



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

**LIBERACIÓN TRANSDÉRMICA DE UN FÁRMACO
ANTIRRETROVIRAL EMPLEANDO PROMOTORES DE
PERMEACIÓN FÍSICOS**

TESIS

PARA OPTAR POR EL GRADO DE

DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA

M. en C.F. IRENE DE JESÚS MARTÍNEZ SEGOVIANO

**DRA. FLORA ADRIANA GANEM RONDERO
FES CUAUTITLÁN, UNAM**



Ciudad de México, junio 2022



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTOS

A CONACyT por la beca otorgada durante el desarrollo de dicho proyecto. No. de registro de becario: 270497, CVU: 446058. Al proyecto PAPIIT IN204022 (DGAPA-UNAM) y a la Cátedra de Investigación CI2209 (FESC-UNAM), por el apoyo financiero que permitió el desarrollo del proyecto.

A la Dra. Adriana Ganem por su paciencia, empatía y apoyo incondicional no sólo en la realización del proyecto, sino también en las circunstancias personales que viví durante este tiempo, sino hubiera sido por su apoyo este proyecto no hubiera sido posible.

A mis asesores el Dr. José Juan y el Dr. Sebastián Lira por sus aportaciones que me hicieron crecer como profesional y persona.

A mis padres por estar ahí siempre para mí, en especial a mi madre por haberme acompañado hasta la FES cuando no podía ir sola.

A Tere Pineda por tantas risas, por ser mi apoyo siempre y estar conmigo en las buenas y las malas; los días en el laboratorio no hubieran sido los mismos sin ti.

A mi hija, por ser mi razón para seguir adelante y por esperarme cuando tenía que ir a realizar algún experimento, llegaste en el momento exacto, te amo.

A mi esposo, por ayudarme con las pruebas, y estar ahí conmigo en todo momento, incluso en sus vacaciones.

A mi hermano Bruno, por acompañarme a la FES en vacaciones y por las ediciones de algunas fotos para el artículo.

A mi hermano Ivan y mi cuñada Itza por ayudarme con Meli cuando tenía que ir a la FES, los quiero.

A Rubén Bautista, por haberme apoyado durante este proyecto, compartiendo sus conocimientos.

Al coordinador del programa el Dr. Emilio por todo su apoyo y a Josefina Tenopala, por preocuparse siempre por mi bienestar.

A mis sinodales la Dra. Sofía, Burillo, la Dra. Elizabeth Piñón, la Dra. Luz Melgoza, la Dra. Josefa Bernad y el Dr. Sebastián Lira por sus aportaciones y comentarios de la tesis, que me hacen crecer como profesional.

A dios y a la vida, por dejarme conocer tantas personas maravillosas durante este tiempo.

A todos los que han creído en mí y forman parte de mi vida, ya que sin su apoyo, ánimos y risas no lo hubiera logrado.

RESUMEN

La zidovudina (AZT) ha sido el fármaco más utilizado para la terapia antirretroviral. Para mejorar la terapia con este fármaco, se han propuesto diferentes alternativas, como la administración transdérmica. No obstante, debido a sus propiedades fisicoquímicas y a la barrera de la permeación natural que impone la piel, se hace necesario el uso de promotores de la permeación para favorecer su paso a través de la misma. En este trabajo se evaluó el efecto de dos promotores de la permeación físicos, sonoforesis y microagujas, sobre la permeabilidad de AZT a través de la piel. Los estudios de permeación con una solución de AZT se realizaron en celdas verticales tipo Franz, utilizando piel de cerdo como modelo biológico. La sonoforesis se aplicó bajo diferentes condiciones (es decir, amplitud, ciclo de trabajo y tiempo de aplicación), seleccionados de acuerdo con un diseño de experimentos, donde las variables de respuesta fueron el incremento de temperatura de la superficie de la piel y el aumento de la pérdida de agua transepidérmica.

La técnica de FTIR-ATR permitió demostrar el efecto de los promotores sobre los componentes de la membrana. La permeabilidad de la AZT a través de piel intacta resultó ser muy pobre, con un tiempo de latencia muy largo. El pretratamiento de la piel con sonoforesis incrementó el transporte de AZT, reduciendo significativamente el tiempo de latencia. El flujo máximo ($27.52 \mu\text{gcm}^{-2}\text{h}^{-1}$) y la cantidad total máxima permeada (alrededor de $624 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) se obtuvieron al aplicar sonoforesis en modo continuo, con una amplitud de 20% y un tiempo de aplicación de 2 min. La sonoforesis parece tener un impacto sobre las proteínas del estrato córneo. El uso de microagujas incrementó aún más el flujo ($30.41 \mu\text{gcm}^{-2}\text{h}^{-1}$) y la cantidad total permeada (alrededor de $915.68 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) en comparación con la sonoforesis. En general, los resultados son alentadores en términos de promover el transporte de AZT a través de la piel usando sonoforesis o microagujas.

ÍNDICE

RESUMEN	4
1. ANTECEDENTES TEÓRICOS	8
1.1. La piel	8
Generalidades	8
Funciones de la piel	9
Capas de la piel	11
Absorción percutánea	15
1.2. Vía de administración transdérmica	16
Factores que influyen en la liberación de los fármacos a partir de un sistema terapéutico transdérmico	17
Rutas de permeación	19
1.3 Microagujas	25
1.4 Sonoforesis	29
1.5 Virus de Inmunodeficiencia Adquirida (VIH)	33
1.6 Zidovudina	38
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	40
3. HIPÓTESIS	42
4. OBJETIVOS	43
5. MATERIALES Y MÉTODOS	44
Materiales	44
Metodología general	45
Métodos específicos	46
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	53

6.1. Condiciones de la Cromatografía en Capa Fina de Alta Resolución para la cuantificación de zidovudina en los estudios de permeación.....	53
6.2. Validación del método analítico por HPTLC para cuantificar la zidovudina en el medio receptor	54
6.3. Validación del método analítico por espectrofotometría UV para la cuantificación de zidovudina en los estudios de estabilidad	56
6.4. Validación del método analítico para cuantificar la zidovudina remanente en piel	57
6.5. Estabilidad de una solución de zidovudina	60
6.6. Diseño de experimentos para determinar las condiciones óptimas de sonoforesis	61
6.7. Microscopía electrónica de barrido.....	63
6.8. Espectroscopia FTIR-ATR.....	66
6.9. Permeaciones <i>in vitro</i> de zidovudina a través de piel de cerdo	69
6.10. Estudios de permeación de zidovudina en piel pretratada con sonoforesis ..	71
6.11. Estudios de permeación de zidovudina en piel pretratada con microagujas .	78
7. CONCLUSIONES.....	80
8. CONGRESOS.....	81
9. ARTÍCULO	81
10. ANEXO 1: VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS.....	82
11. ANEXO 2: TABLAS DE RESULTADOS	85
11.1. Estudios de permeación.....	85
Cantidad de AZT en el medio receptor	85
Cantidad de zidovudina retenida en piel.....	89
11.2. Análisis estadístico.....	90
Zidovudina en el medio receptor	90
Zidovudina retenida en piel.....	92

Diseño de experimentos	94
12. REFERENCIAS	96

ARTÍCULO

1. ANTECEDENTES TEÓRICOS

1.1. La piel

Generalidades

A la piel también se le conoce como tegumento, mientras que el sistema tegumentario incluye piel y sus órganos accesorios (el pelo, las uñas y las glándulas cutáneas). Se atiende más a este sistema de órganos que a cualquier otro, pues es el más visible. [1]

La piel es el órgano más grande y pesado del cuerpo. En adultos, cubre un área de 1.5 a 2.0 m² y representa casi 15% del peso del cuerpo. Consta de dos capas: un epitelio escamoso estratificado al que se denomina *epidermis* y una capa de tejido conjuntivo más profundo, *la dermis* (Figura 1). Debajo de la dermis se encuentra otra capa de tejido conjuntivo, *la hipodermis*, que no es parte de la piel pero que se suele estudiar junto con ella. [2]

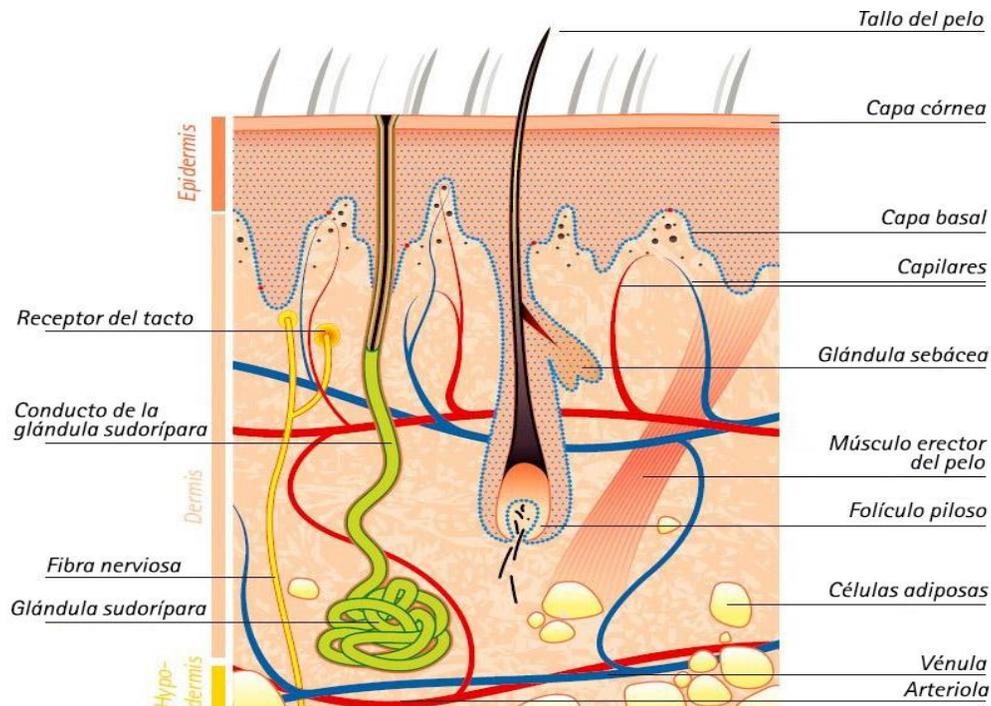


Figura 1. Partes de la piel. Recuperada de <https://www.bbraun.es/es/pacientes/cicatrizacion-de-heridas/que-saber-sobre-la-piel.html>

Casi toda la piel mide de 1 a 2 mm de grosor, pero va de 0.5 mm en los párpados a 6 mm entre las escápulas. La diferencia se debe sobre todo a la variación en el grosor de la dermis, aunque la piel se clasifica como gruesa o delgada con base en el espesor relativo de la epidermis. La piel gruesa cubre palmas, plantas y las superficies correspondientes de los dedos de manos y pies. En estos sitios, la epidermis por sí sola mide casi 0.5 mm de grueso, a causa de una capa superficial muy gruesa de células muertas: *el estrato córneo*. La piel gruesa tiene glándulas sudoríparas, pero carece de folículos pilosos o glándulas sebáceas. El resto del cuerpo está cubierto por piel delgada, que tiene una epidermis de casi 0.1 mm de grosor, y un estrato córneo delgado. Posee folículos pilosos, glándulas sebáceas y sudoríparas. [2]

Funciones de la piel

La piel es mucho más que un contenedor del cuerpo. Tiene varias funciones importantes que van más allá de su aspecto, como se menciona en seguida:

1. *Resistencia a traumatismos e infecciones*. La piel sufre la mayoría de las lesiones físicas del cuerpo, pero resiste y se recupera de los traumatismos mejor que otros órganos. Las células epidérmicas están empacadas con una proteína dura, la queratina, y unidas por desmosomas fuertes que son responsables de la durabilidad de su epitelio. Pocos microorganismos infecciosos pueden penetrar la piel intacta. Las bacterias y hongos colonizan la superficie, pero sus poblaciones se mantienen controladas por la sequedad relativa de la piel, su ligera acidez (pH de 4 a 6) y ciertos péptidos antimicrobianos defensivos: dermicidina y defensinas. La película ácida protectora es el manto ácido. [3]
2. *Síntesis de vitamina D*. En la piel ocurre el primer paso en la síntesis de vitamina D, sustancia necesaria para el desarrollo y mantenimiento de los huesos. El hígado y los riñones completan el proceso. [3]

3. *Sensación.* La piel es el órgano sensitivo más extenso. Contiene terminaciones nerviosas diversas que reaccionan al calor, frío, el tacto, la textura, la presión, la vibración y las lesiones hísticas. Estos receptores sensitivos abundan de manera especial en la cara, palmas, dedos, plantas, pezones y órganos genitales. Hay pocos en la espalda y en la piel que se encuentra sobre articulaciones como la rodilla y el codo. [3]
4. *Termorregulación.* Las terminaciones nerviosas cutáneas, denominadas termorreceptores, vigilan la temperatura superficial del cuerpo. Como respuesta a los escalofríos, el cuerpo retiene el calor al contraer los vasos sanguíneos de la dermis (vasoconstricción cutánea), conservando la sangre con mayor cantidad de calor, éste se libera al dilatar dichos vasos (vasodilatación cutánea), lo que permite que fluya más sangre cerca de la superficie y se pierda calor a través de la piel. Si esto no basta para normalizar la temperatura, las glándulas sudoríparas secretan sudor. La evaporación de este líquido puede tener un efecto enfriador poderoso. Por tanto, la piel desarrolla diversas funciones en el calentamiento y enfriamiento del cuerpo. [3]
5. *Otras funciones de barrera.* La piel es importante como barrera ante el agua, pues evita que el cuerpo la absorba en exceso cuando se está bañando o nadando; sin embargo, es más importante aún el hecho de que evita que el cuerpo pierda agua en exceso. La epidermis también es una barrera ante los rayos ultravioleta (UV), pues bloquea mucha de esta radiación que causa cáncer y evita que la misma alcance capas de tejido más profundas; también es una barrera ante muchas sustancias químicas que podrían ser dañinas.[3]

Capas de la piel

EPIDERMIS

La epidermis es un epitelio escamoso estratificado queratinizado. Como ya se había mencionado su superficie consta de células muertas empaquetadas con una proteína dura, la queratina. Al igual que otros epitelios, la epidermis carece de vasos sanguíneos y depende de la difusión de nutrientes a partir del tejido conjuntivo subyacente. [4]

La epidermis está integrada por cinco tipos de células [5]:

1. Los citoblastos son células indiferenciadas (se encuentran en el estrato basal) que se dividen y dan lugar a los queratinocitos.
2. La mayoría de las células epidérmicas son queratinocitos. Reciben este nombre por su función en la síntesis de queratina.
3. Los melanocitos (estrato basal), sintetizan la melanina, un pigmento que va de color marrón a negro.
4. Las células táctiles (de Merkel) presentes en cantidades bajas, son receptores para el tacto. Se encuentran en la capa basal de la epidermis y están relacionadas con la fibra nerviosa dérmica subyacente.
5. Las células dendríticas (de Langerhans) se encuentran en dos capas de la epidermis: el estrato espinoso y el estrato granuloso. Se trata de células inmunitarias que se originan en la médula ósea pero que migran a la epidermis y el epitelio de la cavidad oral, el estómago y la vagina. La epidermis tiene como 800 células dendríticas por mm^2 , que permanecen en guardia contra las toxinas, los microbios y los patógenos que penetran en la piel. Cuando detectan a estos invasores, dichas células alertan al sistema inmunitario para que el cuerpo pueda defenderse.

Capas de la epidermis

Las células de la epidermis están dispuestas en cuatro a cinco zonas o estratos (cinco en la piel gruesa) como se muestra en la Figura 2. [5]

1. Capa basal (o estrato basal): Es la capa más interna, donde se producen los queratinocitos.
2. Capa espinosa (o estrato espinoso): Los queratinocitos producen queratina (fibras de proteína y llegan a adoptar forma de huso.
3. Capa granular (estrato granuloso): Comienza la queratinización; las células producen gránulos duros y, a medida que éstos migran hacia arriba, secretan queratina y lípidos epidérmicos.
4. Capa clara (o estrato lúcido): Las células están densamente comprimidas, aplanadas y no pueden distinguirse unas de otras.
5. Capa córnea (o estrato córneo): Es la capa más externa de la epidermis y comprende en promedio, unas 20 subcapas de células muertas, aplanadas, en función de la parte del cuerpo que recubre la piel. Estas células se desprenden regularmente en un proceso conocido como descamación. La capa córnea es también asiento de los poros de las glándulas sudoríparas y las aberturas de las glándulas sebáceas.

