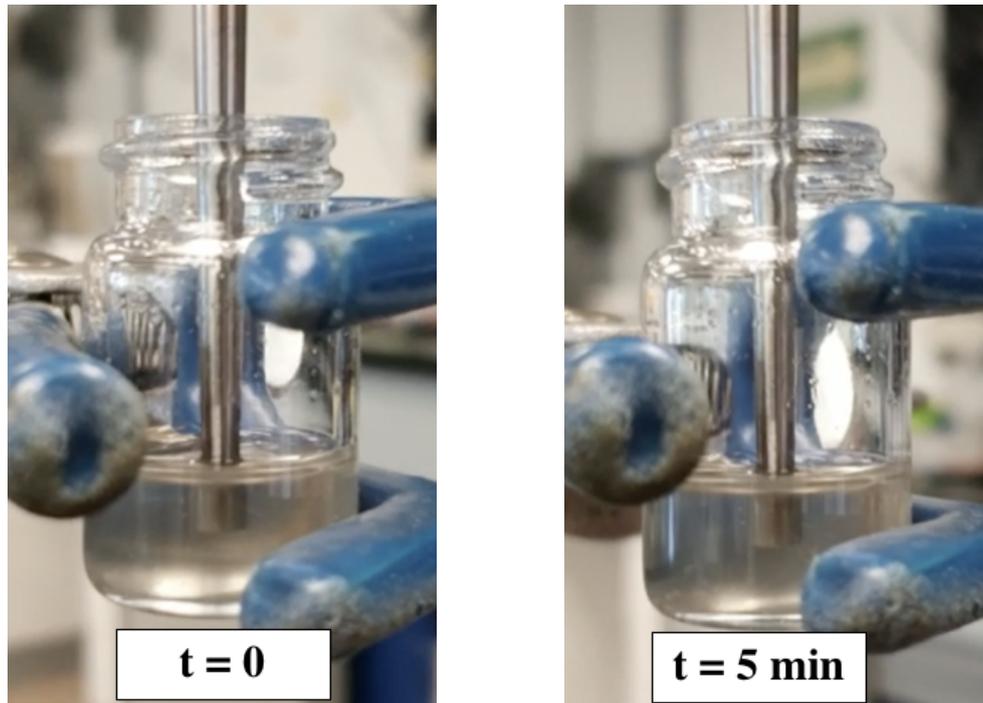


Figura 40. Efecto del ultrasonido sobre la apariencia de las nanosuspensiones

Para los sistemas que no contenían Tween[®] 80, el uso de la sonda de ultrasonido durante 5 minutos disminuyó la talla de partícula y el IPD, principalmente debido al efecto de cavitación, que permite la desintegración y fragmentación de los cristales (Figura 40) [71]. En cambio, tiempos mayores de sonicación incrementan el valor de los IPD y en algunos casos, la talla de los cristales. Estos resultados se asocian con la erosión de las partículas de fármaco, que conlleva a la producción de un gran número de estructuras finas, y como consecuencia, un mayor grado de polidispersión [72].

Con base en los resultados obtenidos, los sistemas SONS2 y SONS10 fueron seleccionados para los siguientes estudios (Figura 41).

Tabla 7. Efecto del tipo de tensoactivo y del tiempo de sonicación sobre el tamaño y el %EP de las nanosuspensiones (n = 3)

Sistema	Tensoactivo	Tiempo de sonicación (min)	Talla (nm)	IPD	%EP
SONS1	Span [®] 80	0	192.77 ± 6.90	0.645 ± 0.079	91.31 ± 0.38
SONS2	Span [®] 80	5	174.20 ± 4.90	0.252 ± 0.009	88.48 ± 2.95
SONS3	Span [®] 80	10	198.83 ± 24.44	0.519 ± 0.053	68.17 ± 1.33
SONS4	Span [®] 80	15	255.03 ± 10.56	0.824 ± 0.023	62.44 ± 2.10
SONS5	Span [®] 80:Tween [®] 80 (1:1)	0	974.43 ± 18.38	0.334 ± 0.034	61.94 ± 1.66
SONS6	Span [®] 80:Tween [®] 80 (1:1)	5	607.47 ± 74.62	0.261 ± 0.033	37.19 ± 0.16
SONS7	Span [®] 80:Tween [®] 80 (1:1)	10	841.30 ± 22.29	0.280 ± 0.012	38.47 ± 0.26
SONS8	Span [®] 80:Tween [®] 80 (1:1)	15	948.73 ± 81.26	0.493 ± 0.051	35.49 ± 1.09
SONS9	Sesquioleato de Sorbitán	0	434.63 ± 6.01	0.291 ± 0.047	75.54 ± 0.63
SONS10	Sesquioleato de Sorbitán	5	149.27 ± 5.93	0.272 ± 0.024	76.33 ± 0.62
SONS11	Sesquioleato de Sorbitán	10	351.27 ± 40.01	0.324 ± 0.018	61.05 ± 1.57
SONS12	Sesquioleato de Sorbitán	15	349.37 ± 33.87	0.424 ± 0.030	37.57 ± 0.68
SONS13	Sesquioleato de Sorbitán: Tween [®] 80 (1:1)	0	439.57 ± 47.09	0.709 ± 0.041	41.21 ± 0.61
SONS14	Sesquioleato de Sorbitán: Tween [®] 80 (1:1):	5	454.30 ± 42.86	0.201 ± 0.016	36.07 ± 0.26
SONS15	Sesquioleato de Sorbitán: Tween [®] 80 (1:1)	10	523.23 ± 5.49	0.295 ± 0.022	37.17 ± 1.02
SONS16	Sesquioleato de Sorbitán: Tween [®] 80 (1:1)	15	603.53 ± 34.04	0.418 ± 0.021	34.19 ± 0.19



Figura 41. Nanosuspensiones elegidas

6.5 Estabilidad de los nanoacarreadores

Los sistemas fueron almacenados bajo dos condiciones diferentes: $40 \pm 2^\circ\text{C}$ / 75% de HR y $25 \pm 2^\circ\text{C}$ / 60% de HR.

Después de ser almacenados a $40 \pm 2^\circ\text{C}$ / 75% de HR, todos los sistemas presentaron un incremento en el tamaño de partícula y la mayor parte de ellos disminuyeron la cantidad de fármaco cargado (Tabla 8).

Las MEs fueron formuladas con tensoactivos hidrofílicos no iónicos como estabilizante que pueden ser susceptibles a un aumento de la temperatura, deshidratándose y volviéndose más hidrofóbicos [73], disminuyendo la estabilidad de las MEs y mostrando un incremento significativo del tamaño de glóbulo después de 3 y 6 meses de almacenamiento. La ME1 no presentó ningún cambio en la cantidad disuelta del fármaco del tiempo de almacenamiento 3 meses a 6 meses. Por el contrario, la aparición de cristales en la ME5 durante el almacenamiento permite inferir que la mayor capacidad de solubilización alcanzada con la ME5 fue debido a la película interfacial del tensoactivo entre las fases acuosa y oleosa, lo que genera sitios adicionales de solubilización para el fármaco, que desaparecen con el aumento de la temperatura al incrementar la hidrofobicidad de los tensoactivos [10].

Las nanosuspensiones también presentaron la aparición de cristales en el fondo de los frascos después de 3 y 6 meses de almacenamiento, esto puede ser explicado considerando que las nanosuspensiones son sistemas coloidales termodinámicamente inestables, estabilizados temporalmente por moléculas de tensoactivos, que forman una película interfacial que al aumentar la temperatura se vuelve más dinámica. Del mismo modo, la adhesión y separación de las moléculas de tensoactivo en la superficie de las partículas dispersas, incrementa el fenómeno de crecimiento de Ostwald como una manera para reducir la energía libre de Gibbs [73,74]. Como consecuencia de la precipitación del fármaco, la cantidad de fármaco cargado disminuye de manera significativa durante el tiempo de almacenamiento.

Tabla 8. Estabilidad de nanosistemas cargados con ALD almacenados a $40 \pm 2^\circ\text{C}$ / 75% de HR durante 6 meses (n = 3)

Formulación	Fármaco cargado ($\mu\text{g/mL}$)			Talla (nm)		
	Tiempo cero	3 meses	6 meses	Tiempo cero	3 meses	6 meses
ME1	7719.60 \pm 131.31	7565.67 \pm 46.10	7511.59 \pm 140.96	38.52 \pm 1.80	436.23 \pm 50.90*	>1000*
ME5	8778.09 \pm 131.33	7603.68 \pm 103.57*	6725.58 \pm 129.14*	40.61 \pm 0.84	58.31 \pm 4.76*	>1000*
	%EP			Talla (nm)		
SONS2	73.44 \pm 1.65	60.20 \pm 1.14*	36.94 \pm 0.68*	176.64 \pm 5.12	352.22 \pm 11.27*	>1000*
SONS10	76.12 \pm 1.01	51.19 \pm 0.41*	49.34 \pm 0.51*	165.52 \pm 11.88	229.25 \pm 5.72*	>1000*

*Diferencia significativa con respecto al tiempo cero ($p < 0.05$)

Los sistemas presentaron una mayor estabilidad al ser almacenados a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ / 60% de HR (Tabla 9). Las MEs no presentaron ninguna diferencia significativa en tamaño de glóbulo ($p > 0.05$) durante el periodo de almacenamiento. El contenido de fármaco de la ME1 se mantuvo constante durante los estudios de estabilidad bajo estas condiciones. La ME5 presentó un decremento significativo ($p < 0.05$) en la cantidad de fármaco cargado a los 3 y a los 6 meses, lo que puede indicar la migración del fármaco hacia la fase acuosa, aumentando la concentración del mismo en esta fase, produciendo una supersaturación y posterior precipitación [76].

Ambas nanosuspensiones presentaron un decremento en el %EP y un aumento en la talla de partícula durante su almacenamiento a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ / 60% de HR (Tabla 9). Con el fin de comprobar la existencia de diferencias significativas en los parámetros estudiados en las SONS bajo diferentes condiciones, se comparó la diferencia entre el valor del parámetro a 6 meses menos el valor del parámetro a tiempo cero a través de una prueba de t, a partir de la cual se puede concluir que los cambios observados a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ / 60% de HR ocurrieron en menor grado que los presentados a $40 \pm 2^\circ\text{C}$ / 75% de HR ($p < 0.05$), lo que puede ser explicado por la menor temperatura y, como consecuencia, una menor velocidad del fenómeno de adhesión y separación de las moléculas de tensoactivos a las superficies de las partículas suspendidas.

Una opción para evitar estos cambios en las microemulsiones es formular el sistema de manera que puedan mezclarse sus fases justo antes de la administración.

Tabla 9. Estabilidad de nanosistemas cargados con ALD almacenados a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ / 60% de HR durante 6 meses (n = 3)

Formulación	Fármaco cargado ($\mu\text{g}/\text{mL}$)			Talla (nm)		
	Tiempo cero	3 meses	6 meses	Tiempo cero	3 meses	6 meses
ME1	7948.48 \pm 64.39	8006.23 \pm 56.75	7849.58 \pm 88.44	33.46 \pm 0.59	33.97 \pm 0.71	34.76 \pm 1.10
ME5	8871.14 \pm 174.68	8495.31 \pm 51.88*	8054.46 \pm 132.10*	48.61 \pm 2.65	47.38 \pm 2.79	50.49 \pm 3.23
	%EP			Talla (nm)		
SONS2	73.13 \pm 0.40	62.07 \pm 1.27*	58.92 \pm 1.32*	155.34 \pm 6.38	229.68 \pm 15.75*	274.94 \pm 15.82*
SONS10	77.89 \pm 0.69	62.04 \pm 0.47*	56.66 \pm 0.45*	209.90 \pm 8.17	271.04 \pm 11.94*	350.95 \pm 2.67*

*Diferencia significativa con respecto al tiempo cero ($p < 0.05$)

6.6 Medición de la pérdida de agua transepidérmica

La protección que ofrece el estrato córneo depende de la integridad de los corneocitos apilados y de los lípidos intercelulares [77]. La medición de la pérdida de agua transepidérmica (TEWL) se realizó antes y después de la aplicación de los nanosistemas, con el fin de determinar si las formulaciones seleccionadas poseían algún impacto sobre la función de barrera de la piel [78], y de esta manera elucidar el mecanismo del aumento de la permeación de los sistemas seleccionados.

En la Figura 42 se presentan los resultados obtenidos para cada sistema antes y después del tratamiento. Se puede observar que la aplicación de la ME1 produce un incremento en el valor de TEWL, mientras que la ME5 presenta una disminución significativa, lo que es el resultado de un mayor porcentaje de fase oleosa en la ME5, dando como resultado un efecto oclusivo sobre la piel. Adicionalmente, la mayor concentración de Labrasol[®] en la ME1 puede interactuar con los lípidos del estrato córneo desordenándolos y aumentando la cantidad de agua que se evapora a través de la piel, siendo este uno de los mecanismos que permiten la permeación del fármaco [78, 79].

En el caso de las SONS, los valores de TEWL presentaron un decremento significativo después del tratamiento con ambas formulaciones, lo que se puede explicar por la habilidad del miristato de isopropilo para formar películas sobre la superficie de la piel, disminuyendo la evaporación de agua [52]. Las diferencias fueron significativas en todos los casos ($p < 0.05$).

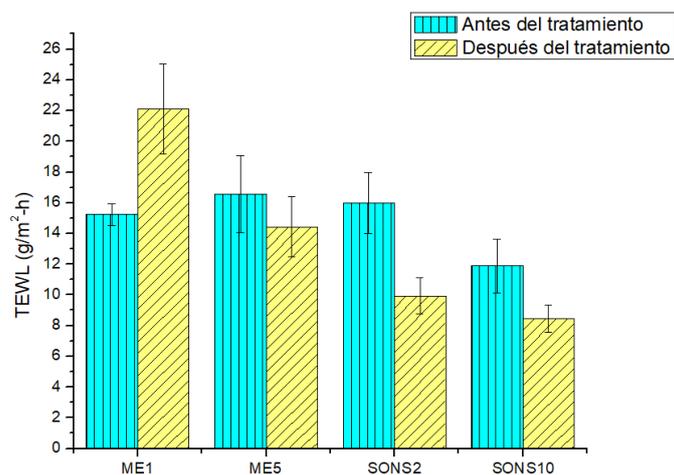


Figura 42. Efecto de las formulaciones elegidas sobre TEWL (n=3)

6.7 Medición del índice de eritema

La potencial irritación causada por los componentes del sistema, principalmente por la desorganización del estrato córneo producida por los tensoactivos y las fases oleosas, fue evaluada midiendo el grado de eritema [8, 80].

El promedio del valor de eritema para cada voluntario se presenta en las Tablas 10, 11 y 12. Los resultados se compararon con la *Guía para valores de eritema* proporcionada por el fabricante (Sin eritema: 0 – 170, eritema mínimo: 170 – 330, enrojecimiento difuso: 330 – 450, eritema alto: 450 – 570, eritema extremo: mayor a 570) [82]. En los resultados se observa que la mayoría de los valores obtenidos disminuyeron después de la aplicación de las formulaciones y no se obtuvo ningún valor mayor a 330, asumiendo de esta manera que todos los sistemas fueron bien tolerados por la piel después de 2 horas de contacto.

Tabla 10. Pruebas de formación de eritema con el sistema ME1 llevadas a cabo en el antebrazo humano (n=5)

		Voluntario											
		1		2		3		4		5		6	
Sistema	Tiempo (min)	AT	PT	AT	PT	AT	PT	AT	PT	AT	PT	AT	PT
ME1	30	343 ± 2	288 ± 5	210 ± 4	211 ± 4	295 ± 14	199 ± 15	281 ± 7	235 ± 8	275 ± 13	292 ± 6	264 ± 12	216 ± 5
	60	341 ± 8	272 ± 27	215 ± 6	203 ± 20	264 ± 1	226 ± 4	247 ± 12	272 ± 2	272 ± 24	313 ± 12	274 ± 8	227 ± 18
	90	324 ± 23	261 ± 14	213 ± 12	174 ± 13	245 ± 7	212 ± 15	277 ± 2	194 ± 15	257 ± 12	321 ± 12	244 ± 14	234 ± 4
	120	297 ± 7	245 ± 11	188 ± 5	144 ± 8	299 ± 11	275 ± 10	292 ± 7	229 ± 6	291 ± 8	265 ± 14	262 ± 4	249 ± 7
Control	30	294 ± 15	285 ± 26	225 ± 17	233 ± 13	316 ± 6	215 ± 7	282 ± 7	244 ± 11	238 ± 15	264 ± 19	263 ± 5	209 ± 9
	60	268 ± 15	265 ± 16	177 ± 11	191 ± 12	257 ± 6	210 ± 12	289 ± 10	312 ± 7	252 ± 10	223 ± 13	259 ± 5	222 ± 13
	90	276 ± 18	229 ± 8	182 ± 4	199 ± 1	223 ± 11	192 ± 14	289 ± 10	272 ± 8	235 ± 12	298 ± 18	246 ± 6	223 ± 10
	120	267 ± 12	251 ± 7	207 ± 2	171 ± 13	269 ± 9	206 ± 13	299 ± 6	254 ± 15	254 ± 13	238 ± 23	264 ± 10	251 ± 7

AT: Antes del tratamiento
PT: Posterior al tratamiento

Tabla 11. Pruebas de formación de eritema con el sistema SONS2 llevadas a cabo en el antebrazo humano (n=5)

		Voluntario											
		1		2		3		4		5		6	
Sistema	Tiempo (min)	AT	PT	AT	PT	AT	PT	AT	PT	AT	PT	AT	PT
SONS2	30	272 ± 6	264 ± 8	253 ± 12	263 ± 9	291 ± 9	255 ± 9	208 ± 9	233 ± 9	282 ± 10	268 ± 10	330 ± 8	305 ± 9
	60	248 ± 5	158 ± 6	269 ± 13	267 ± 9	281 ± 8	255 ± 7	219 ± 11	176 ± 8	272 ± 16	272 ± 11	325 ± 10	319 ± 12
	90	267 ± 10	238 ± 8	228 ± 13	225 ± 9	321 ± 10	308 ± 5	213 ± 11	193 ± 8	291 ± 8	315 ± 12	317 ± 10	318 ± 9
	120	272 ± 10	229 ± 11	237 ± 4	194 ± 10	291 ± 6	312 ± 11	237 ± 10	211 ± 10	353 ± 9	273 ± 25	296 ± 6	316 ± 8
Control	30	286 ± 13	220 ± 6	258 ± 13	218 ± 9	313 ± 11	167 ± 9	217 ± 5	206 ± 6	286 ± 10	268 ± 14	283 ± 14	224 ± 13
	60	280 ± 7	278 ± 18	280 ± 4	248 ± 12	188 ± 9	179 ± 11	236 ± 10	185 ± 8	268 ± 8	215 ± 14	265 ± 16	241 ± 16
	90	286 ± 9	209 ± 10	309 ± 7	239 ± 10	294 ± 11	144 ± 10	211 ± 6	166 ± 7	283 ± 10	222 ± 7	327 ± 10	259 ± 7
	120	290 ± 7	200 ± 15	288 ± 8	202 ± 6	241 ± 12	146 ± 9	230 ± 6	171 ± 10	295 ± 10	203 ± 16	301 ± 17	259 ± 7

AT: Antes del tratamiento
PT: Posterior al tratamiento

Tabla 12. Pruebas de formación de eritema con el sistema SONS10 llevadas a cabo en el antebrazo humano (n=5)

		Voluntario											
		1		2		3		4		5		6	
Sistema	Tiempo (min)	AT	PT	AT	PT	AT	PT	AT	PT	AT	PT	AT	PT
SONS10	30	253 ± 12	275 ± 10	227 ± 10	227 ± 5	226 ± 1	242 ± 7	307 ± 12	255 ± 22	252 ± 10	257 ± 8	291 ± 10	256 ± 13
	60	251 ± 5	243 ± 16	222 ± 7	239 ± 11	248 ± 8	231 ± 10	290 ± 8	277 ± 16	252 ± 6	261 ± 10	271 ± 4	254 ± 5
	90	244 ± 11	237 ± 15	225 ± 9	221 ± 10	228 ± 9	219 ± 9	268 ± 8	279 ± 12	274 ± 14	282 ± 10	247 ± 9	230 ± 5
	120	244 ± 10	173 ± 4	243 ± 10	231 ± 11	234 ± 9	183 ± 16	301 ± 12	269 ± 9	289 ± 9	303 ± 6	234 ± 9	205 ± 5
Control	30	229 ± 7	199 ± 9	201 ± 6	167 ± 9	217 ± 5	200 ± 9	286 ± 10	262 ± 19	283 ± 14	233 ± 12	265 ± 5	252 ± 17
	60	215 ± 2	180 ± 14	185 ± 12	179 ± 11	236 ± 10	185 ± 8	265 ± 10	207 ± 12	278 ± 16	230 ± 19	238 ± 9	273 ± 6
	90	216 ± 6	166 ± 12	194 ± 11	144 ± 10	212 ± 6	168 ± 6	283 ± 10	220 ± 6	331 ± 9	259 ± 7	239 ± 4	212 ± 6
	120	220 ± 8	169 ± 12	243 ± 11	146 ± 9	230 ± 6	165 ± 12	289 ± 13	203 ± 15	284 ± 14	257 ± 8	176 ± 4	224 ± 4

AT: Antes del tratamiento
PT: Posterior al tratamiento

6.8 Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier

La espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (ATR-FTIR) es una herramienta útil para caracterizar la piel a nivel molecular, midiendo el grado de desorden en el estrato córneo, a fin de conocer el mecanismo de promoción de la permeación de los sistemas estudiados [83]. Se estudiaron cuatro bandas características: para lípidos del estrato córneo, vibración asimétrica de metileno (ν_{as}, CH_2) a 2917 cm^{-1} , y vibración simétrica de metileno (ν_s, CH_2) a 2850 cm^{-1} ; para proteínas, amida I a 1638 cm^{-1} y amida II a 1540 cm^{-1} (Figura 43) [49]. Variaciones en las bandas de máxima absorción implican cambios en la organización molecular [78]. Ambas microemulsiones (ME1 y ME5) contienen Labrasol[®], que puede interactuar con los lípidos y desorganizar su estructura; mientras que las nanosuspensiones están compuestas por miristato de isopropilo (IPM) como fase continua, el cual puede distribuirse dentro de las bicapas lipídicas del estrato córneo, aumentando su fluidez y debilitando los puentes de hidrógeno formados entre los grupos C=O de los lípidos [49], [83]. Por otra parte, la concentración tan alta de tensoactivos no iónicos puede interactuar con los filamentos de queratina produciendo un desordenamiento de los corneocitos [84]. Sin embargo, al comparar los resultados de la piel tratada con los nanosistemas contra la piel sin tratamiento (control), en todos los casos se obtuvo una diferencia de 1 cm^{-1} (hacia números de onda mayores o menores) (Tabla 13). Dichos desplazamientos se consideran no significativos teniendo en cuenta la resolución a la cual las mediciones se llevaron a cabo. Por lo que estos resultados no reflejan una alteración en los componentes de la membrana al ser expuestos a los nanosistemas

Tabla 13. Número de onda del espectro ATR-FTIR de los componentes del estrato córneo después del tratamiento con los nanosistemas (n=3)

Muestra	Número de onda (cm^{-1})			
	$\nu_{as}(CH_2)$	$\nu_s(CH_2)$	Amida I	Amida II
Piel control	2917.120	2850.581	1638.409	1540.046
Piel-ME1	2918.084	2849.616	1637.444	1541.011
Piel-ME5	2918.084	2849.616	1638.409	1540.046
Piel-SONS2	2918.084	2849.616	1637.444	1541.011
Piel-SONS10	2918.084	2849.616	1637.444	1541.011

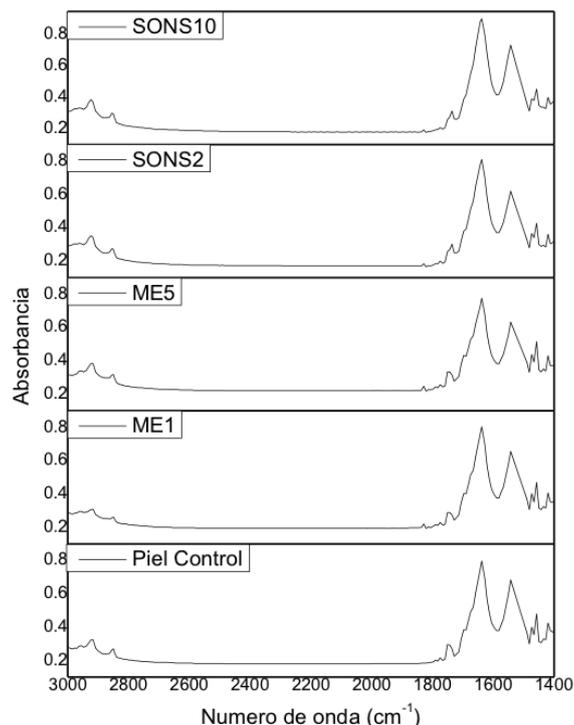


Figura 43. Espectro IR de la piel control y después del tratamiento con las formulaciones elegidas

6.9 Evaluación del perfil de liberación de ALD desde los nanoacarreadores

La Figura 44 muestra los perfiles de liberación de ALD desde los nanoacarreadores. En el caso de las ME1 y ME5, el 100% del fármaco se liberó en menos de 5 horas. La ME1 liberó el fármaco a una velocidad mayor que la ME5 ($p < 0.05$, anexo 2). Esto se atribuye a la mayor solubilidad del ALD en la ME5, indicando una mayor afinidad hacia este sistema que consecuentemente reduce la velocidad de liberación en relación con la ME1 [85]. En cambio, la velocidad de liberación de ALD desde las SONS fue muy lenta, liberando solo el 35.66% desde la SONS2 y 22.86% desde SONS10 en un período de una semana, lo que se atribuye a la tortuosidad de la ruta que el fármaco debe superar para ser liberado y solubilizado [86].

Las soluciones de fármaco (S1 y S2) se utilizaron como controles, presentando una velocidad de liberación a partir de la membrana de diálisis menor al ser comparadas contra las microemulsiones ($p < 0.05$, anexo 2). Este resultado puede estar relacionado con el hecho de que la mayor parte del fármaco en las microemulsiones se encuentra en la fase acuosa continua, interactuando poco con la fase oleosa [83], [87] y, como

consecuencia, las MEs presentan una mayor actividad termodinámica que la soluciones de fármaco. Después de 8 horas de liberación, las soluciones presentaron una meseta, y después de 24 horas, 86 y 82% del total del fármaco fue liberado desde S1 y S2, respectivamente. El resto del fármaco fue cuantificado dentro de las bolsas de diálisis.

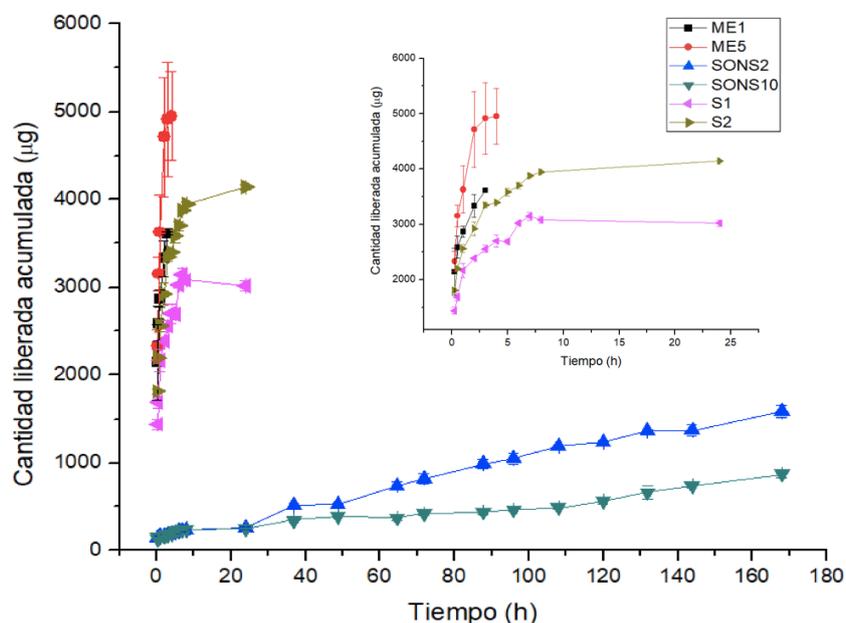


Figura 44. Perfiles de liberación de ALD desde las soluciones, microemulsiones y nanosuspensiones (n = 4)

Con el fin de conocer el mecanismo de liberación de fármaco desde los nanosistemas, se utilizó un complemento de Excel, DDSolver. Los resultados obtenidos de los estudios de liberación se ajustaron a los siguientes modelos matemáticos: orden cero, primer orden, Higuchi y Korsmeyer-Peppas en el caso de las SONS; cero y primer orden para la MEs (liberaron más del 60% del fármaco en la primer hora del estudio). La idoneidad del modelo se determinó con base en los valores de AIC (Criterio de Información Akaike) y MSC (Forma recíproca modificada de AIC) obtenidos (Tabla 14) [88]. Ambas MEs se ajustaron mejor a la Ecuación de primer orden indicando que la velocidad de liberación es dependiente de la concentración del fármaco.

Por otro lado, las SONS presentaron un mejor ajuste con el modelo Korsmeyer-Peppas. SONS2 presentó un valor de “n” de 0.6893 sugiriendo que más de un mecanismo de liberación está involucrado. Este patrón de liberación puede ser atribuido a la débil interacción tensoactivo-fármaco al ser comparado con la SONS10, indicando

mecanismos de difusión y partición. El valor de “n” para SONS10 fue 0.2602 infiriendo un mecanismo de liberación pseudofickiano [88, 89].

Tabla 14. Modelos y cinéticas de liberación de los nanoacarreadores seleccionados

Sistema	Orden 0			Orden 1			Raíz cuadrada de Higuchi			Korsmeyer-Peppas			
	AIC	MSC	K ₀ (% h ⁻¹)	AIC	MSC	K ₁ (h ⁻¹)	AIC	MSC	K ₂ (% h ^{-1/2})	AIC	MSC	n	K _∞ (% h ⁻¹)
ME1	46.183	-2.317	42.310	31.958	0.528	2.583	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
ME5	54.854	-1.439	31.901	36.429	1.632	1.715	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
SONS2	113.337	2.707	0.232	107.246	2.983	0.003	109.789	2.868	2.418	97.306	3.435	0.689	1.015
SONS10	124.193	0.770	0.137	123.263	0.812	0.002	103.935	1.691	1.475	101.054	1.822	0.260	2.673

6.10 Cinéticas de permeación *in vitro* de ALD

Los estudios de permeación *in vitro* se realizaron utilizando una membrana sintética Strat-M[®]. Se eligió esta membrana debido a su reproducibilidad lote a lote y a la buena correlación de valores de permeabilidad en relación con los obtenidos con piel humana [60], [91]. El aledronato es un compuesto muy hidrofílico y cargado eléctricamente, dichas características no favorecen la permeación a través del estrato córneo. Por tal motivo las soluciones de fármaco no presentaron permeación a ningún tiempo. En contraste, la incorporación del fármaco en los nanosistemas mejoró la permeación a través de la membrana Strat-M[®]. Los perfiles de permeación se muestran en la Figura 45 y los parámetros de permeación en la Tabla 15. En el caso de las SONS, se reportan dos valores de flujo (0-5 h y 5-24 h). De acuerdo con su magnitud, los valores de flujo obtenidos con los diferentes nanosistemas presentaron el siguiente orden: ME1 > ME5 > SONS2 (0-5h) = SONS10 (0-5h) > SONS2 (5-24h) > SONS10 (5-24h). Con excepción de SONS2 (0-5h) y SONS10 (0-5h), en el resto de los casos se presentaron diferencias significativas ($p < 0.05$).

Las microemulsiones presentaron los valores de flujo más altos, en especial la ME1, que posee una mayor concentración de Labrasol[®] que la ME5. La membrana Strat-M[®] está compuesta por dos capas de poliétersulfona y una de sulfona poliolefina inmersas en una mezcla de ceramidas, colesterol, ácidos grasos libres y otros lípidos que mimetizan el estrato córneo humano [60]. Así que, durante la permeación el fármaco tiene que atravesar dominios hidrofílicos e hidrofóbicos [92], conforme a los datos obtenidos en la sección 6.6, el valor de TEWL aumenta tras la aplicación de la ME1, mostrando la capacidad de dicho sistema para desordenar los lípidos de la membrana facilitando el transporte del fármaco. Otro factor importante a considerar, es el mayor

grado de saturación de fármaco en la ME1, debido a la menor solubilidad del fármaco en el sistema, lo que implica una actividad termodinámica más grande, favoreciendo la permeación a través de la piel [9].

SONS2 y SONS10 presentaron un flujo significativamente menor que las MEs. Este resultado era esperado al revisar los perfiles de liberación de las SONS. El hecho de que las SONS permitieran la permeación del fármaco hacia el medio receptor, se atribuye a su fase oleosa continua, que contribuye a generar un efecto oclusivo, resultando en una desorganización de los lípidos de la membrana, creando una estructura más fluida, ampliando los dominios hidrofílicos [93].