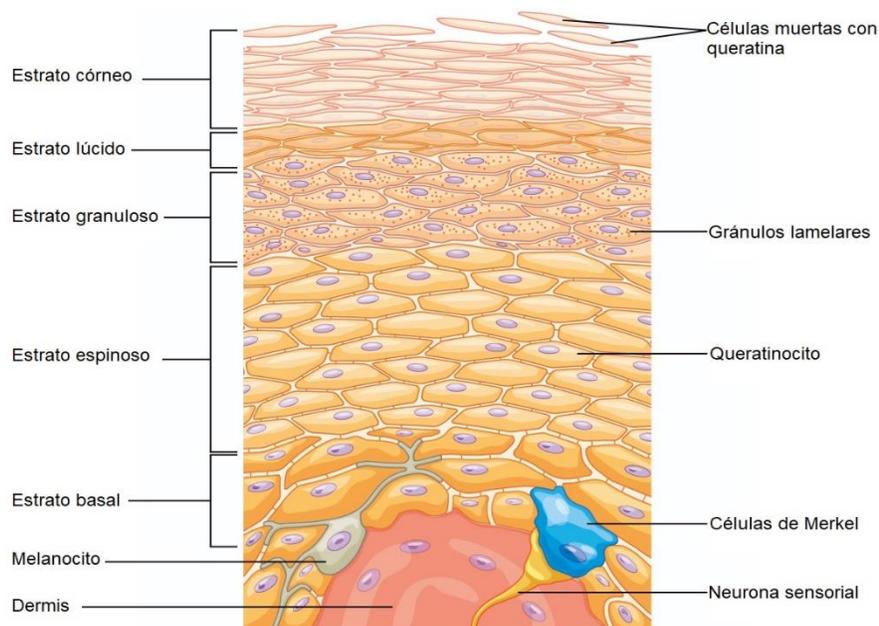


Figura 2. Capas de la epidermis. Recuperada de <https://myuni.adelaide.edu.au/courses/11275/pages/5-dot-1-layers-of-the-skin>

DERMIS

Es una capa de tejido conjuntivo que se encuentra debajo de la epidermis. El grosor de la dermis va de 0.2 mm en los párpados a casi 4 mm en las palmas y las plantas. Está compuesta sobre todo por colágeno, pero también contiene fibras elásticas y reticulares, fibroblastos y otras células típicas de tejido conjuntivo fibroso. Tiene un suministro amplio de vasos sanguíneos, glándulas cutáneas y terminaciones nerviosas (Figura 3). Los folículos pilosos y las raíces de las uñas están incrustadas en esta capa. En el rostro, los músculos estriados se unen a las fibras de colágeno dérmicas y producen expresiones como sonreír, arrugar la frente o levantar una ceja. [5]

La dermis está compuesta de dos subcapas:

1. Capa inferior (o estrato reticular): Es una capa mucho más gruesa, compuesta de tejido conectivo denso e irregular. Parece reticulada (en forma de red) debido a una malla apretada de fibras de elastina, las cuales le aportan cierta elasticidad, lo que permite el movimiento. Las fibras de colágeno le proporcionan estructura y resistencia a la tracción.
2. Capa superior (o estrato papilar): Está conformada de tejido conectivo areolar suelto, lo que significa que las fibras de colágeno y elastina forman una malla suelta. Dentro de la capa papilar hay fibroblastos, una pequeña cantidad de adipocitos y una gran cantidad de vasos sanguíneos pequeños. Además, contiene fagocitos, que ayudan a combatir las bacterias u otras infecciones que hayan penetrado en la piel.

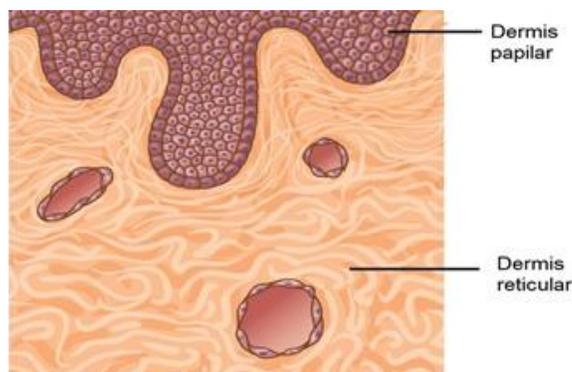


Figura 3. Capas de la dermis. Recuperada de <https://thangguide.org/es/cancer-types/skin/anatomy/>

HIPODERMIS

Debajo de la piel se encuentra una capa llamada hipodermis o tejido subcutáneo. El límite entre la dermis y la hipodermis es indistinguible, pero la hipodermis suele tener más tejido areolar y adiposo. La hipodermis rellena el cuerpo y une la piel con los tejidos subyacentes. Los fármacos se introducen en esta capa mediante inyección, porque el tejido subcutáneo es muy vascular y los absorbe con rapidez. [5]

La grasa subcutánea es hipodermis compuesta de manera predominante por tejido adiposo (Figura 4). Sirve como depósito de energía y aislamiento térmico. No está distribuida con uniformidad; por ejemplo, se encuentra casi ausente en el cuero cabelludo, pero es abundante en las mamas, abdomen, cadera y muslos. El grosor de la grasa subcutánea es, en promedio 8% mayor en mujeres que en hombres, y varía con la edad. [5]



Figura 4. Hipodermis y tejido graso.

Recuperada de
<https://sp.depositphotos.com/stock-photos/la-hipodermis.html?qview=216115438>

Absorción percutánea

La penetración de un principio activo hasta la circulación sistémica o los tejidos circundantes involucra múltiples procesos: disolución y liberación dentro y desde la formulación, partición dentro del estrato córneo, difusión a través del estrato córneo, partición desde el estrato córneo hacia la fase acuosa de la epidermis, difusión a través de la dermis y acceso a la circulación sistémica y/o tejidos circundantes. [6]

El estrato córneo funciona como una barrera altamente lipofílica, la cual evita la pérdida excesiva de agua y previene la penetración de moléculas. Los corneocitos conforman una barrera que dificulta el pasaje de moléculas, independientemente de su tipo. Así mismo, los lípidos hidrofóbicos intercelulares lo hacen impermeable a las sustancias hidrofílicas. [6]

1.2. Vía de administración transdérmica

Los sistemas de liberación transdérmica (SLT) o Sistemas Terapéuticos Transdérmicos (STT), se definen como formas de dosificación autónomas, discretas, de liberación controlada [7] que tienen como premisa básica la penetración del fármaco a través del estrato córneo y la absorción en circulación sistémica.[8] Son una de las formas farmacéuticas más recientes (1980) y se utilizan sobre todo para fármacos de vida media corta que, de otro modo, precisarían de una administración oral muy frecuente, o para aquellos cuya absorción puede ser mejorada. [9]

Ventajas

En comparación con los métodos tradicionales tales como la inyección y la vía oral, la vía transdérmica posee ventajas como: [6, 9-12]

- Gran área superficial.
- La piel es el órgano de más fácil acceso del cuerpo humano.
- No invasiva o mínimamente invasiva (e.g., uso de microagujas).
- Efectos terapéuticos estables y sostenibles.
- Evita degradación en tracto gastrointestinal por acción química o enzimática.
- Evita la descomposición debida al primer paso hepático (formación de metabolitos inactivos o bien que puedan causar efectos secundarios).
- Eliminación de restricciones dietarias asociadas a la vía oral.
- Carencia de efecto irritante local sobre el tubo digestivo.

- Es posible conseguir concentraciones séricas constantes, importante sobre todo para fármacos con vida media corta y estrecho margen terapéutico.

Limitaciones

Algunas de las limitaciones que presenta la vía transdérmica se enuncian a continuación: [11,12]

- Algunos pacientes desarrollan eritema, comezón y edema local en el sitio de aplicación debido a uno o más componentes del sistema.
- La función de barrera de la piel cambia en un sitio y otro en la misma persona, de persona a persona y con la edad.
- La administración transdérmica será muy difícil, si la dosis terapéutica del fármaco es mayor a 10 mg/día.
- Baja permeabilidad para moléculas de alto peso molecular (> 500 Da) e hidrofílicas (péptidos y proteínas).

Factores que influyen en la liberación de los fármacos a partir de un sistema terapéutico transdérmico

PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DEL FÁRMACO

Se ha planteado que el éxito de todo STT depende de la capacidad del fármaco para difundir a través de la piel en cantidades suficientes para lograr el efecto terapéutico deseado. Algunas de las características que debe tener el fármaco para formularse en un STT son: [6, 12]

- Bajo peso molecular (< 500 Daltons).

- Elevada potencia farmacológica (dosis <50 mg/día).
- Ausencia de propiedades irritantes para la piel.
- Estable a temperatura ambiente.
- Solubilidad en lípidos y agua (> 1 mg/mL).
- Coeficiente de partición (log P) entre 1-3; ya que si el fármaco es hidrofílico la cantidad que pase a través del estrato córneo será baja y en el caso de un fármaco muy lipofílico tenderá a retenerse en las membranas, sobre todo en el estrato córneo, formando un depósito.
- Grado de ionización, este influye en la solubilidad del fármaco en las membranas, si una molécula se encuentra no ionizada podrá atravesar más fácilmente el estrato córneo que una molécula ionizada porque ésta podría interactuar con los iones presentes en la piel, tendrá en general un carácter más hidrofílico y por lo tanto no podrá atravesar el estrato córneo.

PROPIEDADES DEL VEHÍCULO

El término vehículo se deriva básicamente de la distinción entre ingredientes activos e inactivos, el o los ingredientes activos se añaden a una matriz, que es justamente el vehículo, que ayuda a llevar el activo a la zona de la piel u órgano deseado. [13] La velocidad de penetración de los fármacos a través de la piel dependerá de las interacciones entre el vehículo, la piel y el fármaco, y puede ser modificada por varios factores: [9]

- Oclusividad. Los vehículos lipofílicos son más hidratantes por su poder oclusivo y favorecen la absorción, mientras que los vehículos hidrofílicos no favorecen la penetración y en ocasiones son deshidratantes.

- Capacidad de penetración del vehículo. Los vehículos que no contienen emulsificantes u otros aditivos que favorecen la penetración son los menos penetrantes y están indicados para tratamientos superficiales. Para tratamientos que requieren penetración interesan excipientes penetrantes o bien potenciarla incorporándoles promotores de la absorción.
- Tensoactivos. Son sustancias que solubilizan el fármaco facilitando su acceso a la superficie cutánea y, por tanto, indirectamente mejoran su capacidad de penetración. Los tensoactivos pueden actuar directamente sobre la membrana, actuando como promotores de la absorción.
- Disolventes. Son compuestos capaces de modificar la naturaleza del estrato córneo aumentando temporalmente la permeabilidad de la piel.

Rutas de permeación

Existe una serie de "compartimientos" y estructuras biológicas en la piel que hacen posible la penetración percutánea. La principal barrera a superar es el estrato córneo. [14, 15] Aunque el estrato córneo consta de sólo 10 a 15 capas de queratinocitos de espesor, constituye una barrera efectiva tanto para el ingreso, como para el egreso de moléculas. Tiene la apariencia de "ladrillos y cemento" con una estructura conformada por corneocitos, los cuales son queratinocitos que al madurar y alcanzar este estrato han perdido organelos y están compuestos básicamente de queratina (ladrillos), inmersos en una matriz intercelular (cemento), que se compone principalmente de ceramidas de cadena larga, ácidos grasos libres, triglicéridos, colesterol y ésteres de cera. Los corneocitos son poligonales, alargados y planos, tienen un espesor de 0.2 a 1.5 μm y un diámetro de 34 a 46 μm . El contenido lipídico intercelular se genera en la parte media a superior del estrato granuloso, donde aparecen los gránulos lamelares, los cuales migran hacia la superficie de las células, se funden con la membrana celular, y liberan su carga lipídica dentro del espacio intercelular. Dentro del estrato córneo, este material

extruido se asocia en forma de bicapas lipídicas altamente ordenadas, lo que contribuye a la efectividad de la barrera de la piel. La presencia de agua es esencial para mantener la integridad de la barrera del estrato córneo y es considerada como un factor de hidratación natural, que actúa como un plastificante para evitar el agrietamiento. [16]

La piel presenta por tanto una barrera no sólo desde un punto de vista "físico", sino también químico: el camino de absorción desde un estrato córneo lipofílico a una hidrofilia progresiva empezando desde la epidermis y pasando a la dermis y finalmente el torrente sanguíneo. [14, 15]

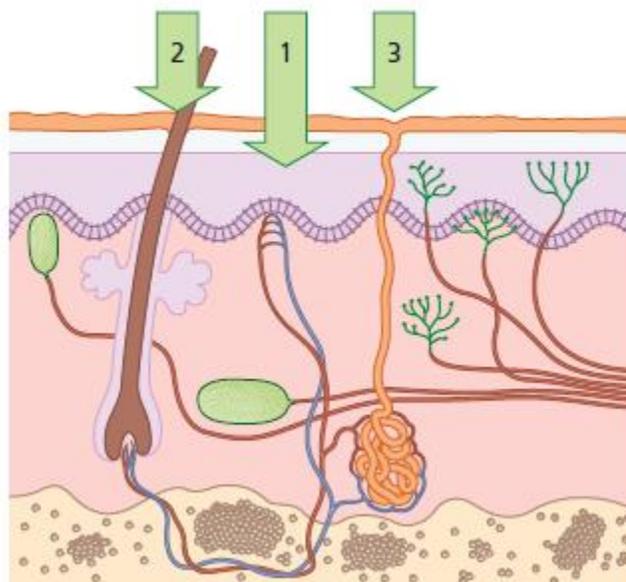
Hay tres vías básicas mediante las cuales los activos penetran a través del estrato córneo (Figura 5): [14,15]

(1) Penetración transepidérmica, modulada por la secreción de los apéndices cutáneos. Esta ruta se puede subdividir a su vez en intracelular e intercelular.

(2) Algunas sustancias hidrofílicas pueden penetrar a través de las glándulas sudoríparas.

(3) Finalmente es posible para algunos compuestos penetrar a través de las glándulas sebáceas.

Figura 5. Rutas principales de permeación a través de la piel. 1) Transepidérmica, 2) Transfolicular, 3) Transglandular. Recuperada de <http://pigmentationandtexture.blogspot.com/2013/09/skin-101-penetracion-percutanea-y.html>



Como el área ocupada por los anexos de la piel corresponde a una fracción aproximada al 0.1% de la superficie total de la piel, esta ruta hace una contribución insignificante al flujo del fármaco hacia y a través de la piel. Sin embargo, el acceso a través de los anexos de la piel puede contribuir al ingreso del fármaco en el lapso que transcurre entre la aplicación del medicamento y el establecimiento de un flujo en estado estacionario. Además, puede ser una ruta importante para iones, grandes moléculas polares, polímeros y partículas coloidales. [16] Por lo que la vía principal de permeación es la 1 (Figura 5): la ruta transepidérmica, es decir, el activo penetra directamente a través de la capa córnea (intacta). [14, 15]

La vía transepidérmica consta de dos vías, la *vía intercelular* y la *vía intracelular*, las cuales se muestran en la Figura 6. La vía más directa, la intracelular, es la vía de penetración primaria para la mayoría de las moléculas pequeñas sin carga. [16] Aunque esta ruta es la más corta para los fármacos hay una resistencia significativa a la permeación porque tendrán que atravesar tanto estructuras lipídicas como hidrofílicas, por lo cual la vía más común para la permeación de fármacos es la intercelular, a través de los intersticios celulares (entre los corneocitos). Para las moléculas polares, la vía dominante residirá en la fase acuosa de los espacios intercelulares y para moléculas no polares, en las regiones hidrofóbicas de las cadenas lipídicas intercelulares. [9, 17] De hecho, el uso de disolventes para eliminar los lípidos del estrato córneo aumenta el flujo de los fármacos, incluso para moléculas hidrofílicas de alto peso molecular. [16]

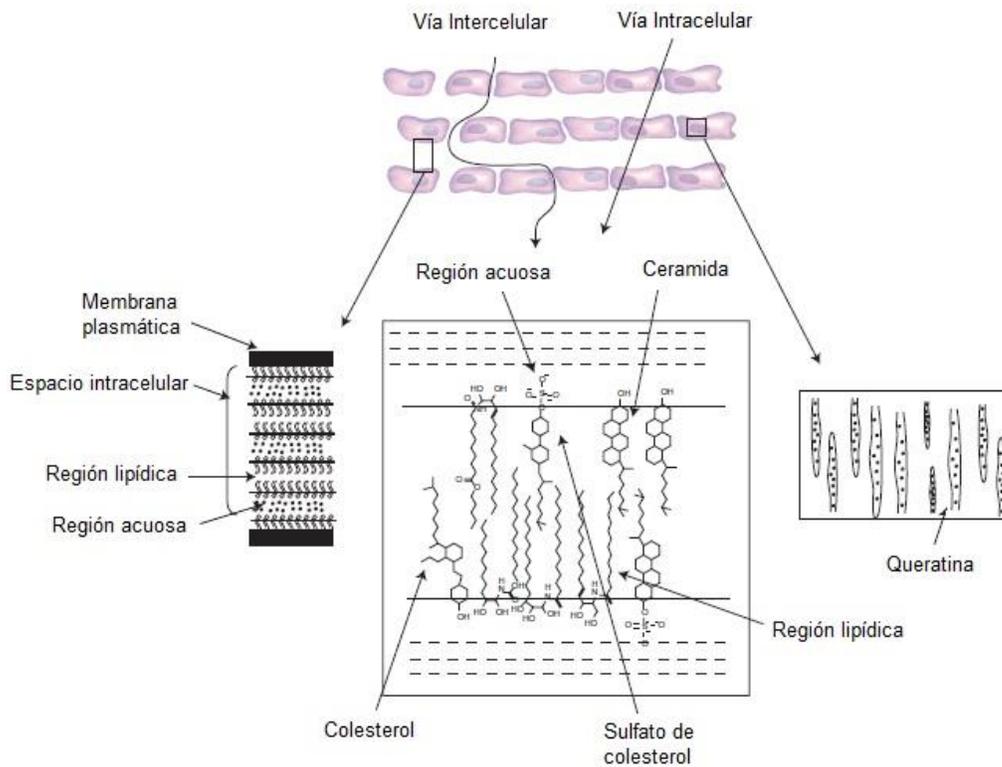


Figura 6. Rutas de la vía transepidérmica: Vía intercelular y vía intracelular.
 Recuperada de Ref [16]

El esfuerzo de los investigadores se ha centrado en el desarrollo de estrategias para mejorar la penetración hacia y a través de la piel con el fin de expandir la administración transdérmica a una gama más amplia de fármacos. Estas estrategias incluyen la optimización de fármacos y vehículos, y la modificación del estrato córneo utilizando productos químicos o métodos físicos. [16]