Como se puede ver en la Figura 45A, ambas nanosuspensiones presentaron un flujo alto durante las primeras 5 horas del estudio de permeación. Esto puede indicar que las moléculas de fármaco que permearon durante este primer periodo fueron aquellas que se encontraban más cercanas a la membrana Strat-M[®], mientras que el resto del fármaco permeado tuvo que moverse a través del sistema para alcanzar la membrana. La fase oleosa representa un medio tortuoso para el fármaco y, como resultado, el flujo disminuyó.

SONS 10 presentó un menor flujo después de 5 horas de permeación debido a la mayor longitud de cadena alquílica del estabilizante (sesquioleato de sorbitán), que puede interactuar con los lípidos de la membrana, incrementando su afinidad y retardando la permeación [94].

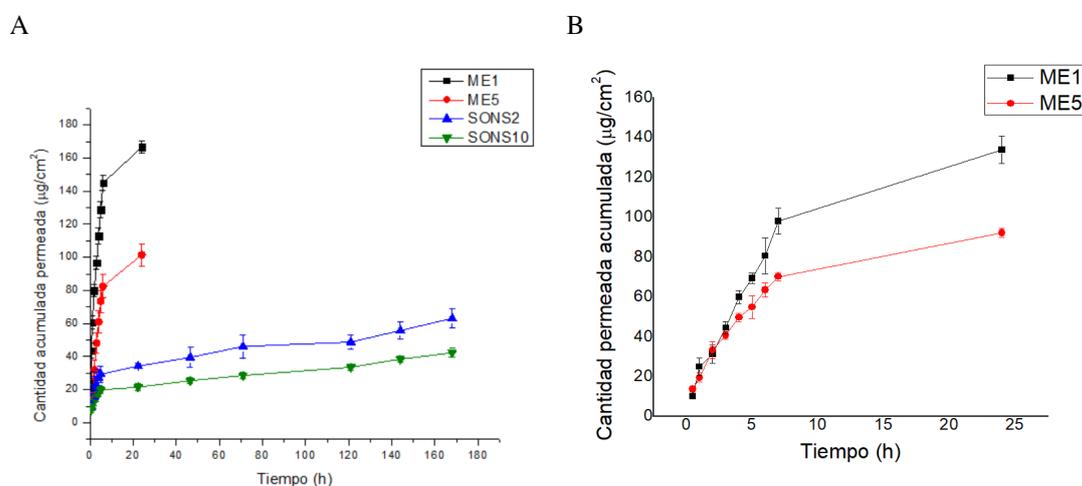


Figura 45. Perfiles de permeación *in vitro* de ALD desde los diferentes sistemas a través de A. Membrana sintética Strat M[®], B. Piel de oreja de cerdo

Como las MEs presentaron los mejores resultados de permeación a través de la membrana sintética, éstas fueron usadas para llevar a cabo un estudio a través de piel de oreja de cerdo. Como se muestra en la Figura 45, los perfiles de permeación a través de la membrana Strat-M[®] (Figura 45A) y a través de la piel (Figura 45B) muestran una tendencia similar, en ambos casos la ME1 presenta una mayor permeabilidad que la ME5. Se encontró una buena correlación entre la cantidad permeada a través de la membrana Strat-M[®] contra la cantidad permeada a través de la piel, con valores de R de 0.89 y 0.95 para la ME1 y la ME5, respectivamente (Figura 46). Lo que corrobora la utilidad de las membranas sintéticas cuando se compara la permeabilidad de diferentes sistemas. No obstante, la membranas sintéticas son generalmente más permeables que la piel, lo que se debe tener en cuenta cuando se utilizan en estudios de permeación. Este hecho se confirma con los resultados mostrados en la Tabla 15, que presenta los parámetros de permeación obtenidos a través de la membrana sintética y a través de la piel, con valores de flujo mayores para la membrana Strat-M[®] que para la piel ($p < 0.05$). Esto se atribuye a la menor tortuosidad de la ruta hidrofílica en las membranas sintéticas, resultando en una mayor permeabilidad para compuestos hidrofílicos [60]. Además, aún cuando los componentes de la membrana traten de imitar la piel, este es un tejido complejo, tanto en composición como en estructura. Por otra parte, al igual que en la membrana Strat-M[®], la solución de fármaco no fue capaz de permear a través de la piel; sin embargo, la formulación de ALD en las microemulsiones favoreció el transporte a través de la piel, la ME1 presentó la mayor cantidad permeada y flujo más alto, debido al mayor porcentaje de Labrasol[®] en su formulación (en comparación con las ME5). Esto concuerda con varios reportes que han demostrado que Labrasol[®] es un buen promotor de la permeación para fármacos de diversas polaridades, no solo a través de la ruta transdérmica sino a través de otras rutas de permeación [91]–[93].

La dosis tradicional utilizada de alendronato vía oral es de 10 mg al día y se ha reportado que la biodisponibilidad del fármaco por esta vía está entre el 0.9 y el 1.8%, por lo que la cantidad que llega a torrente sanguíneo va de 90 a 180 μg . En este trabajo se obtuvo para ME1 en piel de oreja de cerdo un flujo de 13.06 $\mu\text{g}/\text{cm}^2\text{h}$, esta velocidad de permeación permite suponer que ME1 podría ser una alternativa prometedora para el tratamiento de la osteoporosis.

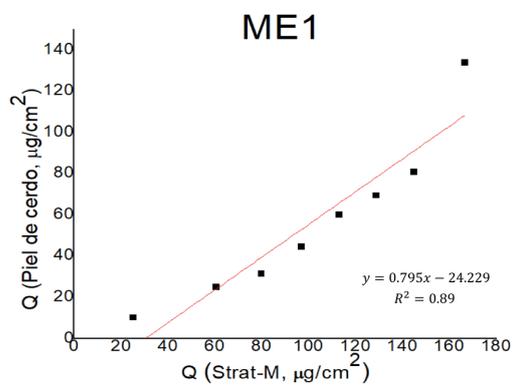
Tabla 15. Parámetros de permeación transdérmica *in vitro* de ALD obtenido de las diferentes formulaciones estudiadas

Formulación	J ($\mu\text{g}/\text{cm}^2\text{h}$)		K_p (cm/h)		Q_t ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)
ME1 (Strat M [®])*	16.70 \pm 0.65		2.39x10 ⁻³ \pm 1.03x10 ⁻³		166.64 \pm 3.65
ME5 (Strat M [®])*	13.35 \pm 1.03		1.52x10 ⁻³ \pm 1.17x10 ⁻³		101.57 \pm 6.78
ME1 (Piel oreja)**	13.06 \pm 1.07		1.87x10 ⁻³ \pm 1.54x10 ⁻³		133.87 \pm 6.80
ME5 (Piel oreja)**	8.52 \pm 0.50		9.68x10 ⁻³ \pm 5.69x10 ⁻³		92.13 \pm 2.28
SONS2	2.91 \pm 0.23 (0-5h)	0.19 \pm 0.02 (5-168h)	3.27x10 ⁻³ \pm 2.60 x10 ⁻³ (0-5h)	2.14x10 ⁻³ \pm 2.07x10 ⁻³ (5-168h)	63.17 \pm 5.94
SONS10	2.54 \pm 0.19 (0-5h)	0.13 \pm 0.01 (5-168h)	3.33x10 ⁻³ \pm 2.44x10 ⁻³ (0-5h)	1.77x10 ⁻³ \pm 1.39x10 ⁻³ (5-168h)	42.32 \pm 2.62

*(Promedio \pm SD; n=4)

** (Promedio \pm SD; n=3)

A



B

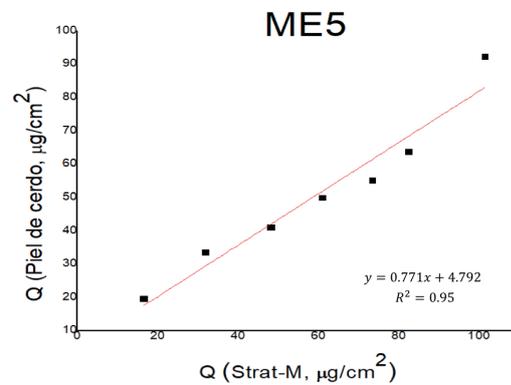


Figura 46. Correlación temporal entre la cantidad de fármaco permeado a través de la membrana Strat M[®] y piel de oreja de cerdo; A. ME1; B. ME5

7. Conclusiones

Se desarrollaron nuevos nanosistemas transdérmicos cargados con alendronato sódico: microemulsiones y nanosuspensiones sólido en aceite, optimizándolos en cuanto a su composición y proceso de preparación; para obtener los sistemas con mayor cantidad de fármaco cargado, menor talla de partícula/glóbulo e IPD. Se demostró a través de estudios *in vitro* utilizando membranas sintéticas Strat® M y piel de oreja de cerdo que los sistemas formulados mejoran la permeación transdérmica de ALD, en especial las microemulsiones debido a su capacidad para desordenar el estrato córneo y a su actividad termodinámica.

Las microemulsiones mostraron una velocidad de liberación mayor que las nanosuspensiones debido al camino menos tortuoso que el fármaco debe recorrer. La cinética de liberación para estos sistemas se ajustó mejor al modelo de primer orden por lo que la velocidad de liberación es dependiente de la concentración del fármaco, mientras que las nanosuspensiones se ajustaron mejor al modelo Korsmeyer-Peppas (el sistema SONS2 con un valor de “n” que indica la participación de dos mecanismos de liberación y la SONS10 una liberación pseudofickiana).

Todos los sistemas presentaron inestabilidad a $40 \pm 2^\circ\text{C}$ / 75% de HR. A la condición de $25 \pm 2^\circ\text{C}$ / 60% de HR la ME1 fue estable no presentando cambios significativos ni en el tamaño de glóbulo ni en la carga del fármaco, mostrando ser un sistema más conveniente al ser comparadas con el resto de los sistemas.

Los resultados presentados en este trabajo permitieron evidenciar el potencial de los sistemas preparados y de la vía transdérmica, como nuevas alternativas para el tratamiento de la osteoporosis de una manera más eficiente y cómoda para el paciente.

8. Perspectivas

- ◆ Llevar a cabo la cuantificación del fármaco en las muestras de plasma obtenidas en los estudios *in vivo*.
- ◆ Calcular la biodisponibilidad oral y transdérmica absoluta de diferentes sistemas cargados con alendronato.
- ◆ Evaluar la biodisponibilidad relativa de los sistemas transdérmicos con alendronato respecto a la administración oral
- ◆ Realizar pruebas de índice de eritema utilizando formulaciones cargadas con fármaco durante períodos más prolongados para conocer el efecto del ALD sobre la seguridad del sistema.
- ◆ Considerar la adición en las formulaciones de un agente secuestrante de especies reactivas de oxígeno y evaluar su efecto en la reducción de la posible irritación en piel ocasionada por el fármaco.
- ◆ Evaluar el efecto terapéutico de la ME1 en un modelo animal.
- ◆ Estudiar la incorporación de otros fármacos hidrofílicos en los sistemas desarrollados para verificar su capacidad de liberación transdérmica.

9. Bibliografía

- [1] K. N. Tu *et al.*, “Osteoporosis: A review of treatment options,” *P T*, vol. 43, no. 2, pp. 92–104, 2018.
- [2] P. Clark, F. Cons-Molina, M. Deleze, J. O. Talavera, L. Palermo, and S. O. Cummings, “The prevalence of radiographic vertebral fractures in Mexican men,” *Osteoporos. Int.*, vol. 21, no. 9, pp. 1523–1528, 2010.
- [3] F. Cosman *et al.*, “Clinician’s Guide to Prevention and Treatment of Osteoporosis,” *Osteoporos. Int.*, vol. 25, no. 10, pp. 2359–2381, 2014.
- [4] P. Clark Peralta *et al.*, “Prevención , diagnóstico y tratamiento de la Osteoporosis. Guía de Consulta Para el Médico de Primer Nivel de Atención.” Centro Nacional de Programas Preventivos y Control de Enfermedades, p. 39, 2017.
- [5] T. Alama *et al.*, “Enhanced oral delivery of alendronate by sucrose fatty acids esters in rats and their absorption-enhancing mechanisms,” *Int. J. Pharm.*, vol. 515, no. 1–2, pp. 476–489, 2016.
- [6] H. K. Han, H. J. Shin, and D. H. Ha, “Improved oral bioavailability of alendronate via the mucoadhesive liposomal delivery system,” *Eur. J. Pharm. Sci.*, vol. 46, no. 5, pp. 500–507, 2012.
- [7] H. Katsumi *et al.*, “Absorption and safety of alendronate, a nitrogen-containing bisphosphonate, after intrapulmonary administration in rats,” *Int. J. Pharm.*, vol. 400, no. 1–2, pp. 124–130, 2010.
- [8] N. B. Watts *et al.*, “American Association of Clinical Endocrinologists Medical Guidelines for Clinical Practice for the diagnosis and treatment of postmenopausal osteoporosis,” *Endocr. Pract.*, vol. 16, pp. 1–37, 2010.
- [9] P. Karande and S. Mitragotri, “Enhancement of transdermal drug delivery via synergistic action of chemicals,” *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.*, vol. 1788, no. 11, pp. 2362–2373, 2009.
- [10] A. Kogan and N. Garti, “Microemulsions as transdermal drug delivery vehicles,” *Adv. Colloid Interface Sci.*, vol. 123–126, no. SPEC. ISS., pp. 369–385, 2006.
- [11] B. J. Thomas and B. C. Finnin, “The transdermal revolution,” *Drug Discov. Today*, vol. 9, no. 16, pp. 697–703, 2004.
- [12] C. Ramachandran and D. Fleisher, “Transdermal delivery of drugs for the treatment of bone diseases,” *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 42, no. 3, pp. 197–223,

- 2000.
- [13] D. J. Hadjidakis and I. I. Androulakis, "Bone remodeling," *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, vol. 1092, pp. 385–396, 2006.
- [14] P. G. Robey, "Noncollagenous Bone Matrix Proteins," *Princ. Bone Biol. Two-Volume Set*, vol. 1, pp. 335–349, 2008.
- [15] Tim Newman, "Bones: Types, structure, and function," 2018. [Online]. Available: <https://www.medicalnewstoday.com/articles/320444>. [Accessed: 19-Apr-2020].
- [16] D. Li *et al.*, "Osteoclast-derived exosomal miR-214-3p inhibits osteoblastic bone formation," *Nat. Commun.*, 2016.
- [17] M. P. Jeremiah, B. K. Unwin, M. H. Greenawald, and V. E. Casiano, "Diagnosis and management of osteoporosis," *Am. Fam. Physician*, vol. 92, no. 4, pp. 261–268, 2015.
- [18] J. L. Angel, W. Vega, M. López-Ortega, and R. Pruchno, "Aging in Mexico: Population trends and emerging issues," *Gerontologist*, vol. 57, no. 2, pp. 153–162, 2017.
- [19] CONAPO, "Projections of the Population of Mexico 2010-2050," p. 15, 2010.
- [20] P. M. Camacho *et al.*, "American association of clinical endocrinologists/American college of endocrinology clinical practice guidelines for the diagnosis and treatment of postmenopausal osteoporosis-2020 update," *Endocrine Practice*, vol. 26, no. s1. American Association of Clinical Endocrinologists, pp. 1–46, 15-May-2020.
- [21] P. M. Camacho *et al.*, "American association of clinical endocrinologists and American college of endocrinology clinical practice guidelines for the diagnosis and treatment of postmenopausal osteoporosis - 2016," *Endocr. Pract.*, vol. 22, no. September, pp. 1–42, 2016.
- [22] M. Fazil, S. Baboota, J. K. Sahni, Ameduzzafar, and J. Ali, "Bisphosphonates: Therapeutics potential and recent advances in drug delivery," *Drug Delivery*, vol. 22, no. 1. pp. 1–9, 2015.
- [23] S. E. Papapoulos, "Bisphosphonates: how do they work?," *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.*, vol. 22, no. 5, pp. 831–847, 2008.
- [24] D. L. Diab, N. B. Watts, and P. D. Miller, *Bisphosphonates: Pharmacology and Use in the Treatment of Osteoporosis*, Fourth Edi. Elsevier, 2013.

- [25] A. P. Soares *et al.*, “Bisphosphonates: Pharmacokinetics, bioavailability, mechanisms of action, clinical applications in children, and effects on tooth development,” *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, vol. 42, pp. 212–217, 2016.
- [26] M. I. Walash, M. E. S. Metwally, M. Eid, and R. N. El-Shaheny, “Validated spectrophotometric methods for determination of Alendronate sodium in tablets through nucleophilic aromatic substitution reactions,” *Chem. Cent. J.*, vol. 6, no. 1, p. 25, 2012.
- [27] J. E. N. Dolatabadi, H. Hamishehkar, M. Eskandani, and H. Valizadeh, “Formulation, characterization and cytotoxicity studies of alendronate sodium-loaded solid lipid nanoparticles,” *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, vol. 117, pp. 21–28, 2014.
- [28] L. P. de la Vega, F. Fervenza, D. Lager, T. Habermann, and N. Leung, “Acute Granulomatous Interstitial Nephritis Secondary to Bisphosphonate Alendronate Sodium,” *Ren. Fail.*, vol. 27, no. 4, pp. 485–489, 2005.
- [29] A. Z. Alkilani, M. T. C. McCrudden, and R. F. Donnelly, “Transdermal drug delivery: Innovative pharmaceutical developments based on disruption of the barrier properties of the stratum corneum,” *Pharmaceutics*, vol. 7, no. 4, pp. 438–470, 2015.
- [30] A. C. Williams, “Topical and transdermal drug delivery,” in *Aulton’s Pharmaceutics*, Fifth., M. E. Aulton and K. Taylor, Eds. Elsevier, 2018, pp. 715–738.
- [31] C. Kolarsick, Paul. Kolarsick, Maria Ann. Goodwin, “Anatomy and Physiology of the Skin,” *J. Dermatol. Nurses. Assoc.*, pp. 203–213, 2011.
- [32] “Cells and Layers of the Epidermis – Earth’s Lab.” [Online]. Available: <https://www.earthslab.com/physiology/cells-layers-epidermis/>. [Accessed: 19-Apr-2020].
- [33] H. A. E. Benson, “Skin Structure, Function, and Permeation,” in *Transdermal and Topical Drug Delivery. Principles and Practice*, First., H. A. E. Benson and A. C. Watkinson, Eds. John Wiley & Sons, Inc, 2012, pp. 3–22.
- [34] A. C. Williams, “Structure and function of human skin,” in *Transdermal and Topical Drug Delivery. From theory to clinical practice*, First., A. C. Williams, Ed. Pharmaceutical Press, 2003, pp. 1–25.
- [35] N. Bibi, N. Ahmed, and G. M. Khan, “Nanostructures in transdermal drug

- delivery systems,” in *Nanostructures for Drug Delivery*, E. Andronescu and A. M. Grumezescu, Eds. Elsevier, 2017, pp. 640–660.
- [36] A. Lauterbach and C. C. Müller-Goymann, “Applications and limitations of lipid nanoparticles in dermal and transdermal drug delivery via the follicular route,” *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, vol. 97, no. July, pp. 152–163, 2015.
- [37] A. Lauterbach and C. C. Mueller-Goymann, “Development, formulation, and characterization of an adapalene-loaded solid lipid microparticle dispersion for follicular penetration,” *Int. J. Pharm.*, vol. 466, no. 1–2, pp. 122–132, 2014.
- [38] J. P. Atkinson, H. Maibach, and N. Dragicevic, “Targets in Dermal and Transdermal Delivery and Classification of Penetration Enhancement Methods,” in *Percutaneous Penetration Enhancers Chemical Methods in Penetration Enhancement: Drug Manipulation Strategies and Vehicle Effects*, N. Dragicevic, Ed. Springer, 2015, pp. 93–104.
- [39] D. Shaker, R. Ishak, A. Ghoneim, and M. Elhuoni, “Nanoemulsion: A Review on Mechanisms for the Transdermal Delivery of Hydrophobic and Hydrophilic Drugs,” *Sci. Pharm.*, vol. 87(3), p. 17, 2019.
- [40] N. Dragicevic, J. P. Atkinson, and H. I. Maibach, “Chemical Penetration Enhancers: Classification and Mode of Action,” in *Percutaneous Penetration Enhancers Chemical Methods in Penetration Enhancement: Modification of Stratum Corneum*, N. Dragicevic and H. I. Maibach, Eds. Springer, 2015, pp. 11–28.
- [41] B. W. Barry, “Terpenes and the Lipid–Protein–Partitioning Theory of Skin Penetration Enhancement,” *Pharm. Res. An Off. J. Am. Assoc. Pharm. Sci.*, vol. 8, no. 1, pp. 17–24, 1991.
- [42] R. H. H. Neubert, “Potentials of new nanocarriers for dermal and transdermal drug delivery,” *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, vol. 77, no. 1, pp. 1–2, 2011.
- [43] G. M. El Maghraby, “Microemulsions as Drug Delivery Systems,” *Curr. Nanosci.*, vol. 8, pp. 504–511, 2012.
- [44] R. Kuswahyuning, J. E. Grice, H. R. Moghimi, and M. S. Roberts, “Formulation Effects in Percutaneous Absorption,” in *Percutaneous Penetration Enhancers Chemical Methods in Penetration Enhancement: Drug Manipulation Strategies and Vehicle Effects*, no. January 2016, N. Dragicevic and H. I. Maibach, Eds. 2015, pp. 110–129.

- [45] M. Kitaoka, R. Wakabayashi, N. Kamiya, and M. Goto, "Solid-in-oil nanodispersions for transdermal drug delivery systems," *Biotechnology Journal*, vol. 11, no. 11, pp. 1375–1385, 2016.
- [46] I. Som, K. Bhatia, and M. Yasir, "Status of surfactants as penetration enhancers in transdermal drug delivery," *J. Pharm. Bioallied Sci.*, vol. 4, no. 1, pp. 2–9, 2012.
- [47] E. B. Manaia, M. P. Abuçafy, B. G. Chiari-Andréo, B. L. Silva, J. A. Oshiro Junior, and L. A. Chiavacci, "Physicochemical characterization of drug nanocarriers," *Int. J. Nanomedicine*, vol. 12, pp. 4991–5011, 2017.
- [48] D. P. Acharya and P. G. Hartley, "Progress in microemulsion characterization," *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.*, vol. 17, no. 5, pp. 274–280, 2012.
- [49] S. Olsztyńska-Janus, A. Pietruszka, Z. Kiełbowicz, and M. A. Czarnecki, "ATR-IR study of skin components: Lipids, proteins and water. Part I: Temperature effect," *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.*, vol. 188, pp. 37–49, 2017.
- [50] J. Hadgraft and M. E. Lane, "Skin permeation: Spectroscopic Methods," in *Transdermal and Topical Drug Delivery. Principles and Practice*, H. Benson and A. C. Watkinson, Eds. Wiley, 2012, pp. 155–166.
- [51] V. Rogiers, "EEMCO guidance for the assessment of transepidermal water loss in cosmetic sciences," *Skin Pharmacology and Applied Skin Physiology*, vol. 14, no. 2, pp. 117–128, 2001.
- [52] A. Patzelt *et al.*, "In vivo investigations on the penetration of various oils and their influence on the skin barrier," *Ski. Res. Technol.*, vol. 18, no. 3, pp. 364–369, 2011.
- [53] T. Tewameter, "TM 1 – Aim & Audience of this Manual TM 2 - General Information on the Measurement," pp. 1–15, 2015.
- [54] A. R. Matias, M. Ferreira, P. Costa, and P. Neto, "Skin colour, skin redness and melanin biometric measurements: Comparison study between Antera 3D, Mexameter and Colorimeter," *Ski. Res. Technol.*, vol. 21, no. 3, pp. 346–362, 2015.
- [55] A. Simon, M. I. Amaro, A. M. Healy, L. M. Cabral, and V. P. de Sousa, "Comparative evaluation of rivastigmine permeation from a transdermal system in the Franz cell using synthetic membranes and pig ear skin with in vivo-in vitro

- correlation,” *Int. J. Pharm.*, vol. 512, no. 1, pp. 234–241, 2016.
- [56] European Medicines Agency, “Guideline on quality of transdermal patches,” 2014.
- [57] FDA, “Immediate-Release Solid Oral Dosage Forms/ Scale-Up and Postapproval Changes Chemistry, Manufacturing, and Controls in Vitro Dissolution Testing in Vivo Bioequivalence Documentation,” 1997.
- [58] “Franz Cell - The Original - PermeGear.” [Online]. Available: <https://permegear.com/franz-cells/>. [Accessed: 20-Apr-2020].
- [59] D. Cropek and P. Karande, “Models, Methods, and Measurements in Transdermal Drug Delivery,” in *Percutaneous Penetration Enhancers. Drug Penetration Into/Through the Skin. Methodology and General Considerations*, N. Dragicevic and H. I. Maibach, Eds. Springer, 2015, pp. 153–172.
- [60] A. Haq, B. Goodyear, D. Ameen, V. Joshi, and B. Michniak-Kohn, “Strat-M® synthetic membrane: Permeability comparison to human cadaver skin,” *Int. J. Pharm.*, vol. 547, no. 1–2, pp. 432–437, 2018.
- [61] M. Millipore, “Test without Limits! Overcome the barriers to predicting diffusion in human skin,” pp. 0–5, 2012.
- [62] E. Abd *et al.*, “Skin models for the testing of transdermal drugs,” *Clin. Pharmacol. Adv. Appl.*, vol. 8, no. March 2017, pp. 163–176, 2016.
- [63] B. Godin and E. Touitou, “Transdermal skin delivery: Predictions for humans from in vivo, ex vivo and animal models,” *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 59, no. 11, pp. 1152–1161, 2007.
- [64] A. L. Morais Ruela, A. Gravinez Perissinato, M. De Sousa Lino, P. Silva Mudrik, and G. Ribeiro Pereiro, “Evaluation of skin absorption of drugs from topical and transdermal formulations,” *Brazilian J. Pharm. Sci.*, vol. 52, no. 3, pp. 527–544, 2016.
- [65] H. Todo, “Transdermal permeation of drugs in various animal species,” *Drug Delivery System*, vol. 32, no. 5. pp. 411–417, 2017.
- [66] S. Sultana, S. Talegaonkar, G. Mittal, A. Bhatnagar, and F. J. Ahmad, “Determination of alendronate sodium by Box-Behnken statistical design,” *Chromatographia*, vol. 72, no. 3–4, pp. 321–326, 2010.
- [67] E. A. Taha and N. F. Youssef, “Spectrophotometric determination of some drugs for osteoporosis,” *Chem. Pharm. Bull.*, vol. 51, no. 12, pp. 1444–1447, 2003.

- [68] W. Ulbrich and A. Lamprecht, "Fluorimetric quantification of clodronate and alendronate in aqueous samples and in serum," *Talanta*, vol. 84, no. 2, pp. 437–442, 2011.
- [69] H. Piao, N. Kamiya, A. Hirata, T. Fujii, and M. Goto, "A novel solid-in-oil nanosuspension for transdermal delivery of diclofenac sodium," *Pharm. Res.*, vol. 25, no. 4, pp. 896–901, 2008.
- [70] R. López-García and A. Ganem-Rondero, "Solid Lipid Nanoparticles (SLN) and Nanostructured Lipid Carriers (NLC): Occlusive Effect and Penetration Enhancement Ability," *J. Cosmet. Dermatological Sci. Appl.*, vol. 05, no. 02, pp. 62–72, 2015.
- [71] T. Hielscher, "Ultrasonic Production of Nano-Size Dispersions and Emulsions," no. December, pp. 14–16, 2007.
- [72] B. Gielen, J. Jordens, L. C. J. Thomassen, L. Braeken, and T. Van Gerven, "Agglomeration control during ultrasonic crystallization of an active pharmaceutical ingredient," *Crystals*, vol. 7, no. 2, 2017.
- [73] K. Toerne, R. Rogers, and R. Von Wandruszka, "Thermal stability of nonionic surfactant aggregates," *Langmuir*, vol. 17, no. 20, pp. 6119–6121, 2001.
- [74] S. Verma, S. Kumar, R. Gokhale, and D. J. Burgess, "Physical stability of nanosuspensions: Investigation of the role of stabilizers on Ostwald ripening," *Int. J. Pharm.*, vol. 406, no. 1–2, pp. 145–152, 2011.
- [75] Y. Wang, Y. Zheng, L. Zhang, Q. Wang, and D. Zhang, "Stability of nanosuspensions in drug delivery," *J. Control. Release*, vol. 172, no. 3, pp. 1126–1141, 2013.
- [76] L. Li, C. Hui Zhou, and Z. Ping Xu, "Self-Nanoemulsifying Drug-Delivery System and Solidified Self-Nanoemulsifying Drug-Delivery System," *Nanocarriers Drug Deliv.*, pp. 421–449, 2019.
- [77] G. K. Menon, G. W. Cleary, and M. E. Lane, "The structure and function of the stratum corneum," *Int. J. Pharm.*, vol. 435, no. 1, pp. 3–9, 2012.
- [78] F. Xie *et al.*, "Transdermal permeation of drugs with differing lipophilicity: Effect of penetration enhancer camphor," *Int. J. Pharm.*, vol. 507, no. 1–2, pp. 90–101, 2016.
- [79] Y. Myoung and H. K. Choi, "Effects of vehicles and pressure sensitive adhesives on the penetration of isosorbide dinitrate across the hairless mouse skin," *Drug*

- Deliv. J. Deliv. Target. Ther. Agents*, vol. 9, no. 2, pp. 121–126, 2002.
- [80] E. S. Park, S. Y. Chang, M. Hahn, and S. C. Chi, “Enhancing effect of polyoxyethylene alkyl ethers on the skin permeation of ibuprofen,” *Int. J. Pharm.*, vol. 209, no. 1–2, pp. 109–119, 2000.
- [81] L. B. Lopes, “Overcoming the cutaneous barrier with microemulsions,” *Pharmaceutics*, vol. 6, no. 1, pp. 52–77, 2014.
- [82] C. Khazaka, “TM 1 – Aim & Audience of this Manual TM 2 - General Information on the Measurement,” pp. 1–15, 2015.
- [83] P. Karande, A. Jain, K. Ergun, V. Kispersky, and S. Mitragotri, “Design principles of chemical penetration enhancers for transdermal drug delivery,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 102, no. 13, pp. 4688–4693, 2005.
- [84] A. Casiraghi, F. Selmin, P. Minghetti, F. Cilurzo, and L. Montanari, “Nonionic Surfactants: Polyethylene Glycol (PEG) Ethers and Fatty Acid Esters as Penetration Enhancers,” in *Percutaneous Penetration Enhancers Physical Methods in Penetration Enhancement*, N. Dragicevic and H. I. Maibach, Eds. 2017, p. 253.
- [85] N. W. El Khayat, A. A. Donia, O. Y. Mady, and G. M. El Maghraby, “Optimization of eugenol microemulsion for transdermal delivery of indomethacin,” *J. Drug Deliv. Sci. Technol.*, vol. 48, no. October, pp. 311–318, 2018.
- [86] H. Yoshiura *et al.*, “Design and in vivo evaluation of solid-in-oil suspension for oral delivery of human growth hormone,” *Biochem. Eng. J.*, vol. 41, no. 2, pp. 106–110, 2008.
- [87] G. Şener, Ö. Şehirli, S. Cetinel, Ş. Midillioğlu, N. Gedik, and G. Ayanoğlu-Dülger, “Protective effect of taurine against alendronate-induced gastric damage in rats,” *Fundam. Clin. Pharmacol.*, vol. 19, no. 1, pp. 93–100, 2005.
- [88] Y. Zhang *et al.*, “DDSolver: An add-in program for modeling and comparison of drug dissolution profiles,” *AAPS J.*, vol. 12, no. 3, pp. 263–271, 2010.
- [89] A. Rezaei, A. Nasirpour, H. Tavanai, and M. Fathi, “A study on the release kinetics and mechanisms of vanillin incorporated in almond gum/polyvinyl alcohol composite nanofibers in different aqueous food simulants and simulated saliva,” *Flavour Fragr. J.*, vol. 31, no. 6, pp. 442–447, 2016.
- [90] M. Wind and H. Lenderink, “A capacitance study of pseudo-fickian polymer

- coatings diffusion in glassy content eight,” *Prog. Org. Coat.*, vol. 28, pp. 239–250, 1996.
- [91] T. Uchida, W. R. Kadhum, S. Kanai, H. Todo, T. Oshizaka, and K. Sugibayashi, “Prediction of skin permeation by chemical compounds using the artificial membrane, Strat-M™,” *Eur. J. Pharm. Sci.*, vol. 67, pp. 113–118, 2015.
- [92] D. D. N’Da, “Prodrug strategies for enhancing the percutaneous absorption of drugs,” *Molecules*, vol. 19, no. 12, pp. 20780–20807, 2014.
- [93] B. W. Barry, “Mode of action of penetration enhancers in human skin,” *J. Control. Release*, vol. 6, no. 1, pp. 85–97, 1987.
- [94] M. J. Kim *et al.*, “Skin permeation enhancement of diclofenac by fatty acids,” *Drug Deliv.*, vol. 15, no. 6, pp. 373–379, 2008.
- [95] P. Ptáček, J. Klíma, and J. Macek, “Determination of alendronate in human urine as 9-fluorenylmethyl derivative by high-performance liquid chromatography,” *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.*, vol. 767, no. 1, pp. 111–116, 2002.
- [96] A. Ferreira and N. Maria, “Revisão,” vol. 28, no. 5, pp. 852–858, 2005.
- [97] A. S. Y. Wong, E. N. M. Ho, T. S. M. Wan, K. K. H. Lam, and B. D. Stewart, “Liquid chromatography-mass spectrometry analysis of five bisphosphonates in equine urine and plasma,” *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, vol. 998–999, pp. 1–7, 2015.
- [98] M. Chen, K. Liu, D. Zhong, and X. Chen, “Trimethylsilyldiazomethane derivatization coupled with solid-phase extraction for the determination of alendronate in human plasma by LC-MS/MS,” *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 402, no. 2, pp. 791–798, 2012.
- [99] Waters corporation, “Sample preparation, The Importance of Sample Preparation,” *Carbon N. Y.*
- [100] Waters corporation, “Care and Use Manual, oasis HLB Cartridges and 96-well plates,” *Methods*, pp. 1–4, 2014.
- [101] P. Lucci, D. Pacetti, O. Nunez, and N. G., “Current Trends in Sample Treatment Techniques for Environmental and Food Analysis,” *Chromatogr. - Most Versatile Method Chem. Anal.*, 2012.