Promotores de permeación/penetración

Cuando una sustancia se aplica sobre la piel con un simple vehículo, la terapia puede resultar insatisfactoria porque la concentración obtenida en la aplicación es insuficiente. [18] Sin embargo, el superar las limitaciones inherentes impuestas por el estrato córneo para lograr una concentración terapéutica sistémica de los

fármacos ha llevado a perturbar la barrera de la piel y mejorar la liberación transdérmica. Los principales enfoques para mejorar la liberación transdérmica son los potenciadores físicos (ultrasonido, iontoforesis, magnetoforesis, microagujas), nanoacarreadores (liposomas, niosomas, transfersomas, microemulsiones, nanopartículas) y potenciadores químicos (sulfóxidos, azonas, glicoles, alcanos, terpenos, etc.). [11, 19]

Los potenciadores o promotores de la penetración son compuestos o técnicas que actúan fundamentalmente sobre los lípidos del estrato córneo modificando su fluidez. La interacción con el estrato córneo puede ocurrir al intercalarse con los lípidos del estrato córneo alterando así su organización, o bien extrayendo una parte de los lípidos del estrato córneo, modificando de este modo el contenido total de lípidos en el estrato córneo y su composición en la piel. [20]

Algunas de las propiedades ideales de los potenciadores de penetración/absorción son: que sean seguros, que no sean tóxicos, que sean farmacológicamente inertes, que no sean irritantes, que no sean alergénicos y que tengan un efecto reversible, para permitir la recuperación de la función de barrera. [6]

PROMOTORES QUÍMICOS

Con el fin de aumentar la penetración del fármaco, el vehículo puede estar integrado con potenciadores que al interactuar con lípidos intercelulares mejoren el coeficiente de difusión del fármaco en el estrato córneo. Los potenciadores químicos pueden: a) aumentar la capacidad de difusión del fármaco dentro de la barrera, alterándola al interactuar con los componentes membranales, fundamentalmente los lípidos, b) extraer lípidos de membrana, o c) mejorar el coeficiente de reparto hacia el estrato córneo. [20]

Los excipientes como propilenglicol y dimetilsulfóxido (DMSO) pueden incrementar la difusión alterando la organización de los lípidos de la capa córnea. La

interferencia con la biosíntesis de ciertos lípidos puede alterar la estructura de la barrera e incrementar la penetración. [20] Los alcoholes de cadena corta como etanol e isopropanol son los más usados; el etanol puede ser utilizado como codisolvente y como promotor de la penetración; la habilidad del etanol o mezclas de etanol-agua para modificar la función de barrera de la piel que ha sido reportada incluye la fluidización y extracción de lípidos. [21]

Los tensoactivos, en particular, tienden a interactuar con la queratina de los corneocitos, abriendo la estructura densa de la queratina haciéndola más permeable. [22] Estudios de calorimetría indican que los tensoactivos alteran la estructura de los lípidos incrementando así la permeabilidad de la membrana, [21] además causan la depleción de lípidos en el estrato córneo por su solubilización en micelas (extracción de lípidos), debilitando así la propiedad de barrera y, afectando el transporte de materiales hidrofílicos, causando el paso de agua a través de la piel. [20]

PROMOTORES FÍSICOS

Los promotores físicos que se describen a continuación se encuentran entre los más estudiados [11]:

- *Iontoforesis*: Aplicación de corriente constante de bajo voltaje. Promueve el transporte de moléculas con carga (por un mecanismo de repulsión) y neutras (mediante flujo electroosmótico).
- *Electroporación*: Aplicación de pulsos de voltaje elevado de corta duración.
- *Microagujas*: Arreglos de agujas de talla micrométrica (100-1000 μm). Traspasan el estrato córneo sin dolor, creando microporos. El fármaco puede estar incluido en la microaguja, fungiendo ésta como una matriz de liberación.
- *Sonoforesis*: Ondas ultrasónicas de baja frecuencia, facilitan el paso de sustancias por cavitación.

- *Sistemas inyectores libres de aguja.* Dispositivos capaces de traspasar el estrato córneo al impactar partículas o gotas de líquido a gran velocidad (100-200 m/s), esto por la acción de un gas a alta presión (200-900 psi).

1.3 Microagujas

Generalidades

Cuando la administración oral de medicamentos no es factible debido a la mala absorción del fármaco o la degradación enzimática en el tracto gastrointestinal o hígado, la alternativa más común es el uso de una dolorosa aguja hipodérmica; por lo que un enfoque que es más atractivo para los pacientes es la administración del fármaco a través de la piel usando un parche. Sin embargo, la administración transdérmica está limitada por la incapacidad de la mayoría de los fármacos para penetrar la piel debido al estrato córneo. Para aumentar la permeabilidad de la piel, se han estudiado diferentes estrategias que van desde la inclusión de sustancias que actúen como promotores químicos, hasta técnicas físicas como iontoforesis, electroporación y ultrasonido. Aunque los mecanismos son diferentes, estos métodos comparten como objetivo común el alterar la estructura del estrato córneo para crear “huecos o poros” lo suficientemente grandes como para que las moléculas penetren. Se cree que el tamaño de los huecos o espacios generados mediante estos métodos es de dimensiones nanométricas, pero lo suficientemente grandes como para permitir el transporte de pequeños fármacos. Un enfoque alternativo implica la formación de huecos de dimensiones micrométricas utilizando agujas microscópicas. [23]

El concepto de usar microagujas se remonta a 1976, cuando Alza Corporation patentó la idea. Por ejemplo, Ganem y Cols. afirman que la aplicación de las microagujas en la liberación transdérmica fue propuesta por Henry y Cols., [24], cuando demostraron que el uso de las microagujas de silicón facilitó existosamente la liberación de un fármaco modelo, calceína, a través de la piel humana. [25]

Concepto

Las microagujas (MN, por sus siglas en inglés) constituyen un método mecánico para favorecer la liberación de fármacos, el cual es similar a las agujas tradicionales, pero la diferencia es que las MN se fabrican en escala micrométrica y el tamaño oscila entre 100 y 1000 micras de longitud y 1 micra de diámetro. [26] Las MN generalmente se fabrican en forma de arreglos que pueden contener un número variable de MN por cm^2 en varias geometrías y materiales (silicón, metal, polímero, materiales solubles o biodegradables). [27]

Cuando se aplican en la superficie de la piel, las MN atraviesan el estrato córneo. [28] Las MN son lo suficientemente largas como para penetrar la epidermis, pero lo suficientemente cortas para evitar la estimulación de nervios dérmicos o punción de vasos sanguíneos. [27] Los huecos creados en la piel al insertarse las MN se pueden aprovechar para administrar fármacos desde la superficie de la piel, alcanzando la microcirculación dérmica (Figura 7). Por lo tanto, las MN se consideran dispositivos mínimamente invasivos (sin dolor). [28]

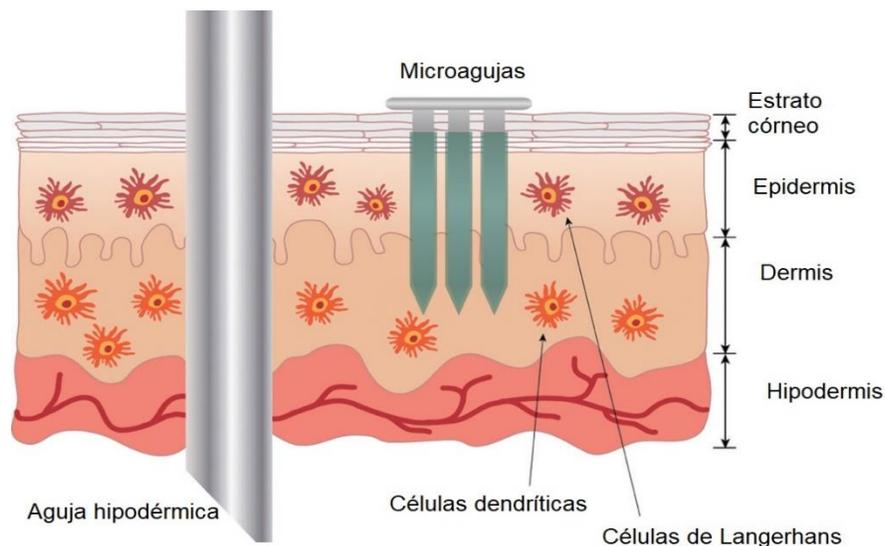


Figura 7. Representación gráfica de la penetración de las microagujas vs aguja hipodérmica.
Recuperada de Ref. [27]

Tipos de Microagujas

Existen diferentes tipos de microagujas, las cuales se mencionan a continuación (Figura 8):

- A. *Microagujas sólidas*. Se han fabricado a partir de silicón, metales y polímeros (policarbonato). Se han utilizado metales tales como acero inoxidable y titanio para la fabricación de MN sólidas. Incrementan la permeabilidad del activo formando huecos de tamaño micrométrico a través de la piel. [25]
- B. *Microagujas recubiertas*. Las MN recubiertas se pueden fabricar de silicón o metal y el fármaco y/o medicamento en cuestión se carga en cada aguja del conjunto de MN en estado sólido (seco) como una capa de revestimiento. Después de la inserción de las MN recubiertas en la piel, el fármaco se libera rápidamente en el tejido. Las MN recubiertas ofrecen la ventaja de permitir una aplicación de un solo paso en comparación con las MN sin recubrimiento que requieren de dos pasos. [25]
- C. *Microagujas solubles o biodegradables*. Se fabrican principalmente de polímeros debido a su biocompatibilidad, biodegradación y a sus perfiles de seguridad. Algunos ejemplos de polímeros utilizados en la fabricación de este tipo de MN son el ácido poliláctico (PLA), ácido poliláctico-co-glicólico (PLGA), ácido poliglicólico (PGA), polivinilpirrolidona (PVP), ácido hialurónico y quitosano. También se han utilizado otros materiales solubles, entre ellos carbohidratos como maltosa. En estos casos, la liberación ocurre por la degradación o disolución de la matriz de las MN en la cual se encuentra incorporado el fármaco. [25]
- D. *Microagujas huecas*. Se han fabricado en una amplia gama de longitudes y geometrías, principalmente de silicón y metal. Las MN huecas permiten la entrega continua de fármacos a través del canal de las MN ya sea por difusión, presión o aplicando corriente eléctrica. Este tipo de MN permite la administración de grandes cantidades de fármaco en comparación con las MN recubiertas. [25]

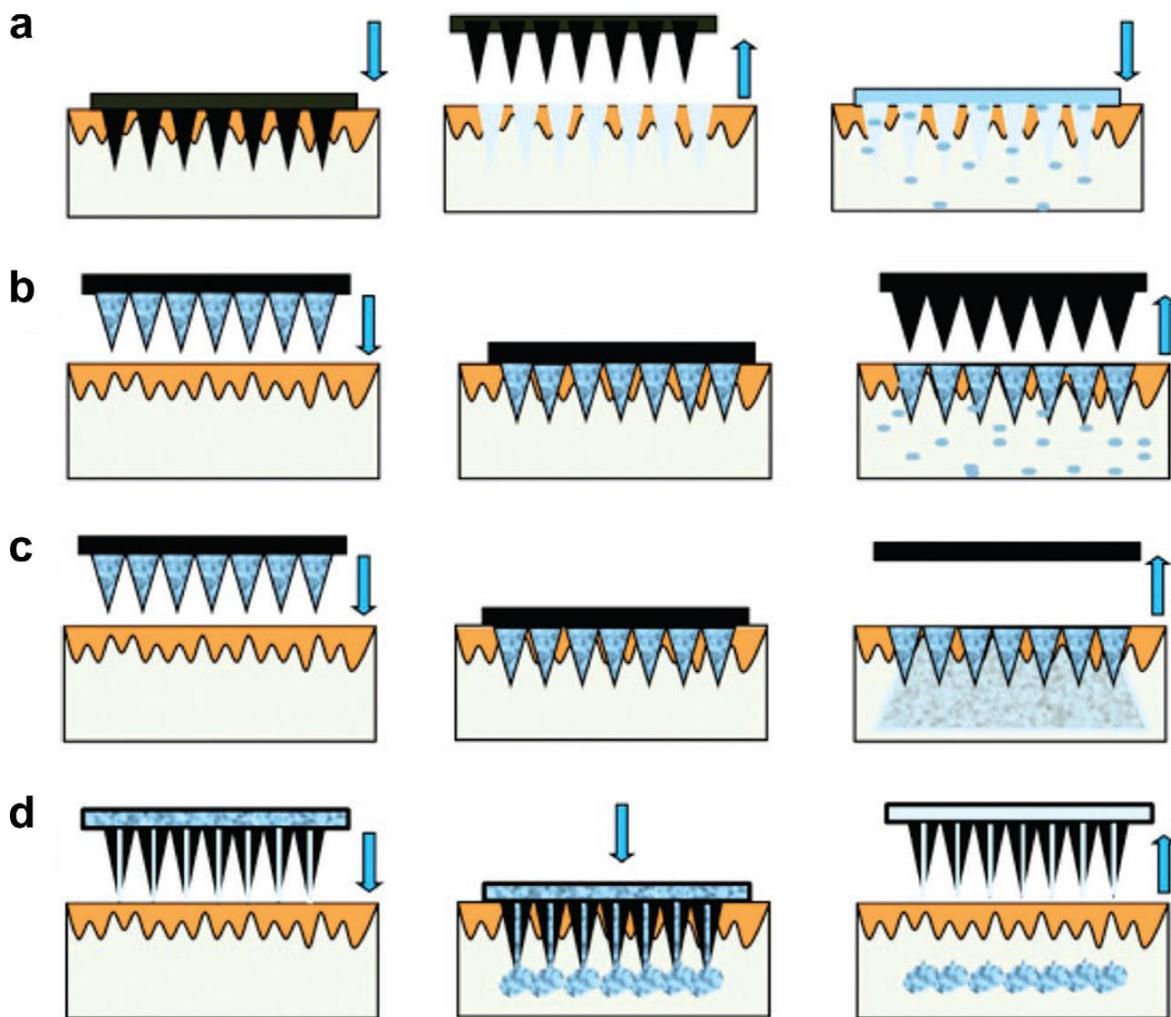


Figura 8. Representación de los cuatro tipos de microagujas (MN). (a) MN sólidas, (b) MN recubiertas, (c) MN biodegradables o solubles, (d) MN huecas. Recuperada de Ref. [25]

1.4 Sonoforesis

Generalidades

Sonoforesis (SN) o fonoforesis, se define como la administración facilitada de medicamentos a través de la piel por medio de ultrasonido. Esta técnica se ha convertido en uno de los promotores físicos más prometedores (Figura 9). En esta técnica, un cristal piezoeléctrico es responsable de convertir la energía eléctrica en ondas acústicas. [29] La aplicación de ultrasonido ha demostrado mejorar el transporte transdérmico de varios fármacos incluyendo macromoléculas. El ultrasonido se utiliza en un rango de frecuencias que van desde 20 kHz-16 MHz; sin embargo, se ha observado un transporte más efectivo a través de la piel empleando ultrasonido de baja frecuencia ($f < 100$ kHz). [30]

Entre los mecanismos propuestos por los cuales actúa la SN se encuentra la cavitación, la cual se considera como la principal responsable. La cavitación involucra la rápida formación y el colapso de cavidades gaseosas, las cuales impactan la superficie de la piel, alterando la estructura del estrato córneo. No obstante, se ha sugerido que este no es el único mecanismo, y que el efecto térmico debido al ultrasonido, también puede contribuir a incrementar la permeabilidad al aumentar la temperatura de la piel. Además, se ha sugerido que la mejoría en la permeabilidad de la piel depende de los parámetros utilizados, tales como frecuencia, intensidad, ciclo de trabajo, diámetro de radiación del transductor y el tiempo de aplicación del ultrasonido.[31]

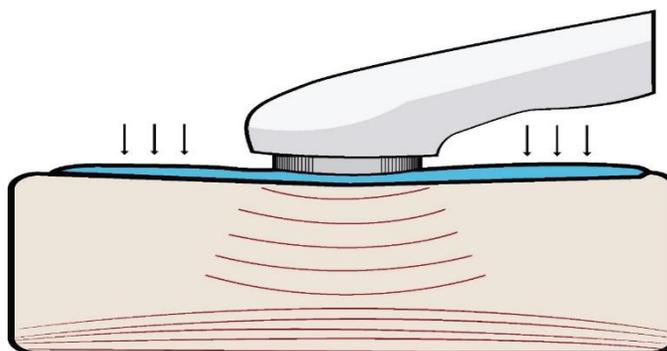


Figura 9. Ilustración esquemática del tratamiento con sonoforesis.

Mecanismos de acción

EFECTO TÉRMICO

Cuando el ultrasonido pasa a través de un medio, la energía se absorbe parcialmente. En el cuerpo humano, la energía del ultrasonido absorbida causa un aumento local de temperatura dependiendo de la frecuencia, intensidad, área del haz de ultrasonido, la duración y ciclo de trabajo. [32] Los efectos térmicos con respecto a la sonoforesis se han estudiado con detalle, porque la atenuación de una onda de ultrasonido conduce al calentamiento del medio que atraviesa la onda. Un aumento en la temperatura puede incrementar la permeabilidad de la piel al: a) aumentar la energía cinética y difusividad de los fármacos, b) generar puntos de dilatación en la entrada de la piel (por ejemplo, folículos pilosos y glándulas sudoríparas), c) facilitar la absorción de los fármacos, y d) mejorar la circulación de la sangre en el área de tratamiento (en experimentos *In vitro*) e) desnaturalización de proteínas y queratina, así como la desorganización de lípidos, tal como se muestra en la Figura 10. [33]

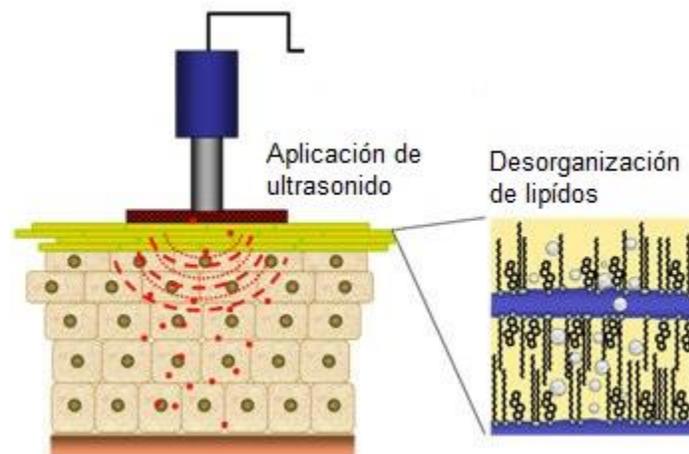


Figura 10. Efecto térmico de la sonoforesis sobre la piel.

Recuperada de <https://www.researchgate.net/figure/Schematic-Expression-of-Drug-Administration-Facilitated-By-Sonophoresis->

EFFECTOS DE CAVITACIÓN

La cavitación acústica se produce debido a la nucleación de cavidades de aire durante los cambios de presión en el medio. La probabilidad de la cavitación está estrechamente relacionada con la frecuencia del ultrasonido, así como con el tamaño y forma de la burbuja. [32] La cavitación se divide en dos categorías: inercial y estable. En la cavitación inercial, la burbuja crece rápidamente y luego colapsa cuando alcanza un cierto diámetro (dependiendo de la frecuencia del ultrasonido) tal como se observa en la Figura 11. Por otro lado, la cavitación estable se refiere a burbujas oscilantes estables en el campo de ultrasonido. [34]

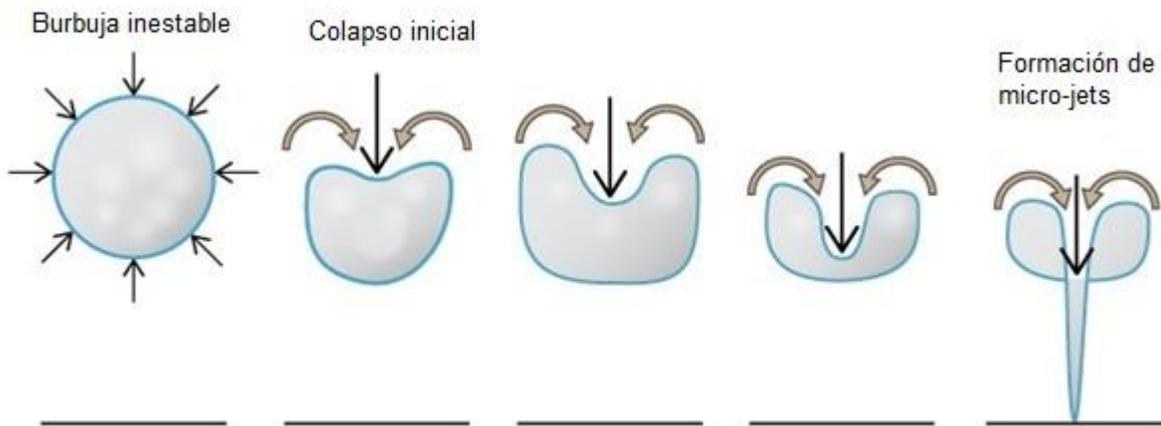


Figura 11. Tres modos posibles a través de los cuales la cavitación inercial puede mejorar la permeabilidad del estrato córneo (SC). (a) El colapso esférico cerca de la superficie del SC emite ondas de choque, (b) La burbuja de aire colapsa rápidamente, (c) micro-jets penetrando el SC. Recuperada de <http://algix.com/algae-cell-disruption-with-ultrasound-technology/>.

EFFECTO DE CONVECCIÓN

La aplicación simultánea de una formulación y ultrasonido mejora el transporte de un fármaco de 2 formas: (i) por cambios en la estructura de los lípidos de la piel y (ii) a través de mecanismos relacionados con la convección. [35] El papel de la convección en la permeación de los fármacos está relacionada con las velocidades de los fluidos que se generan en un medio en contacto con el ultrasonido formando así oscilaciones de las burbujas de cavitación, estas velocidades generadas pueden afectar el transporte transdérmico al inducir la convección del fármaco a través de la piel, especialmente a través de folículos pilosos y conductos sudoríparos. Los hallazgos experimentales sugieren que la convección no juega un papel importante en la mejora transdérmica observada. [36]

1.5 Virus de Inmunodeficiencia Adquirida (VIH)

El VIH ataca y destruye los linfocitos CD4 del sistema inmunitario. Los linfocitos CD4 son un tipo de glóbulos blancos que desempeñan una función importante en la protección del cuerpo contra la infección. El VIH emplea el mecanismo de las células CD4 para replicarse y propagarse por todo el cuerpo. Este proceso, que se realiza en siete pasos o etapas, se llama el ciclo de vida del VIH. [37]

Ciclo de vida del VIH

Para entender el ciclo de vida del VIH, conviene primero saber la apariencia que tiene el virus (Figura 12) en el cual: [37]

- ARN: es el material genético del virus.
- Cápside: es el núcleo en forma de bala que contiene el ARN del virus.
- Envoltura: es la superficie externa del virus.
- Enzimas: proteínas que realizan varias funciones en el ciclo de vida del virus.
- Glucoproteínas: “espículas” de proteína incorporadas en la envoltura del virus, las principales son las gp120 y gp41.

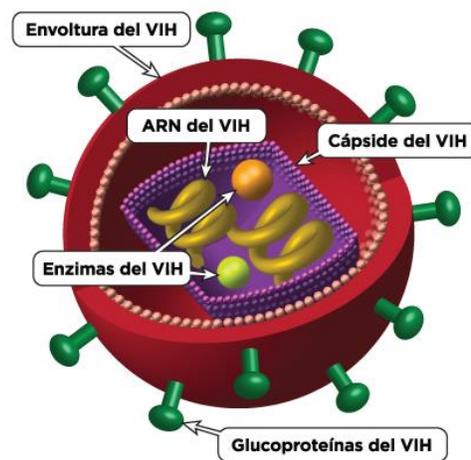


Figura 12. Estructura del Virus de Inmunodeficiencia Adquirida (VIH).

Recuperada de Ref. [37]

Las siete etapas del ciclo de vida del VIH son (Figura 13):

1. *Enlace (también llamado fijación)*. Las gp120 del VIH se enlazan (se fijan) a los receptores en la superficie del linfocito CD4. [37]
2. *Fusión*. Una vez fijado en los receptores CD4, el VIH activa otras proteínas presentes en la membrana de la célula denominadas: correceptores CCR5, lo que permite que ambas superficies se fusionen (por lo que el VIH entra a la célula). [37, 38]
3. *Transcripción inversa*. Dentro del linfocito CD4, el VIH libera y usa la transcriptasa inversa (una enzima del VIH) para convertir el ARN del VIH, su material genético, en ADN del VIH. La conversión de ARN a ADN le permite al VIH entrar al núcleo del linfocito CD4 y combinarse con el ADN de este.[35]
4. *Integración*. Dentro del núcleo del linfocito CD4, el VIH libera la integrasa (Una enzima del VIH). El VIH usa la integrasa para insertar (integrar) su ADN vírico dentro del ADN del linfocito CD4). [37]
5. *Multiplicación*. Una vez que el VIH se integra dentro del ADN del linfocito CD4, comienza a emplear el mecanismo de ese linfocito para crear cadenas largas de proteínas del VIH. Esas cadenas de proteínas son elementales para producir más copias del VIH. De un VIH pueden salir millones de copias y además de utilizar al linfocito para multiplicarse, al final lo destruye. [37, 38]
6. *Ensamblaje*. El ARN del VIH y las nuevas proteínas víricas producidas por el linfocito CD4 salen a la superficie de la célula y se ensamblan en un VIH inmaduro (no infeccioso). [37]
7. *Gemación*. El VIH inmaduro recién formado (no infeccioso) se impulsa hacia el exterior de la célula CD4 huésped. El nuevo VIH libera a la proteasa (Una enzima del VIH). La proteasa descompone las largas cadenas de proteínas en el virus inmaduro, creando el virus maduro (infeccioso). [37]

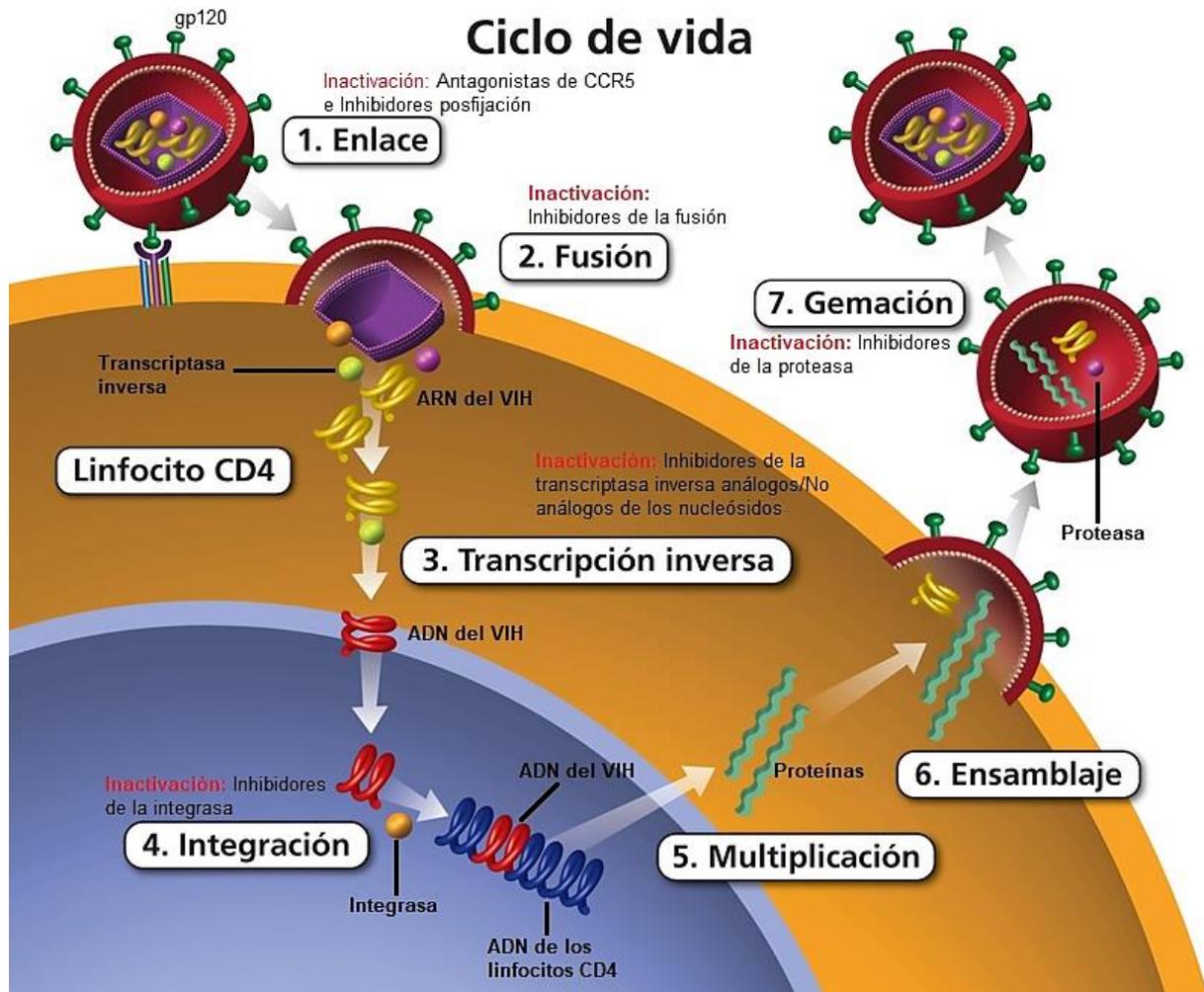


Figura 13. Ciclo de vida del Virus de Inmunodeficiencia Adquirida (VIH).
 Recuperada de Ref. [37]

Conexión entre el ciclo de vida del VIH y los medicamentos para su tratamiento

El tratamiento antirretroviral (TAR) consiste en el uso de medicamentos contra el VIH para tratar dicha infección. Las personas con TAR reciben una combinación de medicamentos contra el VIH todos los días, estos medicamentos protegen el sistema inmunitario al bloquear el virus en diferentes etapas de su ciclo de vida. En función de su diana en el ciclo de vida del virus, en la actualidad se dispone de los siguientes grupos farmacológicos para el tratamiento de la infección por el VIH:

1. *Inhibidores de la transcriptasa inversa análogos de nucleósidos.* Comercializados en la actualidad son: zidovudina (AZT), didanosina (ddI), estavudina (d4T), lamivudina (3TC) y abacavir. Estructuralmente, estos fármacos son análogos de los nucleósidos que actúan inhibiendo la transcriptasa inversa (TI) del VIH-1 y del VIH-2. Todos necesitan activarse (incorporar tres moléculas de fosfato) para poder actuar inhibiendo la TI, estas reacciones están catalizadas por enzimas celulares que suelen o pueden ser diferentes para cada compuesto y para cada tipo de célula. Por ello a pesar de tener una estructura química y un mecanismo de acción muy similares, se comportan como fármacos diferentes y la combinación de dos o más puede ser potencialmente sinérgica o aditiva y ampliar el espectro de células infectadas del huésped sobre las que ejercen su actividad. [39]
2. *Inhibidores de la transcriptasa reversa no análogos de nucleósidos.* Efavirenz y nevirapina. Estructuralmente no tienen nada en común. Inhiben exclusivamente la TI del VIH-1 (no son activos frente al VIH-2). No necesitan metabolizarse para ser activos y basta una o muy pocas mutaciones para desarrollar una resistencia de alto nivel. [39]
3. *Inhibidores de la proteasa.* Atazanavir, lopinavir, fosamprenavir, nelfinavir, saquinavir, ritonavir, indinavir, tipranavir y darunavir. Actúan inhibiendo la proteasa del VIH; no necesitan transformarse o metabolizarse para ser activos y actúan en la fase final del ciclo de replicación vírica. [39]

4. *Inhibidores de la entrada (Inhibidores de CCR5 y fusión)*. La enfuvirtida (T-20) es el primer inhibidor de la fusión disponible en la clínica, si bien presenta la limitación de que debe administrarse por vía parenteral. El maraviroc (antagonista de CCR5) bloquea los receptores de CCR5 en la superficie de los linfocitos CD4 que necesita el VIH para penetrar en ellos. [39]
5. *Inhibidores de la integrasa*. Dolutegravir (DTG), raltegravir (RAL). Esta clase de medicamentos bloquea la integrasa del VIH, una enzima que necesita el virus para replicarse. El TAR no puede curar la infección por el VIH, pero ayuda a las personas a tener una vida más larga y sana; además reducen el riesgo de transmisión del VIH. [39]

1.6 Zidovudina

La zidovudina (3'-azida-3'-deoxitimidina, AZT, Figura 14a) pertenece a los inhibidores de la transcriptasa inversa análogos de los nucleósidos. Es un compuesto didesoxinucleósido en el cual el grupo 3'-hidroxi del resto del azúcar es reemplazado por un grupo azida y es análogo estructural de la timidina (Figura 14b). [39, 40]

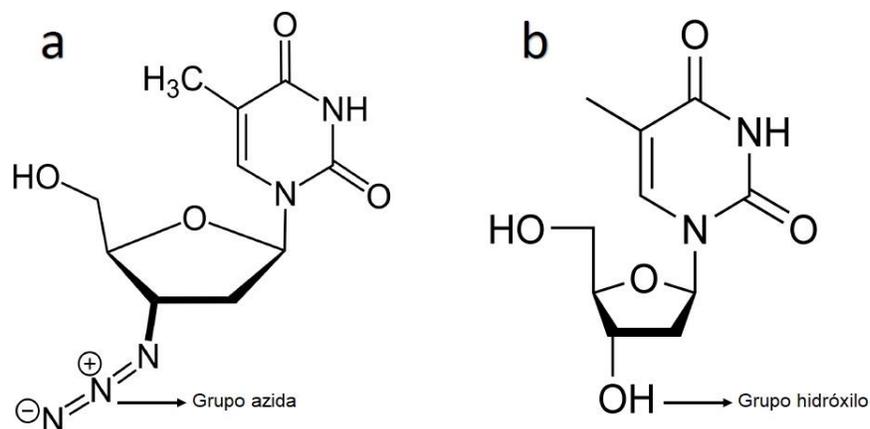


Figura 14. a) Estructura de la zidovudina, b) Estructura de la Timidina.
Recuperada de Ref. [40]

Propiedades fisicoquímicas

- Fórmula molecular: $C_{10}H_{13}N_5O_4$
- Peso molecular: 267.24 g/mol.
- Sólido cristalino color blanco.
- Solubilidad: en agua 20100 mg/L (a 25 °C).
- Log Kow= 0.05

Farmacocinética

La zidovudina se administra por vía oral. Tras la administración oral, la zidovudina se absorbe rápidamente en el tracto gastrointestinal. La biodisponibilidad aumenta cuando la zidovudina se administra con una comida alta en grasas, ya que el metabolismo de primer paso reduce la biodisponibilidad sistémica a aproximadamente 65%. Las concentraciones séricas máximas se producen dentro de 0.5-1.5 horas, aunque la variación individual es alta en el grado y velocidad de absorción. [40]