10. Anexos

Anexo 1. Validación de métodos analíticos

Espectroscopía UV-visible

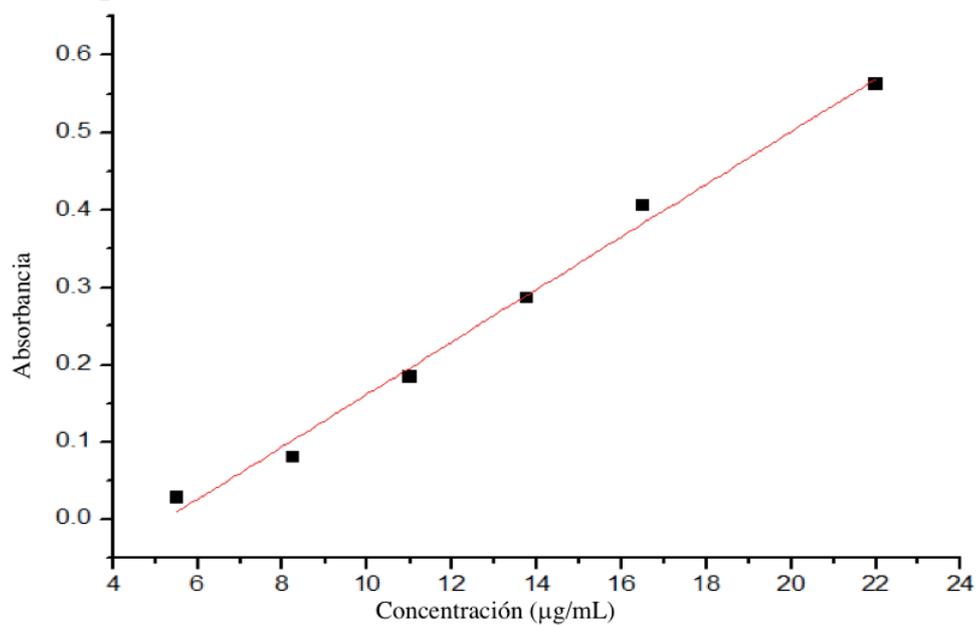


Figura 47. Curva de calibración para cuantificar ALD por espectroscopía UV-Vis

Tabla 16. Resultados de la validación parcial para cuantificar ALD por espectroscopía UV-Vis

Parámetro	
Coeficiente de correlación (R)	0.996
Coeficiente de determinación (R ²)	0.992
Precisión	0.4%
Exactitud (Intervalo de confianza)	91.0 - 97.0%.
Límite de detección	0.701 µg/mL
Límite de cuantificación	2.339 µg/mL

Espectroscopía de fluorescencia

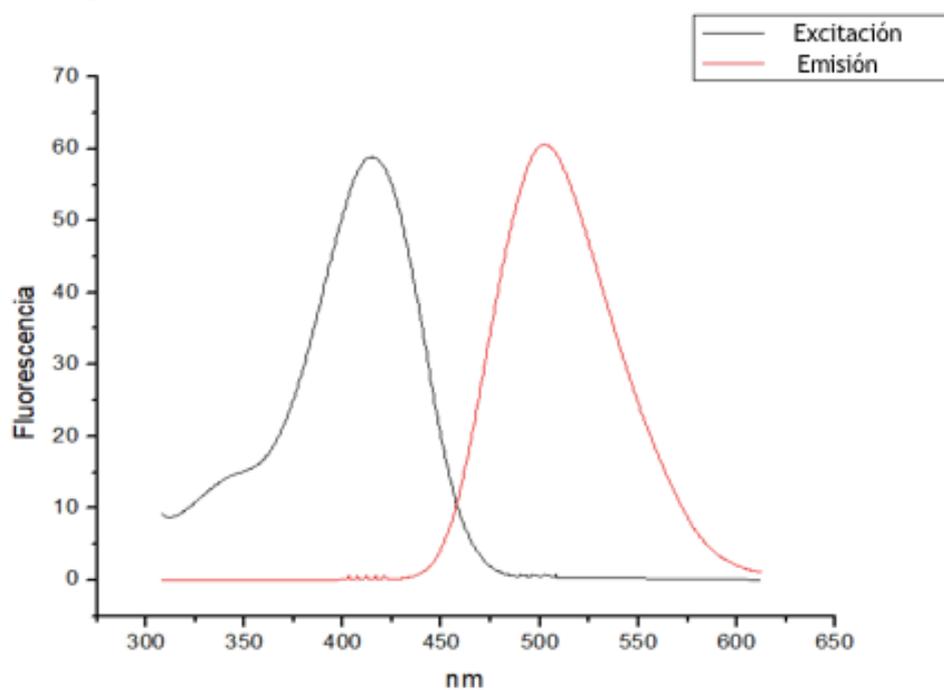


Figura 48. Barrido de excitación/emisión del complejo Al³⁺-Morin en la longitud de onda de 300 a 600 nm

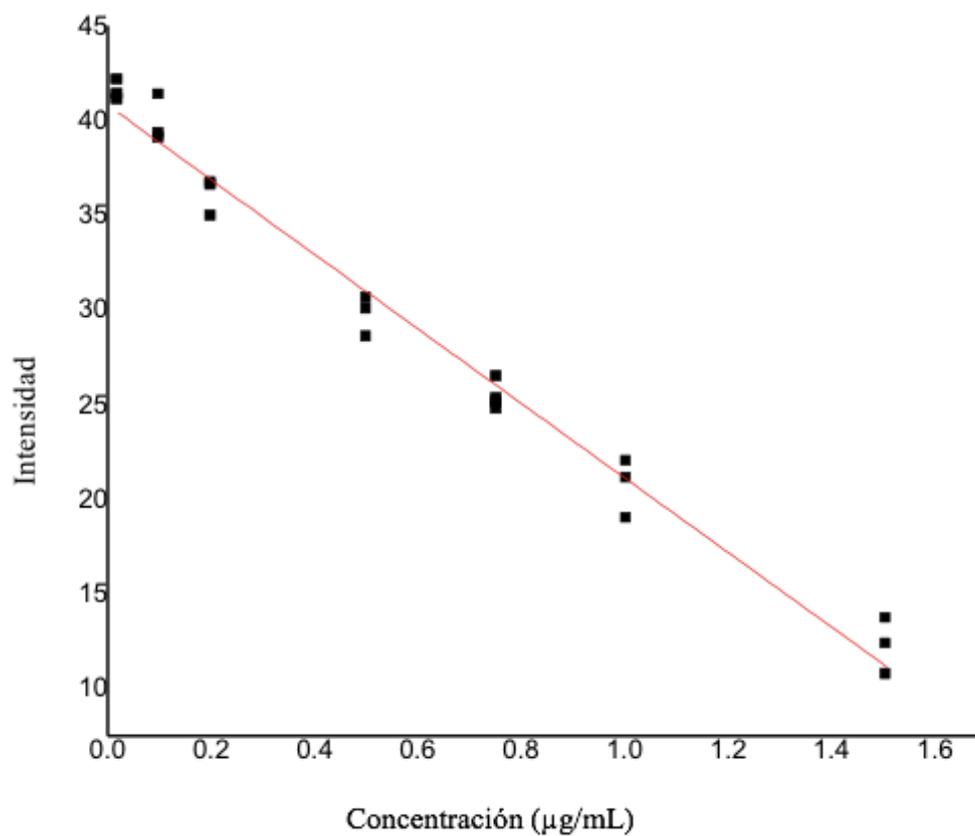


Figura 49. Curva de calibración para cuantificar ALD por fluorimetría (Strat M[®])

Tabla 17. Resultados de la validación parcial para cuantificar ALD por fluorimetría (Strat M®)

Parámetro	
Coefficiente de correlación (R)	0.9911
Coefficiente de determinación (R ²)	0.9822
Precisión	7.9%
Exactitud	104.1% CV= 7.7
Límite de detección	0.055 µg/mL
Límite de cuantificación	0.165 µg/mL

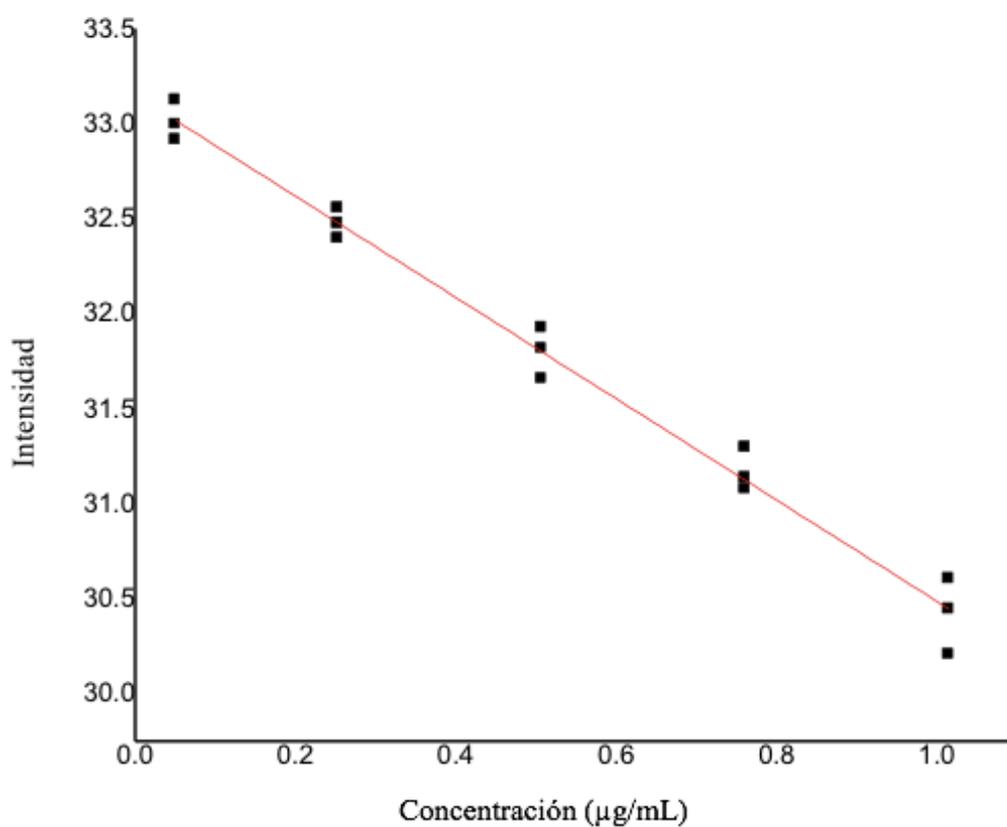


Figura 50. Curva de calibración para cuantificar ALD por fluorimetría (piel de oreja de cerdo)

Tabla 18. Resultados de la validación parcial para cuantificar ALD por fluorimetría (piel de oreja de cerdo)

Parámetro	
Coefficiente de correlación (R)	0.9926
Coefficiente de determinación (R ²)	0.9854
Precisión	1.1%
Exactitud	99.4% CV= 6.4
Límite de detección	0.062 µg/mL
Límite de cuantificación	0.185 µg/mL

Anexo 2. Análisis estadístico

Análisis estadístico de la caracterización de los sistemas microemulsificados

Nota: En las tablas de rangos múltiples las “X” que aparecen alineadas indican que no existe diferencia significativa entre los grupos.

Tabla 19. Resultados de la caracterización de las microemulsiones

Formulación	Talla de glóbulo(nm)	Fármaco cargado (µg/g)	Formulación	Talla de glóbulo(nm)	Fármaco cargado (µg/g)
ME1	36.96	6418.57	ME5	31.47	8656.88
ME1	37.61	6429.23	ME5	34.98	8847.38
ME1	36.14	6239.89	ME5	34.17	8890.17
ME2	47.03	5011.93	ME6	45.57	6308.08
ME2	42.44	5007.59	ME6	51.32	6429.11
ME2	42.08	5209.11	ME6	49.2	6092.44
ME3	46.76	4385.03	ME7	80.45	6448.87
ME3	44.78	4358.71	ME7	88.02	6029.17
ME3	44.41	4339.41	ME7	81.52	6032.54
ME4	35.19	3776.44	ME8	80.64	3099.04
ME4	32.67	3761.56	ME8	72.33	2990.03
ME4	36.71	3668.27	ME8	75.88	3206.33

Análisis estadístico del tamaño de glóbulo en función del tipo de formulación

Tabla 20. Análisis de Varianza para tamaño de glóbulo de las microemulsiones

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	7601.91	7	1085.99	144.99	0.0000
Intra grupos	119.845	16	7.4903		
Total (Corr.)	7721.75	23			

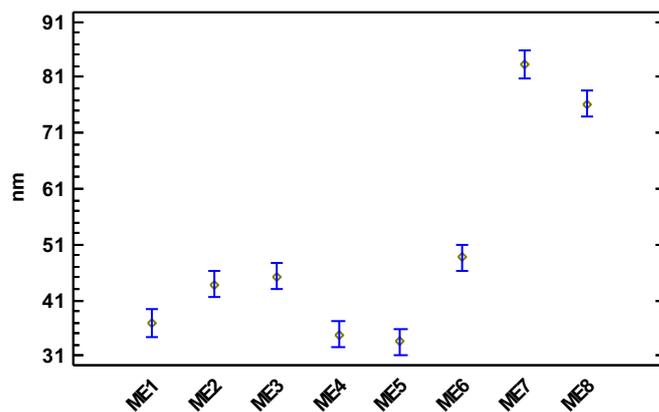


Figura 51. Prueba de comparaciones múltiples para tamaño de glóbulo de microemulsiones

Tabla 21. Prueba de Rangos Múltiples para tamaño de glóbulo de las microemulsiones (Método: 95.0 porcentaje LSD)

	Casos	Media	Grupos Homogéneos
ME5	3	33.54	X
ME4	3	34.8567	X
ME1	3	36.9033	X
ME2	3	43.85	X
ME3	3	45.3167	XX
ME6	3	48.6967	X
ME8	3	76.2833	X
ME7	3	83.33	X

Análisis estadístico del fármaco cargado en función del tipo de formulación

Tabla 22. Análisis de Varianza para la cantidad de fármaco cargado en las microemulsiones

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	6.909E7	7	9.87E6	552.25	0.0000
Intra grupos	285957.	16	17872.3		
Total (Corr.)	6.93759E7	23			

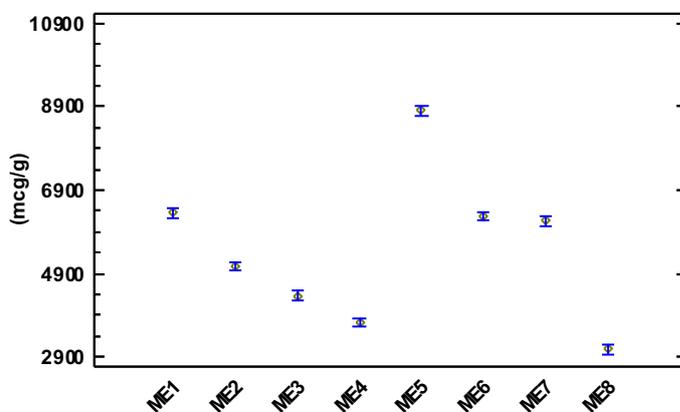


Figura 52. Prueba de comparaciones múltiples para cantidad de fármaco cargado en microemulsiones

Tabla 23. Prueba de Rangos Múltiples para cantidad de fármaco cargado en las microemulsiones (Método: 95.0 porcentaje LSD)

	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
ME8	3	3098.47	X
ME4	3	3735.42	X
ME3	3	4361.05	X
ME2	3	5076.21	X
ME7	3	6170.19	X
ME6	3	6276.55	X
ME1	3	6362.56	X
ME5	3	8798.14	X

Análisis estadístico del efecto del tiempo de sonicación sobre la caracterización de SONS

Tabla 24. Efecto del tiempo de sonicación sobre la talla de partícula y el %EP de las nanosuspensiones

Sistema	Talla de partícula (nm)	%EP	Sistema	Talla de partícula (nm)	%EP
SONS1	186.00	90.88	SONS9	429.40	76.27
SONS1	192.50	91.60	SONS9	433.30	75.09
SONS1	199.80	91.45	SONS9	441.20	75.27
SONS2	169.40	86.91	SONS10	154.80	77.04
SONS2	174.00	91.88	SONS10	143.00	76.06
SONS2	179.20	86.65	SONS10	150.00	75.90
SONS3	225.60	66.64	SONS11	311.80	61.67
SONS3	193.20	69.01	SONS11	391.80	62.21
SONS3	177.70	68.87	SONS11	350.20	59.26
SONS4	242.90	63.10	SONS12	312.50	36.86
SONS4	262.10	64.12	SONS12	379.10	37.64
SONS4	260.10	60.09	SONS12	356.50	38.20
SONS5	953.50	63.62	SONS13	493.30	40.71
SONS5	987.90	60.30	SONS13	405.50	41.90
SONS5	981.90	61.89	SONS13	419.90	41.04
SONS6	693.30	37.03	SONS14	498.80	36.26
SONS6	558.00	37.22	SONS14	413.30	35.77
SONS6	571.10	37.34	SONS14	450.80	36.17
SONS7	862.80	38.24	SONS15	516.90	36.51
SONS7	818.30	38.76	SONS15	526.70	36.66
SONS7	842.80	38.41	SONS15	526.10	38.34
SONS8	999.20	36.70	SONS16	641.30	34.06
SONS8	855.00	35.21	SONS16	575.20	34.11
SONS8	992.00	34.57	SONS16	594.10	34.41

Análisis estadístico de la talla de partícula de SONS en función del tiempo de sonicación (formulación con Span® 80)

Tabla 25. Análisis de Varianza para el tamaño de partícula de las nanosuspensiones formuladas con Span® 80

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	10918.4	3	3639.48	18.65	0.0006
Intra grupos	1561.04	8	195.13		
Total (Corr.)	12479.5	11			

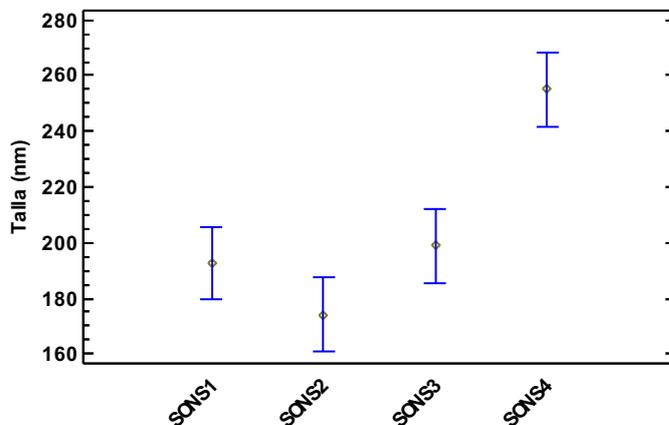


Figura 53. Prueba de comparaciones múltiples para efecto del tiempo de ultrasonido sobre el tamaño de partícula de las nanosuspensiones formuladas con Span® 80

Tabla 26. Prueba de Rangos Múltiples para la talla de partícula de nanosuspensiones formuladas con Span® 80 (Método: 95.0 porcentaje LSD)

	Casos	Media	Grupos Homogéneos
SONS2	3	174.2	X
SONS1	3	192.767	X
SONS3	3	198.833	X
SONS4	3	255.033	X

Análisis estadístico de la talla de partícula de SONS en función del tiempo de sonicación (formulación con Span® 80 y Tween® 80)

Tabla 27. Análisis de Varianza para el tamaño de partícula de las nanosuspensiones formuladas con Span® 80 y Tween® 80

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	251799.	3	83933.1	25.82	0.0002
Intra grupos	26010.5	8	3251.31		
Total (Corr.)	277810.	11			

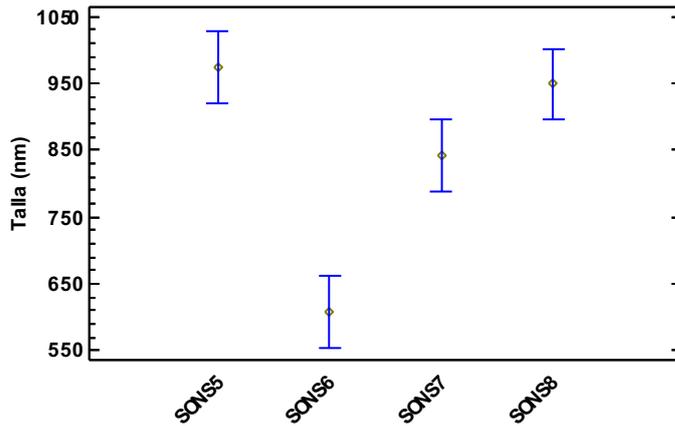


Figura 54. Prueba de comparaciones múltiples para efecto del tiempo de ultrasonido sobre el tamaño de partícula de las nanosuspensiones formuladas con Span® 80 y Tween® 80

Tabla 28. Prueba de Rangos Múltiples para la talla de partícula de nanosuspensiones formuladas con Span® 80 y Tween® 80 (Método: 95.0 porcentaje LSD)

	Casos	Media	Grupos Homogéneos
SONS6	3	607.467	X
SONS7	3	841.3	X
SONS8	3	948.733	X
SONS5	3	974.433	X

Análisis estadístico de la talla de partícula de SONS en función del tiempo de sonicación (formulación con sesquioleato de sorbitán)

Tabla 29. Análisis de Varianza para el tamaño de partícula de las nanosuspensiones formuladas con Sesquioleato de sorbitán

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	132377.	3	44125.5	62.61	0.0000
Intra grupos	5638.53	8	704.816		
Total (Corr.)	138015.	11			

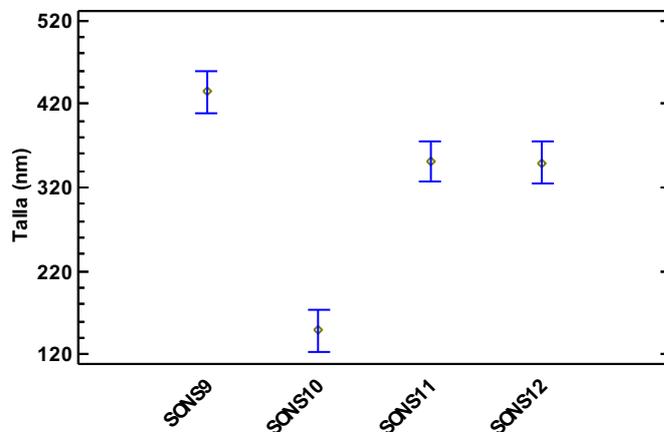


Figura 55. Prueba de comparaciones múltiples para efecto del tiempo de ultrasonido sobre el tamaño de partícula de nanosuspensiones formuladas con Sesquioleato de Sorbitán

Tabla 30. Prueba de Rangos Múltiples para la talla de partícula de nanosuspensiones formuladas con Sesquioleato de sorbitán (Método: 95.0 porcentaje LSD)

	Casos	Media	Grupos Homogéneos
SONS10	3	149.267	X
SONS12	3	349.367	X
SONS11	3	351.267	X
SONS9	3	434.633	X

Análisis estadístico de la talla de partícula de SONS en función del tiempo de sonicación (formulación con sesquioleato de sorbitán y Tween® 80)

Tabla 31. Análisis de Varianza para el tamaño de partícula de las nanosuspensiones formuladas con Sesquioleato de sorbitán y Tween® 80

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	50679.5	3	16893.2	12.89	0.0020
Intra grupos	10486.5	8	1310.81		
Total (Corr.)	61166.1	11			

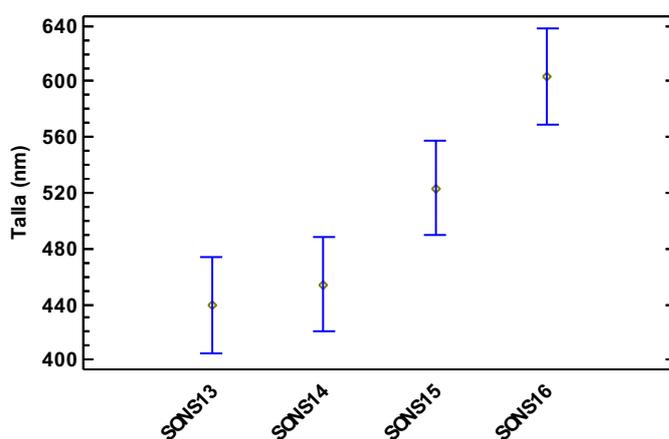


Figura 56. Prueba de comparaciones múltiples para efecto del tiempo de ultrasonido sobre el tamaño de partícula de nanosuspensiones formuladas con Sesquioleato de Sorbitán y Tween® 80

Tabla 32. Prueba de Rangos Múltiples para la talla de partícula de nanosuspensiones formuladas con Sesquioleato de sorbitán y Tween® 80 (Método: 95.0 porcentaje LSD)

	Casos	Media	Grupos Homogéneos
SONS13	3	439.567	X
SONS14	3	454.3	X
SONS15	3	523.233	X
SONS16	3	603.533	X

Análisis estadístico de %EP de SONS en función del tiempo de sonicación (formulación con Span® 80)

Tabla 33. Análisis de Varianza para el %EP de las nanosuspensiones formuladas con Span® 80

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	1875.2	3	625.067	166.43	0.0000
Intra grupos	30.0454	8	3.75568		
Total (Corr.)	1905.25	11			

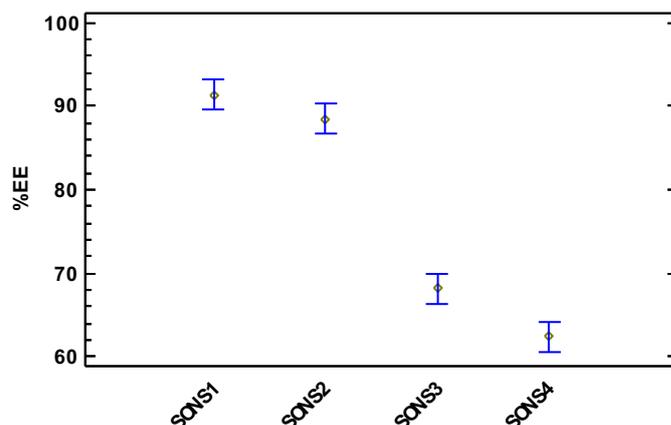


Figura 57. Prueba de comparaciones múltiples para efecto del tiempo de ultrasonido sobre el %EP de nanosuspensiones formuladas con Span® 80

Tabla 34. Prueba de Rangos Múltiples para %EP de nanosuspensiones formuladas con Span® 80 (Método: 95.0 porcentaje LSD)

	Casos	Media	Grupos Homogéneos
SONS4	3	62.4384	X
SONS3	3	68.1734	X
SONS2	3	88.4799	X
SONS1	3	91.3098	X

Análisis estadístico de %EP de SONS en función del tiempo de sonicación (formulación con Span® 80 y Tween® 80)

Tabla 35. Análisis de Varianza para el %EP de las nanosuspensiones formuladas con Span® 80 y Tween® 80

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	1406.7	3	468.899	462.14	0.0000
Intra grupos	8.11707	8	1.01463		
Total (Corr.)	1414.81	11			

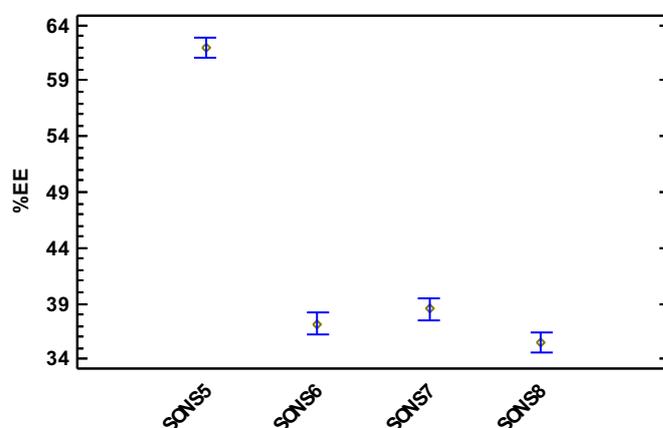


Figura 58. Prueba de comparaciones múltiples para efecto del tiempo de ultrasonido sobre el %EP de nanosuspensiones formuladas con Span® 80 y Tween® 80

Tabla 36. Prueba de Rangos Múltiples para %EP de nanosuspensiones formuladas con Span® 80 y Tween® 80 (Método: 95.0 porcentaje LSD)

	Casos	Media	Grupos Homogéneos
SONS8	3	35.4901	X
SONS6	3	37.1939	XX
SONS7	3	38.4703	X
SONS5	3	61.9359	X

Análisis estadístico de %EP de SONS en función del tiempo de sonicación (formulación con sesquioleato de sorbitán)

Tabla 37. Análisis de Varianza para el %EP de las nanosuspensiones formuladas con Sesquioleato de sorbitán

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	2955.24	3	985.079	1060.04	0.0000
Intra grupos	7.43428	8	0.929285		
Total (Corr.)	2962.67	11			

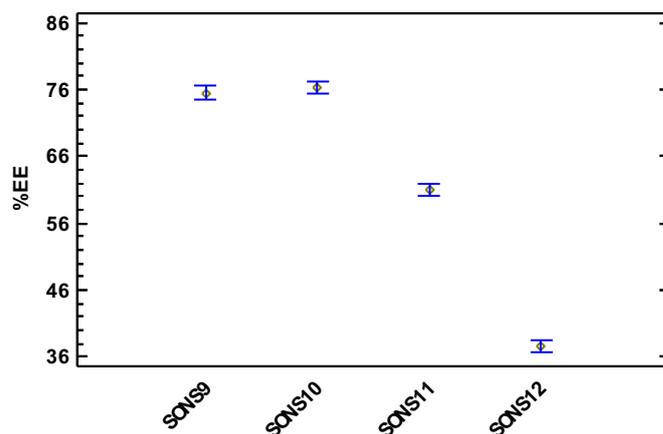


Figura 59. Prueba de comparaciones múltiples para efecto del tiempo de ultrasonido sobre el %EP de nanosuspensiones formuladas con Sesquioleato de Sorbitán

Tabla 38. Prueba de Rangos Múltiples para %EP de nanosuspensiones formuladas con Sesquioleato de sorbitán (Método: 95.0 porcentaje LSD)

	Casos	Media	Grupos Homogéneos
SONS12	3	37.5671	X
SONS11	3	61.0465	X
SONS9	3	75.5425	X
SONS10	3	76.33	X

Análisis estadístico de %EP de SONS en función del tiempo de sonicación (formulación con sesquioleato de sorbitán y Tween® 80)

Tabla 39. Análisis de Varianza para el %EP de las nanosuspensiones formuladas con Sesquioleato de sorbitán y Tween® 80

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	79.3285	3	26.4428	69.67	0.0000
Intra grupos	3.03643	8	0.379554		
Total (Corr.)	82.3649	11			

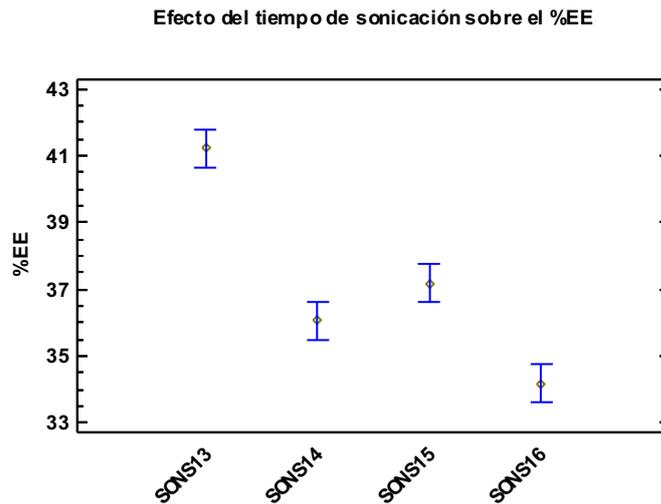


Figura 60. Prueba de comparaciones múltiples para efecto del tiempo de ultrasonido sobre el %EP de nanosuspensiones formuladas con Sesquioleato de Sorbitán y Tween® 80

Tabla 40. Prueba de Rangos Múltiples para %EP de nanosuspensiones formuladas con Sesquioleato de sorbitán y Tween® 80 (Método: 95.0 porcentaje LSD)

	Casos	Media	Grupos Homogéneos
SONS16	3	34.1895	X
SONS14	3	36.0679	X
SONS15	3	37.1704	X
SONS13	3	41.2129	X

Análisis estadístico de la condiciones de almacenamiento sobre la estabilidad de los sistemas

Tabla 41 Análisis de Varianza para cantidad de fármaco cargado en ME1 bajo las condiciones $40 \pm 2^\circ\text{C}$, 75% HR

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	69889.7	2	34944.8	1.78	0.2470
Intra grupos	117710.	6	19618.3		
Total (Corr.)	187599.	8			

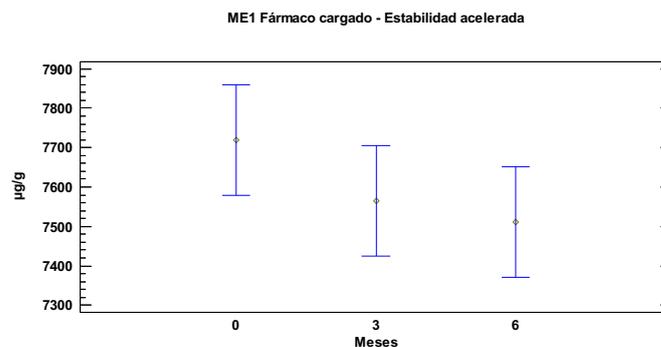


Figura 61 Prueba de comparaciones múltiples para para cantidad de fármaco cargado en ME1 bajo las condiciones $40 \pm 2^\circ\text{C}$, 75% HR

Tabla 42. Prueba de Rangos Múltiples para cantidad de fármaco cargado en ME1 bajo las condiciones $40 \pm 2^\circ\text{C}$, 75% HR (Método: 95.0 porcentaje LSD)

	Casos	Media	Grupos Homogéneos
6	3	7511.59	X
3	3	7565.67	X
0	3	7719.61	X

Tabla 43. Análisis de Varianza para tamaño de glóbulo de ME1 bajo las condiciones $40 \pm 2^\circ\text{C}$, 75% HR

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	1.40046E6	2	700231.	539.78	0.0000
Intra grupos	7783.47	6	1297.24		
Total (Corr.)	1.40825E6	8			

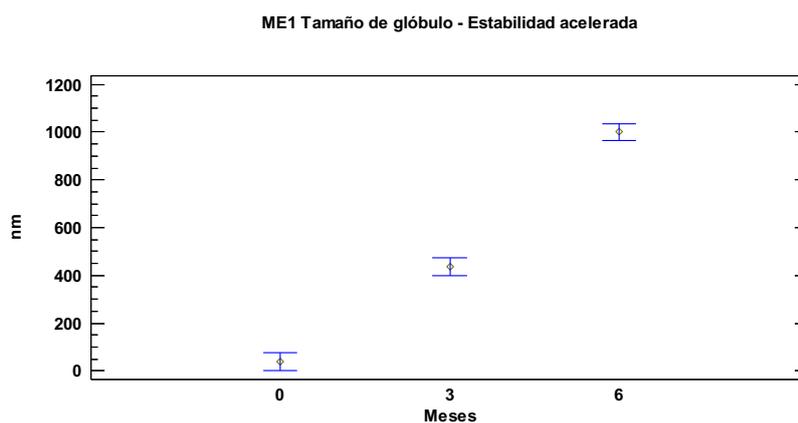


Figura 62 Prueba de comparaciones múltiples para tamaño de glóbulo de ME1 bajo las condiciones $40 \pm 2^\circ\text{C}$, 75% HR

Tabla 44. Prueba de Rangos Múltiples tamaño de glóbulo de ME1 bajo las condiciones $40 \pm 2^\circ\text{C}$, 75% HR (Método: 95.0 porcentaje LSD)

	Casos	Media	Grupos Homogéneos
0	3	38.5167	X
3	3	436.233	X
6	3	1000.0	X

Tabla 45. Análisis de Varianza para cantidad de fármaco cargado en ME5 bajo las condiciones $40 \pm 2^\circ\text{C}$, 75% HR

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	6.36306E6	2	3.18153E6	142.50	0.0000
Intra grupos	133955.	6	22325.9		
Total (Corr.)	6.49701E6	8			

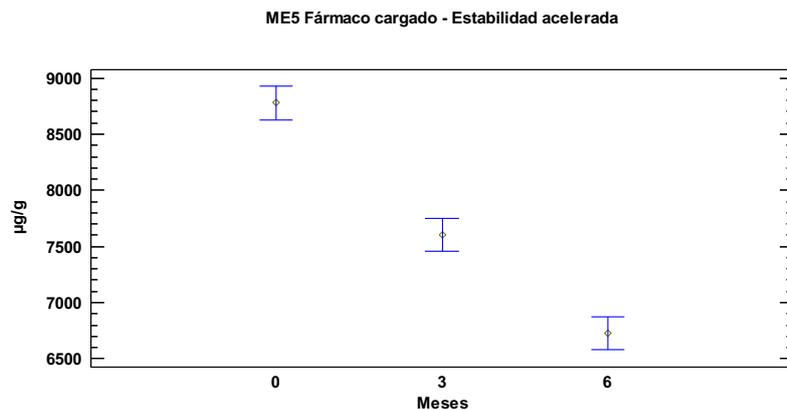


Figura 63 Prueba de comparaciones múltiples para cantidad de fármaco cargado en ME5 bajo las condiciones $40 \pm 2^\circ\text{C}$, 75% HR

Tabla 46. Prueba de Rangos Múltiples para cantidad de fármaco cargado en ME5 bajo las condiciones $40 \pm 2^\circ\text{C}$, 75% HR (Método: 95.0 porcentaje LSD)

	Casos	Media	Grupos Homogéneos
6	3	6725.59	X
3	3	7603.68	X
0	3	8778.09	X

Tabla 47. Análisis de Varianza para tamaño de glóbulo de ME5 bajo las condiciones $40 \pm 2^\circ\text{C}$, 75% HR

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	1.80752E6	2	903758.	77234.31	0.0000
Intra grupos	70.2091	6	11.7015		
Total (Corr.)	1.80759E6	8			

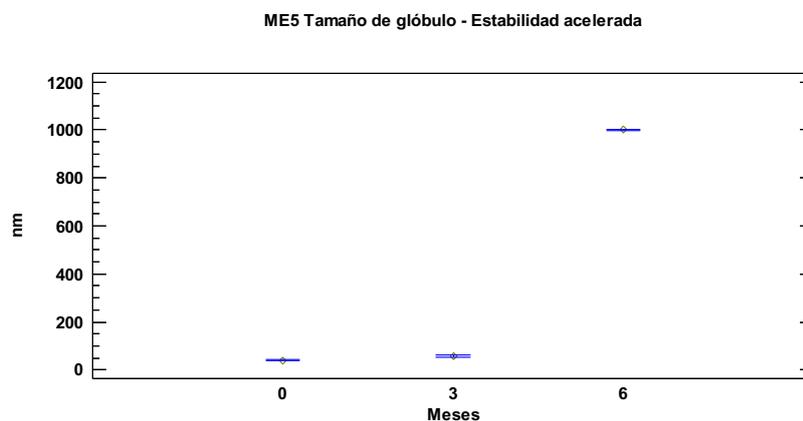


Figura 64. Prueba de comparaciones múltiples para tamaño de glóbulo de ME5 bajo las condiciones $40 \pm 2^\circ\text{C}$, 75% HR

Tabla 48. Prueba de Rangos Múltiples tamaño de glóbulo de ME5 bajo las condiciones $40 \pm 2^\circ\text{C}$, 75% HR (Método: 95.0 porcentaje LSD)

	Casos	Media	Grupos Homogéneos
0	3	40.61	X
3	3	58.3133	X
6	3	1000.0	X

Tabla 49. Análisis de Varianza para % eficiencia del proceso en SONS2 bajo las condiciones $40 \pm 2^\circ\text{C}$, 75% HR

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	2048.18	2	1024.09	456.45	0.0000
Intra grupos	13.4615	6	2.24358		
Total (Corr.)	2061.64	8			

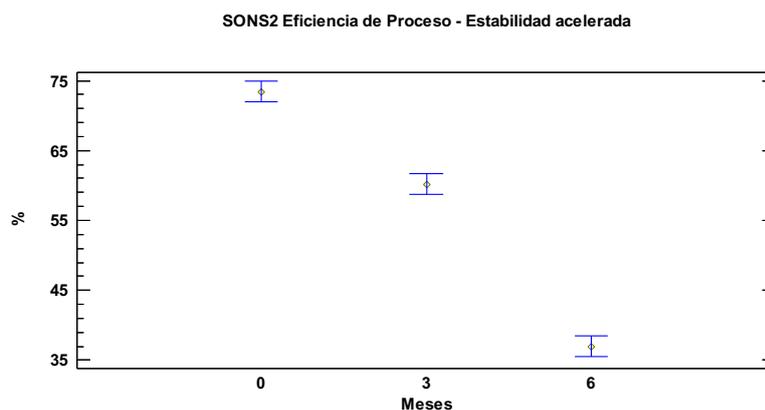


Figura 65. Prueba de comparaciones múltiples para % eficiencia del proceso en SONS2 bajo las condiciones $40 \pm 2^\circ\text{C}$, 75% HR

Tabla 50. Prueba de Rangos Múltiples para % eficiencia del proceso en SONS2 bajo las condiciones $40 \pm 2^\circ\text{C}$, 75% HR (Método: 95.0 porcentaje LSD)

	Casos	Media	Grupos Homogéneos
6	3	6725.59	X
3	3	7603.68	X
0	3	8778.09	X

Tabla 51. Análisis de Varianza para tamaño de partícula en SONS2 bajo las condiciones $40 \pm 2^\circ\text{C}$, 75% HR

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	1.12836E6	2	564180.	7365.88	0.0000
Intra grupos	459.562	6	76.5937		
Total (Corr.)	1.12882E6	8			

SONS2 Tamaño de partícula - Estabilidad acelerada

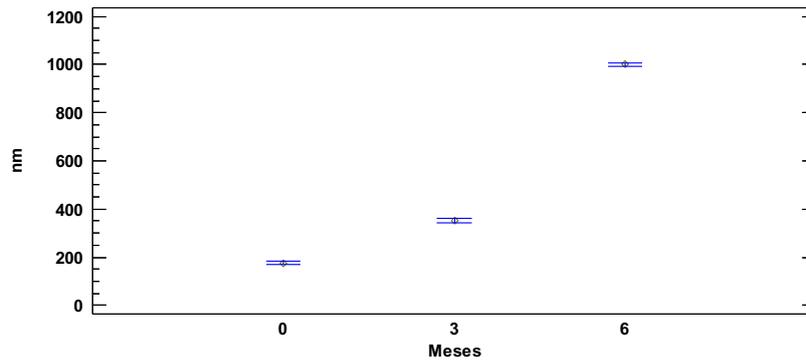


Figura 66. Prueba de comparaciones múltiples para tamaño de partícula en SONS2 bajo las condiciones $40 \pm 2^{\circ}\text{C}$, 75% HR

Tabla 52. Prueba de Rangos Múltiples para tamaño de partícula en SONS2 bajo las condiciones $40 \pm 2^{\circ}\text{C}$, 75% HR (Método: 95.0 porcentaje LSD)

	Casos	Media	Grupos Homogéneos
0	3	176.643	X
3	3	352.223	X
6	3	1000.0	X

Tabla 53. Análisis de Varianza para % eficiencia del proceso en SONS10 bajo las condiciones $40 \pm 2^{\circ}\text{C}$, 75% HR

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	1.29446E6	2	647229.	7434.77	0.0000
Intra grupos	522.326	6	87.0544		
Total (Corr.)	1.29498E6	8			

SONS10 Eficiencia de Proceso - Estabilidad acelerada

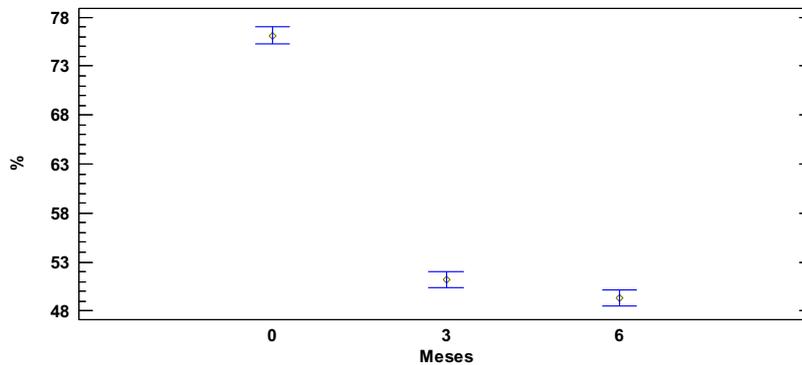


Figura 67 Prueba de comparaciones múltiples para % eficiencia del proceso en SONS10 bajo las condiciones $40 \pm 2^{\circ}\text{C}$, 75% HR

Tabla 54. Prueba de Rangos Múltiples para % eficiencia del proceso en SONS10 bajo las $40 \pm 2^\circ\text{C}$, 75% HR (Método: 95.0 porcentaje LSD)

	Casos	Media	Grupos Homogéneos
6	3	49.34	X
3	3	51.1967	X
0	3	76.1233	X

Tabla 55. Análisis de Varianza para tamaño de partícula en SONS10 bajo las condiciones $40 \pm 2^\circ\text{C}$, 75% HR

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	1.12836E6	2	564180.	7365.88	0.0000
Intra grupos	459.562	6	76.5937		
Total (Corr.)	1.12882E6	8			

SONS10 Tamaño de partícula - Estabilidad acelerada

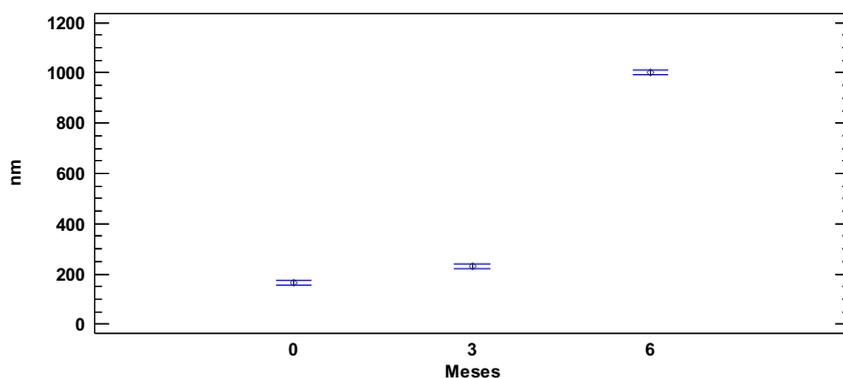


Figura 68 Prueba de comparaciones múltiples para tamaño de partícula en SONS10 bajo las condiciones $40 \pm 2^\circ\text{C}$, 75% HR

Tabla 56. Prueba de Rangos Múltiples para tamaño de partícula en SONS10 bajo las condiciones $40 \pm 2^\circ\text{C}$, 75% HR (Método: 95.0 porcentaje LSD)

	Casos	Media	Grupos Homogéneos
0	3	165.523	X
3	3	229.257	X
6	3	1000.0	X

Tabla 57. Análisis de Varianza para cantidad de fármaco cargado en ME1 bajo las condiciones $25 \pm 2^\circ\text{C}$, 60% HR

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	37656.0	2	18828.0	2.48	0.1641
Intra grupos	45566.0	6	7594.33		
Total (Corr.)	83222.0	8			

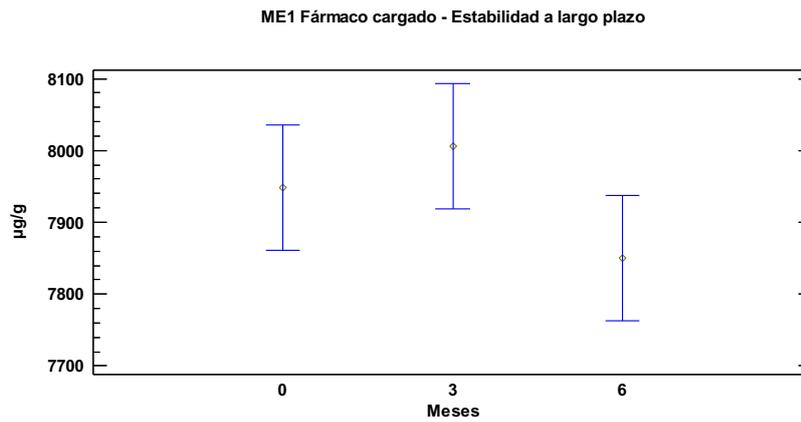


Figura 69. Prueba de comparaciones múltiples para cantidad de fármaco cargado en ME1 bajo las condiciones $25 \pm 2^\circ\text{C}$, 60% HR

Tabla 58. Prueba de Rangos Múltiples para cantidad de fármaco cargado en ME1 bajo las condiciones $25 \pm 2^\circ\text{C}$, 60% HR (Método: 95.0 porcentaje LSD)

	Casos	Media	Grupos Homogéneos
6	3	7849.58	X
0	3	7948.48	X
3	3	8006.23	X

Tabla 59. Análisis de Varianza para tamaño de glóbulo de ME1 bajo las condiciones $25 \pm 2^\circ\text{C}$, 60% HR

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	2.56871	2	1.28436	1.24	0.3533
Intra grupos	6.19554	6	1.03259		
Total (Corr.)	8.76425	8			

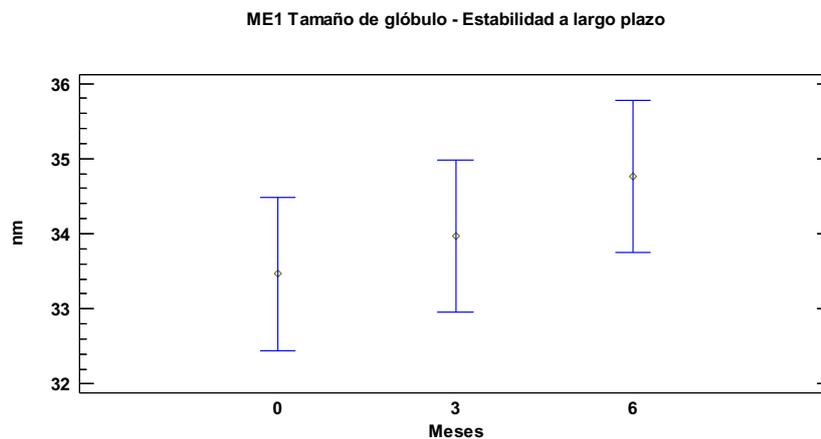


Figura 70. Prueba de comparaciones múltiples para tamaño de glóbulo de ME1 bajo las condiciones $25 \pm 2^\circ\text{C}$, 60% HR

Tabla 60. Prueba de Rangos Múltiples tamaño de glóbulo de ME1 bajo las condiciones $25 \pm 2^\circ\text{C}$, 60% HR (Método: 95.0 porcentaje LSD)

	Casos	Media	Grupos Homogéneos
ME1 Inicial	3	33.4633	X
ME1 3 meses 25°C	3	33.9667	X
ME1 6 meses 25°C	3	34.7611	X

Tabla 61. Análisis de Varianza para cantidad de fármaco cargado en ME5 bajo las condiciones $25 \pm 2^\circ\text{C}$, 60% HR

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	1.00256E6	2	501279.	19.79	0.0023
Intra grupos	151971.	6	25328.5		
Total (Corr.)	1.15453E6	8			

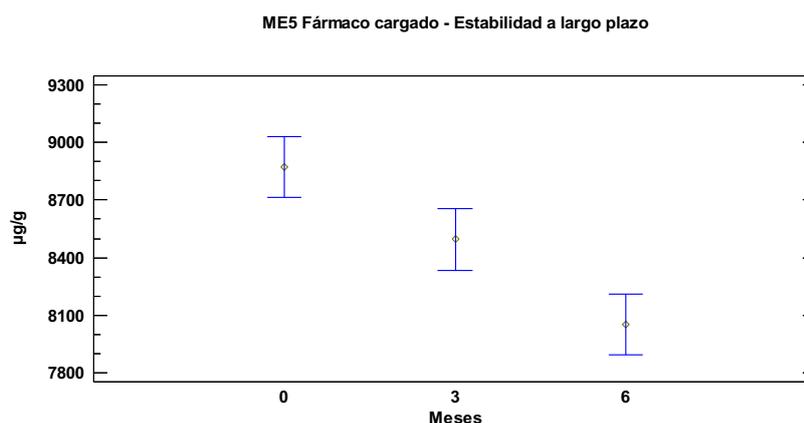


Figura 71. Prueba de comparaciones múltiples para para cantidad de fármaco cargado en ME5 bajo las condiciones $25 \pm 2^\circ\text{C}$, 60% HR

Tabla 62. Prueba de Rangos Múltiples para cantidad de fármaco cargado en ME5 bajo las condiciones $25 \pm 2^\circ\text{C}$, 60% HR (Método: 95.0 porcentaje LSD)

	Casos	Media	Grupos Homogéneos
6	3	8054.46	X
3	3	8495.32	X
0	3	8871.14	X

Tabla 63. Análisis de Varianza para tamaño de glóbulo de ME5 bajo las condiciones $25 \pm 2^\circ\text{C}$, 60% HR

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	14.7083	2	7.35416	0.58	0.5875
Intra grupos	75.8223	6	12.6371		
Total (Corr.)	90.5307	8			

ME5 Tamaño de glóbulo - Estabilidad a largo plazo

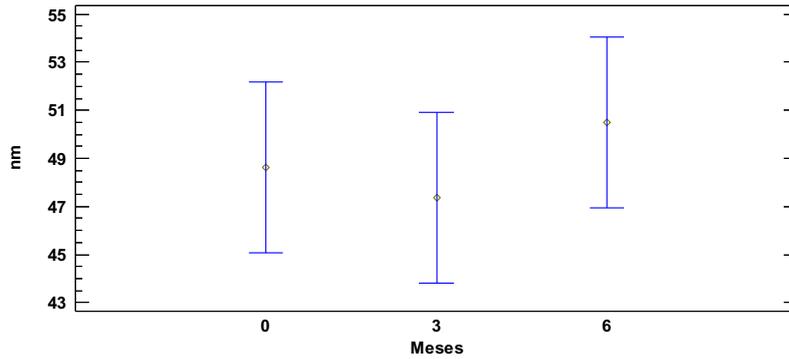


Figura 72. Prueba de comparaciones múltiples para tamaño de glóbulo de ME5 bajo las condiciones $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$, 60% HR

Tabla 64. Prueba de Rangos Múltiples tamaño de glóbulo de ME5 bajo las condiciones $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$, 60% HR (Método: 95.0 porcentaje LSD)

	Casos	Media	Grupos Homogéneos
ME5 3 meses 25°C	3	47.3833	X
ME5 Inicial	3	48.6133	X
ME5 6 meses 25°C	3	50.4922	X

Tabla 65. Análisis de Varianza para % eficiencia del proceso en SONS2 bajo las condiciones $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$, 60% HR

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	334.253	2	167.126	95.43	0.0000
Intra grupos	10.5075	6	1.75125		
Total (Corr.)	344.76	8			

SONS2 Eficiencia de Proceso - Estabilidad a largo plazo

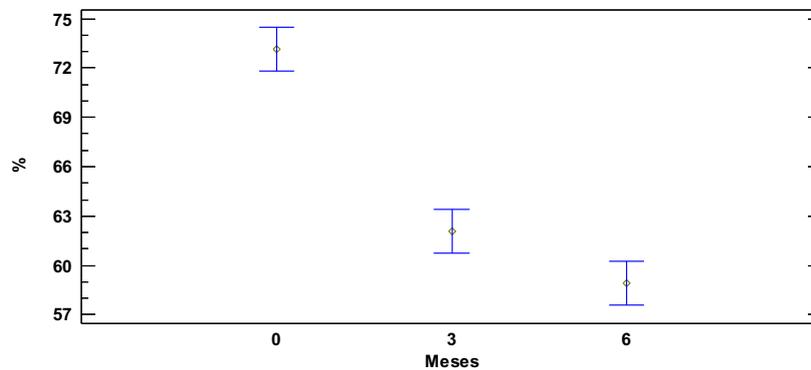


Figura 73. Prueba de comparaciones múltiples para % eficiencia del proceso en SONS2 bajo las condiciones $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$, 60% HR

Tabla 66. Prueba de Rangos Múltiples para % eficiencia del proceso en SONS2 bajo las condiciones $25 \pm 2^\circ\text{C}$, 60% HR (Método: 95.0 porcentaje LSD)

	Casos	Media	Grupos Homogéneos
6	3	58.9161	X
3	3	62.0733	X
0	3	73.13	X

Tabla 67. Análisis de Varianza para tamaño de partícula en SONS2 bajo las condiciones $25 \pm 2^\circ\text{C}$, 60% HR

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	21878.1	2	10939.1	40.58	0.0003
Intra grupos	1617.28	6	269.546		
Total (Corr.)	23495.4	8			

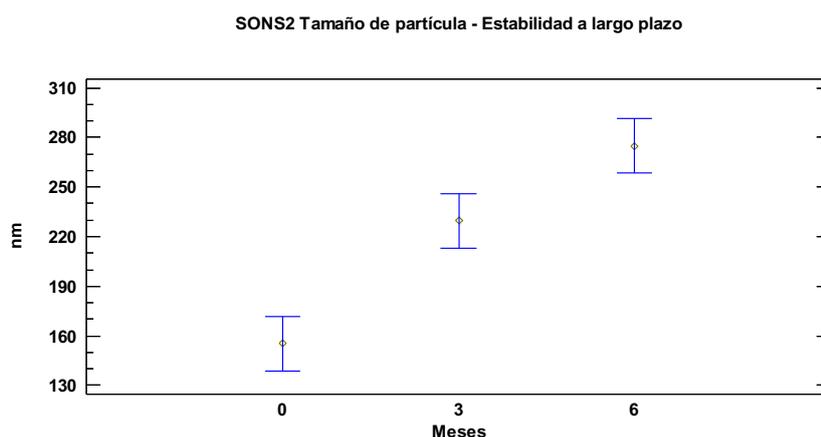


Figura 74. Prueba de comparaciones múltiples para tamaño de partícula en SONS2 bajo las condiciones $25 \pm 2^\circ\text{C}$, 60% HR

Tabla 68. Prueba de Rangos Múltiples para tamaño de partícula en SONS2 bajo las condiciones $25 \pm 2^\circ\text{C}$, 60% HR (Método: 95.0 porcentaje LSD)

	Casos	Media	Grupos Homogéneos
SONS2 Inicial	3	155.343	X
SONS2 3 meses 25°C	3	229.68	X
SONS2 6 meses 25°C	3	274.941	X

Tabla 69. Análisis de Varianza para % eficiencia del proceso en SONS10 bajo las condiciones $25 \pm 2^\circ\text{C}$, 60% HR

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	731.361	2	365.681	801.60	0.0000
Intra grupos	2.73714	6	0.45619		
Total (Corr.)	734.098	8			

SONS10 Eficiencia de Proceso - Estabilidad a largo plazo

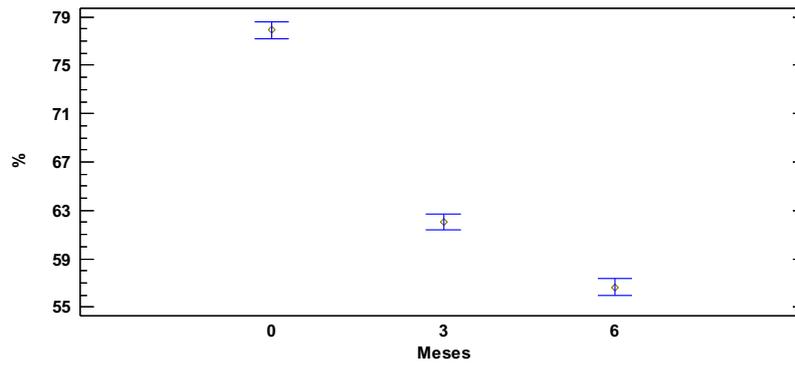


Figura 75. Prueba de comparaciones múltiples para % eficiencia del proceso en SONS10 bajo las condiciones $25 \pm 2^\circ\text{C}$, 60% HR

Tabla 70. Prueba de Rangos Múltiples para % eficiencia del proceso en SONS10 bajo las condiciones $25 \pm 2^\circ\text{C}$, 60% HR (Método: 95.0 porcentaje LSD)

	Casos	Media	Grupos Homogéneos
6	3	56.6589	X
3	3	62.0433	X
0	3	77.8967	X

Tabla 71. Análisis de Varianza para tamaño de partícula en SONS10 bajo las condiciones $25 \pm 2^\circ\text{C}$, 60% HR

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	30018.2	2	15009.1	138.73	0.0000
Intra grupos	649.131	6	108.188		
Total (Corr.)	30667.3	8			

SONS10 Tamaño de partícula - Estabilidad a largo plazo

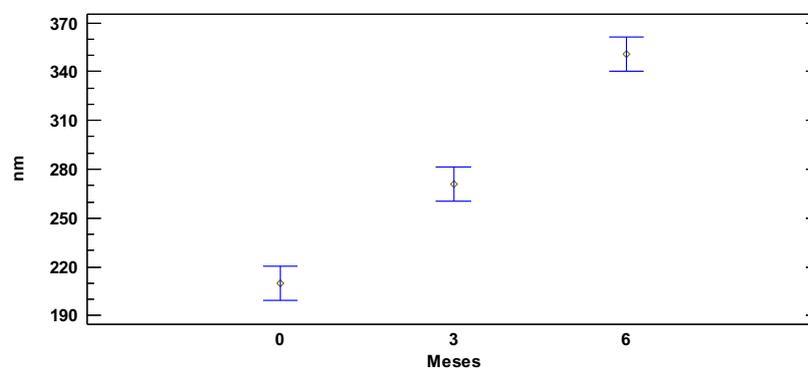


Figura 76. Prueba de comparaciones múltiples para tamaño de partícula en SONS10 bajo las condiciones $25 \pm 2^\circ\text{C}$, 60% HR

Tabla 72. Prueba de Rangos Múltiples para tamaño de partícula en SONS10 bajo las condiciones $25 \pm 2^\circ\text{C}$, 60% HR (Método: 95.0 porcentaje LSD)

	Casos	Media	Grupos Homogéneos
SONS10 Inicial	3	209.907	X
SONS10 3 meses 25°C	3	271.037	X
SONS10 6 meses 25°C	3	350.954	X

Tabla 73. Prueba t para dos muestras suponiendo varianzas iguales para la diferencia de % Eficiencia del proceso con respecto al tiempo inicial para SONS2 a 6 meses bajo las distintas condiciones de almacenamiento estudiadas

	$40 \pm 2^\circ\text{C}$, 75% HR	$25 \pm 2^\circ\text{C}$, 60% HR
Media	36.49666667	14.21666667
Varianza	1.841233333	1.277033333
Observaciones	3	3
Varianza agrupada	1.559133333	
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	4	
Estadístico t	21.85340869	
P(T<=t) una cola	1.2972E-05	
Valor crítico de t (una cola)	2.131846786	
P(T<=t) dos colas	2.5944E-05	
Valor crítico de t (dos colas)	2.776445105	

Tabla 74. Prueba t para dos muestras suponiendo varianzas iguales para la diferencia de tamaño de partícula con respecto al tiempo inicial para SONS2 a 6 meses bajo las distintas condiciones de almacenamiento estudiadas

	$40 \pm 2^\circ\text{C}$, 75% HR	$25 \pm 2^\circ\text{C}$, 60% HR
Media	823.3566667	119.6
Varianza	39.45853333	737.2444
Observaciones	3	3
Varianza agrupada	388.3514667	
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	4	
Estadístico t	43.73767334	
P(T<=t) una cola	8.16933E-07	
Valor crítico de t (una cola)	2.131846786	
P(T<=t) dos colas	1.63387E-06	
Valor crítico de t (dos colas)	2.776445105	

Tabla 75. Prueba t para dos muestras suponiendo varianzas iguales para la diferencia de % Eficiencia del proceso con respecto al tiempo inicial para SONS10 a 6 meses bajo las distintas condiciones de almacenamiento estudiadas

	$40 \pm 2^\circ\text{C}, 75\% \text{ HR}$	$25 \pm 2^\circ\text{C}, 60\% \text{ HR}$
Media	26.78333333	21.23666667
Varianza	0.544433333	1.898433333
Observaciones	3	3
Varianza agrupada	1.221433333	
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	4	
Estadístico t	6.146711261	
P(T<=t) una cola	0.001776463	
Valor crítico de t (una cola)	2.131846786	
P(T<=t) dos colas	0.003552927	
Valor crítico de t (dos colas)	2.776445105	

Tabla 76. Prueba t para dos muestras suponiendo varianzas iguales para la diferencia de tamaño de partícula con respecto al tiempo inicial para SONS10 a 6 meses bajo las distintas condiciones de almacenamiento estudiadas