Los datos sobre la distribución son limitados, pero se sabe que la zidovudina atraviesa la barrera de hemato-encéfalica, así como la placenta y que se excreta en la leche humana. Tras la administración de una dosis única de 200 mg a mujeres infectadas por el VIH, se ha encontrado la misma concentración media de zidovudina tanto en leche materna como en suero. La unión a proteínas es de 30-38%. El 5'-glucurónido de AZT es el principal metabolito en plasma y en orina y corresponde al 50-80% de la dosis administrada, misma que se elimina por excreción renal. [40]

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El virus de inmunodeficiencia humana (VIH) infecta a las células del sistema inmunitario, alterando o anulando su función. La infección produce un deterioro progresivo del sistema inmunitario, con la consiguiente “inmunodeficiencia”. Se considera que el sistema inmunitario es deficiente cuando deja de poder cumplir su función de lucha contra las infecciones y enfermedades, llevando en etapas avanzadas a la aparición del SIDA. [41] Actualmente más de 40 millones de personas están infectadas por VIH. El VIH/SIDA, sigue siendo uno de los problemas de salud pública más graves del mundo. En México hasta noviembre de 2021, se registraron 328 791 casos acumulados, de los que sólo 113 788 personas se encontraban con tratamiento antirretroviral. [42] No obstante, gracias a los tratamientos con fármacos antirretrovirales, las personas con esta enfermedad pueden prolongar su vida, con un mejor estado de salud. [43]

La zidovudina, también conocida como azidotimidina (AZT) es un importante fármaco usado en el tratamiento para el VIH. Pertenece a la familia de los inhibidores de la transcriptasa inversa análogo de los nucleósidos (NRTIs por sus siglas en inglés) y está estructuralmente relacionada con un grupo azo de la timidina endógena en lugar del grupo hidroxilo en la posición 3' del anillo de desoxirribosa. La presencia del grupo azo previene la formación de enlaces fosfodiéster necesarios para la replicación del ADN, causando la terminación de la cadena. Este es el mecanismo por el cual la AZT interfiere con la replicación viral. La eficacia de la AZT en el tratamiento de la infección por VIH se debe a su afinidad selectiva por la transcriptasa inversa del VIH frente a polimerasas del ADN humano. [44] Además fue el primer compuesto anti-VIH aprobado para su uso clínico, y es uno de los más ampliamente utilizados. Después de una administración oral es rápidamente absorbido hacia el tracto gastrointestinal con una concentración máxima en suero en aproximadamente 1 h. Sin embargo, su biodisponibilidad no es muy alta (52-75%), debido al metabolismo de primer paso y tiene en promedio una vida media

de aproximadamente 1 h. Para mantener los niveles terapéuticos es necesario que se administre frecuentemente; en concentraciones de 200 mg cada 4 h. [45]

Es por ello que la ruta transdérmica se presenta como una buena alternativa para conseguir niveles plasmáticos constantes, que además permitan reducir la frecuencia de dosificación. Debido a que la AZT es una molécula relativamente polar, con un $\log P$ -0.05, su permeabilidad transdérmica es pobre, por lo que es necesario recurrir a diversas estrategias con el fin de incrementar su transporte a través de la piel: (i) Técnicas físicas (ej., iontoforesis, sonoforesis, microagujas) y (ii) promotores químicos, ej., disolventes empleados como vehículos, como etanol y propilenglicol y terpenos como mentol, cineol, terpineol, etc. [46]

En este trabajo se propone el uso de dos promotores físicos, sonoforesis y microagujas, para incrementar el transporte de AZT a través de la piel, como una forma alternativa para administrar este fármaco, buscando reducir los efectos adversos (como estreñimiento, acidez, diarrea, insuficiencia hepática, entre otros) después de una administración oral.

3. HIPÓTESIS

Al utilizar promotores de permeación físicos como la sonoforesis y/o microagujas, se promoverá y aumentará el flujo de zidovudina a través de la piel.

4. OBJETIVOS

General

Estudiar el efecto de dos tipos de promotores físicos, sonoforesis y microagujas, sobre la permeación a través de piel *in vitro* de una solución de zidovudina.

Particulares

- Desarrollar y validar métodos analíticos para la cuantificación de zidovudina en el medio receptor al realizar los estudios de permeación *in vitro*.
- Desarrollar y validar métodos analíticos para la cuantificación de zidovudina remanente en piel al finalizar los estudios de permeación *in vitro*.
- Realizar estudios de permeación *in vitro* de zidovudina a través de piel de cerdo intacta, utilizando celdas de difusión tipo Franz.
- Realizar estudios de permeación *in vitro* en piel de cerdo pretratada con sonoforesis o con microagujas, empleando celdas de difusión tipo Franz, con el fin de evaluar el efecto de estos promotores sobre el transporte transdérmico de zidovudina.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

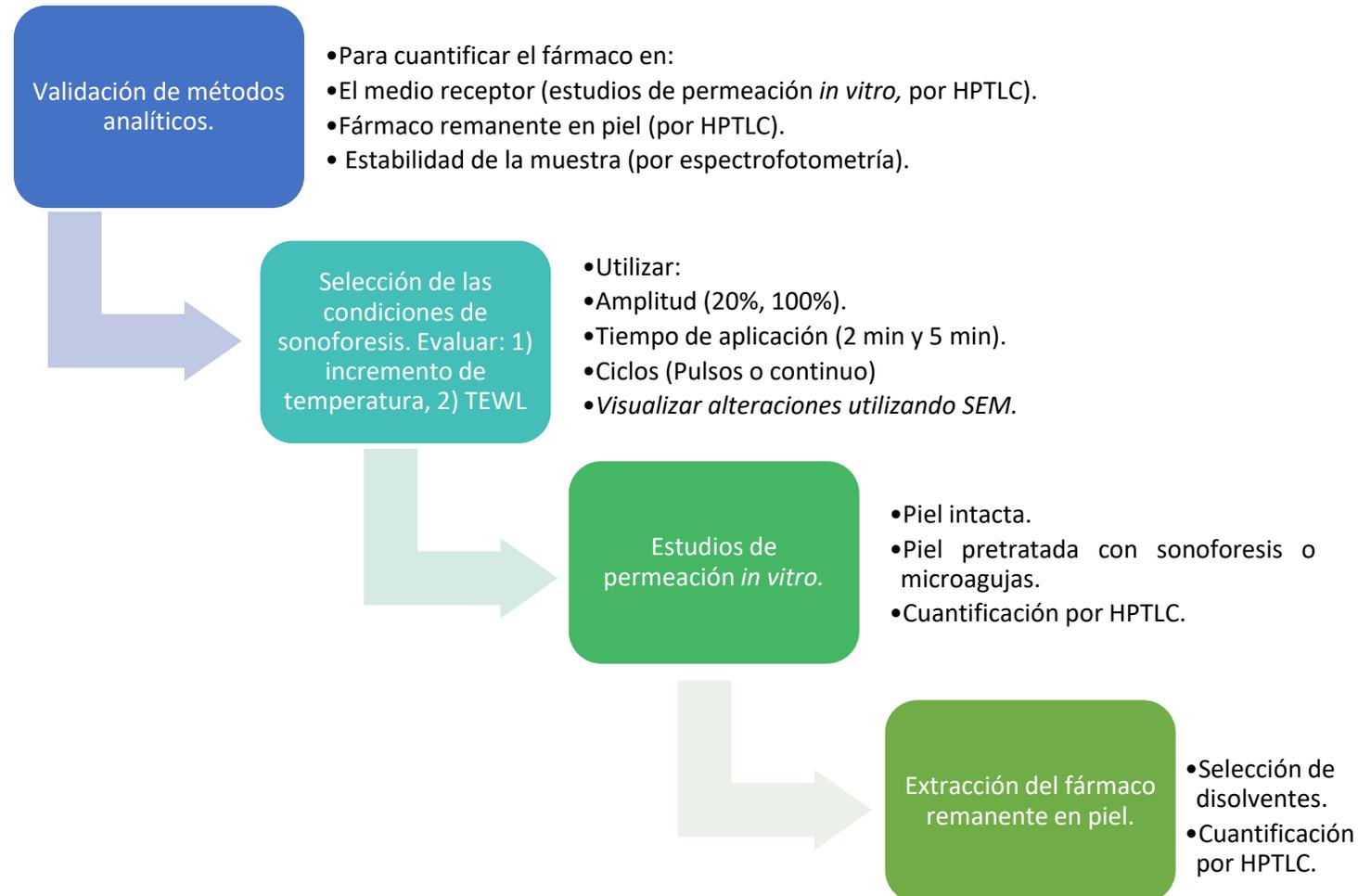
Materiales

Metanol (J. T Baker[®], EUA), cloroformo (J. T Baker[®], EUA), tolueno (J. T Baker[®], EUA), fosfato monobásico de potasio (J. T Baker[®], EUA), cloruro de sodio (J. T Baker[®], EUA), lauril sulfato de sodio (J. T Baker[®], EUA), agua purificada, etanol (J. T Baker[®], EUA), zidovudina estándar (Sigma-Aldrich[®]), zidovudina materia prima (donada por laboratorio APOTEX, México), celdas de difusión tipo Franz (fabricadas en el taller de vidrio de la FESC), agitadores magnéticos, rodillo de microagujas de 200 μm (Derma Roller System[®], China), cámara de elución en vidrio para cromatografía en capa fina (CAMAG, Suiza), placas para cromatografía en capa fina fina Sílica gel 60 F₂₅₄ (Macherey-Nagel[®], GmbH & Co., Alemania), pre-filtro (Whatman[®], Fisher Scientific, EUA), membrana de 0.45 μm (Merck Millipore[®], Ltd, Irlanda).

Material biológico

Se empleó piel de oreja de cerdo. Las orejas se recuperaron del rastro, antes de que los animales fueran sometidos a tratamiento con agua caliente o vapor.

Metodología general



Métodos específicos

ESTUDIOS DE PERMEACIÓN IN VITRO DE ZIDOVUDINA A TRAVÉS DE PIEL DE CERDO

Los estudios de permeación se realizaron con piel de cerdo, utilizando celdas de difusión tipo Franz (área de difusión 0.78 cm²) durante 24 h. La piel de la oreja de cerdo se separó del cartílago con ayuda de un escalpelo, retirando el músculo con tijeras. La piel se cortó con la ayuda de un dermatoma (Zimmer 901, Ohio, E.U.A) uniformando a un grosor de 750 µm aproximadamente. La piel se almacenó a -20 °C hasta su uso. El día del estudio, la piel se descongeló y se sujetó con pinzas entre el compartimento donador y el compartimento receptor de las celdas de Franz, con el estrato córneo hacia el compartimento donador. El compartimento receptor se llenó con 2 mL de solución amortiguadora de fosfatos (PBS, por sus siglas en inglés) pH 7.4, mantenida a 37 °C en un baño de agua con agitación magnética constante durante todo el estudio, utilizando un agitador múltiple IKA-WERKE (modelo RO-15, Alemania). La solución donadora consistió de 1 mL de AZT en PBS pH 7.4 (2 mg/mL). El método de muestreo que se utilizó para los estudios de permeación fue el de reemplazo de medio receptor, por lo que el medio se retiró por completo del compartimento receptor en tiempos determinados previamente, reemplazando inmediatamente el volumen con medio fresco, previamente calentado a 37 °C.

Una vez que se completaron los estudios de permeación, se retiró la solución de fármaco del compartimento donador, enjuagando la piel con PBS pH 7.4. En seguida la piel se cortó en fragmentos pequeños con tijeras y se colocaron en frascos con 5 mL de etanol, después se colocó una barra magnética y se cerró el frasco, manteniendo en agitación a temperatura ambiente durante 24 h, con el fin de extraer el fármaco remanente en la piel. Cada muestra se analizó mediante Cromatografía en Capa Fina de Alta Resolución (HPTLC, por sus siglas en inglés). Se construyó el perfil de permeación, graficando la cantidad permeada acumulada por unidad de área vs el tiempo (h). El flujo (J) se determinó a partir de la pendiente.

El coeficiente de permeabilidad (K_p) se calculó como el cociente entre el flujo y la concentración de fármaco en el compartimento donador (flujo/concentración de fármaco). Además de la cantidad acumulada de AZT al final del estudio, también se registró la cantidad de fármaco remanente en la piel. Cada estudio de permeación se realizó por sextuplicado.

ESTUDIOS DE PERMEACIÓN DE ZIDOVUDINA EN PIEL PRE-TRATADA CON MICROAGUJAS

En el caso de los estudios con microagujas, se utilizó un rodillo (MTS-Roller, E.U.A), con un arreglo de microagujas de 200 μm de longitud. Antes de montar la piel en las celdas de Franz, la piel se fijó sobre una superficie de espuma de poliestireno con la ayuda de tachuelas, pasando el rodillo sobre la superficie de la piel un total de cinco veces en cada dirección, tal como se muestra en la Figura 15. Después de este procedimiento, la piel se montó en las celdas de Franz, realizando los estudios de permeación como ya se describió en el apartado del método de *Estudios de permeación in vitro de zidovudina a través de piel de cerdo*. Los experimentos se realizaron por sextuplicado.



Figura 15. Método de tratamiento de la piel con el arreglo de microagujas sólidas de 200 μm de longitud.

ESTUDIOS DE PERMEACIÓN DE ZIDOVUDINA EN PIEL PRE-TRATADA CON SONOFORESIS

Los estudios de permeación aplicando sonoforesis se realizaron utilizando un procesador ultrasónico Hielscher UP50H (densidad de potencia acústica: 600 W/cm²; frecuencia de trabajo: 30 kHz ± 1 kHz) con un sonotrodo MS2 (diámetro de punta de 2mm), según el siguiente procedimiento: Una vez montada la piel en las celdas de Franz, se añadió al compartimento donador 1 mL de una solución acuosa de lauril sulfato de sodio (LSS) al 1% (m/v), utilizada como medio de acoplamiento, colocando el sonotrodo a una distancia de 1 cm por encima de la superficie de la piel [47], operando el equipo de ultrasonido, en las condiciones previamente determinadas, según un diseño de experimentos factorial 2³, teniendo en cuenta los siguientes factores: Amplitud (20 y 100%, considerando una amplitud máxima de 220 μm), tiempo (2 y 5 min) y ciclo (0.5 y 1). Una vez completado el tratamiento con el ultrasonido, se retiró la solución de LSS del compartimento donador y se enjuagó la superficie de la piel a fondo con PBS pH 7.4. A continuación, se llevó a cabo el estudio de permeación de acuerdo con el procedimiento descrito en el método de *Estudios de permeación in vitro de zidovudina a través de piel de cerdo*. El estudio se realizó por sextuplicado. Además, para determinar si el uso de LSS tenía algún efecto sobre la permeabilidad cutánea, se realizaron permeaciones sin aplicar sonoforesis, pero dejando la piel en contacto con LSS durante el mismo tiempo de pre-tratamiento de la piel con sonoforesis.

MÉTODOS ANALÍTICOS PARA LA CUANTIFICACIÓN DE ZIDOVUDINA

La cantidad de AZT se determinó mediante Cromatografía en Capa Fina de Alta Resolución (HPTLC). Las muestras se aplicaron en placas de cromatografía en capa fina (TLC) utilizando un aplicador TLC automático 4 (CAMAG, Suiza), mediante la técnica de spray, en forma de bandas de 6 mm de largo a una velocidad

de 10 nL/s (soluciones con PBS) y 25 nL/s (soluciones con etanol). El revelado de las placas se realizó mediante la técnica ascendente, en una cámara de vidrio de doble compartimento utilizando como fase móvil cloroformo/metanol/tolueno (8: 2: 2). [48] Se dejó que la cámara se saturara con la fase móvil durante 45 minutos antes de introducir la placa, pasado este tiempo se introdujo la placa en la cámara y se dejó eluir hasta que la fase móvil alcanzó 5 cm, la placa se retiró de la cámara y se dejó secar al aire. En seguida las muestras se cuantificaron en un escáner TLC 3 (CAMAG, Suiza), equipado con un software de cromatografía plana win-CATS 1.4.0, en el modo de absorbancia/reflexión a 271 nm. La dimensión del slit se fijó en 5 mm x 0.45 mm. El método fue validado, evaluando los siguientes parámetros: Especificidad, linealidad, repetibilidad, precisión, exactitud, límite de detección y límite de cuantificación (para más detalles, ir a Anexo 1). Las condiciones de validación en cada caso fueron las siguientes:

- i. *Cuantificación de zidovudina en el compartimento receptor.* Disolvente: Buffer de fosfato pH 7.4 en contacto con la piel de cerdo con agitación mecánica durante 24 h, una vez pasado este tiempo la solución se filtró a través de un pre-filtro de microfibras de vidrio (Whatman, Fisher Scientific, USA) y después a través de una membrana de nylon de 0.45 μm (Merck, Millipore Ltd, Irlanda).
- ii. *Cuantificación de zidovudina remanente en piel.* Disolvente: Etanol en contacto con piel de cerdo (cortada en trozos pequeños) con agitación mecánica durante 24 h. una vez pasado este tiempo la solución se filtró a través de un pre-filtro de microfibras de vidrio (Whatman, Fisher Scientific, USA) y después a través de una membrana de nylon de 0.45 μm (Merck, Millipore Ltd, Irlanda).