	$40 \pm 2^\circ\text{C}, 75\% \text{ HR}$	$25 \pm 2^\circ\text{C}, 60\% \text{ HR}$
Media	834.4766667	141.0466667
Varianza	212.0265333	121.4126333
Observaciones	3	3
Varianza agrupada	166.7195833	
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	4	
Estadístico t	65.77410513	
P(T<=t) una cola	1.60041E-07	
Valor crítico de t (una cola)	2.131846786	
P(T<=t) dos colas	3.20083E-07	
Valor crítico de t (dos colas)	2.776445105	

Análisis estadístico del tipo de nanosistema sobre TEWL

Tabla 77. Resultados de TEWL antes y posterior al tratamiento con cada formulación

Sistema	ME1	ME1	ME5	ME5	SONS2	SONS2	SONS10	SONS10
Medición	Basal	Final	Basal	Final	Basal	Final	Basal	Final
TEWL (g/m ² h)	15.9	25	14.1	12.5	16.9	11.1	10.8	7.6
	16	24.8	14.1	12.2	16.8	11.6	10.7	7.9
	16.2	24.5	14.2	12	16.8	11.6	10.7	7.9
	14.3	19.6	19.5	16.6	13.5	8.8	10.7	7.8
	14.9	19.5	19.8	16.7	13.4	8.7	10.7	8
	14.4	19.2	20	16.9	13.3	8.8	10.9	8
	15.4	22.5	15.7	14.5	17.6	9.8	13.4	9.5
	15.3	23	15.7	14.2	17.9	9.6	14.3	9.6
	14.7	19.6	15.9	14.3	17.8	9.5	14.9	9.9

Tabla 78. Prueba t para medias de dos muestras emparejadas para el valor de TEWL antes y después de la aplicación de la ME1

	<i>TEWL basal</i>	<i>Tewl final</i>
Media	15.2333333	21.9666667
Varianza	0.495	6.2425
Observaciones	9	9
Coefficiente de correlación de Pearson	0.95286843	
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	8	
Estadístico t	-10.975182	
P(T<=t) una cola	2.1101E-06	
Valor crítico de t (una cola)	1.85954804	
P(T<=t) dos colas	4.2202E-06	
Valor crítico de t (dos colas)	2.30600414	

Tabla 79. Prueba t para medias de dos muestras emparejadas para el valor de TEWL antes y después de la aplicación de la ME5

	<i>TEWL basal</i>	<i>Tewl final</i>
Media	16.5555556	14.4333333
Varianza	6.32027778	3.83
Observaciones	9	9
Coefficiente de correlación de Pearson	0.97619725	
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	8	
Estadístico t	8.62850047	
P(T<=t) una cola	1.2618E-05	
Valor crítico de t (una cola)	1.85954804	
P(T<=t) dos colas	2.5236E-05	
Valor crítico de t (dos colas)	2.30600414	

Tabla 80. Prueba t para medias de dos muestras emparejadas para el valor de TEWL antes y después de la aplicación de la SONS 2

	<i>TEWL basal</i>	<i>Tewl final</i>
Media	16	21.9666667
Varianza	3.975	6.2425
Observaciones	9	9
Coefficiente de correlación de Pearson	0.58972656	
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	8	
Estadístico t	11.282169	
P(T<=t) una cola	1.7128E-06	
Valor crítico de t (una cola)	1.85954804	
P(T<=t) dos colas	3.4255E-06	
Valor crítico de t (dos colas)	2.30600414	

Tabla 81. Prueba t para medias de dos muestras emparejadas para el valor de TEWL antes y después de la aplicación de la SONS 10

	<i>TEWL basal</i>	<i>Tewl final</i>
Media	11.9	8.46666667
Varianza	3.1225	0.835
Observaciones	9	9
Coefficiente de correlación de Pearson	0.98392298	
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	8	
Estadístico t	11.6624535	
P(T<=t) una cola	1.3319E-06	
Valor crítico de t (una cola)	1.85954804	
P(T<=t) dos colas	2.6638E-06	
Valor crítico de t (dos colas)	2.30600414	

Análisis estadístico del tipo de nanosistema sobre la velocidad de liberación del fármaco

Tabla 82. Velocidad de liberación de ALD desde los sistemas estudiados

Sistema	Velocidad de liberación del fármaco ($\mu\text{g/h}$)					
	ME1	ME5	SONS2	SONS10	S1	S2
Celda 1	602.85	388.34	8.9699	3.7836	217.39	256.14
Celda 2	826.22	594.98	8.9747	3.5089	215.43	241.96
Celda 3	555.86	494.08	8.7741	3.6153	222.39	247.7

Análisis estadístico de la velocidad de liberación en función del tipo de sistema

Tabla 83. Análisis de Varianza para la velocidad de liberación de a ALD

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	1.03525E6	5	207051.	39.30	0.0000
Intra grupos	63213.8	12	5267.81		
Total (Corr.)	1.09847E6	17			

Velocidad de liberación de alendronato

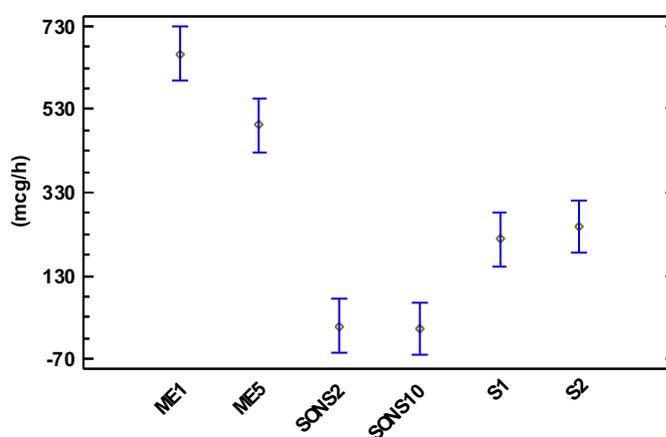


Figura 77. Prueba de comparaciones múltiples para efecto del tipo de nanosistema sobre la velocidad de liberación de ALD

Tabla 84. Prueba de Rangos Múltiples para la velocidad de liberación de ALD (Método: 95.0 porcentaje LSD)

	Casos	Media	Grupos Homogéneos
SONS10	3	3.63593	X
SONS2	3	8.90623	X
S1	3	218.403	X
S2	3	248.6	X
ME5	3	492.467	X
ME1	3	661.643	X

Análisis estadístico del tipo de nanosistema sobre los parámetro de permeación del fármaco a través de la membrana Strat M®

Tabla 85. Flujo de ALD obtenido con las formulaciones estudiadas a través de la membrana Strat® M

Sistema	Flujo de fármaco, J ($\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$)					
	ME1	ME5	SONS2 (0-5 h)	SONS10 (0-5 h)	SONS2 (5-168 h)	SONS10 (5-168 h)
Celda 1	15.81	13.89	3.1938	2.8025	0.1799	0.1379
Celda 2	16.93	12.10	2.9971	2.446	0.1707	0.1482
Celda 3	17.36	14.45	2.6786	2.5095	0.2022	0.1256
Celda 4	16.70	12.96	2.7714	2.3826	0.2099	0.1268

Tabla 86. Coeficiente de permeabilidad obtenido con las formulaciones estudiadas a través de la membrana Strat® M

Sistema	Coeficiente de permeabilidad, kp (cm/h)					
	ME1	ME5	SONS2 (0-5 h)	SONS10 (0-5 h)	SONS2 (5-168 h)	SONS10 (5-168 h)
Celda 1	2.26E-03	1.58E-03	3.58E-04	3.68E-04	2.02E-05	1.81E-05
Celda 2	2.42E-03	1.38E-03	3.36E-04	3.21E-04	1.92E-05	1.95E-05
Celda 3	2.48E-03	1.64E-03	3.01E-04	3.30E-04	2.27E-05	1.65E-05
Celda 4	2.39E-03	1.47E-03	3.11E-04	3.13E-04	2.36E-05	1.67E-05

Tabla 87. Cantidad de ALD permeada por área obtenida con las formulaciones estudiadas a través de la membrana Strat® M

Sistema	Fármaco permeado por área ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)			
	ME1	ME5	SONS2	SONS10
Celda 1	161.74	103.54	55.99	39.00
Celda 2	166.62	93.05	60.83	45.04
Celda 3	167.75	109.31	66.66	43.63
Celda 4	170.47	100.38	69.22	41.60

Análisis estadístico del flujo, J ($\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$), en función del tipo de sistema a través de membrana Strat® M

Tabla 88. Análisis de Varianza para el flujo de ALD a través de la membrana Strat® M

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	628.114	3	209.371	527.71	0.0000
Intra grupos	4.76104	12	0.396753		
Total (Corr.)	632.875	15			

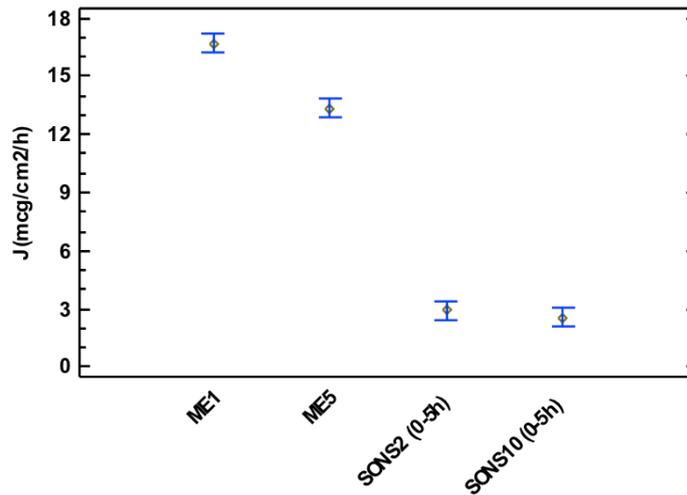


Figura 78. Prueba de comparaciones múltiples para efecto del tipo de nanosistema sobre el flujo de ALD a través de la membrana Strat M®

Tabla 89. Prueba de Rangos Múltiples para el flujo de ALD a través de la membrana Strat M® (Método: 95.0 porcentaje LSD)

	Casos	Media	Grupos Homogéneos
SONS10 (0-5h)	4	2.53515	X
SONS2 (0-5h)	4	2.91023	X
ME5	4	13.35	X
ME1	4	16.7	X

Análisis estadístico del flujo, J ($\mu\text{g}/\text{cmh}$), en función del tipo de SONS (5-168 h) a través de membrana Strat M®

Tabla 90. Prueba t para dos muestras suponiendo varianzas iguales para los valores de J de SONS (5-168h)

Media	0.190675	0.134625
Varianza	0.00033918	0.00011256
Observaciones	4	4
Varianza agrupada	0.00022587	
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	6	
Estadístico t	5.27426735	
P(T<=t) una cola	0.00093776	
Valor crítico de t (una cola)	1.94318028	
P(T<=t) dos colas	0.00187551	
Valor crítico de t (dos colas)	2.44691185	

Análisis estadístico del coeficiente de permeabilidad, Kp (cm/h), en función del tipo de sistema a través de membrana Strat M®

Tabla 91. Análisis de Varianza para el coeficiente de permeabilidad a través de la membrana StratM®

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	0.0000146131	3	0.00000487103	786.64	0.0000
Intra grupos	7.43061E-8	12	6.19217E-9		
Total (Corr.)	0.0000146874	15			

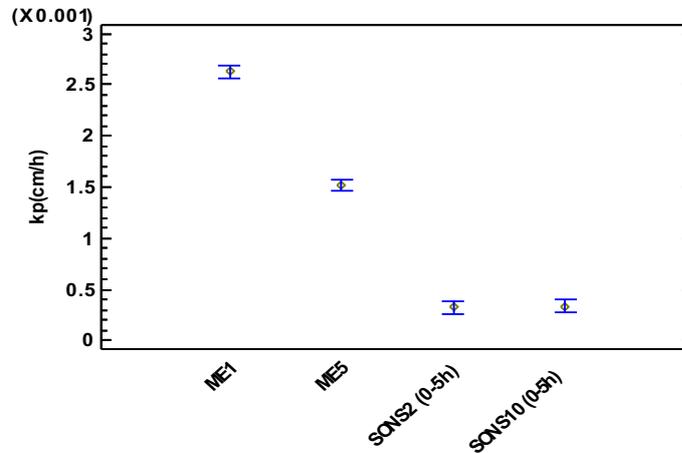


Figura 79. Prueba de comparaciones múltiples para efecto del tipo de nanosistema sobre el coeficiente de permeabilidad (kp) de ALD a través de la membrana Strat M®

Tabla 92. Prueba de Rangos Múltiples para el coeficiente de permeabilidad a través de la membrana Strat M® (Método: 95.0 porcentaje LSD)

	Casos	Media	Grupos Homogéneos
SONS2 (0-5h)	4	0.0003265	X
SONS10 (0-5h)	4	0.000332987	X
ME5	4	0.0015175	X
ME1	4	0.0026275	X

Análisis estadístico del coeficiente de permeabilidad, Kp (cm/h), en función del tipo de SONS (5-168 h) a través de membrana Strat M®

Tabla 93. Prueba t para dos muestras suponiendo varianzas iguales para los valores de Kp de SONS (5-168h)

Media	2.1425E-05	0.0000177
Varianza	4.2692E-12	1.9467E-12
Observaciones	4	4
Varianza agrupada	3.1079E-12	
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	6	
Estadístico t	2.98817888	
P(T<=t) una cola	0.01218875	
Valor crítico de t (una cola)	1.94318028	
P(T<=t) dos colas	0.02437751	
Valor crítico de t (dos colas)	2.44691185	

Análisis estadístico de la cantidad total permeada por área Q_t ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$), en función del tipo de sistema a través de membrana Strat M[®]

Tabla 94. Análisis de Varianza para la cantidad permeada por área a través de la membrana Strat M[®]

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	35818.6	3	11939.5	471.13	0.0000
Intra grupos	304.107	12	25.3423		
Total (Corr.)	36122.7	15			

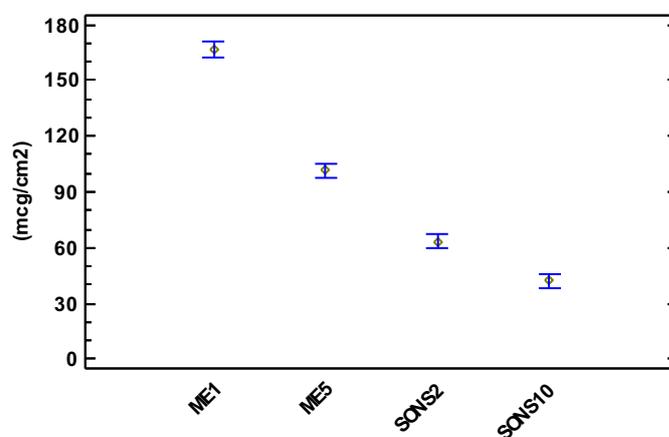


Figura 80. Prueba de comparaciones múltiples para efecto del tipo de nanosistema sobre la cantidad de ALD permeada por área a través de la membrana Strat M[®]

Tabla 95. Prueba de Rangos Múltiples para la cantidad permeada por área a través de la membrana Strat M[®] (Método: 95.0 porcentaje LSD)

	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
SONS10	4	42.3165	X
SONS2	4	63.1746	X
ME5	4	101.568	X
ME1	4	166.645	X

Análisis estadístico del tipo de nanosistema sobre los parámetros de permeación del fármaco a través de piel de oreja de cerdo

Tabla 96. Parámetros de permeación obtenidos con las MEs a través de piel de oreja de cerdo

	Flujo de fármaco, J ($\mu\text{g}/\text{cm}/\text{h}$)		Coeficiente de permeabilidad, k_p (cm/h)		Fármaco permeado por área ($\mu\text{g}/\text{cm}$)	
	ME1	ME5	ME1	ME5	ME1	ME5
Celda 1	12.01	7.94	1.72E-03	9.03E-04	126.04	89.66
Celda 2	14.16	8.78	2.03E-03	9.98E-04	138.34	94.15
Celda 3	13.01	8.84	1.86E-03	1.00E-03	137.22	92.58

Análisis estadístico del flujo, J ($\mu\text{g}/\text{cm}/\text{h}$), en función del tipo de sistema a través de piel de oreja de cerdo

Tabla 97. Prueba t para dos muestras suponiendo varianzas iguales para los valores de J de ME a través de piel de oreja de cerdo

	ME1	ME5
Media	13.06	8.52
Varianza	1.1575	0.2532
Observaciones	3	3
Varianza agrupada	0.70535	
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	4	
Estadístico t	6.6206274	
P(T<=t) una cola	0.00134958	
Valor crítico de t (una cola)	2.13184679	
P(T<=t) dos colas	0.00269916	
Valor crítico de t (dos colas)	2.77644511	

Análisis estadístico del coeficiente de permeabilidad, K_p (cm/h), en función del tipo de sistema a través de piel de oreja de cerdo

Tabla 98. Prueba t para dos muestras suponiendo varianzas iguales para los valores de K_p de ME a través de piel de oreja de cerdo

	ME1	ME5
Media	0.00187	0.000967
Varianza	2.41E-08	3.073E-09
Observaciones	3	3
Varianza agrupada	1.3587E-08	
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	4	
Estadístico t	9.48810721	
P(T<=t) una cola	0.00034428	
Valor crítico de t (una cola)	2.13184679	
P(T<=t) dos colas	0.00068855	
Valor crítico de t (dos colas)	2.77644511	

Análisis estadístico de la cantidad total permeada por área Q_t ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$), en función del tipo de sistema a través de piel de oreja de cerdo

Tabla 99. Prueba t para dos muestras suponiendo varianzas iguales para los valores de Q_t de ME a través de piel de oreja de cerdo

	<i>ME1</i>	<i>ME5</i>
Media	133.866667	92.13
Varianza	46.2561333	5.1919
Observaciones	3	3
Varianza agrupada	25.7240167	
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	4	
Estadístico t	10.0784559	
P(T<=t) una cola	0.00027263	
Valor crítico de t (una cola)	2.13184679	
P(T<=t) dos colas	0.00054525	
Valor crítico de t (dos colas)	2.77644511	

Anexo 3. Documentos para pruebas de índice de eritema
Protocolo para las pruebas de índice de eritema de nanosuspensiones

Universidad Nacional Autónoma de México Facultad de Estudios Superiores de Cuautitlán Laboratorio de Investigación y Posgrado en Tecnología Farmacéutica		
Protocolo: Evaluación del grado del eritema <i>in vivo</i> al aplicar una nanosuspensión en la piel		Autorizado por:
Elaborado 26/09/2019 M en C. Angélica Villanueva Martínez	Revisado 04/10/2019 Dra. Adriana Ganem Rondero	Dra. Adriana Ganem Rondero 04/10/2019

Índice

1. Introducción.....	2
2. Objetivo.....	2
3. Alcance.....	2
4. Responsabilidades.....	3
5. Definiciones y abreviaturas.....	3
6.Ámbito de aplicación.....	3
7. Metodología.....	3
8. Referencias.....	5

Universidad Nacional Autónoma de México Facultad de Estudios Superiores de Cuautitlán Laboratorio de Investigación y Posgrado en Tecnología Farmacéutica		
Protocolo: Evaluación del grado del eritema <i>in vivo</i> al aplicar una nanosuspensión en la piel		Autorizado por:
Elaborado 26/09/2019 M en C. Angélica Villanueva Martínez	Revisado 04/10/2019 Dra. Adriana Ganem Rondero	Dra. Adriana Ganem Rondero 04/10/2019

1. Introducción

El color de la piel se encuentra determinado principalmente por pigmentos tales como la hemoglobina, melanina, bilirrubina y caroteno. Estos componentes pueden ser alterados significativamente por luz ultravioleta y diversas sustancias, como pueden ser las formas farmacéuticas transdérmicas (1).

Una de las principales estrategias utilizadas para mejorar la permeación a través de piel es el uso de nanoacarreadores, que son sistemas coloidales que poseen estructuras de tamaños debajo de los 500 nm. Los nanosistemas brindan oportunidades de liberar y permear el agente terapéutico en cantidades significativas sin comprometer la barrera de la piel. Varios nanoacarreadores han demostrado mejorar la permeación transdérmica, entre ellos se encuentran las nanosuspensiones (2).

La seguridad de los productos aplicados sobre la piel es de gran importancia, por tal motivo, las evaluaciones del color de la misma son un método ampliamente usado para determinar el grado de respuesta fisiopatológica de los vasos a un agente químico externo. El eritema se produce cuando la exposición a irritantes, alérgenos y luz ultravioleta de onda corta provoca una dilatación de los vasos sanguíneos cerca de la superficie de la piel. La oxihemoglobina en los eritrocitos le da a la piel un color rojo. Esta respuesta de color puede ser usada como un indicador de la integridad y sensibilidad de la piel (1,3)

Con el fin de descartar la posible sensibilidad después del uso de un producto aplicado por vía tópica se lleva a cabo la medición de eritema antes y después del uso de una formulación.

Tradicionalmente, el eritema ha sido evaluado visualmente por observadores entrenados utilizando escalas arbitrarias predeterminadas. Sin embargo, tales evaluaciones son altamente subjetivas y están notablemente influenciadas por el color de fondo de la piel (3).

La medición de eritema se puede llevar cabo utilizando un instrumento llamado Mexameter® basado en la absorción/reflexión de la luz desde la piel. En este dispositivo, 16 diodos emisores de luz arreglados circularmente emiten luz a tres longitudes de onda específicas. Un fotodetector mide la luz reflejada por la piel. Como la cantidad de luz emitida es definida, la cantidad de luz absorbida por la piel puede ser calculada. El Mexamater proporciona la medición de luz absorbida y reflejada a longitudes de onda en el verde y el rojo para hemoglobina. El cálculo del índice de eritema se realiza a partir de la intensidad de la luz absorbida y reflejada a 568 y 660 nm, respectivamente (4).

Universidad Nacional Autónoma de México Facultad de Estudios Superiores de Cuautitlán Laboratorio de Investigación y Posgrado en Tecnología Farmacéutica		
Protocolo: Evaluación del grado del eritema <i>in vivo</i> al aplicar una nanosuspensión en la piel		Autorizado por:
Elaborado 26/09/2019 M en C. Angélica Villanueva Martínez	Revisado 04/10/2019 Dra. Adriana Ganem Rondero	Dra. Adriana Ganem Rondero 04/10/2019

2. Objetivo

Evaluar el grado del eritema que se pueda generar debido a la aplicación tópica *in vivo* de una nanosuspensión compuesta por Span 80®/Sesquiolato de Sorbitán, Miristato de Isopropilo, Alendronato sódico, en 6 voluntarios humanos sanos.

3. Alcance

El procedimiento plasmado en este protocolo es válido para la evaluación del grado del eritema *in vivo* de una nanosuspensión, aplicada en voluntarios sanos, a realizarse en el Laboratorio de Investigación y Posgrado en Tecnología Farmacéutica laboratorio L-322, edificio L-3, Campo 1 de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán/UNAM.

4. Responsabilidades

El estudio lo realizará la M. en C. Angélica Villanueva Martínez y estará supervisado por la Dra. Adriana Ganem Rondero, ambas laborando en el Laboratorio de Investigación y Posgrado en Tecnología Farmacéutica (L-322, campo 1) de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán- UNAM

5. Definiciones y abreviaturas

GE: grado del eritema

nm: nanómetro

6. Ámbito de aplicación

Este documento va dirigido a investigadores, profesionales y académicos del área farmacéutica, cosmética, dermatológica y afines.

7. Criterios para la selección de los participantes

Criterios de inclusión:

Mujeres y hombres mayores de 18 años.

Mujeres y hombres que no hayan utilizado algún producto cosmético y/o farmacéutico en la parte interna de ambos brazos el día del estudio.

Mujeres y hombres sin enfermedad alguna, ni antecedentes de alergias, patologías e hipersensibilidad en la piel.

Mujeres no embarazadas.

Fototipo cutáneo II y III

Universidad Nacional Autónoma de México Facultad de Estudios Superiores de Cuautitlán Laboratorio de Investigación y Posgrado en Tecnología Farmacéutica		
Protocolo: Evaluación del grado del eritema <i>in vivo</i> al aplicar una nanosuspensión en la piel		Autorizado por:
Elaborado 26/09/2019 M en C. Angélica Villanueva Martínez	Revisado 04/10/2019 Dra. Adriana Ganem Rondero	Dra. Adriana Ganem Rondero 04/10/2019

Criterios de exclusión:

Mujeres y hombres menores de 18 años.

Mujeres y hombres que hayan utilizado algún producto cosmético y/o farmacéutico en la parte interna de ambos brazos el día del estudio.

Mujeres y hombres con alguna enfermedad, con antecedentes de alergias, patologías e hipersensibilidad en la piel.

Mujeres embarazadas.

Criterios de eliminación:

Mujeres y hombres que no deseen participar.

Voluntarios que presenten hipersensibilidad a las formulaciones.

8. Metodología

Nota 1. El material a utilizar debe estar limpio y seco.

Nota 2. Los sujetos de estudio deben cumplir con los criterios y recomendaciones indicadas al inicio del estudio.

• **Aplicación de la Nanosuspensión**

Los voluntarios para la prueba estarán en reposo, bajo climatización de aproximadamente 25 °C durante 15 minutos, posteriormente se procederá de la siguiente manera con cada individuo.

1. Limpiar la parte interna de los antebrazos del sujeto de estudio, utilizando algodón humedecido con agua. Secar suavemente el área sin frotar con ayuda de una gasa.
2. Seleccionar y demarcar 4 zonas de 2.25 cm² de superficie en ambos antebrazos, con una distancia entre cada una de ellas de 2 cm. Uno de los antebrazos se utilizará como *control* (no se aplicará la formulación) pero se cubrirá con plástico adherente. En el otro antebrazo (antebrazo *prueba*) se aplicará un volumen de 0.1 ml de la formulación, previamente impregnada en un papel filtro cortado al tamaño del área a tratar.
3. Antes de aplicar las formulaciones, se registra una lectura inicial (sin tratamiento) en todas las zonas marcadas de ambos antebrazos.
4. Utilizar papel filtro con 100 µL de la nanosuspensión para aplicar la muestra en el antebrazo prueba, en cada una de las 4 zonas seleccionadas.
5. Utilizar papel filtro con 100 µL de agua destilada y colocarlos en las 4 zonas marcadas del antebrazo control.
6. Cubrir cada zona de ambos antebrazos de manera individual utilizando plástico adherente.

Universidad Nacional Autónoma de México Facultad de Estudios Superiores de Cuautitlán Laboratorio de Investigación y Posgrado en Tecnología Farmacéutica		
Protocolo: Evaluación del grado del eritema <i>in vivo</i> al aplicar una nanosuspensión en la piel		Autorizado por:
Elaborado 26/09/2019 M en C. Angélica Villanueva Martínez	Revisado 04/10/2019 Dra. Adriana Ganem Rondero	Dra. Adriana Ganem Rondero 04/10/2019

- **Lectura del grado de eritema (GE)**

Realizar las lecturas del GE en las diferentes zonas, dejando la nanosuspensión en contacto con la piel durante 30, 60, 90 y 120 min. Cada tiempo corresponde a una de las zonas tratadas.

1. Retirar el plástico adherente después del tiempo correspondiente en una de las zonas (para ambos antebrazos).
2. Retirar la nanosuspensión, en el caso del antebrazo *prueba* con un algodón humedecido con solución salina. En el antebrazo *control*, donde no hay formulación, realizar el mismo procedimiento de limpieza. Secar la zona suavemente, sin frotar, usando una gasa seca.
3. Realizar la lectura inmediatamente después de haber limpiado la zona. La medición consiste en colocar el sensor del equipo sobre la zona tratada, con una suave presión y registrar la lectura que se genera en un minuto.

*El voluntario podría presentar una irritación alta (enrojecimiento importante de la zona y/o edema), en tal caso, el producto será retirado de todas las zonas y el área se lavará con abundante agua, dando por terminado el estudio en el tiempo de contacto en que se presente esto. En caso de persistir la reacción, el voluntario será trasladado a la unidad de servicios médicos de la FES Cuautitlán.

- **Recolección, resguardo y destrucción de los datos**

La información obtenida para cada participante será etiquetada como voluntario y un número consecutivo de identificación con el fin de garantizar la confidencialidad de los datos.

En ningún reporte de resultados se presentará el nombre de los voluntarios o algún dato personal.

Los resultados serán resguardados durante 5 años; posteriormente, los registros electrónicos serán eliminados incluyendo la papelera de reciclaje y los registros físicos serán destruidos rompiendo los documentos en tiras delgadas.

9. Referencias

1. Clarys P, Alewaeters K, Lambrecht R, Barel AO. Skin color measurements: Comparison between three instruments: The Chromameter®, the DermaSpectrometer® and the Mexameter®. *Ski Res Technol.* 2000;6(4):230–8.

Universidad Nacional Autónoma de México Facultad de Estudios Superiores de Cuautitlán Laboratorio de Investigación y Posgrado en Tecnología Farmacéutica		
Protocolo: Evaluación del grado del eritema <i>in vivo</i> al aplicar una nanosuspensión en la piel		Autorizado por:
Elaborado 26/09/2019 M en C. Angélica Villanueva Martínez	Revisado 04/10/2019 Dra. Adriana Ganem Rondero	Dra. Adriana Ganem Rondero 04/10/2019

2. Neubert RHH. Potentials of new nanocarriers for dermal and transdermal drug delivery. Eur J Pharm Biopharm [Internet]. 2011;77(1):1–2. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejpb.2010.11.003>
3. Hermanns JF, Piérard-Franchimont C, Piérard GE. Skin colour assessment in safety testing of cosmetics. An overview. Int J Cosmet Sci. 2000;22(1):67–71.
4. Matias AR, Ferreira M, Costa P, Neto P. Skin colour, skin redness and melanin biometric measurements: Comparison study between Antera 3D, Mexameter and Colorimeter. Ski Res Technol. 2015;21(3):346–62.

Carta de consentimiento informado para las pruebas de índice de eritema de nanosuspensiones

Universidad Nacional Autónoma de México Facultad de Estudios Superiores de Cuautitlán Laboratorio de investigación y posgrados en tecnología farmacéutica		 UNAM CUAUTITLÁN
Carta de consentimiento informado y criterios de inclusión del protocolo: Evaluación del grado de eritema <i>in vivo</i> al aplicar una nanosuspensión en la piel		
Elaborado 26/09/2019 Dra. Adriana Ganem Rondero M en C. Angélica Villanueva Martínez	Revisado 04/10/2019 Dra. Adriana Ganem Rondero	Autorizado 04/10/2019 Dra. Adriana Ganem Rondero

Nombre del protocolo: Evaluación del grado de eritema *in vivo* al aplicar una nanosuspensión en la piel

Los estudios de evaluación del grado del eritema *in vivo* se realizarán en 6 voluntarios humanos sanos que acepten participar y que firmen la carta de consentimiento informado (ver anexo).

Previo a la realización del estudio se dará una explicación detallada del procedimiento y requerimientos por parte del voluntario a fin de aclarar todas sus dudas durante el estudio. Al finalizar la explicación se le solicitará firmar el consentimiento informado.

Criterios de inclusión:

Mujeres y hombres mayores de 18 años.

Mujeres y hombres que no hayan utilizado algún producto cosmético y/o farmacéutico en la parte interna de ambos brazos el día del estudio.

Mujeres y hombres sin enfermedad alguna, ni antecedentes de alergias, patologías e hipersensibilidad en la piel.

Mujeres no embarazadas.

Fototipo cutáneo II y III

Criterios de exclusión:

Mujeres y hombres menores de 18 años.

Mujeres y hombres que hayan utilizado algún producto cosmético y/o farmacéutico en la parte interna de ambos brazos el día del estudio.

Mujeres y hombres con alguna enfermedad, con antecedentes de alergias, patologías e hipersensibilidad en la piel.

Mujeres embarazadas.

Criterios de eliminación:

Mujeres y hombres que no deseen participar.

Voluntarios que presenten hipersensibilidad a las formulaciones.

Investigador responsable: Dra. Adriana Ganem Rondero (ganemq@hotmail.com)

Universidad Nacional Autónoma de México Facultad de Estudios Superiores de Cuautitlán Laboratorio de investigación y posgrados en tecnología farmacéutica		 UNAM CUAUTITLÁN
Carta de consentimiento informado y criterios de inclusión del protocolo: Evaluación del grado de eritema <i>in vivo</i> al aplicar una nanosuspensión en la piel		
Elaborado 26/09/2019 Dra. Adriana Ganem Rondero M en C. Angélica Villanueva Martínez	Revisado 04/10/2019 Dra. Adriana Ganem Rondero	Autorizado 04/10/2019 Dra. Adriana Ganem Rondero

ANEXO

CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

Por medio de la presente, se informa que el C. _____, a quien en lo sucesivo denominaremos “voluntario”, ha sido informado (a) en forma clara que el objetivo del presente estudio es evaluar el grado del eritema que se podría generar debido a la aplicación de una nanosuspensión compuesta por: Span 80®/Sesquiolato de Sorbitán, Miristato de Isopropilo, Alendronato sódico, utilizando para la medición el equipo Mexameter® MX 18 de Courage +Khazaka electronic GmbH - Alemania. Esta medición se realizará en el Laboratorio L-322, Edificio L-3, Campo 1, de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, ubicada en Av. 1° de Mayo s/n, Santa María las Torres, Cuautitlán Izcalli, C.P. 54740.

Es de su conocimiento que los responsables de esta investigación son: Dra. Adriana Ganem Rondero, y M en C. Angélica Villanueva Martínez y cualquier duda o pregunta podrán ser contestadas por ellas.