ESTABILIDAD DE LA ZIDOVUDINA EN SOLUCIÓN

La estabilidad de AZT en solución se realizó por espectrofotometría UV (se realizó por este método debido a una avería en el equipo de HPTLC), lo que se buscó con este estudio era corroborar si la AZT era estable en solución, primeramente debido

a que los estudios de permeación se realizaron durante un periodo de 24 h y el análisis de las muestras podría llevarse hasta 8 h después de finalizar los estudios de permeación y en segundo lugar, porque pensando en que la AZT pudiera formularse en un vehículo acuoso, e.g. un gel dentro de un parche, se tendría un referente. Siguiendo la NOM 073 Estabilidad de fármacos y medicamentos [50], así como de remedios herbolarios. Se realizó una estabilidad acelerada, colocando 5 mL de una solución de AZT (400 µg/mL) en 3 frascos de vidrio transparente y en 3 frascos de vidrio ámbar, respectivamente. Las muestras se colocaron en una estufa a 40 °C ± 2 °C y 75% ± 5% de Humedad relativa (% H.R). Las muestras se cuantificaron a los 0, 1, 2 y 3 meses.

MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO

Para detectar posibles cambios superficiales en la piel cuando es tratada con microagujas o sonoforesis la piel se visualizó por microscopía electrónica de barrido utilizando un microscopio JSM-6010LA (Jeol, Tokyo, Japón). La superficie de piel tratada se comparó con la de la piel intacta.

MEDICIÓN DE LA PÉRDIDA DE AGUA TRANSEPIDÉRMICA

Se utilizó piel de cerdo para evaluar el efecto de la sonoforesis y microagujas sobre la pérdida de agua transepidermica (TEWL, por sus siglas en inglés). Esta es una medida de la cantidad de agua que se evapora pasivamente a través de la piel hacia el medio externo debido al gradiente de presión del vapor de agua en ambos lados de la barrera cutánea. Para ello, se separó la piel del cartílago de la oreja de cerdo, eliminando el músculo y los tejidos grasos con tijeras, uniformando el grosor a aproximadamente 750 µm con la ayuda de un dermatoma (Zimmer 901, Ohio, E.U.A). La TEWL fue medida con un Tewameter® TM 300 conectado a un adaptador multisonda MPA 5 Courage und Khazaka (Köln, Renania del Norte, Westfalia, Alemania). Las mediciones se realizaron por triplicado. La piel fue montada en una celda de difusión tipo Franz, con un área de 0.78 cm², con el estrato córneo hacia el compartimento donador. En el compartimento receptor se colocaron

2 mL de PBS pH 7.4. El sistema ensamblado se colocó dentro de una caja de acrílico (construida específicamente para estos fines) durante 30 minutos, para asegurar un microclima aislado (de movimientos de aire en el ambiente) que permitiera la medición de TEWL. Después de este tiempo se midió la TEWL basal. Se registraron los valores de TEWL de las siguientes muestras: (i) Piel intacta, (ii) Piel pretratada con microagujas, (iii) Piel pretratada con una solución acuosa de Lauril Sulfato de Sodio (LSS) al 1% (m/v), (iv) Piel pretratada con LSS 1% (m/v) + sonoforesis, bajo las condiciones de la Tabla 9.

ESPECTROSCOPIA INFRARROJA CON TRANSFORMADA DE FOURIER Y REFLECTANCIA TOTAL ATENUADA (ATR-FTIR, POR SUS SIGLAS EN INGLÉS)

Se obtuvo el espectro de la superficie de la piel de cerdo utilizando un espectrofotómetro FTIR marca Perkin-Elmer® Frontier (Waltham, MA, EUA), realizando 16 escaneos por espectro, con una resolución de 4 cm^{-1} , en la región de 4000 cm^{-1} a 500 cm^{-1} . Se registraron los números de onda de las bandas asociadas con los lípidos y proteínas. Para ello, las muestras de piel fueron montadas en celdas de difusión tipo Franz, llenando el compartimento receptor con 2 mL de PBS pH 7.4. Una vez retirada la piel de las celdas de Franz, se registró el espectro FTIR de las siguientes muestras: (i) Piel pretratada con una solución acuosa de LSS 1% (m/v) durante 2 min, (ii) Piel pretratada con LSS 1% (m/v) durante 5 min, (iii) Piel pretratada con LSS 1% (m/v) + sonoforesis, bajo las condiciones que se muestran en la Tabla 9. Los espectros fueron comparados con uno correspondiente a piel intacta.

VALORACIÓN DE ZIDOVUDINA (MATERIA PRIMA)

Para garantizar que la pureza de la AZT (materia prima) utilizada se mantuviera dentro del rango establecido (90-110%), se desarrolló un método espectrofotométrico UV, utilizando una solución estándar de AZT (Sigma-Aldrich, EUA), y como disolvente PBS pH 7.4. El método fue validado, evaluando los

siguientes parámetros: Especificidad, linealidad, repetibilidad, precisión, exactitud, límite de detección y límite de cuantificación. La valoración de la materia prima se realizó cada 6 meses.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico de los datos se realizó usando el Software GraphPad Prism 9. Los datos se compararon usando el análisis de varianza de una vía (ANOVA), y una prueba de rango post-hoc de comparación múltiple de Tukey y Dunnett's. Un valor de $p < 0.05$ fue considerado estadísticamente significativo.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. Condiciones de la Cromatografía en Capa Fina de Alta Resolución para la cuantificación de zidovudina en los estudios de permeación

Para cuantificar la AZT en los estudios de permeación In vitro se utilizó la Cromatografía en Capa Fina de Alta Resolución (HPTLC, por sus siglas en inglés), por lo que se determinaron las condiciones idóneas para la cuantificación del fármaco.

FASE MÓVIL

Para la elección de la fase móvil se inició con una propuesta por Girum Habte y cols. [47] la cual consiste en tolueno/ cloroformo/ metanol (1:6:3 v/v/v); sin embargo, con esta fase las muestras corrían junto con el frente del disolvente. Por lo que se probaron otras proporciones, las cuales se muestran en la Tabla 1. La fase móvil compuesta por cloroformo/metanol/tolueno (8:2:2 v/v/v) fue la que se eligió debido a que presentó un tiempo de elución menor y un $R_f = 0.65$.

Disolventes	Concentración (v/v/v)	Resultado
Tolueno/cloroformo/metanol	1:6:1.5	$R_f = 0.73$, pero tarda en eluir 30 min.
Acetona/tolueno/metanol	4:2:4	La muestra eluye con el frente del disolvente.
Cloroformo/metanol/tolueno	8:2:2	$R_f = 0.65$, tarda en eluir 6 min.

CONDICIONES PARA CUANTIFICAR ZIDOVUDINA POR HPTLC

En cuanto a las condiciones del equipo algunas de ellas fueron definidas en base a lo reportado en la literatura. Para la elección de la longitud de onda a la que se leerían las muestras, se realizó un barrido de 200 a 400 nm, encontrando el máximo de absorbancia a 271 nm. Las condiciones finales se muestran a continuación:

- Fase móvil: cloroformo/metanol/tolueno (8:2:2 v/v/v), tiempo de saturación 1 h.
- Placas para cromatografía en capa fina Sílica gel 60 F₂₅₄ (Macherey-Nagel).
- Tamaño de placa: 16.5 x 5 cm.
- Slit: 5 x 0.45 mm.
- Inicio de aplicación: 8 mm.
- Frente del disolvente: 5 cm.
- R_f aproximado obtenido: 0.45-0.53.
- Longitud de onda: 271 nm.
- Diluyente y blanco: buffer de fosfatos pH 7.4 en contacto con piel de cerdo.

6.2. Validación del método analítico por HPTLC para cuantificar la zidovudina en el medio receptor

En la Tabla 2 se muestran los resultados de la validación para cuantificar AZT en el medio receptor durante los estudios de permeación *in vitro*. Tal como se puede observar los resultados se encuentran dentro de los criterios de aceptación y como se muestra en la Figura 16 no se observó absorbancia de ninguna sustancia diferente a la AZT en una longitud de onda de 271 nm. La ecuación de la recta para este método fue la siguiente: Área bajo la curva = 10.346 * Cantidad (ng/mancha) + 144.46, además se obtuvo una correlación de los datos del 99.37%.

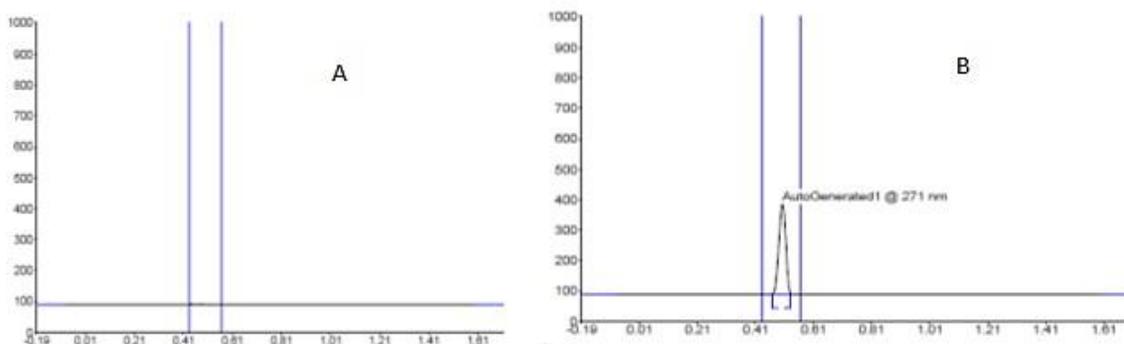


Figura 16. Parámetro de especificidad A) Blanco (Buffer de fosfatos pH 7.4), B) Solución de zidovudina en buffer de fosfatos pH 7.4 (100 ng/mancha).

Tabla 2. Resultados de la validación del método para la cuantificación de AZT en el medio receptor (Buffer de fosfatos pH 7.4 en contacto con piel de cerdo) utilizando HPTLC.		
Parámetros validados	Resultados	Criterios de aceptación [48, 49]
Rango	50-200 ng/mancha	---
Linealidad		
Coeficiente de correlación (r)	0.9937	$r \geq 0.99$
Coeficiente de determinación (r^2)	0.9876	$r^2 \geq 0.98$
Intercepto-y	144.46 I.C= 58.27-230.65	El I.C puede incluir el 0
Pendiente	10.346 I.C= 9.65-11.03	El I.C no debe incluir el 0
Precisión		
Repetibilidad (3 concentraciones/6 réplicas de cada una bajo las mismas condiciones)	Nivel 1 (50 ng/mancha): C.V=4.05% Nivel 2 (100 ng/mancha): C.V= 1.71% Nivel 3 (200 ng/mancha): C.V= 1.77%	C.V \leq 15%
Precisión intermedia (3 concentraciones/6 réplicas en diferentes días)	Nivel 1 (50 ng/mancha): C.V=6.99% Nivel 2 (100 ng/mancha): C.V= 7.63% Nivel 3 (200 ng/mancha): C.V= 2.87%	C.V \leq 15%
Exactitud	Nivel 1 (50 ng/mancha): 91%-111% Nivel 2 (100 ng/mancha): 97%-101% Nivel 3 (150 ng/mancha): 89%-94%	% Recobro = 85%-115%
Especificidad	Ningún componente diferente a la zidovudina fue observado a 271 nm (Ver Figura 16)	No se deben observar componentes diferentes a la zidovudina en el cromatograma.
Límite de detección	9.87 ng/mancha	---
Límite de cuantificación	24.67 ng/mancha	---

6.3. Validación del método analítico por espectrofotometría UV para la cuantificación de zidovudina en los estudios de estabilidad

En la Tabla 3 se muestran los resultados de la validación, tal como se puede observar los resultados se encuentran dentro de los criterios de aceptación. La ecuación de la recta fue la siguiente: Absorbancia= 0.0306*Concentración ($\mu\text{g/mL}$) + 0.0126 con una correlación de los datos de 99.93%.

Tabla 3. Resultados de la validación del método por espectrofotometría UV para la cuantificación de AZT durante los estudios de estabilidad, empleando como disolvente PBS pH 7.4		
Parámetros validados	Resultados	Criterios de aceptación [48, 49]
Rango	1-40 $\mu\text{g/mL}$	---
Linealidad		
Coeficiente de correlación (r)	0.9993	$r \geq 0.99$
Coeficiente de determinación (r^2)	0.9987	$r^2 \geq 0.98$
Intercepto-y	0.0126 I.C= 0.00399-0.02393	El I.C puede incluir el 0
Pendiente	0.0306 I.C= 0.0301-0.0310	El I.C no debe incluir el 0
Precisión		
Repetibilidad (3 concentraciones/6 réplicas de cada una bajo las mismas condiciones)	Nivel 1 (2.5 $\mu\text{g/mL}$): C.V=4.00% Nivel 2 (10 $\mu\text{g/mL}$): C.V= 2.54% Nivel 3 (15 $\mu\text{g/mL}$): C.V= 1.24%	C.V \leq 15%
Precisión intermedia (3 concentraciones/6 réplicas-diferentes analistas)	Nivel 1 (2.5 $\mu\text{g/mL}$): C.V= 3.73% Nivel 2 (10 $\mu\text{g/mL}$): C.V= 4.46% Nivel 3 (15 $\mu\text{g/mL}$): C.V= 3.84%	C.V \leq 15%
Exactitud	Nivel 1 (2.5 $\mu\text{g/mL}$): 89%-93% Nivel 2 (10 $\mu\text{g/mL}$): 100%-103% Nivel 3 (15 $\mu\text{g/mL}$): 99%-102%	% Recobro = 85%-115%
Especificidad	Ningún componente diferente a la zidovudina fue observado a 271 nm	No se deben observar componentes diferentes a la zidovudina en el espectro de absorción.
Límite de detección	< 1 $\mu\text{g/mL}$	---
Límite de cuantificación	1 $\mu\text{g/mL}$	---

6.4. Validación del método analítico para cuantificar la zidovudina remanente en piel

ELECCIÓN DEL DISOLVENTE EXTRACTOR

Antes de llevar a cabo la validación del método analítico se realizaron pruebas para la extracción del fármaco remanente en piel utilizando dos disolventes: buffer de fosfatos pH 7.4 y metanol. Como se puede observar en la Tabla 4, se extrajo un porcentaje mayor de fármaco con el metanol, aunque el coeficiente de variación (C.V.) fue muy alto (39.88%).

Tabla 4. Resultados de la extracción del fármaco remanente en piel (n=7) en dos disolventes.	
Extracción en buffer de fosfatos pH 7.4	Extracción en metanol
23.98 %	40.32%
48.13%	23.59%
26.72%	76.57%
26.26%	70.49%
62.56%	65.22%
92.03%	30.72%
51.62%	66.61%
Promedio= 47.33%	Promedio= 53.36%
C.V.= 52.21%	C.V.= 39.88%

Al no obtener los resultados deseados se decidió realizar la extracción utilizando como disolvente el etanol, en el cual de acuerdo a la bibliografía la AZT tiene una solubilidad > 20 mg/mL. [38] Los resultados de la extracción de AZT remanente en piel de cerdo utilizando etanol se muestran en la Tabla 5.

Tabla 5. Resultados del porcentaje de AZT remanente en piel de cerdo extraída con etanol.	
Muestra	% extraído
1	73.62
2	76.90
3	72.75
4	70.62
5	70.61
6	83.42
Promedio	74.65%
C.V	6.53%

Debido a los buenos resultados obtenidos se decidió utilizar el etanol al 100% como disolvente extractor para la cuantificación de AZT retenida en piel, una vez terminados los estudios de permeación *in vitro*.

VALIDACIÓN DEL MÉTODO POR HPTLC

En la Tabla 6 se muestran los resultados de la validación del método. Tal como se observa, los resultados se encuentran dentro de los criterios de aceptación. La ecuación de la recta fue la siguiente: Área Bajo la Curva= 11.46*Cantidad (ng/mancha) + 519.59 con una correlación de los datos de 99.61%.

Tabla 6. Resultados de la validación del método para la cuantificación de zidovudina remanente en piel (extracción en etanol) utilizando HPTLC.		
Parámetros validados	Resultados	Criterios de aceptación [48, 49]
Rango	50-400 ng/mancha	---
Linealidad		
Coeficiente de correlación (r)	0.9961	$r \geq 0.99$
Coeficiente de determinación (r^2)	0.9923	$r^2 \geq 0.98$
Intercepto-y	519.59 I.C= 371.17-668.00	El I.C puede incluir el 0
Pendiente	11.46 I.C= 10.86-12.06	El I.C no debe incluir el 0
Precisión		
Repetibilidad (3 concentraciones/6 réplicas de cada una bajo las mismas condiciones)	Nivel 1 (100 ng/mancha): C.V=1.87% Nivel 2 (200 ng/mancha): C.V= 0.87% Nivel 3 (300 ng/mancha): C.V= 0.58%	C.V \leq 15%
Precisión intermedia (3 concentraciones/6 réplicas en diferentes días)	Level 1 (100 ng/mancha): C.V=5.19% Level 2 (200 ng/mancha): C.V= 1.90% Level 3 (300 ng/mancha): C.V= 3.46%	C.V \leq 15%
Exactitud	Level 1 (100 ng/mancha): 96%-111% Level 2 (200 ng/mancha): 95%-99% Level 3 (300 ng/mancha): 103%-109%	% Recobro = 80%-120%
Especificidad	Ningún componente diferente a la zidovudina fue observado a 271 nm (Figura 17)	No se deben observar componentes diferentes a la zidovudina en el cromatograma.
Límite de detección	12 ng/mancha	---
Límite de cuantificación	20 ng/mancha	---

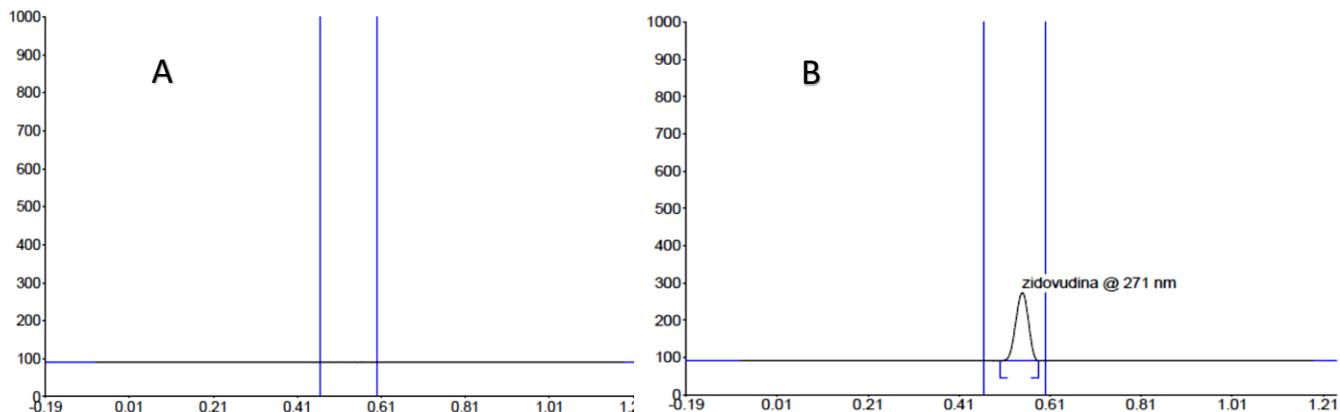


Figura 17. A: Cromatograma del blanco utilizado (etanol). B: Cromatograma de una solución de zidovudina en etanol.