El voluntario conoce que el beneficio de su colaboración en este estudio es la evaluación de la seguridad de un sistema nanométrico sobre la piel; de igual manera tiene conocimiento de que su participación constará de la aplicación de 0.1 ml de una formulación consistente en una nanosuspensión compuesta por: Span 80®/Sesquiolato de Sorbitán, Miristato de Isopropilo, Alendronato sódico. La aplicación se realizará impregnando un papel filtro con la formulación y colocándolo en una zona delimitada de 2.25cm², en la parte interna del antebrazo, fijando este papel en su sitio mediante plástico autoadherente. Los tiempos de contacto serán de 30, 60, 90 y 120 minutos. Al concluir cada uno de los periodos, se limpiará la zona donde se le haya colocado la formulación, limpiando suavemente y sin frotar con una gasa humedecida con solución salina, para retirar la formulación remanente en la zona y posteriormente se secará sin frotar con una gasa seca. Después de 5 minutos de dejar la zona tratada expuesta al aire, se procederá a realizar la medición utilizando el equipo Mexameter® MX 18. La medición consiste en colocar el sensor del equipo sobre la zona tratada, con una suave presión y registrar la lectura que se genera en un minuto. El voluntario podría presentar una irritación alta (enrojecimiento importante de la zona y/o edema), en tal caso, el producto será retirado de todas las zonas y el área se

Investigador responsable: Dra. Adriana Ganem Rondero (ganemq@hotmail.com)

Universidad Nacional Autónoma de México Facultad de Estudios Superiores de Cuautitlán Laboratorio de investigación y posgrados en tecnología farmacéutica		
Carta de consentimiento informado y criterios de inclusión del protocolo: Evaluación del grado de eritema <i>in vivo</i> al aplicar una nanosuspensión en la piel		
Elaborado 26/09/2019 Dra. Adriana Ganem Rondero M en C. Angélica Villanueva Martínez	Revisado 04/10/2019 Dra. Adriana Ganem Rondero	Autorizado 04/10/2019 Dra. Adriana Ganem Rondero

lavará con abundante agua, dando por terminado el estudio en el tiempo de contacto en que se presente esto. En caso de persistir la reacción, el voluntario será trasladado a la unidad de servicios médicos de la FES Cuautitlán.

Toda la información que se obtenga del estudio será confidencial. El voluntario no será identificado (a) en ninguna publicación o presentación del estudio. Su participación en el estudio es voluntaria. Puede negarse a participar o puede suspender su participación en cualquier momento, si así lo decide. Sin embargo, es preciso mencionar que para que los resultados de esta aplicación puedan ser considerados para el estudio es indispensable concluir con todos los tiempos de muestreo.

El voluntario ha leído la información anterior y comprende los propósitos del trabajo de investigación. He tenido la oportunidad de que se me respondan las preguntas y aclaren las dudas, por tanto, **DOY MI LIBRE CONSENTIMIENTO** para ser participante en este estudio. Recibo una copia del consentimiento informado.

Nombre y firma de la persona que explicó	Teléfono	Fecha
Nombre y firma del voluntario	Teléfono	Fecha
Nombre y firma del Testigo	Fecha	
Nombre y firma del Testigo	Fecha	

Investigador responsable: Dra. Adriana Ganem Rondero (ganemq@hotmail.com)

Anexo 4. Evaluación de permeación *in vivo* en ratas

1. Detección de ALD por HPLC-fluorimetría

Para conocer la cantidad de fármaco extraído de las muestras plasmáticas de rata se realizó una reacción de derivatización con 9-fluorenil metil cloroformato (FMOC) (Figura 81). Se siguió el método descrito por Ptáček et al. [95] con ligeras modificaciones. Brevemente, se tomó una alícuota de fármaco en solución acuosa igual a 270 μL , a la cual se adicionaron 100 μL de una solución de carbonato de sodio 1M (pH 10.65), posteriormente se adicionaron 100 μL de solución de FMOC (2 mg en 4 mL de acetonitrilo), se agitó utilizando un vórtex durante 1 minuto, después de 30 minutos se adicionaron 100 μL de ácido cítrico 1M para detener la derivatización y 200 μL de la muestra obtenida fueron inyectados en el sistema cromatográfico.

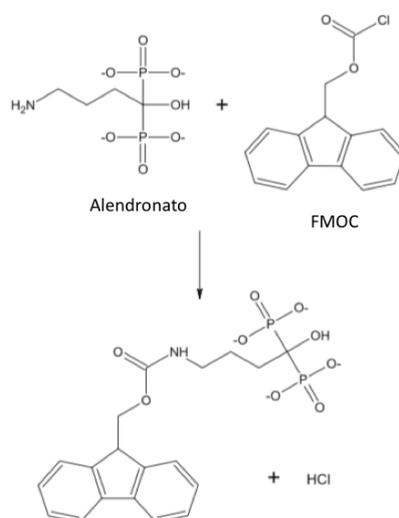


Figura 81. Reacción de derivatización de ALD con FMOC [96]

Las muestras se analizaron por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). El equipo contaba con una bomba (Perkin Elmer, Series 200), un detector de fluorescencia (Perkin Elmer, Series 200) a 260 y 310 nm para excitación y emisión, respectivamente. Se utilizó una columna C18, de 150 x 4,6 mm, partícula de 5 μm de tamaño (Teknokroma, Brisa LC2). La fase móvil estaba compuesta por 70% de una solución de metanol:acetonitrilo (1:1) y 30% de solución de ácido cítrico 12.5 mM / fosfato de sodio 12.5 mM, a un flujo de 1mL/min. El tiempo de la corrida fue de 15 minutos.

2. Animales

Se emplearon 18 ratas macho de la cepa wistar con peso entre 200-300 g, mantenidas en la sección de producción animal SCSIE de Burjassot de la Universitat de València. Los animales fueron mantenidos en condiciones adecuadas según las normativas vigentes (Directiva 63/2010/UE, RD 53/2013 sobre protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos, incluida la docencia). Los protocolos con animales fueron aprobados previamente por el comité de ética de experimentación y bienestar animal de la Universitat de València y por la Dirección General de Agricultura, Ganadería y Pesca de la Generalitat Valenciana (Autorización 2019/VSC/PEA/0145).

3. Canulación de la vena yugular

Se indujo la anestesia del animal con isoflurano por inhalación, una vez alcanzada se administró por vía subcutánea el analgésico y antiinflamatorio butorfanol tartrato. Se colocó el animal sobre una tabla de policloruro de vinilo (PVC) en posición decúbito supino, se localizó la zona de emplazamiento de la vena yugular, se rasuró e impregnó con povidona yodada, se sujetó la piel con las pinzas de diente de ratón y usando las pinzas de punta roma se realizó una incisión transversal de la piel menor de 0.5 cm. Desde la incisión con la ayuda de una aguja intratecal se condujo la cánula a través del tejido subcutáneo hacia la zona cervical hasta exteriorizarlo a través de la piel. Posteriormente, se rellenó el catéter con suero fisiológico heparinizado utilizando una jeringa de 1 mL para evitar la entrada de aire a la vena yugular, se descubrió la vena yugular con ayuda de tijeras de punta fina, se disecó la vena yugular del tejido conectivo con ayuda de pinzas de punta fina, la vena yugular se aisló utilizando un hilo de seda deslizándolo por debajo de la misma, luego se realizó una incisión en bisel en la pared de la vena yugular por donde se introdujo el extremo del catéter, se retiraron los hilos que aislaban el vaso, se fijó la cánula a un músculo pectoral o digástrico mediante un punto de sutura usando la aguja curva. Finalmente se cosió la capa de tejido subcutáneo y la piel.

4. Administración y toma de muestras

24 horas después de la canulación de los animales (Figura 82) se llevó a cabo la administración del fármaco por vía intravenosa, oral o transdérmica (Tabla 100).



Figura 82. Rata 24 horas después de la canulación

Tabla 100 . Vías de administración

Vía de administración	Descripción	Toma de muestra sanguínea
Intravenosa	Se utilizó una bomba de perfusión (Harvard apparatus 11) administrando durante 30 minutos Solución de fármaco, 1 mg ALD/kg	5, 20, 40, 60, 90, 120, 180, 240, 300 minutos
Oral	Se usó una sonda gástrica Solución de fármaco, 25 mg ALD/kg	20, 40, 60, 90, 120, 180, 300 minutos
Transdérmica	Se rasuró la espalda baja del animal, se fijó un dispositivo con el fin de delimitar el área de aplicación: 3.8 cm ² (Figura 83) 1. Microemulsión 25 mg ALD/kg (ME1)* 2. Microemulsión 50 mg ALD/kg (ME1 cargada al doble)* *Se aplicaron aproximadamente 0.6 g de formulación de acuerdo al peso de la rata	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 horas



Figura 83. Ratas administradas por vía transdérmica

En la Tabla 101 se muestra el número de ratas empleadas para cada grupo de administración, así como el peso de cada una de ellas.

Tabla 101. Peso y vía de administración de animales

Vía de administración	No de rata	Peso (g)	Vía de administración	No de rata	Peso (g)
Intravenosa	1	197	Transdérmica (25 mg ALD/kg)	1	280
	2	210		2	241
	3	220		3	229
	4	218		4	255
Oral	1	247	Transdérmica (50 mg ALD/kg)	1	220
	2	241		2	197
	3	215		3	210
	4	272		4	205
	5	198		5	204

Las muestras fueron centrifugadas inmediatamente a una velocidad de 8 min⁻¹ durante 10 minutos y el plasma se congeló a una temperatura de -20°C.

5. Extracción del fármaco del plasma

La extracción del fármaco del plasma se realizó utilizando cartuchos Oasis WAX 3cc/60 mg, en la Figura 84A se muestra el procedimiento llevado a cabo.

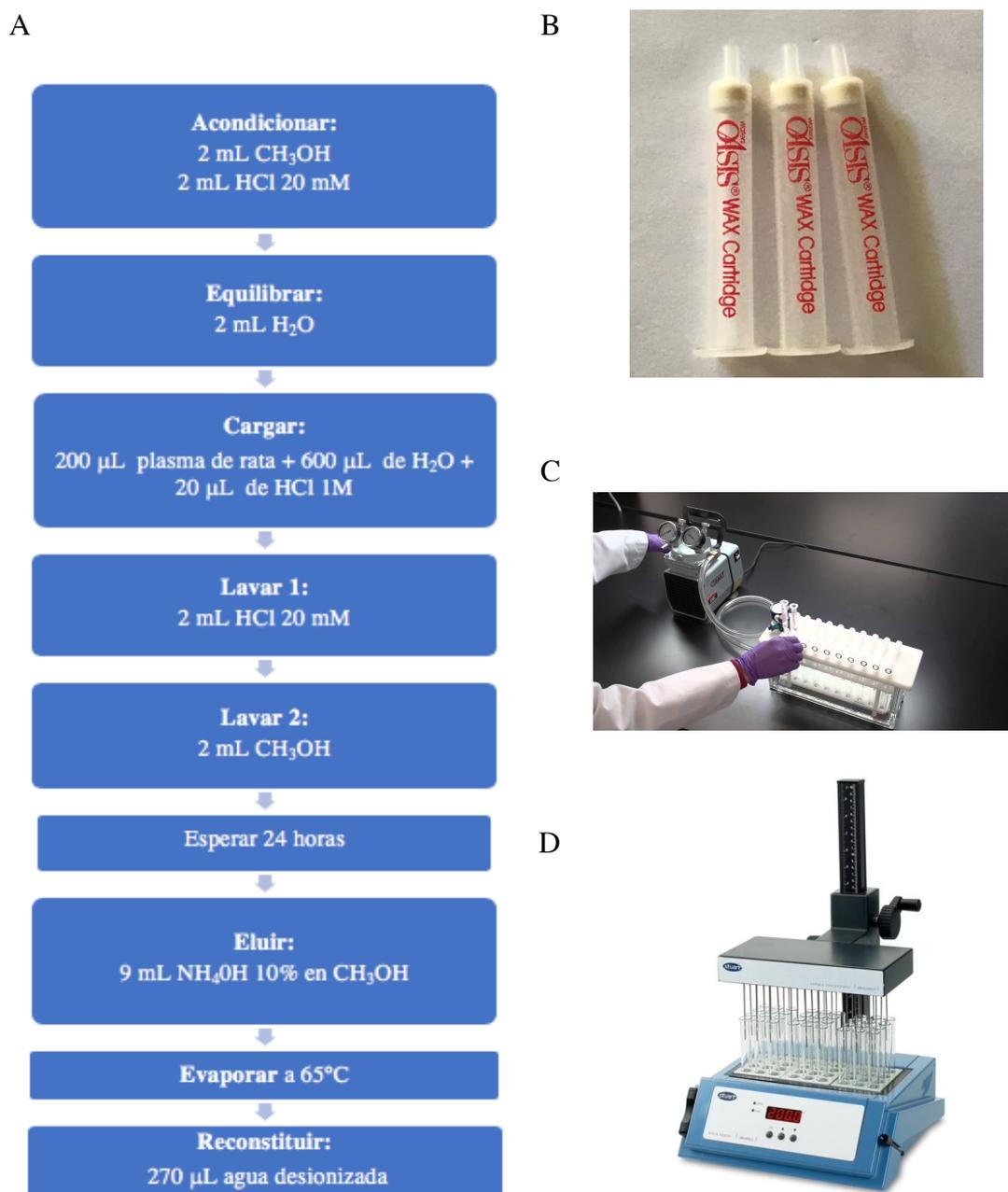


Figura 84. A. Procedimiento para la extracción de fármaco a través de cartuchos Oasis WAX; B. Cartucho Oasis WAX 3cc/60; C. Cámara de vacío utilizada para la extracción; D. Concentrador de muestras usado para evaporar eluyente (Stuart SBH130D/3)

La complejidad de las matrices juega un papel importante en la extracción del fármaco, por lo que se optó por el uso de cartuchos de extracción de fase sólida (piperazina WAX) que han mostrado conseguir recobros entre moderados y altos de bifosfonatos en plasma [94, 95].

Los cartuchos Oasis WAX (Weak Anion-eXchange) son utilizados para la extracción de ácidos fuertes. El mecanismo de retención se lleva a cabo a través de la combinación de dos mecanismos: intercambio iónico y fase reversa (Figura 85) [99].

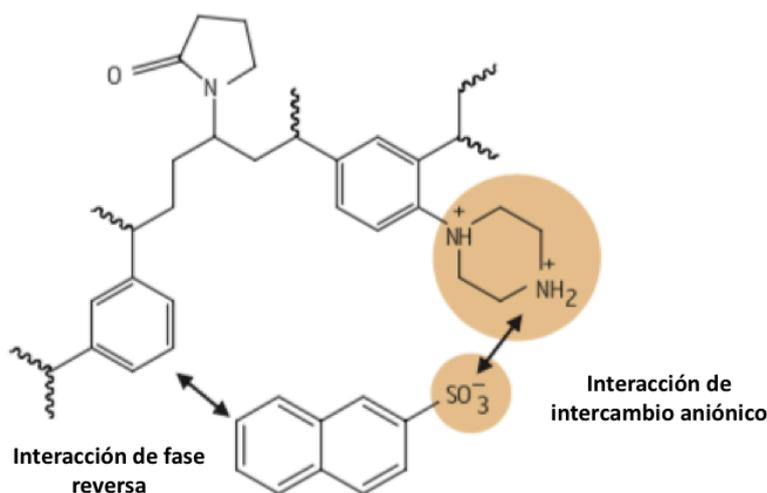


Figura 85. Mecanismos de retención de los cartuchos Oasis WAX [99]

Los pasos de acondicionamiento y equilibrio del cartucho son útiles para mejorar la humectabilidad del mismo, la disminución del pH de la muestra se realiza con el fin de aumentar la retención del analito ácido, el primer lavado con HCl tiene como objetivo mejorar dicha retención, mientras que el segundo lavado pretende eliminar las proteínas. Finalmente, el cambio de pH de la solución utilizada para eluir permite la liberación del fármaco del cartucho (Figura 86) [100].

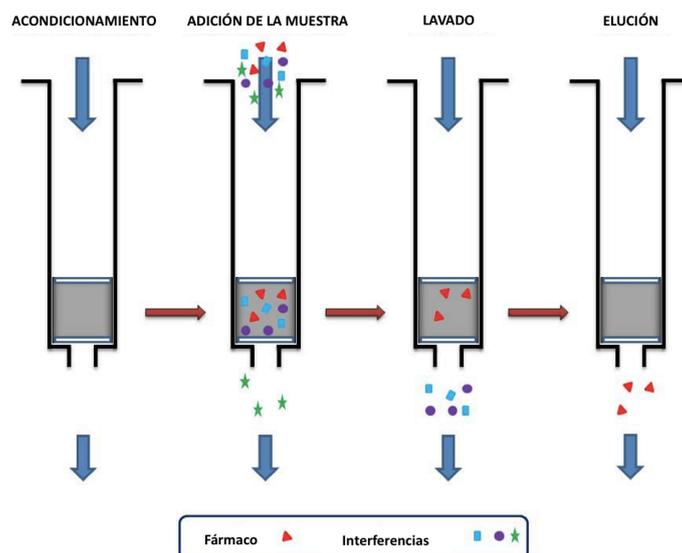


Figura 86. Esquema del proceso de extracción [101]

El porcentaje de recobro se determinó midiendo dos tipos de muestras. La primera una solución acuosa de ALD de concentración conocida (20 y 30 $\mu\text{g/mL}$), preparada derivatizando el ALD con FMOc e inyectando en el cromatógrafo posteriormente. Y la segunda muestra (plasma cargado con concentraciones de ALD conocidas, 20 y 30 $\mu\text{g/mL}$) empleando el método de extracción propuesto.

El porcentaje de recobro obtenido para las diferentes concentraciones de ALD cargadas fueron: 75.12 y 74.68% para 30 y 20 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente (Tabla 102).

Tabla 102. Porcentaje de recobro obtenido después de la extracción del ALD a través del cartucho

Concentración	Área (sin cartucho)*	Área (con cartucho)**	% Recobro
30 $\mu\text{g/mL}$	1,325,677.39	995,786.56	75.12
20 $\mu\text{g/mL}$	916,250.05	684,288.32	74.68

* Área del pico después de la inyección de la solución directamente al cromatógrafo

** Área del pico después de la extracción del plasma

Debido a la contingencia sanitaria, el estudio de la permeación *in vivo* no se ha concluido. La cuantificación de las muestras extraídas se realizará posteriormente para lo cual se desarrollará y validará un método analítico apropiado.



Contents lists available at ScienceDirect

International Journal of Pharmaceutics

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ijpharm

Evaluating two nanocarrier systems for the transdermal delivery of sodium alendronate



Angélica Villanueva-Martínez, Laura Hernández-Rizo, Adriana Ganem-Rondero*

División de Estudios de Posgrado (Tecnología Farmacéutica), Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Universidad Nacional Autónoma de México, Av. 1° de Mayo S/N Cuautitlán Izcalli, Estado de México 54704, Mexico

ARTICLE INFO

Keywords:

Sodium alendronate
Osteoporosis
Microemulsion
Nanosuspension
Transdermal delivery

ABSTRACT

Sodium alendronate is a nitrogen-containing bisphosphonate, widely used for osteoporosis treatment. However, due to its several oral administration drawbacks, the transdermal route represents an interesting option. The aim of this study was to formulate sodium alendronate in two submicron delivery systems, microemulsions, and solid-in-oil nanosuspensions, both systems possessing permeation enhancing properties. The composition of microemulsions was determined through the construction of pseudo-ternary phase diagrams. Solid-in-oil nanosuspensions were prepared by an emulsification-freeze-drying method, evaluating the effect of sonication time and the type of surfactant. According to the results of drug loading capacity, droplet/particle size, and polydispersity index, two microemulsions and two nanosuspensions were selected to perform the subsequent evaluations. The results showed that microemulsions allowed a faster release of alendronate than nanosuspensions. The permeation capacity of alendronate formulations was assessed through the synthetic membrane Strat M[®], as well as through pigskin, finding higher fluxes with microemulsions than with nanosuspensions. In order to elucidate the effect of the formulations on the permeability barrier of the stratum corneum, techniques such as ATR-FTIR and TEWL were used. Finally, measurements of erythema intensity showed that neither of the two nanosystems caused skin irritation after 2 h of contact. The results suggest that alendronate formulated in a microemulsion can be a viable transdermal nanocarrier for osteoporosis treatment.

1. Introduction

Osteoporosis is a silent skeletal disorder characterized by a lack of balance in bone turnover in such a way that bone resorption exceeds bone formation (McClung, 1996), leading to low bone density and degeneration of bone architecture which increase the risk of fractures. This disorder represents a very important and growing public health problem which causes pain, loss of function, costs, nursing home placement, and increased mortality (Tu et al., 2018).

Sodium alendronate is one of four drugs (risendronate, zoledronic acid and denosumab), generally considered the first option for the treatment of osteoporosis, due to the evidence of its “broad spectrum” anti-fracture efficacy (Camacho et al., 2016).

Although alendronate is the most commonly used bisphosphonate for the prevention and treatment of osteoporosis, administered orally, it is associated with jaw osteonecrosis, atrial fibrillation, and

musculoskeletal pain. In addition, it is recommended that the drug be administered after a prolonged fast, drinking a full glass of water, without drinking anything but water in the next 30 min (Watts et al., 2010; Katsumi et al., 2010; Alama et al., 2016; Han et al., 2012).

Patients should remain standing for 30 to 60 min in order to avoid esophageal irritation and chronically, esophageal cancer. This means a problem for its administration since the vast majority of patients are elderly and disabled people (Han et al., 2012).

In addition, under ideal conditions, the bioavailability of orally administered alendronate is approximately 0.9–1.8% due to its high polarity, its negative charge at physiological pH and hydrophilicity (Watts et al., 2010; Katsumi et al., 2010; Alama et al., 2016). Therefore, the development of an alternate route which overcomes the drawbacks of the orally administered alendronate is needed.

Transdermal drug delivery has many advantages over the oral route of administration: It avoids hepatic metabolism, the administration is

Abbreviations: SC, stratum corneum; ME, microemulsions; SONS, solid-on-oil nanosuspensions; PDI, polydispersity index; %EE, % entrapment efficiency; PBS, phosphate buffer solution; TEWL, transepidermal water loss; J, flux; Kp, permeability coefficient; Q_t, cumulative amount of alendronate that penetrates per unit area; LSD, Least Significant Difference; IPM, isopropyl myristate; ROS, reactive oxygen species

* Corresponding author.

E-mail address: ganemq@hotmail.com (A. Ganem-Rondero).

<https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2020.119312>

Received 31 October 2019; Received in revised form 29 March 2020; Accepted 5 April 2020

Available online 08 April 2020

0378-5173/ © 2020 Published by Elsevier B.V.

easier and more convenient for the patient, and there is the possibility of immediate withdrawal of the treatment if necessary. Despite the great potential of transdermal drug administration, only a few drug formulations are commercially available. The main reason for this is the barrier function of the stratum corneum (SC), a structure constituted by keratinocytes embedded in a lipid matrix, which makes the skin a highly impermeable site (Karande and Mitragotri, 2009; Kogan and Garti, 2006; Thomas and Finnin, 2004). The biggest obstacle for the transdermal delivery of alendronate is its low lipophilicity ($\log P = 0.0017$) and its negative charge (Ramachandran and Fleisher, 2000).

A way to overcome this situation is the use of nanocarriers and chemical permeation enhancers to promote the release of the drug through the skin. Therefore, the goal of this study was to investigate the ability of a nanocarrier system to incorporate and deliver sodium alendronate into the skin. For this purpose, microemulsions (ME) and solid-in-oil nanosuspensions (SONS) were formulated.

ME are colloidal dispersions composed of an oil phase, an aqueous phase, a surfactant and a co-surfactant, in suitable proportions (Kogan and Garti, 2006). ME have attracted the attention of researchers due to their easy preparation, stability, solubilization capacity and improvement in drug release (Fanun, 2012). Ramachandran and Fleisher (2000) studied the ability of ME to facilitate the transport of polar molecules through the skin, particularly those intended for the treatment of bone diseases. On the other hand, SONS are colloidal formulations that seek to improve the dispersibility of hydrophilic drugs in an oil phase. Since SONS contain permeation enhancers and have a submicron size, they are considered good candidates for the administration of hydrophilic drugs through the skin (Piao et al., 2011). Piao et al. (2008) developed a SONS for the transdermal release of diclofenac sodium, in order to avoid the adverse effects that arise when administered orally. The authors found a 3.8-fold increase in the flux of the drug formulated in a SONS, in relation to a control, suggesting the potential of this system to increase the permeability of hydrophilic drugs when administered transdermally.

Taking into account the above-mentioned advantages, in this study, two types of nanosystems, microemulsions and nanosuspensions were formulated. The systems were characterized by average size and entrapment efficiency, selecting from a series of systems, those with the best technological qualities to proceed to evaluate the *in vitro* release and permeation profiles. In addition, tests such as ATR-FTIR and transepidermal water loss (TEWL) were performed on pigskin, in order to envision a possible alteration of the skin's permeability barrier when applying nanocarriers. Finally, measurements of the degree of erythema were made to rule out possible skin irritation caused by the components of the formulations.

2. Materials and methods

2.1. Materials

Alendronate sodium trihydrate was obtained from Moléculas Finas de México, S.A. de C.V (Mexico City, Mexico); polyoxyethylene sorbitan monooleate (Tween® 80) was purchased from Merck KGaA (Darmstadt, Hesse, Germany). Sorbitan sesquiolate, sorbitan monooleate (Span® 80), aluminium nitrate, morin hydrate (2', 3, 4', 5, 7-pentahydroxyflavone), and ninhydrin were acquired from Sigma-Aldrich (Missouri, USA). Sodium hydroxide, monobasic potassium phosphate, and sodium acetate trihydrate were obtained from J. T. Baker (Mexico State, Mexico). Acetic acid, sodium bicarbonate, cyclohexane, methanol, isopropyl alcohol, acetone, and ethanol were purchased from Meyer, Química Suastes (Mexico City, Mexico). Isopropyl myristate was acquired from Droguería Cosmopolita (Mexico City, Mexico), while Capryol® 90 (propylene glycol monocaprylate), Transcutol®-P (diethylene glycol monoethyl ether), Labrafac® lipophile WL 1349 (medium chain triglycerides), Labrasol® (caprylocaproyl polyoxyl-8 glycerides),

Plurol® Diisostearique CG: (Polyglyceryl-3 Diisostearate), and isostearyl isostearate were generously donated by Químicos Lyontec-Gattefossé (Mexico City, Mexico). Propylene glycol was purchased from Central de Drogas (Mexico State, Mexico). Deionized water was obtained using a Synergy UV Water Purification System (Millipore, France).

The skin of the pig's ear was obtained from a local slaughterhouse, immediately after the slaughter of the pigs, and before the animals were treated with hot water or steam. Strat M® membranes were purchased from Merck Millipore (Carrigtwohill, County Cork, Ireland). Dialysis tubing membrane, molecular weight cut-off 6,000–8,000 Da was acquired from Spectrum Laboratories, Inc. (California, USA).

2.2. Preparation of nanocarriers

2.2.1. Selection of components to prepare microemulsions

The selection of the components to formulate the microemulsions (ME) was performed by testing the solubility of sodium alendronate in different surfactants (Tween® 80, Labrasol®, Plurol® Diisostearique CG), co-surfactants (Transcutol® P, isopropyl alcohol, propylene glycol, ethanol) and oils (Capryol® 90, isopropyl myristate, Labrafac® lipophile WL, isostearyl isostearate). These compounds were saturated with the drug, determining the concentration by a spectrophotometric method at 569 nm, forming a complex with ninhydrin. The components with the highest solubility values were selected for the construction of the pseudo-ternary phase diagrams.

2.2.2. Construction of pseudo-ternary diagrams for the preparation of microemulsions

In order to determine the composition of ME, pseudo-ternary diagrams were constructed, making mixtures of oil, water and surfactants. According to the sodium alendronate solubility tests (Section 2.2.1), isostearyl isostearate was selected as the oil phase, and Labrasol® and Plurol® Diisostearique as surfactants. Mixtures of Labrasol®:Plurol® Diisostearique were tested in 1:1, 2:1, and 3:1 ratios, varying the proportion of the oil phase:surfactant mixtures as follows: 1:9, 2:8, 3:7, 4:6, 5:5, 6:4, 7:3, 8:2, and 9:1. These mixtures were titrated drop-by-drop with distilled water, under moderate stirring. After reaching the equilibrium, the mixtures were assessed by visual characterization. Samples that remained transparent and homogenous after vigorous vortexing were assigned a monophasic area in the phase diagram. Turbidity was considered as an indication of phase separation or the formation of a macroemulsion. Drug-loaded ME were prepared by dissolving alendronate gradually in distilled water. After complete solubilization, the rest of the components were added and the mixture was stirred until a homogeneous, translucent system was obtained.

2.2.3. Optimization and preparation of SONS containing sodium alendronate

SONS containing alendronate were prepared by an emulsification-freeze-drying method, as described by Piao et al. (Piao et al., 2008), with slight modifications. Briefly, 5 mL of an aqueous solution of sodium alendronate and Tween® 80 (when required), and 10 mL of a solution of cyclohexane containing Span® 80 or sorbitan sesquiolate were poured into a test tube and mixed with a rotor-stator homogenizer Ultraturrax T18, Digital, IKA (Königswinter, North Rhine-Westphalia, Germany) at 22,000 rpm for 5 min to form W/O emulsions. The resulting systems were frozen using a bath of dry ice and acetone for 10 min, and lyophilized using a freeze-drying machine Freezezone 2.5 (Labconco, Missouri, USA) for 24 h. A volume of 2 mL of isopropyl myristate (IPM) was added to the resulting paste and was sonicated with a 30 kHz Hielscher UP50H sonotrode MS3, operating at 460 W/cm² (Teltow, Brandenburg, Germany). The particle size, polydispersity index (PDI) and entrapment efficiency (% EE) were evaluated as a function of the type of surfactant (Span® 80, Span® 80-Tween® 80, Sorbitan Sesquiolate, Sorbitan Sesquiolate-Tween® 80) and sonication time (0, 5, 10, 15 min), in order to assess the best conditions for

obtaining the SONS.

2.3. Characterization of nanosystems

2.3.1. Evaluation of viscosity, conductivity and drug loading in microemulsions

The viscosity of microemulsions was determined in triplicate at 25 °C, using a viscosimeter Brookfield CAP 2000 (Massachusetts, USA) with cone 1. The shear stress was measured by increasing the shear rate in the range of 2.67×10^3 – 1.87×10^4 s⁻¹. A rheogram was constructed to determine the rheological behavior of the test samples.

Electrical conductivity was measured in triplicate with a potentiometer S479 SevenExcellence™ Mettler Toledo (Schwerzenbach, Zurich, Switzerland). A calibrated electrode was immersed directly into the dispersion.

The content of alendronate in microemulsions was determined by forming a complex with ninhydrin, determining the absorbance at 569 nm in a U-5100 Spectrophotometer (Hitachi, Japan). For this purpose, 50 mg of alendronate microemulsion were diluted in 1.0 mL of phosphate buffer solution (PBS) pH 7.4, adding the ninhydrin solution to form the complex (Sultana et al., 2010). The studies were performed in triplicate.

2.3.2. Determination of alendronate entrapment efficiency in SONS

To determine the entrapment efficiency (% EE) of the drug in the SONS, 50 µL of the resulting solid/oil (S/O) suspension were centrifuged for 2 h at 12,000 rpm at 15 °C using a centrifuge Hermle Z326 (Wehingen, Baden-Württemberg Germany). Then, the supernatant was withdrawn and the sediment resuspended in 0.5 mL of deionized water, using an ultrasonic bath 8891 Cole-Parmer (Illinois, USA) for 10 min. The concentration of alendronate in the aqueous phase was determined by forming a complex with ninhydrin, determining the absorbance at 569 nm. The entrapment efficiency was calculated using Eq. (1):

$$\%EE = (Q_1/Q_0) \times 100 \quad (1)$$

where Q_1 is the drug content in the S/O nanosuspension, and Q_0 is the total amount of drug added to the aqueous solution.

2.3.3. Evaluation of particle size distribution and polydispersity index

The average size and the polydispersity index (PDI) of nanocarriers were determined by dynamic light scattering (DLS) technique using a Zetasizer Nano-ZS90, Malvern Instruments (Worcestershire, West Midlands, United Kingdom).

2.3.4. Stability of nanocarriers

The stability of the nanosystems was evaluated by analyzing the droplet/particle size by DLS, as well as the drug content/entrapment efficiency, forming a complex with ninhydrin, and reading the absorbance at 569 nm. Three batches of each system were stored in well-sealed 10 mL vials, keeping them under two different conditions, 25 ± 2 °C/60% RH and 40 ± 2 °C/75% RH in a stability chamber Memmert IF75 (Schwabach, Bavaria, Germany). At periodic time intervals (0, 3 and 6 months), the samples were withdrawn and analyzed for droplet/particle size and drug content/entrapment efficiency.

2.3.5. Measurement of transepidermal water loss

Pig ear skin was used to evaluate the effect of the selected nanosystems on transepidermal water loss (TEWL). The skin was excised from the ear, the fatty tissues were removed with a scalpel, and the skin was cut to a thickness of 750 µm, using an electric dermatome Zimmer (Ohio, USA). The skin was washed with saline solution, sectioned to pieces of required size and kept frozen (–20 °C) before the experiment. TEWL was evaluated with a Tewameter® TM 300 connected to a Multi Probe Adapter MPA 5 Courage und Khazaka (Köln, North Rhine-Westphalia, Germany). The measurements for each system were performed in triplicate.

The skin samples were mounted in Franz diffusion cells, with a diffusion area of 0.64 cm², with the SC side facing the donor compartment. The receptor compartment contained 2 mL of PBS pH 7.4. The systems thus assembled were kept inside an acrylic box (built specifically for these purposes), for 30 min to ensure an isolated microclimate that allowed the measurement of TEWL, independent of ambient air movements. After this time, the basal TEWL was measured. Subsequently, 50 µL of the nanocarrier were deposited on the donor compartment and the systems were kept inside the acrylic box for 2 h. At the end of this time, the formulation was removed by gently cleaning the skin with the help of a gauze, measuring the value of TEWL after 20 min.

2.3.6. Attenuated total Reflectance-Fourier-Transform Infrared (ATR-FTIR) spectroscopy

Pig ear skin was excised, cut with dermatome, and mounted in Franz diffusion cells (with an area of 0.64 cm²) as described in Section 2.3.5. Briefly, 50 µL of each nanocarrier formulation was placed in the donor compartment of the cells, and the receiver compartment was filled with 2 mL of PBS pH 7.4, maintaining a temperature of 37 ± 2 °C and a constant stirring using magnetic bars. After 24 h under these conditions, the excess of nanosystems was removed, rinsing the skin with deionized water. Infrared spectra were obtained using an FT-IR Spectrophotometer ABB MB3000 (Quebec, Canada), collecting 150 scans per spectrum, with a resolution of 2 cm⁻¹, in the region from 500 cm⁻¹ to 4000 cm⁻¹. Untreated skin was used as a control. Each formulation was studied in triplicate to assess its effect on the SC.

2.3.7. Measurement of erythema intensity

To evaluate skin irritation, a Mexameter® 18 connected to a Multi Probe Adapter MPA 5 Courage und Khazaka (Köln, North Rhine-Westphalia, Germany) was used. Six healthy volunteers of both sexes, age group 29–50 years, participated in this evaluation. Once the procedure was explained in detail, all volunteers signed an informed consent letter. The tests were carried out, respecting at all times, the Helsinki protocol. None had any previous or existing history of skin diseases or allergies. Volunteers were asked not to wash the area to be treated with any type of soap on the day of the study and not to apply pharmaceutical, cosmetic or perfume products. Prior to the experimental procedures, all volunteers remained at rest for 30 min, after which, the inner part of the forearm was gently cleaned with gauze. For the treatment, four square pieces of filter paper, with an area of 2.25 cm² were placed on the inner part of the forearm of the participants. The right forearm was used as control, depositing 100 µL of distilled water on each piece of filter paper; while on the left forearm, 100 µL of the placebo nanocarrier formulation were placed on the filter papers. The erythema index was measured at 0, 30, 60, 90 and 120 min after applying formulations (removing the filter papers randomly). To perform the measurement, the Mexameter probe was placed on the skin surface with constant pressure. For each time, quintuplicate measurements were made in each of the areas studied.

2.3.8. Evaluation of alendronate release profiles from nanocarriers

The release profile of alendronate from the selected formulations was estimated via the dialysis bag method, using a Spectra Por® dialysis tubing membrane with a molecular weight cut-off 6,000–8,000. Approximately 500 µL of systems loaded with alendronate were applied inside the tubing membrane, sealing both ends of the tube using a clamp to avoid leakage. The bags were submerged in a 10 mL screw-capped glass container, filled with 7 mL of PBS pH 7.4.

All systems were kept inside a bath of water at 37 ± 2 °C, under constant stirring. Samples of 500 µL were withdrawn from the receiver medium at predetermined time intervals, replacing the volume with fresh buffer solution. The release study in the case of ME was monitored for 24 h, while the release from SONS was followed during a week. The concentration of the drug in the receptor solution was measured after

having formed the complex with ninhydrin, determining the absorbance at 569 nm. For comparison, the release of alendronate in phosphate buffer solutions pH 7.4 (S1 and S2) was studied, containing a quantity of drug equivalent to that of the formulations: S1 an amount equivalent to ME1 and SONS10; S2 an amount equivalent to ME5 and SONS2. The measurements were conducted in triplicate. The percentage released was calculated based on the initial amount of alendronate in the dialysis bags.

2.3.9. Study of the *in vitro* permeation kinetics of alendronate formulated in nanocarriers

An *in vitro* transdermal permeation experiment for alendronate formulated in nanocarriers was conducted using Franz diffusion cells. The test was followed for 24 h in the case of the ME and for 168 h (one week) for the SONS. In the case of SONS, a Strat-M® membrane was placed between the donor and the receptor compartment of a diffusion cell. Regarding the ME, the test was performed using both the Strat-M® membrane and pigskin (obtained from a local slaughterhouse). The effective permeation area of the diffusion cell was 0.64 cm². The receptor compartment containing 1.8 mL and 2 mL of deionized water for ME and SONS, respectively, were kept under constant stirring. All the cells were placed in a water bath, keeping the donor's temperature at 32 °C. A volume of 50 µL of the formulations (ME or SONS) were added to the donor compartment, keeping it closed. The complete receptor media was withdrawn from the sampling port at predetermined time intervals, replacing the volume with fresh deionized water. This test was also carried out with alendronate in PBS pH 7.4 (used as a control), both through the Strat-M® membrane and through the pigskin. Each sample was analyzed using a fluorimetric method, as described in Section 2.5. The cumulative amount permeated per unit area was plotted versus time, and the flux (J) was determined from the slope at the steady-state. The permeability coefficient (Kp) was the ratio of the flux and the drug concentration in each formulation (flux/drug concentration). The cumulative amount of alendronate that permeated at the end of the study was reported as Q_T.

2.4. UV-Vis analysis of sodium alendronate

Quantitative analysis of alendronate was performed by using a UV-Vis U-5100 Spectrophotometer Hitachi (Tokyo, Japan). Since alendronate does not contain chromophores groups, a colorful compound was obtained with ninhydrin. Drug reacted with ninhydrin in the presence of sodium bicarbonate via an oxidation deamination reaction of the primary amino group, followed by condensation of the reduced ninhydrin to form the colored reaction product (Ruhemen's purple), which presents a maximum absorbance at 569 nm. The complex formation took place in a water bath at 92 °C for one hour (Sultana et al., 2010; Taha and Youssef, 2003). The assay showed to be linear in the concentration range of 5.5 to 22.0 µg/mL (A = 0.034, C = -0.178 and R² = 0.992) with a detection limit of 0.701 µg/mL, a quantification limit of 2.339 µg/mL and RSD = 0.4%. The percentage recoveries ranged from 91.0 to 97.0%.

2.5. Fluorimetric analysis of sodium alendronate

An indirect fluorescence method was used to enable the quantification of alendronate in each permeation sample. A fluorescent complex was formed by the derivatization reaction between Al³⁺ and morin (2', 3, 4', 5, 7-pentahydroxy-flavone). When phosphate ions are added to the complex, morin is released because of the formation of the stronger Al³⁺-phosphate complex, leading to a decrease in fluorescence. This correlation between phosphate concentration and the decrease in fluorescence is the basis for the quantitative determination of the drug. The fluorescence intensity of the complex was recorded at 410/495 nm (Kitaoka et al., 2016) using a Fluorescence Spectrophotometer F-7000, Hitachi (Tokyo, Japan). The assay was linear in the

concentration range of 0.02 to 1.51 µg/mL (A = -19.679, C = 40.787 and R² = 0.982) with a detection limit of 0.211 µg/mL and an RSD = 7.8%. The recovery percentage was 104.12%.

2.6. Statistical analysis

Statistical analysis of the data was performed using Statgraphics software (Centurion XVI). Data were compared using one-way analysis of variance (ANOVA), and a Fisher's Least Significant Difference (LSD) post-hoc test. The difference was considered significant at p < 0.05.

3. Results and discussion

3.1. Pseudo-ternary phase diagrams and characterization of the selected microemulsion formulations

The components used for assessing the solubility of the drug were preselected according to their non-toxicity and their ability to act as permeation enhancers. A low solubility was found with Tween® 80, Transcutol® P, isopropyl alcohol, ethanol, Labrafac® lipophile WL 1349 and isopropyl myristate. In the rest of the vehicles tested, the solubility was 1007.46 µg/g ± 2.50 for Labrasol®, 2632.78 µg/g ± 7.56 for Plurol® Diisostearique CG, and 1283.16 µg/g ± 7.24 for isostearyl isostearate. As the drug did not show good solubility in any of the co-surfactants tested, two surfactants (Labrasol® and Plurol® Diisostearique) at different weight ratios were used to decrease the interfacial tension.

The pseudo-ternary phase diagrams of the systems containing isostearyl isostearate as the oil phase, distilled water, and Labrasol®:Plurol® Diisostearique (in proportions 3:1 and 2:1) are presented in Fig. 1A and B, respectively. The shaded area corresponds in both cases to the formation of microemulsified systems. As it can be seen, the increase in the concentration of Plurol® Diisostearique results in an increase of this area. To incorporate the drug, four points of the phase diagram were selected according to the principle of the maximum percentage of water, so that a high drug load can be achieved. The systems were characterized by measuring droplet size, PDI, viscosity and conductivity. The composition and characterization of these systems are presented in Table 1. As seen in the table, all the systems presented a droplet size in the nanometric range, being ME1 and ME5 the systems that exhibited the smallest size and the highest drug loading ability, which can be explained by the fact that those systems contain the highest proportion of water, enhancing the drug solubilization capacity. As expected, the value of conductivity is higher as the water content increases.

The rheological behavior of ME is a useful tool for predicting the structural properties of the systems. In this study, the rheograms (Fig. 1C) revealed that all the systems are Newtonian fluids, with a linear relationship between the shear stress and the shear rate, which is a feature of discontinuous microemulsions (Acharya and Hartley, 2012). According to these results, it was decided to continue the characterization studies with ME1 and ME5, since, as it has already been mentioned, they presented the smallest droplet sizes and the highest drug content.

3.2. Preparation of SONS containing sodium alendronate

SONS were prepared by the removal of water and cyclohexane from w/o emulsion via lyophilization, and the redispersion of the nonionic surfactant-drug complex in an oily penetration enhancer (isopropyl myristate). To investigate the influence of the sonication time and structure of surfactant on the formation of alendronate SONS, Span® 80, sorbitan sesquiolate and Tween® 80 were employed either alone or as mixtures, and sonication time varied from 0 to 15 min.

Nonionic surfactants were chosen due to their low skin irritability. Span® 80 and sorbitan sesquiolate were used as hydrophobic

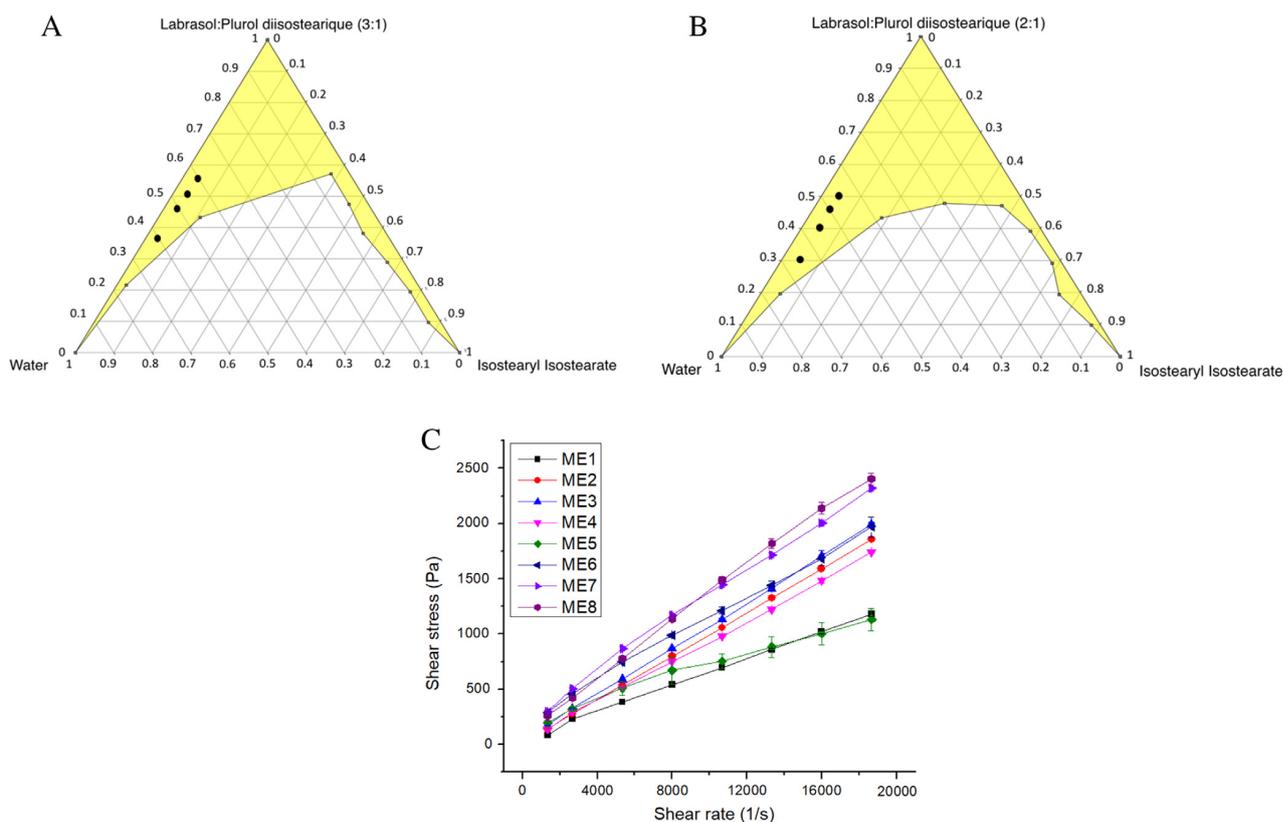


Fig. 1. The pseudoternary phase diagrams of Labrasol, Plurol diisostearique, Isostearyl Isostearate and water at different surfactant ratios; (A) Labrasol: Plurol Diisostearique (3:1), (B) Labrasol: Plurol Diisostearique (2:1); (C) Rheograms of the studied microemulsions. All results are expressed as the means \pm SE (n = 3).

emulsifiers with an HLB of 4.3 and 3.7 respectively, while Tween® 80 was used as a hydrophilic emulsifier (HLB = 15.0). Cyclohexane was employed as a volatile solvent due to its freezing point of 6.5 °C which allows that both phases, water and cyclohexane, freeze simultaneously in a dry ice and acetone bath, sublimating during the freeze-drying process.

3.3. Characterization of nanosuspensions containing sodium alendronate

3.3.1. Determination of alendronate entrapment efficiency

As shown in Table 2, nanosuspensions containing Tween® 80 exhibited the lowest percentage of drug content, while the systems formulated with a hydrophobic surfactant presented an entrapment efficiency (%EE) greater than 60.0% for almost all systems. This fact can be attributed to the limited affinity of Tween® 80 by the organic phase, which generates a non-stable system, resulting in a low drug loading capacity (Kitaoka et al., 2016).

3.3.2. Particle size and polydispersity index measurements

Two non-ionic lipophilic surfactants soluble in cyclohexane (Span® 80 and sorbitan sesquioleate) were used in this study, as well as their mixtures with a non-ionic hydrophilic surfactant (Tween® 80) in order to determine the effect of the type of surfactant and of the length of the hydrocarbon chain on the stability and performance of the SONS. Those nanosystems prepared only with a lipophilic surfactant had sizes for alendronate-surfactant complexes in IPM of less than 400 nm. In contrast, those systems prepared with a mixture of a lipophilic surfactant and Tween® 80 presented larger complexes due to the insolubility of Tween® 80 in cyclohexane (Kitaoka et al., 2016).

For systems without Tween® 80, sonication for 5 min allowed to reduce the particle size and PDI, primarily due to the effect of cavitation, which allows the disintegration and fragmentation of the crystals (Hielscher, 2007). On the contrary, longer sonication times increased the value of the PDI and in some cases, the size of the crystals. These results are associated with the erosion of drug particles, which causes

Table 1

Composition, amount of drug loaded and physicochemical properties of the prepared microemulsion formulations. The average \pm SD is reported (n = 3).

Formulation code	Amount of aqueous phase (%)	Amount of surfactant (%)	Amount of oil phase (%)	Labrasol®:Plurol Diisostearique®	Drug loaded (mg/g)	Particle size (nm)	Polydispersity Index	Conductivity (μ S/cm)	Viscosity (cP)
ME1	60	37	3	(3:1)	6.362 \pm 0.106	36.90 \pm 0.74	0.494 \pm 0.004	424.9 \pm 2.5	65 \pm 1
ME2	50	47	3	(3:1)	5.076 \pm 0.115	43.85 \pm 2.76	0.487 \pm 0.005	173.1 \pm 1.4	100 \pm 2
ME3	45	52	3	(3:1)	4.361 \pm 0.023	45.32 \pm 1.26	0.483 \pm 0.100	126.9 \pm 1.3	106 \pm 1
ME4	40	57	3	(3:1)	3.735 \pm 0.059	34.86 \pm 2.04	0.435 \pm 0.019	78.3 \pm 2.5	92 \pm 1
ME5	65	30	5	(2:1)	8.798 \pm 0.124	33.54 \pm 1.84	0.492 \pm 0.020	667.3 \pm 12.7	71 \pm 7
ME6	55	40	5	(2:1)	6.276 \pm 0.170	48.70 \pm 2.91	0.624 \pm 0.125	201.4 \pm 6.7	114 \pm 3
ME7	50	45	5	(2:1)	6.170 \pm 0.241	83.33 \pm 4.10	0.386 \pm 0.004	137.1 \pm 3.2	135 \pm 2
ME8	45	50	5	(2:1)	3.098 \pm 0.108	76.28 \pm 4.17	0.414 \pm 0.015	91.5 \pm 4.9	139 \pm 3

Table 2Effect of sonication time on the entrapment efficiency and size distribution of the prepared nanosuspensions (the average \pm SD is reported; n = 3).

System	Surfactant (type)	Sonication time (min)	Size (nm)	PDI	% EE
SONS1	Span 80	0	192.77 \pm 6.90	0.645 \pm 0.079	91.31 \pm 0.38
SONS2	Span 80	5	174.20 \pm 4.90	0.252 \pm 0.009	88.48 \pm 2.95
SONS3	Span 80	10	198.83 \pm 24.44	0.519 \pm 0.053	68.17 \pm 1.33
SONS4	Span 80	15	255.03 \pm 10.56	0.824 \pm 0.023	62.44 \pm 2.10
SONS5	Span 80:Tween 80 (1:1)	0	974.43 \pm 18.38	0.334 \pm 0.034	61.94 \pm 1.66
SONS6	Span 80:Tween 80 (1:1)	5	607.47 \pm 74.62	0.261 \pm 0.033	37.19 \pm 0.16
SONS7	Span 80:Tween 80 (1:1)	10	841.30 \pm 22.29	0.280 \pm 0.012	38.47 \pm 0.26
SONS8	Span 80:Tween 80 (1:1)	15	948.73 \pm 81.26	0.493 \pm 0.051	35.49 \pm 1.09
SONS9	Sorbitan Sesquiolate	0	434.63 \pm 6.01	0.291 \pm 0.047	75.54 \pm 0.63
SONS10	Sorbitan Sesquiolate	5	149.27 \pm 5.93	0.272 \pm 0.024	76.33 \pm 0.62
SONS11	Sorbitan Sesquiolate	10	351.27 \pm 40.01	0.324 \pm 0.018	61.05 \pm 1.57
SONS12	Sorbitan Sesquiolate	15	349.37 \pm 33.87	0.424 \pm 0.030	37.57 \pm 0.68
SONS13	Sorbitan Sesquiolate:Tween 80 (1:1)	0	439.57 \pm 47.09	0.709 \pm 0.041	41.21 \pm 0.61
SONS14	Sorbitan Sesquiolate:Tween 80 (1:1):	5	454.30 \pm 42.86	0.201 \pm 0.016	36.07 \pm 0.26
SONS15	Sorbitan Sesquiolate:Tween 80 (1:1):	10	523.23 \pm 5.49	0.295 \pm 0.022	37.17 \pm 1.02
SONS16	Sorbitan Sesquiolate:Tween 80 (1:1)	15	603.53 \pm 34.04	0.418 \pm 0.021	34.19 \pm 0.19

the production of a large number of fine structures and, as a consequence, a greater degree of polydispersion (Gielen et al., 2017).

In view of the above-mentioned results, SONS2 and SONS10 were selected for further studies due to the high % EE, low particle size, and low PDI.

3.4. Stability studies for nanocarriers

After being stored at 40 ± 2 °C/75% RH, all the systems presented an increase in particle size and most of them a decrease in the amount of loaded alendronate (data presented as supplementary material).

ME are formulated with hydrophilic nonionic surfactants as stabilizers which can be sensitive to temperature increases, becoming less hydrated and consequently more hydrophobic (Toerne et al., 2001), decreasing the stability of ME and showing eventually a significant increase in globule size after three and six months of storage. ME1 did not present any changes in drug solubility. In contrast, the appearance of crystals in ME5 during storage allowed inferring that the higher solubilization of drug achieved in ME5 was due to the surfactant film interface between the oil and water phases, which leads to additional solubilization sites for alendronate (Kogan and Garti, 2006).

SONS also presented the appearance of crystals at the bottom of the containers after three and six months of storage. This can be explained on the basis that SONS are thermodynamically unstable colloidal systems, stabilized by surfactant molecules, which form an interfacial film that becomes more dynamic as the temperature increases. Likewise, the attachment and detachment of surfactant molecules at the surface of the dispersed particles, increase the Ostwald ripening phenomenon as a way to reduce the Gibbs free energy (Verma et al., 2011; Wang et al., 2013). As a consequence of drug precipitation, the amount of drug-loaded decreased significantly over the time of storage.

The systems presented a greater stability after being stored at 25 ± 2 °C and 60% RH (data presented as supplementary material). Neither ME had significant differences in size ($p > 0.05$) during the storage period. According to the results shown in the supplementary material, it can be seen that the amount of drug loaded in ME1 did not show significant differences during the time of storage; however ME5 presented a decrease ($p < 0.05$) in the amount of drug loaded at 3 and 6 months, which could indicate the migration of drug toward the aqueous phase, leading to supersaturation and drug precipitation (Li and Hui Zhou, 2019).

Both SONS presented a decrease in %EE and an increase in particle size during the storage at 25 ± 2 °C and 60% of RH. Nevertheless, these changes occurred to a lesser extent than those presented at 40 ± 2 °C and 75% of RH, which can be explained by the lower temperature and, as a result, a low rate in the phenomena of attachment and detachment of surfactant molecules at the surface of the suspended

particles.

3.5. Measurement of transepidermal water loss

The protection provided by the SC depends on the integrity of the stacking of corneocytes and intercellular lipids (Menon et al., 2012). TEWL measurements were performed before and after applying the nanosystems, in order to determine whether the selected formulations have certain impact on the skin barrier function (Xie et al., 2016), in order to elucidate the enhancement mechanism of the studied formulations.

Fig. 2 presents the results obtained for each pre- and post-treatment system. As can be seen, the application of ME1 provoked an increase in the value of TEWL, while ME5 showed a decrease, which is the result of the higher percentage of oil phase in ME5, resulting in an occlusive effect on the skin. In addition, the higher concentration of Labrasol® in ME1 can interact with the lipids of the SC disrupting the arrangements and enhancing the amount of water that evaporates through the skin (Myoung and Choi, 2002; Park et al., 2000). Regarding SONS, significant decreases in TEWL were obtained after the treatment with SONS2 and SONS10, which can be explained by the ability of IPM to form a protective film on the surface of the skin, decreasing water evaporation (Patzelt et al., 2011). Significant differences were observed in all cases.

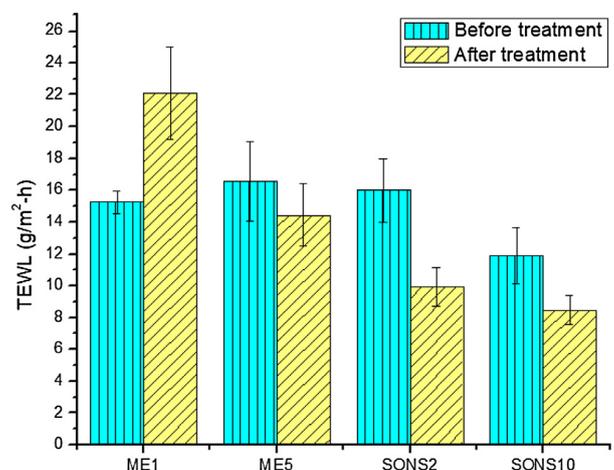


Fig. 2. Effect of the selected formulations (ME1, ME5, SONS2 and SONS10) on TEWL values (n = 3). All differences were significant ($p < 0.05$).

3.6. Measurement of erythema intensity

Although the transdermal route represents a good alternative for the administration of drugs, when developing a formulation it is important to consider the possible reactions of the skin against the components of the transdermal medication (i.e., the drug or the other components of the formulation). The most common signs associated with these reactions involve the appearance of redness (erythema) or itching, which may be accompanied by edema. In most cases, these symptoms are mild to moderate, limited to the area of application, and usually transient, disappearing after removal of the formulation. Most of these skin reactions are a form of irritant contact dermatitis, which can be minimized, for example, by rotating the application site, gently removing the formulation (especially if it is a patch), and applying some products that alleviate these symptoms, e.g., moisturizers (Ale et al., 2009).

In the present study, the potential irritation caused by the components of the nanosystems was evaluated by measuring the degree of erythema. Especially because of the possible disruption of the SC provoked by the surfactants and the oil phases with which the nanosystems were prepared (Karande and Mitragotri, 2009; Lopes, 2014).

The average erythema index values after two hours of contact with each system are presented in Table 3. The measurement was made for ME1 (because it contains a greater amount of Labrasol than ME5), SONS2 and SONS10. The results were compared with the *Guide for erythema values* provided by the device manufacturer (No erythema: 0–170, minimal erythema: 170–330, diffuse redness: 330–450, high erythema: 450–570, extreme erythema: over 570) (Khazaka, 2015). Most erythema values decreased when applying the formulations and no values greater than 330 were obtained, so it is assumed that all nanosystems were well tolerated by the skin after 2 h of contact.

However, in this regard, there are still multiple questions to answer, so deeper studies are required to determine the potential irritation of the proposed systems: (i) On the one hand, increasing the contact time, considering that a longer duration of treatment increases the risk of irritation. (ii) On the other hand, determining the risk of irritation of alendronate contained in the nanosystems. In this regard, Sener et al. (Şener et al., 2005) had already reported alendronate-induced gastric damage related to neutrophil activation, accompanied by the release of reactive oxygen species (ROS). Subsequently, Kusamori et al. (Kusamori et al., 2010) observed for the first time, skin damage induced by administering alendronate transdermally, and Katsumi et al. (Katsumi et al., 2012) found slight erythema when applying an alendronate-loaded microneedle array. The damage was proportional to the dose and the period of application. One way to solve this drawback is through the co-administration of an antioxidant agent such as taurine (Şener et al., 2005), butylhydroxyanisole or butylhydroxytoluene (Kusamori et al., 2010), which prevent the damage induced to the skin during the transdermal release of alendronate. Therefore, the addition of a ROS scavenger to the formulation should be considered, and its effect on drug permeation evaluated (Şener et al., 2005; Kusamori et al., 2010; Katsumi et al., 2012). Furthermore, it would be interesting to determine if there is a correlation between the degree of irritation and the amount of drug permeated.

3.7. Attenuated total Reflectance-Fourier-transform infrared (ATR-FTIR) spectroscopy

ATR-FTIR is a helpful tool to characterize the skin tissue at the molecular level, measuring the extent of SC disruption, in order to understand the enhancement mechanism of the studied systems (Karande et al., 2005). Four primary signals were mapped: CH₂ asymmetric stretching mode (ν_{as} CH₂) at about 2917 cm⁻¹ and CH₂ symmetric stretching mode (ν_s CH₂) at 2850 cm⁻¹, resulting from the lipids in the horny layer; amide I at about 1638 cm⁻¹ and amide II at 1540 cm⁻¹, as characteristic absorption keratin bands (Olsztyńska-Janus et al., 2017). A shift in the maximum absorption bands associated

with SC lipids, implies changes in the molecular organization (Xie et al., 2016). Both microemulsions (ME1 and ME5) contain Labrasol®, which is expected to interact with the lipids and disorganize their structure, while nanosuspensions are composed of IPM as a continuous phase, which can partition into SC lipid bilayers increasing its fluidization, weakening the hydrogen bonds established through the C=O groups of lipids (Karande et al., 2005; Olsztyńska-Janus et al., 2017). On the other hand, the high concentration of non-ionic surfactants can interact with the keratin filament causing disruption within the corneocytes (Casiraghi et al., 2017). However, when comparing the results of skin treated with nanosystems with those of untreated skin (control), in all cases a difference of 1 cm⁻¹ (either towards higher or lower wavenumbers) was obtained (Table 4). Displacements that are considered non-significant taking into account the resolution at which the measurements were carried out. Therefore, these results did not reflect an alteration in the membrane components when exposed to the nanosystems.

3.8. Evaluation of alendronate release profiles from nanocarriers

Fig. 3 shows the release profiles of alendronate from the nanocarriers. In the case of microemulsions ME1 and ME5, 100% of the drug was released in less than 5 h. Of these two microemulsions, ME1 released the drug at a significantly higher rate than ME5 ($p < 0.05$). This is attributed to the fact that alendronate is solubilized to a greater degree in ME5, indicating a greater affinity for this system which consequently reduces the release rate in relation to ME1 (El Khayat et al., 2018). In contrast, SONS released the drug very slowly, having released only 35.66% from SONS2 (containing Span 80) and 22.86% from SONS10 (containing sorbitan sesquiolate) in a period of one week. This slow release is attributed to the tortuous path that the drug has to overcome to be released and solubilized (Yoshiura et al., 2008).

Drug solutions (S1 and S2) were used as controls, finding a significantly slower release rate for both solutions than for ME ($p < 0.05$). This unexpected result can be attributed to the fact that both ME1 and ME5 are microemulsions o/w, with a high percentage of aqueous phase (60 and 65%, respectively). Due to the nature of the drug, it is mainly located in the continuous phase, with a low interaction between the drug and the oil phase (Djordjevic et al., 2005; Leyland-Jones, 1993), so it is immediately available to be released. In addition, it is very important to take into account the high content of surfactants (Labrasol®:Plurol Diisostearique®), which contribute to further increase the solubility of the drug in the aqueous medium. This would explain the fact that ME1, with a total surfactant content of 37% releases 100% of the drug in less time than ME5 with 30% surfactants. After 8 h of release, solutions presented a plateau, and after 24 h, 86% and 82% were released from S1 and S2 respectively. The rest of the drug was quantified inside the dialysis bags.

In order to understand the mechanism of drug release from the nanosystems, DDSolver, an add-in program, was used. The results obtained from the release studies were fitted to the following mathematical models: zero-order, first-order, Higuchi and Korsmeyer-Peppas in the case of SONS; zero and first order for ME (they released more than 60% of the drug in the first hour of the study). The suitability of the model was determined on the basis of best fit to the model using the AIC (Akaike Information Criterion) and MSC (modified reciprocal form of the AIC) values (Table 5) (Zhang et al., 2010). Both ME best fit the first-order equation indicating that the release rate is dependent on the drug concentration.

On the other hand, SONS presented the best fit using the Korsmeyer-Peppas model. SONS2 showed an “n” value of 0.6893 suggesting that more than one release mechanism is involved. Such a release pattern could be attributed to the weak surfactant-drug interaction when compared with SONS10, indicating diffusion and partition mechanisms. SONS10 “n” value was 0.2602 inferring a pseudofickian mechanism of drug release (Rezaei et al., 2016; Wind and Lenderink,

Table 3
Results of the erythema index values determined in six volunteers for ME1, SONS2, and SONS10 at different contact times. The average of the erythema index value \pm SE is reported (n = 5).