6.5. Estabilidad de una solución de zidovudina

Se determinó la estabilidad acelerada de una solución de AZT basándose en la NOM-073 [50], colocando las muestras a $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ / $75\% \pm 5\%$ H.R. En la Tabla 7 se muestran los resultados en los meses 0, 1, 2 y 3, en muestras almacenadas en frasco ámbar o transparente. Tal como se puede observar, al comparar el promedio de AZT inicial (0 meses) y el final (3 meses) hay una disminución del 5.54% y del 5.05% en frasco ámbar y transparente respectivamente. Pero a pesar de esta disminución, las soluciones en ambos frascos no mostraron cambios visibles durante este tiempo y la valoración se mantuvo dentro de especificación (90-110%). En base a estos resultados se concluyó que la AZT es estable durante este periodo de tiempo. Con estos datos además se tiene un referente de la estabilidad de AZT para su formulación en un parche transdérmico por ejemplo.

Tabla 7. Porcentaje de AZT cuantificado durante la estabilidad acelerada.		
Tiempo (mes)	% de zidovudina /Frasco ámbar	% de zidovudina /Frasco transparente
0	M ₁ = 99.69 M ₂ =100.32 M ₃ =100.20	M ₁ =99.69 M ₂ =100.32 M ₃ =100.20
	Promedio= 100.07, C.V= 0.33%	Promedio= 100.07, C.V= 0.33%
1	M ₁ =101.32 M ₂ =105.56 M ₃ =104.64	M ₁ =96.97 M ₂ =99.64 M ₃ =97.45
	Promedio= 103.84, C.V= 2.15%	Promedio= 98.02%, C.V= 1.45%
2	M ₁ =92.36 M ₂ =95.50 M ₃ =93.09	M ₁ =94.59 M ₂ =96.32 M ₃ =93.17
	Promedio= 93.65, C.V= 1.75%	Promedio= 94.69, C.V= 1.67%
3	M ₁ =94.28 M ₂ =96.31 M ₃ =93.01	M ₁ =93.86 M ₂ =97.85 M ₃ =93.34
	Promedio= 94.53, C.V= 1.76%	Promedio= 95.02, C.V= 2.60%

6.6. Diseño de experimentos para determinar las condiciones óptimas de sonoforesis

Para el tratamiento previo de la piel con sonoforesis se consideraron 3 variables: la amplitud, el tiempo y el ciclo de trabajo. Con el fin de determinar las condiciones óptimas con las cuales se consiguiera una buena difusión del fármaco a través de la piel, sin provocar daño (quemaduras, por ejemplo), se realizó un diseño de experimentos factorial multinivel el cual se muestra en la Tabla 8 en donde 1 corresponde a la condición alta y -1 a la condición baja. Se evaluaron dos respuestas: el incremento en la temperatura de la piel y la TEWL.

Tabla 8. Diseño de experimentos factorial multinivel utilizado en el tratamiento con Sonoforesis.				
Bloque	Experimento	Amplitud*	Tiempo**	Ciclo***
1	1	1	1	1
1	2	1	1	-1
1	3	1	-1	1
1	4	1	-1	-1
1	5	-1	-1	1
1	6	-1	-1	-1
1	7	-1	1	-1
1	8	-1	1	1
*Amplitud: 1=100%, -1= 20%. **Tiempo: 1= 5 min, -1= 2 min. ***Ciclo: 1= 1, -1= 0.5.				

En la Tabla 9 se muestran los resultados obtenidos del incremento de temperatura así como el promedio de TEWL en la piel. De acuerdo con los resultados las mejores condiciones para pretratar la piel con sonoforesis fueron:

- i. A= 100%, c= 0.5, t= 5 min
- ii. A= 100%, c= 1.0, t= 2 min
- iii. A= 20%, c= 0.5, t= 5 min
- iv. A= 20%, c= 1.0, t= 2 min

Tabla 9. Resultados de la pérdida de agua transepidérmica (TEWL) y el aumento de la temperatura en piel, después del tratamiento bajo distintas condiciones. Piel intacta (sin tratar); LSS (Pretratamiento con LSS durante 2 y 5 min)				
Pretratamiento	Condiciones	ΔT (°C)	TEWL (n= 6)	TEWL Relativa
Ninguno	Piel intacta	---	29.32 ± 0.85	1
Sin sonoforesis	LSS, t= 2 min	---	28.52 ± 2.09	0.973
	LSS, t= 5 min	---	31.49 ± 2.30	1.074
1	A= 100%, c= 0.5, t= 5 min	2.7 ± 0.52	61.18 ± 0.53	2.087
2	A= 100%, c= 1.0, t= 2 min	5.3 ± 0.52	59.60 ± 5.09	2.033
3	A= 20%, c= 0.5, t= 5 min	3.0 ± 1.55	64.03 ± 3.70	2.184
4	A= 20%, c= 1.0, t= 2 min	3.2 ± 0.75	53.16 ± 3.74	1.813
5	A= 100%, c= 1.0, t= 5 min	9.3 ± 1.15	72.00 ± 0.92	2.456
6	A= 20%, c= 1.0, t= 5 min	5.7 ± 0.58	69.83 ± 3.05	2.382
7	A= 100%, c= 0.5, t= 2 min	3.3 ± 0.58	31.27 ± 0.84	1.067
8	A= 20%, c= 0.5, t= 2 min	0.7 ± 0.58	39.50 ± 0.61	1.347
Microagujas	200 μ m de longitud	---	58.53 ± 1.97	1.996

6.7. Microscopía electrónica de barrido

En general, los cambios en la estructura de la piel cuando se aplica sonoforesis están directamente relacionados con la frecuencia, intensidad, ciclo, tiempo de aplicación, y por supuesto del modelo animal utilizado [53]. Las técnicas de microscopia tales como microscopía electrónica de barrido y microscopía electrónica de transmisión han sido utilizadas para revelar alteraciones en la estructura de la piel. En este trabajo, la superficie de la piel fue observada por microscopia electrónica de barrido, con el fin de determinar cualquier alteración visible en la piel pretratada con sonoforesis. En la Figura 18 se muestran las micrografías de dos de las condiciones de sonoforesis probadas (Tabla 9): La condición 8 presentó un bajo incremento en la temperatura de la piel y uno de los valores más bajos de TEWL, mientras que la condición 5 presentó el mayor

incremento de temperatura y de TEWL. De acuerdo con esto, se esperaba que el tratamiento de la piel con sonoforesis se reflejara en un cambio estructural de la superficie de la piel. Como se puede observar en la Figura 18A, la piel intacta presenta una superficie bastante lisa, mientras que en las imágenes de la piel pretratada con sonoforesis, la superficie ya no es tan lisa, especialmente para la condición 5, con un tiempo de exposición de 5 min, 100% de amplitud y un ciclo continuo. Aunque en ambos casos parece que la aplicación de ultrasonido desorganiza la capa más externa del estrato córneo, esto es más evidente en la condición 5, que puede estar relacionado con el resultado del aumento de temperatura (aproximadamente 9 °C) y el aumento de TEWL (alrededor de 2.4 veces más comparada con la piel intacta), tal como se muestra en la Tabla 9. Sin embargo, aunque esta última condición podría promover el paso de mayor cantidad de AZT a través de la piel, los estudios de permeabilidad no se llevaron a cabo con esta condición debido al gran aumento de temperatura en la piel.

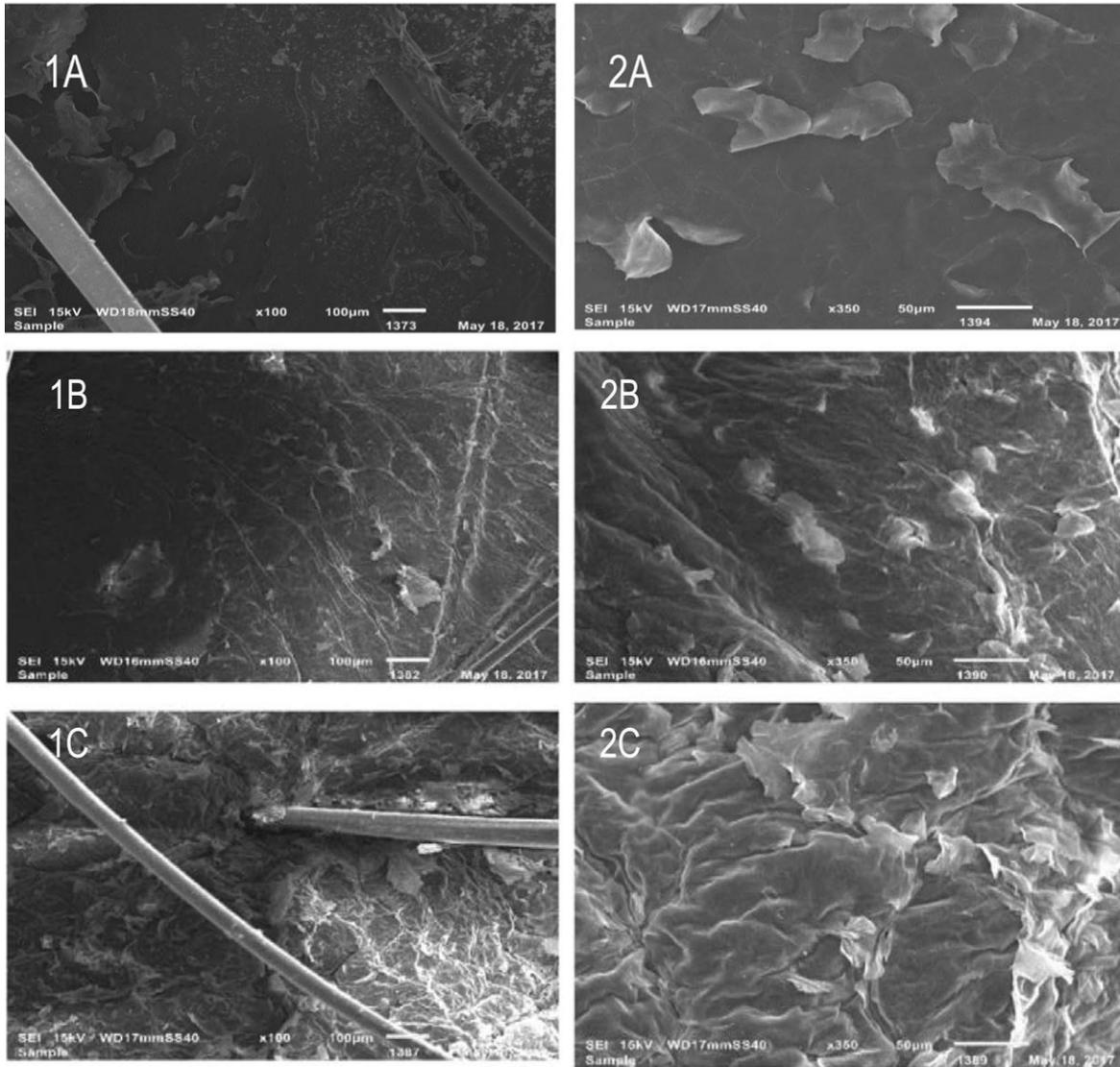


Figura 18. Micrografías de piel de cerdo obtenidas por SEM. A) Piel intacta (sin tratamiento); B) piel pre-tratada con sonoforesis (A= 20%, c= 0.5, t= 2 min); C) piel pre-tratada con sonoforesis (A= 100%, c= 1.0, t= 5 min). El número 1 se refiere a una amplificación de 100X (la barra corresponde a 100 μm), y el número 2 se refiere a una amplificación de 350X (la barra corresponde a 50 μm).

Otros autores han estudiado los cambios histológicos en la piel cuando aplican sonoforesis bajo diferentes condiciones de intensidad, ciclo y tiempo de tratamiento. Por ejemplo, Yamashita y cols. [51], encontraron un desprendimiento total del estrato córneo en piel de ratón, así como la formación de poros, una vez que la piel fue expuesta a ultrasonido durante 5 min a 48 kHz y 0.5 W/cm²; mientras que en piel humana, solo observaron un ligero desprendimiento de queratinocitos alrededor de los folículos pilosos. Boucaud y cols. [52], reportaron desprendimiento epidérmico y edema en la dermis superior al aplicar ultrasonido con una frecuencia de 20 kHz y una intensidad de 5.2 W/cm² en modo de pulsaciones, e incluso quemaduras con intensidades más altas, en estudios *in vitro* utilizando piel humana con el espesor completo. Estos autores no encontraron cambios en la estructura de la piel cuando aplicaron ultrasonido con intensidades menores a 2.5 W/cm². Los autores atribuyeron estos efectos principalmente a la cavitación y no al aumento de temperatura en la piel. Es importante tener en mente que las alteraciones en la piel causadas por la sonoforesis no se limitan solo a alteraciones visibles en la superficie de la piel. Otras alteraciones pueden ocurrir dependiendo del tipo de tratamiento (por ejemplo, tiempo de aplicación, ciclo, intensidad, frecuencia, etc.) incluidas, por ejemplo, extracción de lípidos, desprendimiento de la dermis y degeneración de fibras de colágeno.

6.8. Espectroscopia FTIR-ATR

La espectroscopia infrarroja es una de las técnicas más utilizadas para revelar el estado de la permeabilidad de la barrera de la piel y el efecto de los promotores de absorción, tanto químicos como físicos, sobre la estructura de los componentes de la membrana (es decir, lípidos y proteínas). En el presente trabajo, se corrieron los espectros infrarrojos de la piel tratada con LSS durante 2 y 5 min, así como con sonoforesis bajo las distintas condiciones probadas. Estos espectros se compararon con los obtenidos en piel intacta. Se analizaron las bandas relacionadas con proteínas que aparecen cerca de 1645 cm⁻¹ (Amida I) y 1540 cm⁻¹ (Amida II); así como las bandas relacionadas con los lípidos que se observan cerca de 2920 cm⁻¹

y 2850 cm^{-1} , correspondientes al estiramiento simétrico y asimétrico de las cadenas alquílicas hidrofóbicas. En la Figura 19A se muestran los espectros correspondientes a la piel intacta, piel tratada con LSS durante 5 min y piel tratada con sonoforesis. En la figura 19B se muestra la relación del número de onda de la piel tratada (con LSS o con sonoforesis)/ número de onda de la piel intacta. En este sentido, un valor de 1 indica que la posición de estas bandas no cambió al tratar la piel, mientras que valores distintos de 1 se asocian con un cambio en el número de onda de las bandas. En el caso de bandas asociadas con los lípidos, la posición espectral proporciona información del empaquetamiento del grupo acilo de los lípidos, así como su orden conformacional, por ejemplo, la isomería trans-gauche. En general, se supone que un cambio hacia frecuencias mayores está relacionado con el desorden de los lípidos (mayor proporción de isómeros gauche) que se conoce como “fluidización”. Un cambio hacia frecuencias más bajas, por otro lado, es indicativo de un orden superior en la membrana. [53] Los resultados de la Figura 19B muestran que con excepción de la banda de la Amida II, no hubo desplazamiento en el resto de las bandas. La banda de la Amida II mostró cambios hacia números de onda menores, de aproximadamente entre 4 y 13 unidades, lo que algunos autores lo atribuyen a los cambios en la estructura secundaria de las proteínas [54]. Estos cambios parecen estar relacionados con el aumento de la permeabilidad de la AZT. Como se verá más adelante, las condiciones 2 y 4 (Tablas 9 y 10) son las que presentaron los valores más altos de J, Kp y cantidad total permeada, estando también entre aquellos donde los desplazamientos de la banda correspondiente a la Amida II son mayores. Por lo que no se descarta que la posibilidad de un aumento en la permeabilidad, esté asociado con una modificación en la estructura de las proteínas, debido al efecto de la sonoforesis. Algunos autores también reportan un aumento en la permeabilidad debido a la extracción intercelular de lípidos, resultado de la cavitación, fenómeno que se refleja como una disminución en el área bajo la curva de las bandas. Sin embargo, como afirman Álvarez- Román y cols. [55] en este trabajo esto no se pudo demostrar, ya que los espectros corresponden solo a la parte más externa del estrato córneo y no a la membrana completa.