System	Time (min)	Volunteer											
		1		2		3		4		5		6	
		BT	AT										
ME1	30	343 \pm 2	288 \pm 5	210 \pm 4	211 \pm 4	295 \pm 14	199 \pm 15	281 \pm 7	235 \pm 8	275 \pm 13	292 \pm 6	264 \pm 12	216 \pm 5
	60	341 \pm 8	272 \pm 27	215 \pm 6	203 \pm 20	264 \pm 1	226 \pm 4	247 \pm 12	272 \pm 2	272 \pm 2	313 \pm 24	274 \pm 8	227 \pm 18
	90	324 \pm 23	261 \pm 14	213 \pm 12	174 \pm 13	245 \pm 7	212 \pm 15	277 \pm 2	194 \pm 15	257 \pm 12	321 \pm 12	244 \pm 14	234 \pm 4
	120	297 \pm 7	245 \pm 11	188 \pm 5	144 \pm 8	299 \pm 11	275 \pm 10	292 \pm 7	229 \pm 6	291 \pm 8	265 \pm 14	262 \pm 4	249 \pm 7
Control for ME1	30	294 \pm 15	285 \pm 26	225 \pm 17	233 \pm 13	316 \pm 6	215 \pm 7	282 \pm 7	244 \pm 11	238 \pm 15	264 \pm 19	263 \pm 5	209 \pm 9
	60	268 \pm 15	265 \pm 16	177 \pm 11	191 \pm 12	257 \pm 6	210 \pm 12	289 \pm 10	312 \pm 7	252 \pm 10	223 \pm 13	259 \pm 5	222 \pm 13
	90	276 \pm 18	229 \pm 8	182 \pm 4	199 \pm 1	223 \pm 11	192 \pm 14	289 \pm 10	272 \pm 8	235 \pm 12	298 \pm 18	246 \pm 6	223 \pm 10
	120	267 \pm 12	251 \pm 7	207 \pm 2	171 \pm 13	269 \pm 9	206 \pm 13	299 \pm 6	254 \pm 15	254 \pm 13	238 \pm 23	264 \pm 10	251 \pm 7
SONS2	30	272 \pm 6	264 \pm 8	253 \pm 12	263 \pm 9	291 \pm 9	255 \pm 9	208 \pm 9	233 \pm 9	282 \pm 10	268 \pm 10	330 \pm 8	305 \pm 9
	60	248 \pm 5	158 \pm 6	269 \pm 13	267 \pm 9	281 \pm 8	255 \pm 7	219 \pm 11	176 \pm 8	272 \pm 16	272 \pm 11	325 \pm 10	319 \pm 12
	90	267 \pm 10	238 \pm 8	228 \pm 13	225 \pm 9	321 \pm 10	308 \pm 5	213 \pm 11	193 \pm 8	291 \pm 8	315 \pm 12	317 \pm 10	318 \pm 9
	120	272 \pm 10	229 \pm 11	237 \pm 4	194 \pm 10	291 \pm 6	312 \pm 11	237 \pm 10	211 \pm 10	353 \pm 9	273 \pm 25	296 \pm 6	316 \pm 8
Control for SONS2	30	286 \pm 13	220 \pm 6	258 \pm 13	218 \pm 9	313 \pm 11	167 \pm 9	217 \pm 5	206 \pm 6	286 \pm 10	268 \pm 14	283 \pm 14	224 \pm 13
	60	280 \pm 7	278 \pm 18	280 \pm 4	248 \pm 12	188 \pm 9	179 \pm 11	236 \pm 10	185 \pm 8	268 \pm 8	215 \pm 14	265 \pm 16	241 \pm 16
	90	286 \pm 9	209 \pm 10	309 \pm 7	239 \pm 10	294 \pm 11	144 \pm 10	211 \pm 6	166 \pm 7	283 \pm 10	222 \pm 7	327 \pm 10	259 \pm 7
	120	290 \pm 7	200 \pm 15	288 \pm 8	202 \pm 6	241 \pm 12	146 \pm 9	230 \pm 6	171 \pm 10	295 \pm 10	203 \pm 16	301 \pm 17	259 \pm 7
SONS10	30	253 \pm 12	275 \pm 10	227 \pm 10	227 \pm 5	226 \pm 1	242 \pm 7	307 \pm 12	255 \pm 22	252 \pm 10	257 \pm 8	291 \pm 10	256 \pm 13
	60	251 \pm 5	243 \pm 16	222 \pm 7	239 \pm 11	248 \pm 8	231 \pm 10	290 \pm 8	277 \pm 16	252 \pm 6	261 \pm 10	271 \pm 4	254 \pm 5
	90	244 \pm 11	237 \pm 15	225 \pm 9	221 \pm 10	228 \pm 9	219 \pm 9	268 \pm 8	279 \pm 12	274 \pm 14	282 \pm 10	247 \pm 9	230 \pm 5
	120	244 \pm 10	173 \pm 4	243 \pm 10	231 \pm 11	234 \pm 9	183 \pm 16	301 \pm 12	269 \pm 9	289 \pm 9	303 \pm 6	234 \pm 9	205 \pm 5
Control for SONS10	30	229 \pm 7	199 \pm 9	201 \pm 6	167 \pm 9	217 \pm 5	200 \pm 9	286 \pm 10	262 \pm 19	283 \pm 14	233 \pm 12	265 \pm 5	252 \pm 17
	60	215 \pm 2	180 \pm 14	185 \pm 12	179 \pm 11	236 \pm 10	185 \pm 8	265 \pm 10	207 \pm 12	278 \pm 16	230 \pm 19	238 \pm 9	273 \pm 6
	90	216 \pm 6	166 \pm 12	194 \pm 11	144 \pm 10	212 \pm 6	168 \pm 6	283 \pm 10	220 \pm 6	331 \pm 9	259 \pm 7	239 \pm 4	212 \pm 6
	120	220 \pm 8	169 \pm 12	243 \pm 11	146 \pm 9	230 \pm 6	165 \pm 12	289 \pm 13	203 \pm 15	284 \pm 14	257 \pm 8	176 \pm 4	224 \pm 4

BT: Before treatment.
AT: After treatment.

Table 4

ATR-FTIR signals for stratum corneum components after treatment with nanosystems. CH₂ asymmetric (ν_{as} CH₂) and CH₂ symmetric (ν_s CH₂) stretching vibrations at about 2917 cm⁻¹ and 2850 cm⁻¹, respectively. Signals for amide I at about 1638 cm⁻¹ and amide II at about 1540 cm⁻¹ ($n = 3$).

Samples	$\nu_{as}(\text{CH}_2)$	$\nu_s(\text{CH}_2)$	Amide I	Amide II
	Wavenumber (cm ⁻¹)			
Control skin	2917.120	2850.581	1638.409	1540.046
Skin-ME1	2918.084	2849.616	1637.444	1541.011
Skin-ME5	2918.084	2849.616	1638.409	1540.046
Skin-SONS2	2918.084	2849.616	1637.444	1541.011
Skin-SONS10	2918.084	2849.616	1637.444	1541.011

1996).

3.9. *In vitro* permeation kinetics of sodium alendronate

In order to measure the enhancing capability of the selected systems, *in vitro* permeation studies were carried out using a synthetic membrane Strat-M[®]. Some of the advantages of this membrane are its batch-to-batch reproducibility, no need of special storage (as in the case of the skin), and good correlation of permeability values in relation to those of human skin (Haq et al., 2018; Uchida et al., 2015). As mentioned before, alendronate is a highly hydrophilic, electrically charged compound, characteristics not favorable for permeation through the SC. Proven fact with the tests that showed that alendronate in solution was not able to permeate at any time. However, as it can be seen, the incorporation of alendronate into nanosystems enhanced the permeability through the Strat M[®] membrane. The permeation profiles are shown in Fig. 4A and the recorded permeation parameters appear in Table 6. In the case of SONS, two flux values (0–5 h and 5–24 h) are reported. According to their magnitude, the flux values obtained with the different nanosystems have the following order: ME1 > ME5 > SONS2 (0–5 h) = SONS10 (0–5 h) > SONS2 (5–24 h) > SONS10 (5–24 h). With the exception of SONS2 (0–5 h) and SONS10 (0–5 h), significant differences were found in all cases for the flux values

($p < 0.05$). Likewise, significant differences were obtained for the total amounts permeated with all systems ($p < 0.05$).

ME had the highest flux values, especially ME1, which contains a higher concentration of Labrasol[®] than ME5. The Strat-M[®] membrane is composed of two layers of polyethersulfone and one of polyolefin sulfone embedded in a mix of ceramides, cholesterol, free fatty acids and others mimicking human SC lipids (Haq et al., 2018). Therefore, although during permeation alendronate has to cross hydrophilic and lipophilic domains (N'Da, 2014), the obtained TEWL values showed that the ME1 presented a higher value, which implies that it is able to disrupt the lipids to a larger extent than ME5, and, as a consequence, it possesses a higher capacity to facilitate the drug penetration through the synthetic membrane. Another important factor to consider, is the higher degree of saturation of drug in ME1, as the drug is less soluble in this system, thus possessing a greater thermodynamic activity and therefore, favoring the permeation through the skin (Karande and Mitragotri, 2009). This result is consistent with that obtained when performing TEWL measurements.

SONS2 and SONS10 showed significantly lower flux values than the ME. This result was expected when viewing the SONS release profiles. However, the fact that SONS allowed its permeation towards the receptor medium, can be attributed to its continuous oil phase, which contributes to generate an occlusive effect, resulting in the disruption of membrane lipids, creating a more fluid bilayer structure, extending the hydrophilic domains (Barry, 1987).

As it can be seen in Fig. 4A, both SONS presented a high flux during the first 5 h of the permeation study. These results can indicate that the drug molecules that permeated during the first period were those closer to the Strat M[®] membrane, while the rest of the permeated drug had to move through the system in order to reach the membrane. The oil phase represents a tortuous medium for the drug and, as a result, the flux was slowed down.

The lower flux for SONS10 after 5 h of permeation is attributed to the longer alkyl chain of the stabilizer (sorbitan sesquiolate), which can interact with the membrane lipids, increasing their affinity and retarding the permeation (Kim et al., 2008).

As ME systems presented the best permeation results through the synthetic membrane, they were used to conduct a study using pigskin.

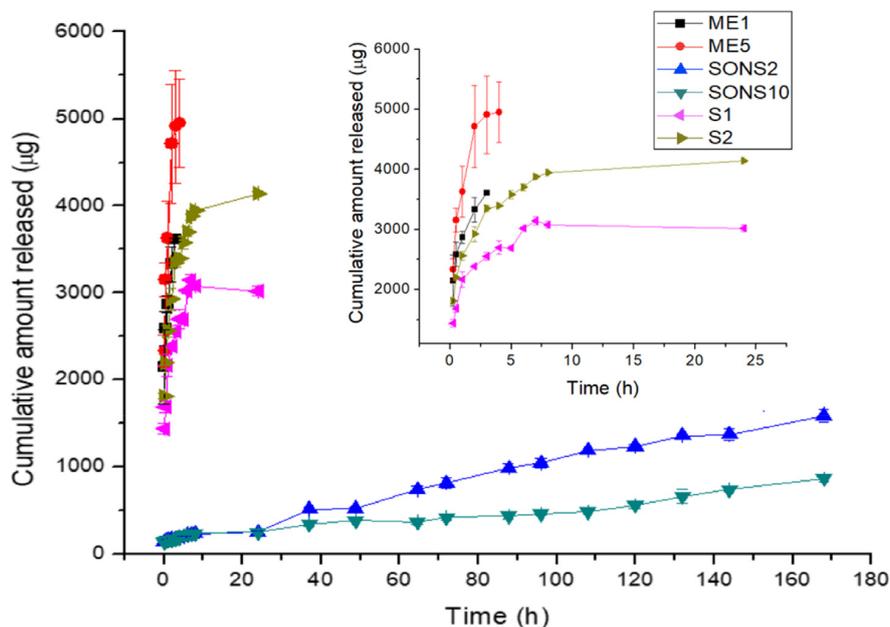


Fig. 3. *In vitro* release profile of alendronate from solutions, microemulsions and nanosuspensions ($n = 4$). For better visualization, the release from microemulsions during the first hours is shown in the box. All results are expressed as the means \pm SE.

Table 5
Modeling and release kinetics of alendronate-loaded selected nanosystems.

Formulation	Zero order			First order			Higuchi's square root			Korsmeyer-Peppas			
	AIC	MSC	K_0 (% h ⁻¹)	AIC	MSC	K_1 (h ⁻¹)	AIC	MSC	K_H (%h ^{-0.5})	AIC	MSC	n	K_{EP} (%h ⁿ)
ME1	46.183	-2.317	42.310	31.958	0.528	2.583	—	—	—	—	—	—	—
ME5	54.854	-1.439	31.901	36.429	1.632	1.715	—	—	—	—	—	—	—
SONS2	113.337	2.707	0.232	107.246	2.983	0.003	109.789	2.868	2.418	97.306	3.435	0.689	1.015
SONS10	124.193	0.770	0.137	123.263	0.812	0.002	103.935	1.691	1.475	101.054	1.822	0.260	2.673

As it is shown in Fig. 4, the permeation profiles through the Strat-M® membrane (Fig. 4A) and through the skin (Fig. 4B) showed a similar trend, (i.e., in both cases ME1 presents a greater permeability than ME5). A relatively good correlation was found between the amount permeated through the Strat-M® membrane vs. the amount permeated through the skin, with R² values of 0.89 and 0.95 for ME1 and ME5, respectively (Fig. 5). This corroborates the usefulness of synthetic membranes when comparing the permeability of different molecules or systems, especially because of the advantages already mentioned that they offer. However, synthetic membranes are generally more permeable than skin, as seen in Figs. 4 and 5, something that should be taken into account when used in permeation studies. This is confirmed by the results in Table 6, which shows the permeation parameters obtained with both the skin and the synthetic membrane, with higher flux values for the Strat-M® membrane than for the skin ($p < 0.05$). This can be attributed to the lower tortuosity of the hydrophilic pathway in the synthetic membrane, resulting in a greater permeability for hydrophilic compounds (Haq et al., 2018). In addition, although the components of the synthetic membrane try to imitate the skin, this is a complex tissue, both in composition and structurally. On the other hand, alendronate solution was not able to permeate either through the Strat-M® membrane or through the skin. Nevertheless, the formulation of alendronate in microemulsions favored the transport through the skin, finding the greatest amount permeated and the highest flux with ME1 (Table 6), which is attributed to its greater content of Labrasol® (in comparison with ME5). This is in accordance with various reports that have shown that Labrasol® is a good absorption enhancer for drugs with different polarities, not only for the transdermal route, but for other routes of administration (Guo et al., 2019; McCartney et al., 2019).

4. Conclusions

Novel transdermal nanosystems with sodium alendronate, microemulsions and solid-in-oil nanosuspensions, were developed and optimized to obtain the highest drug loading, and the smallest particle size and PDI. It was demonstrated through *in vitro* studies that both nanosystems enhanced the permeation of alendronate through the skin, especially the microemulsions, thanks to their capacity of disrupting the stratum corneum and to their thermodynamic activity. This indicated a great potential in the treatment of osteoporosis though further investigations might still be required to confirm this finding.

CRedit authorship contribution statement

Angélica Villanueva-Martínez: Investigation, Methodology, Writing - original draft. **Laura Hernández-Rizo:** Methodology. **Adriana Ganem-Rondero:** Project administration, Supervision, Writing - review & editing.

Declaration of Competing Interest

The authors declare the following financial interests/personal relationships which may be considered as potential competing interests:

Angélica Villanueva-Martínez - Development of the bulk of the experimental part: Preparation, characterization and evaluation of the systems including sodium alendronate.

Laura Hernández-Rizo - Support for the transepidermal water loss and erythema tests.

Adriana Ganem-Rondero - Review of results and article text.

Acknowledgements

The authors acknowledge a grant from CONACyT (Ref. 409450), PIAPI (Ref. 1803) and PAPIIT/UNAM (Ref. IN226119).

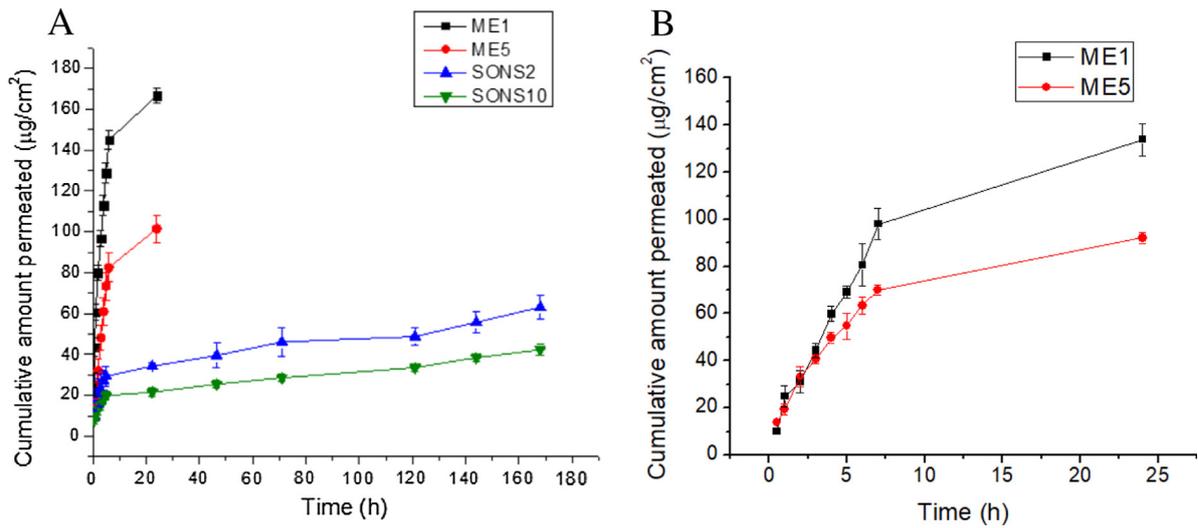


Fig. 4. *In vitro* permeation profile of alendronate from different nanosystems across (A) Strat M® membrane (n = 4), (B) pig ear skin (n = 3). All results are expressed as the means ± SE. *Plain solutions did not permeate at any time.

Table 6

In vitro transdermal permeation parameters for alendronate contained in the different studied formulations.

Formulation	J (µg/cm ² h)	K _p (cm/h)	Q _T (µg/cm ²)
ME1 (Strat-M®)	16.70 ± 0.65	2.39 × 10 ⁻³ ± 1.03 × 10 ⁻⁴	166.64 ± 3.65
ME5 (Strat-M®)	13.35 ± 1.03	1.52 × 10 ⁻³ ± 1.17 × 10 ⁻⁴	101.57 ± 6.78
ME1 (Pigskin)	13.06 ± 1.07	1.87 × 10 ⁻³ ± 1.54 × 10 ⁻⁴	133.87 ± 6.80
ME5 (Pigskin)	8.52 ± 0.50	9.68 × 10 ⁻⁴ ± 5.69 × 10 ⁻⁵	92.13 ± 2.28
SONS2 (Strat-M®)	2.91 ± 0.23 (0–5 h) 0.19 ± 0.02 (5–168 h)	3.27 × 10 ⁻⁴ ± 2.60 × 10 ⁻⁵ (0–5 h) 2.14 × 10 ⁻⁵ ± 2.07 × 10 ⁻⁶ (5–168 h)	63.17 ± 5.94
SONS10 (Strat-M®)	2.54 ± 0.19 (0–5 h) 0.13 ± 0.01 (5–168 h)	3.33 × 10 ⁻⁴ ± 2.44 × 10 ⁻⁵ (0–5 h) 1.77 × 10 ⁻⁵ ± 1.39 × 10 ⁻⁶ (5–168 h)	42.32 ± 2.62

J = flux, K_p = Permeability coefficient, Q_T = Total amount permeated. Average ± SE reported for Strat-M® (n = 4) and for pigskin (n = 3).

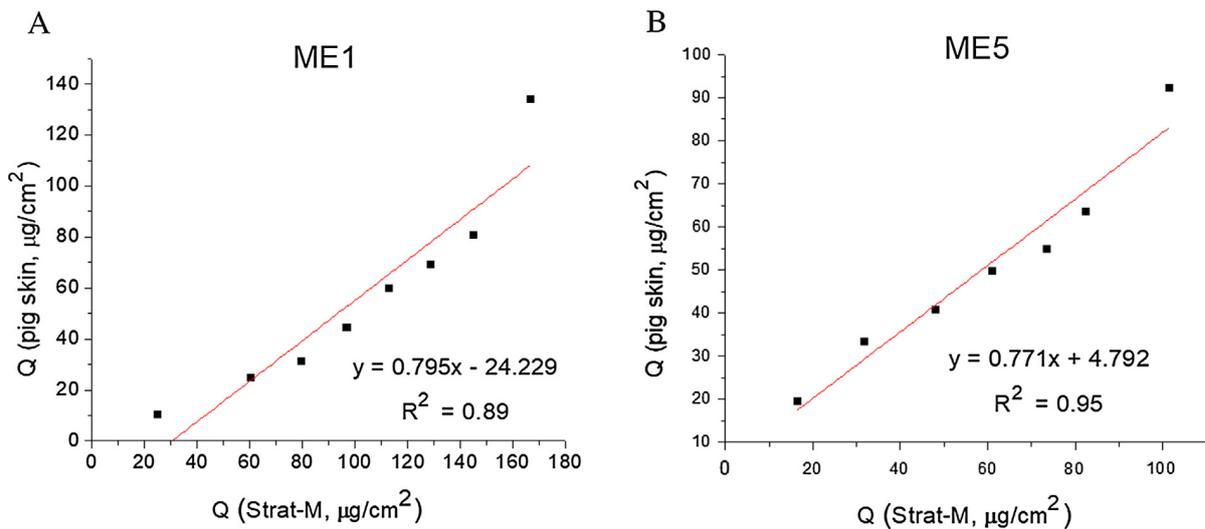


Fig. 5. Time point correlations between the amounts of drug penetrated through pig ear skin and Strat-M® membrane (A) ME1, (B) ME5.

Appendix A. Supplementary material

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2020.119312>.

References

McClung, M.R., 1996. Current bone mineral density data on bisphosphonates in postmenopausal osteoporosis. *Bone* 19 (5 SUPPL.), 195S–198S.

Tu, K.N., Lie, J.D., Wan, C.K.V., Cameron, M., Austel, A.G., Nguyen, J.K., et al., 2018. Osteoporosis: A review of treatment options. *P T*. 43 (2), 92–104.
 Camacho, P.M., Petak, S.M., Binkley, N., Clarke, B.L., Harris, S.T., Hurley, D.L., et al., 2016. American association of clinical endocrinologists and American college of endocrinology clinical practice guidelines for the diagnosis and treatment of postmenopausal osteoporosis – 2016. *Endocr. Pract.* 22 (September), 1–42.
 Watts, N.B., Bilezikian, J.P., Camacho, P.M., Greenspan, S.L., Harris, S.T., Hodgson, S.F., et al., 2010. American Association of Clinical Endocrinologists Medical Guidelines for Clinical Practice for the diagnosis and treatment of postmenopausal osteoporosis. *Endocr. Pract.* 16, 1–37.
 Katsumi, H., Nakatani, M., Sano, J.ichi, Abe, M., Kusamori, K., Kurihara, M., et al., 2010.

- Absorption and safety of alendronate, a nitrogen-containing bisphosphonate, after intrapulmonary administration in rats. *Int. J. Pharm.* 400 (1–2), 124–130. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2010.08.041>.
- Alama, T., Katayama, H., Hirai, S., Ono, S., Kajiyama, A., Kusamori, K., et al., 2016. Enhanced oral delivery of alendronate by sucrose fatty acids esters in rats and their absorption-enhancing mechanisms. *Int. J. Pharm.* 515 (1–2), 476–489. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2016.10.046>.
- Han, H.K., Shin, H.J., Ha, D.H., 2012. Improved oral bioavailability of alendronate via the mucoadhesive liposomal delivery system. *Eur. J. Pharm. Sci.* 46 (5), 500–507. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2012.04.002>.
- Karande, P., Mitragotri, S., 2009. Enhancement of transdermal drug delivery via synergistic action of chemicals. *Biochim Biophys Acta – Biomembr.* 1788 (11), 2362–2373. <https://doi.org/10.1016/j.bbmem.2009.08.015>.
- Kogan, A., Garti, N., 2006. Microemulsions as transdermal drug delivery vehicles. *Adv. Colloid Interface Sci.* 123–126, 369–385. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2006.05.014>.
- Thomas, B.J., Finnin, B.C., 2004. The transdermal revolution. *Drug Discov. Today* 9 (16), 697–703.
- Ramachandran, C., Fleisher, D., 2000. Transdermal delivery of drugs for the treatment of bone diseases. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 42 (3), 197–223.
- Fanun, M., 2012. Microemulsions as delivery systems. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* 17 (5), 306–313.
- Piao, H., Kamiya, N., Cui, F., Goto, M., 2011. Preparation of a solid-in-oil nanosuspension containing L-ascorbic acid as a novel long-term stable topical formulation. *Int. J. Pharm.* 420 (1), 156–160. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2011.08.025>.
- Piao, H., Kamiya, N., Hirata, A., Fujii, T., Goto, M., 2008. A novel solid-in-oil nanosuspension for transdermal delivery of diclofenac sodium. *Pharm. Res.* 25 (4), 896–901.
- Sultana, S., Talegaonkar, S., Mittal, G., Bhatnagar, A., Ahmad, F.J., 2010. Determination of alendronate sodium by Box-Behnken statistical design. *Chromatographia* 72 (3–4), 321–326.
- Taha, E.A., Youssef, N.F., 2003. Spectrophotometric determination of some drugs for osteoporosis. *Chem. Pharm. Bull.* 51 (12), 1444–1447.
- Kitaoka, M., Wakabayashi, R., Kamiya, N., Goto, M., 2016. Solid-in-oil nanodispersions for transdermal drug delivery systems. *Biotechnol. J.* 11 (11), 1375–1385.
- Acharya, D.P., Hartley, P.G., 2012. Progress in microemulsion characterization. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* 17 (5), 274–280. <https://doi.org/10.1016/j.cocis.2012.07.002>.
- Hielscher, T. 2007. Ultrasonic Production of Nano-Size Dispersions and Emulsions. (December): 14–6. <http://arxiv.org/abs/0708.1831>.
- Gielen, B., Jordens, J., Thomassen, L.C.J., Braeken, L., Van Gerven, T., 2017. Agglomeration control during ultrasonic crystallization of an active pharmaceutical ingredient. *Crystals* 7.
- Toerne, K., Rogers, R., Von Wandruszka, R., 2001. Thermal stability of nonionic surfactant aggregates. *Langmuir* 17 (20), 6119–6121.
- Verma, S., Kumar, S., Gokhale, R., Burgess, D.J., 2011. Physical stability of nanosuspensions: Investigation of the role of stabilizers on Ostwald ripening. *Int. J. Pharm.* 406 (1–2), 145–152. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2010.12.027>.
- Wang, Y., Zheng, Y., Zhang, L., Wang, Q., Zhang, D., 2013. Stability of nanosuspensions in drug delivery. *J. Control. Release* 172 (3), 1126–1141. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2013.08.006>.
- Li, L., Hui Zhou, C., 2019. Ping Xu Z. Self-Nanoemulsifying Drug-Delivery System and Solidified Self-Nanoemulsifying Drug-Delivery System. *Nanocarriers Drug Deliv.* 421–449.
- Menon, G.K., Cleary, G.W., Lane, M.E., 2012. The structure and function of the stratum corneum. *Int. J. Pharm.* 435 (1), 3–9. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2012.06.005>.
- Xie, F., Chai, J.K., Hu, Q., Yu, Y.H., Ma, L., Liu, L.Y., et al., 2016. Transdermal permeation of drugs with differing lipophilicity: Effect of penetration enhancer camphor. *Int. J. Pharm.* 507 (1–2), 90–101.
- Myoung, Y., Choi, H.K., 2002. Effects of vehicles and pressure sensitive adhesives on the penetration of isosorbide dinitrate across the hairless mouse skin. *Drug Deliv. J. Deliv. Target Ther. Agents* 9 (2), 121–126.
- Park, E.S., Chang, S.Y., Hahn, M., Chi, S.C., 2000. Enhancing effect of polyoxyethylene alkyl ethers on the skin permeation of ibuprofen. *Int. J. Pharm.* 209 (1–2), 109–119.
- Patzelt, A., Lademann, J., Richter, H., Darvin, M.E., Schanzer, S., Thiede, G., et al., 2011. In vivo investigations on the penetration of various oils and their influence on the skin barrier. *Ski. Res. Technol.* 18 (3), 364–369.
- Ale, I., Lachapelle, J.M., Maibach, H.I., 2009. Skin tolerability associated with transdermal drug delivery systems: An overview. *Adv. Ther.* 26 (10), 920–935.
- Lopes, L.B., 2014. Overcoming the cutaneous barrier with microemulsions. *Pharmaceutics* 6 (1), 52–77.
- Khazaka, C. 2015. TM 1 – Aim & Audience of this Manual TM 2 - General Information on the Measurement. 1–15.
- Şener, G., Şehirli, Ö., Cetinel, S., Midillioglu, Ş., Gedik, N., Ayanoglu-Dülger, G., 2005. Protective effect of taurine against alendronate-induced gastric damage in rats. *Fundam. Clin. Pharmacol.* 19 (1), 93–100.
- Kusamori, K., Katsumi, H., Abe, M., Ueda, A., Sakai, R., Hayashi, R., et al., 2010. Development of a novel transdermal patch of alendronate, a nitrogen-containing bisphosphonate, for the treatment of osteoporosis. *J. Bone Miner. Res.* 25 (12), 2582–2591.
- Katsumi, H., Liu, S., Tanaka, Y., Hitomi, K., Hayashi, R., Hirai, Y., et al., 2012. Development of a novel self-dissolving microneedle array of alendronate, a nitrogen-containing bisphosphonate: evaluation of transdermal absorption, safety, and pharmacological effects after application in rats. *J. Pharm. Sci.* 101 (9), 3230–3238.
- Karande, P., Jain, A., Ergun, K., Kispersky, V., Mitragotri, S., 2005. Design principles of chemical penetration enhancers for transdermal drug delivery. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 102 (13), 4688–4693.
- Olczyńska-Janus, S., Pietruszka, A., Kiełbowski, Z., Czarnecki, M.A., 2017. ATR-IR study of skin components: Lipids, proteins and water. Part I: Temperature effect. *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* 188, 37–49.
- Casiraghi, A., Selmin, F., Minghetti, P., Cilurzo, F., Montanari, L., 2017. Nonionic Surfactants: Polyethylene Glycol (PEG) Ethers and Fatty Acid Esters as Penetration Enhancers. In: Dragicevic, N., Maibach, H.I. (Eds.), *Percutaneous Penetration Enhancers Physical Methods in Penetration Enhancement*, pp. 253.
- El Khayat, N.W., Donia, A.A., Mady, O.Y., El Maghraby, G.M., 2018. Optimization of eugenol microemulsion for transdermal delivery of indomethacin. *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* 48 (October), 311–318. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2018.10.006>.
- Yoshiura, H., Tahara, Y., Hashida, M., Kamiya, N., Hirata, A., Fujii, T., et al., 2008. Design and in vivo evaluation of solid-in-oil suspension for oral delivery of human growth hormone. *Biochem. Eng. J.* 41 (2), 106–110.
- Djordjevic, L., Primorac, M., Stupar, M., 2005. In vitro release of diclofenac diethylamine from caprylocaproyl macroglycerides based microemulsions. *Int. J. Pharm.* 296 (1–2), 73–79.
- Leyland-Jones, B., 1993. Targeted drug delivery. *Semin. Oncol.* 20, 12–17.
- Zhang, Y., Huo, M., Zhou, J., Zou, A., Li, W., Yao, C., et al., 2010. DDSolver: An add-in program for modeling and comparison of drug dissolution profiles. *AAPS J.* 12 (3), 263–271.
- Rezaei, A., Nasirpour, A., Tavanai, H., Fathi, M., 2016. A study on the release kinetics and mechanisms of vanillin incorporated in almond gum/polyvinyl alcohol composite nanofibers in different aqueous food simulants and simulated saliva. *Flavour Fragr. J.* 31 (6), 442–447.
- Wind, M., Lenderink, H., 1996. A capacitance study of pseudo-fickian polymer coatings diffusion in glassy content eight. *Prog. Org. Coat.* 28, 239–250.
- Haq, A., Goodyear, B., Ameen, D., Joshi, V., Michniak-Kohn, B., 2018. Strat-M® synthetic membrane: Permeability comparison to human cadaver skin. *Int. J. Pharm.* 547 (1–2), 432–437. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2018.06.012>.
- Uchida, T., Kadhum, W.R., Kanai, S., Todo, H., Oshizaka, T., Sugibayashi, K., 2015. Prediction of skin permeation by chemical compounds using the artificial membrane Strat-M™. *Eur. J. Pharm. Sci.* 67, 113–118. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2014.11.002>.
- N'Da, D.D., 2014. Prodrug strategies for enhancing the percutaneous absorption of drugs. *Molecules* 19 (12), 20780–20807.
- Barry, B.W., 1987. Mode of action of penetration enhancers in human skin. *J. Control. Release* 6 (1), 85–97.
- Kim, M.J., Doh, H.J., Choi, M.K., Chung, S.J., Shim, C.K., Kim, D.D., et al., 2008. Skin permeation enhancement of diclofenac by fatty acids. *Drug. Deliv.* 15 (6), 373–379.
- Guo, P., Li, N., Fan, L., Lu, J., Liu, B., Zhang, B., et al., 2019. Study of penetration mechanism of labrasol on rabbit cornea by Ussing chamber, RT-PCR assay, Western blot and immunohistochemistry. *AJPS.* 14, 329–339. <https://doi.org/10.1016/j.ajps.2018.05.005>.
- McCartney, F., Jannin, V., Chevrier, S., Boulghobra, H., Hristov, D.R., Ritter, N., et al., 2019. Labrasol® is an efficacious intestinal permeation enhancer across rat intestine: Ex vivo and in vivo rat studies. *J. Control. Release* 310, 115–126. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2019.08.008>.