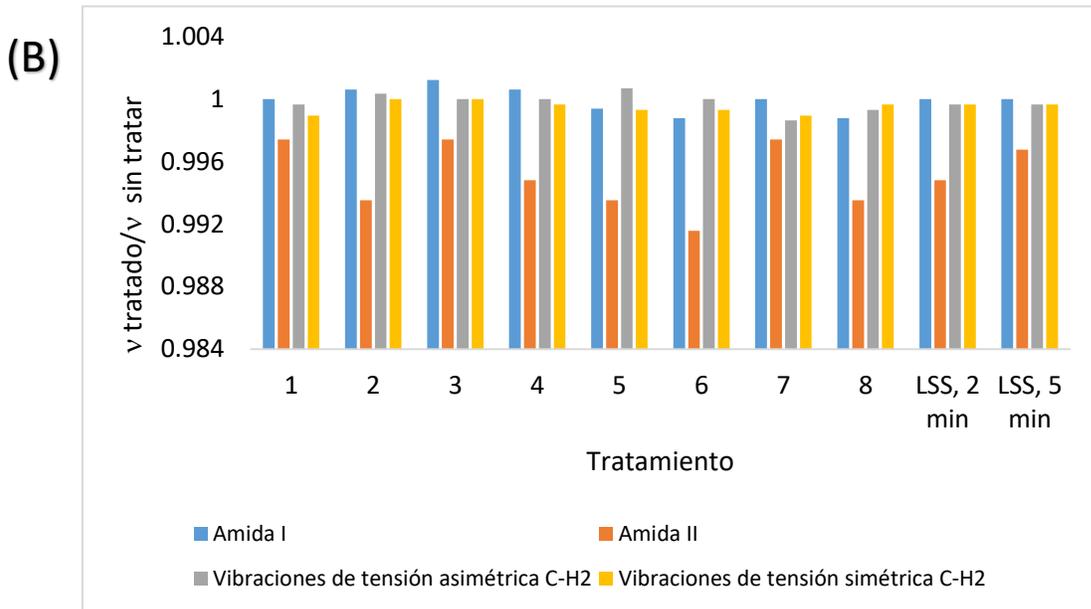
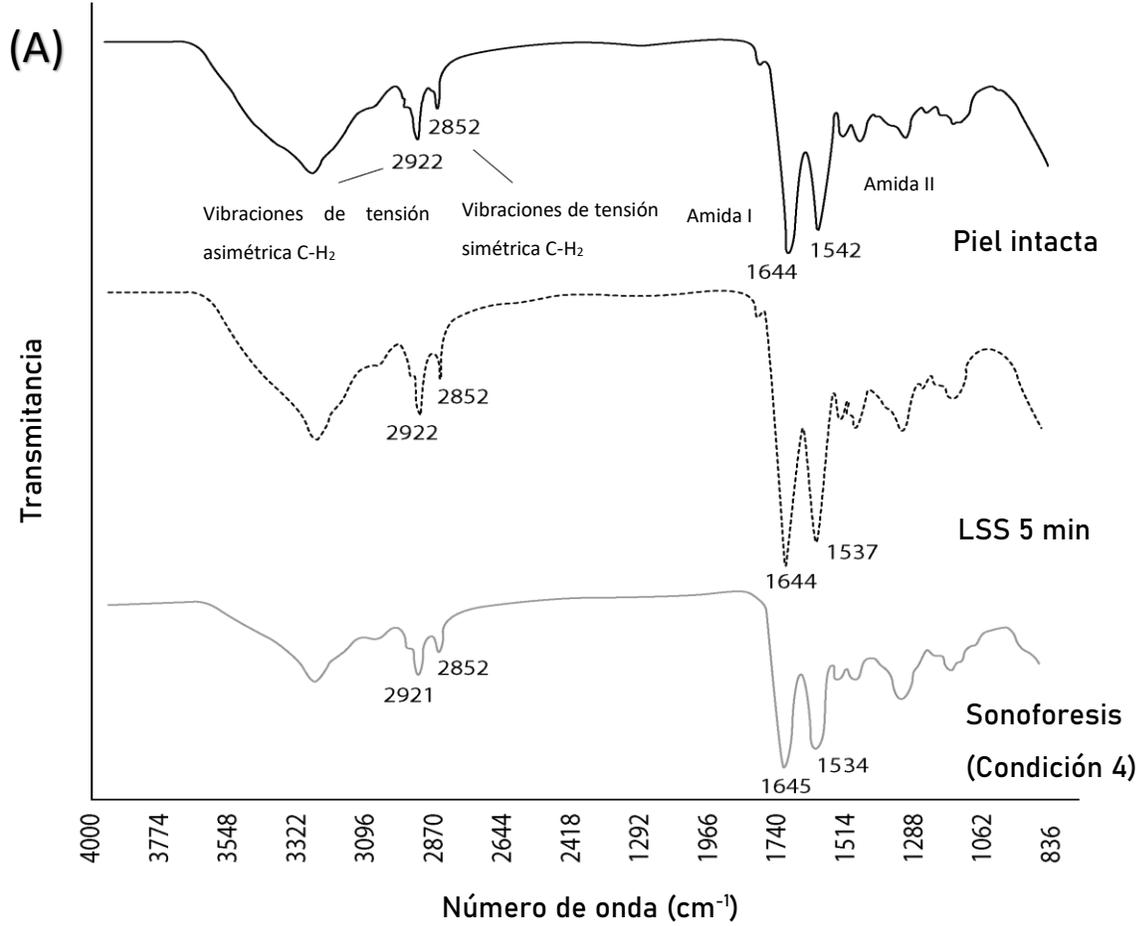


Figura 19. (A) Representación del espectro FTIR-ATR de piel de oreja de cerdo tratada con: Sonoforesis (Condición 4: A= 20%, t= 2 min, c= 1.0), y con LSS durante 5 min. Para efectos de comparación, se incluye el espectro de la piel intacta. (B) Relación del número de onda de la piel tratada con sonoforesis bajo las condiciones probadas o LSS (v tratado) y el número de onda de la piel intacta (v sin tratar).

6.9. Permeaciones *in vitro* de zidovudina a través de piel de cerdo

El interés de este trabajo se centró en el estudio y comparación del efecto de dos promotores físicos, microagujas y sonoforesis, sobre el transporte de AZT, para poder proporcionar información sobre su posible aplicación en la administración de este fármaco a través de la piel. Por lo que se realizaron permeaciones de AZT a través de piel intacta (piel no tratada); piel pretratada con microagujas sólidas (200 μm) y piel pretratada con sonoforesis. En la Figura 20 se muestran los perfiles de permeación y en la Figura 21 se incluye la cantidad de AZT en la solución receptora a las 24 h, la cantidad retenida en piel al final de los estudios de permeación, así como la cantidad total permeada (es decir, AZT en el receptor + AZT retenida en piel).

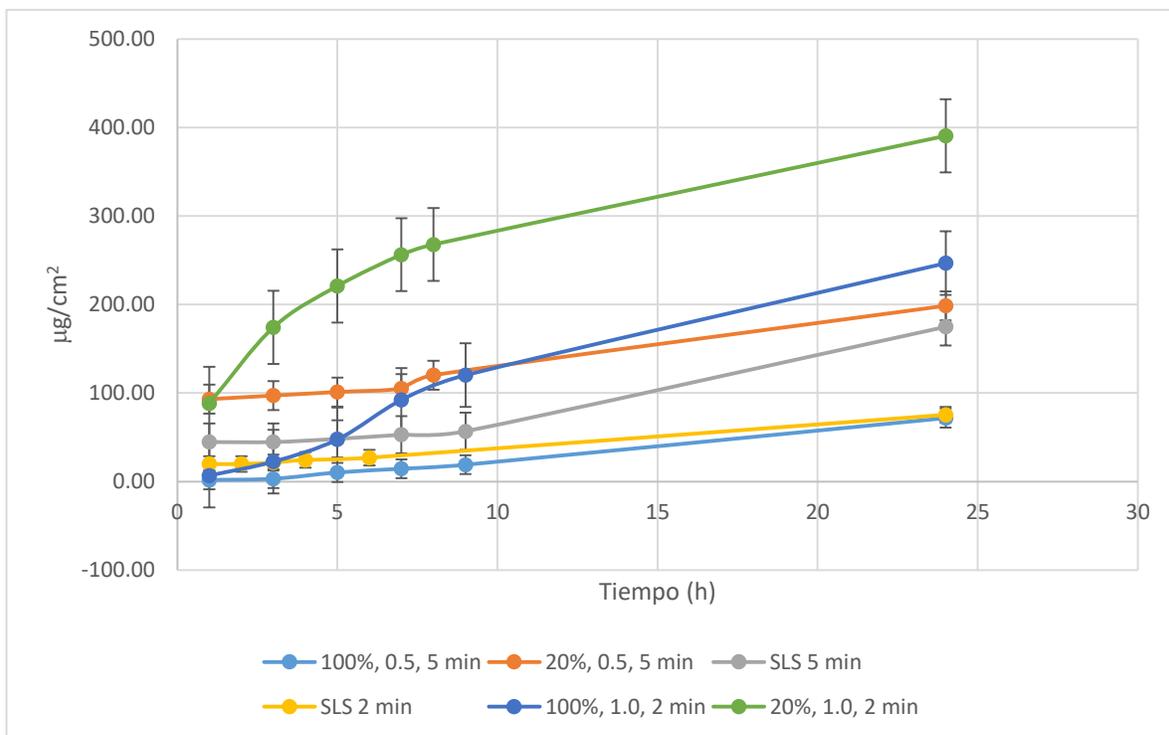


Figura 20. Resultados de la permeación de ATZ a través de la piel de la oreja de cerdo sometida a diferentes tratamientos: Lauril Sulfato de Sodio (LSS) 1% (p/v) durante 2 y 5 min; sonoforesis bajo diferentes condiciones de amplitud, tiempo de aplicación y ciclo; y microagujas. Los puntos corresponden al promedio de los resultados y las barras de error representan la desviación estándar (n=6).

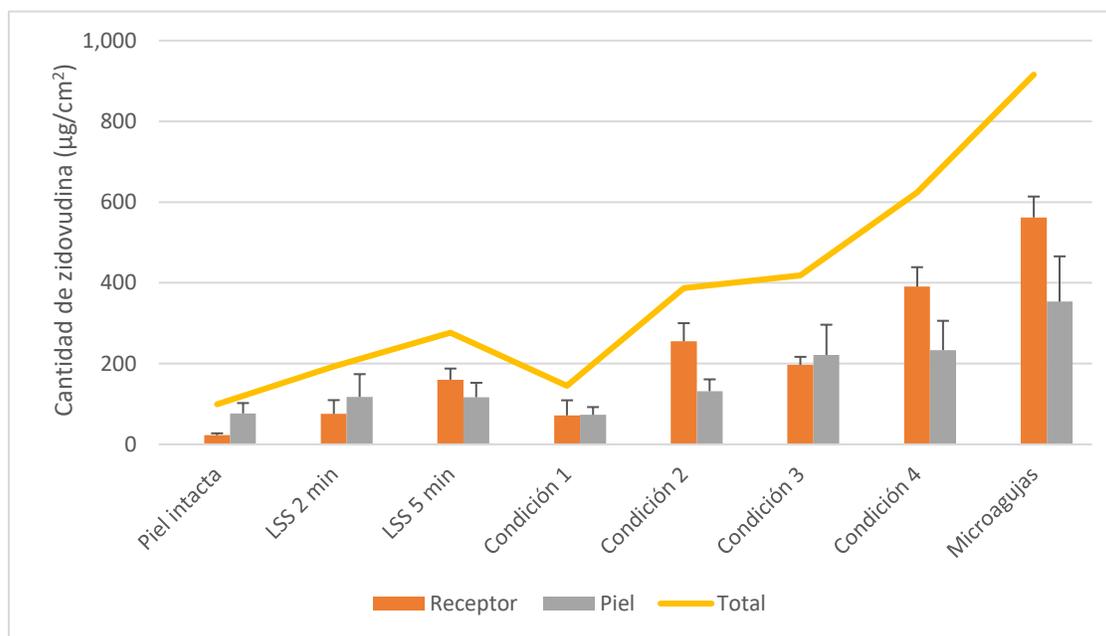


Figura 21. Resultados de la cantidad de ATZ al final de los estudios de permeación (24 h). En el medio receptor, retenido en la piel, y la cantidad total permeada (cantidad en el receptor + cantidad retenida en piel).

Las permeaciones se llevaron a cabo reemplazando la solución receptora periódicamente hasta las 8 h, y posteriormente a las 24 h. En el caso de la piel intacta, el fármaco se encontró en el medio receptor solo en la muestra de 24 h (Tabla 14, Figura 21), lo que muestra que la cantidad de AZT capaz de penetrar a través de la piel es muy baja (Cantidad acumulada en el receptor= $22.76 \pm 4.7 \mu\text{g}/\text{cm}^2$). Esta cantidad coincide con la reportada por Takmaz y cols. [56], quienes encontraron una cantidad permeada de AZT de $24 \mu\text{g}/\text{cm}^2$. Sin embargo, esta cantidad se encontró a las 8 h de la permeación, lo que puede atribuirse a que la piel de rata tiene mayor permeabilidad en relación con la piel de cerdo [57]. Otros autores como Oh y cols. [58] cuantificaron la cantidad de AZT en el medio receptor, encontrando una cantidad acumulada de $44 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ a las 24 h para una solución de ATZ de 10 mg/mL, y de $82 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ para una solución de AZT de 20 mg/mL. La diferencia en la cantidad permeada encontrada por estos autores en relación con lo encontrado en este trabajo se atribuye fundamentalmente al hecho de que usaron

piel de ratón, y que la concentración de AZT fue mayor (en el presente trabajo se utilizó una solución de AZT de 2 mg/mL). Obviamente, la cantidad permeada es mayor a medida que aumenta la concentración de AZT, como también lo ha informado Seki y cols. [59]. Prácticamente todos los autores han encontrado una baja permeabilidad de AZT a través de la piel con más o menos largos tiempos de latencia largos, dependiendo del vehículo. Por ejemplo, Kumar Narishetty y Panchagnula [60] y Tomas y Panchagnula [61], reportan flujos de $11.7 \mu\text{gcm}^{-2}\text{h}^{-1}$ y $23.4 \mu\text{gcm}^{-2}\text{h}^{-1}$ así como un tiempo de latencia de 14.2 y 46.9 h, respectivamente, para una solución acuosa de AZT de 50 mg/mL. En nuestro caso no fue posible obtener un valor de flujo, ya que como se mencionó, la AZT solo se logró cuantificar en el medio receptor a las 24 h.

6.10. Estudios de permeación de zidovudina en piel pretratada con sonoforesis

Las frecuencias bajas de sonoforesis han mostrado ser más efectivas en la promoción del transporte de fármacos a través de la piel, reduciendo el tiempo de latencia. La sonoforesis se puede aplicar simultáneamente (junto con el fármaco), o pretratando la piel antes de aplicar el fármaco [62]. En este trabajo, se decidió pretratar la piel, considerando que el pretratamiento con sonoforesis permite aumentar la permeabilidad de la piel durante un periodo de tiempo, en el cual es posible administrar un fármaco. Generalmente, la aplicación de la sonoforesis implica el uso de un medio de acoplamiento, es decir, un líquido presente entre el transductor del ultrasonido y la piel, que generalmente consiste en una solución acuosa de un tensoactivo. En este trabajo se utilizó como medio de acoplamiento una solución acuosa de Lauril Sulfato de Sodio (LSS) al 1% (p/v). Mitragotri [63] mostró que la adición de LSS como medio de acoplamiento, provoca un aumento lineal en la permeabilidad de la piel en un rango de concentración de LSS de 0-1%. Cabe mencionar que el LSS ha sido aprobado por la FDA para su uso en diversos cosméticos y productos farmacéuticos.

En este trabajo, se evaluó la influencia de la amplitud, ciclo y tiempo de aplicación, de acuerdo al diseño de experimentos 2³. Para cada condición, se evaluó el incremento de temperatura en la superficie de la piel y la medida de pérdida de agua transepidérmica (TEWL). Se supone que un aumento de TEWL implica una mayor permeabilidad de la piel [64], por lo que, de las diferentes condiciones evaluadas, se eligieron aquellas que presentaron un mayor incremento en el valor de TEWL. De acuerdo con los resultados mostrados en la Tabla 9, las condiciones 1, 2, 3 y 4 presentaron el mayor incremento en el TEWL, sin que hubiera un aumento significativo en la temperatura, y a pesar de que otras condiciones como la 5 presentaron un mayor valor de TEWL, está no fue seleccionada, debido al alto incremento de temperatura que registró [65, 66]. De acuerdo a estos resultados, los estudios de permeabilidad con sonoforesis se realizaron bajo las condiciones 1, 2, 3 y 4. Como puede verse en la Tabla 10, al utilizar un ciclo de 1 (condiciones 2 y 4) se favorece el transporte de AZT a través de la piel, obteniendo valores más altos para el flujo (J) y coeficiente de permeabilidad (Kp) que con un ciclo de trabajo de 0.5 (Condiciones 1 y 3).

En cuanto a la cantidad permeada en el medio receptor a las 24 h, el promedio también fue mayor para un ciclo de trabajo de 1.0, mostrando una diferencia significativa ($p < 0.05$) entre todos los tratamientos, a excepción de la piel intacta vs condición 1, y condición 2 vs condición 3 (ver ANOVA y prueba de comparaciones múltiples en Anexo 2). El ciclo se refiere al tiempo que el ultrasonido está encendido. En este sentido, un ciclo de trabajo de 1.0 implica una aplicación continua de ultrasonido, mientras que en un ciclo de trabajo de 0.5 la aplicación es en pulsos, estando 50% del tiempo encendido y 50% del tiempo apagado.

Para la cantidad de AZT retenida en piel, se encontraron diferencias significativas ($p < 0.05$) entre la piel intacta vs condición 3, y condición 1 vs condiciones 2, 3 y 4. (ver ANOVA y prueba de comparaciones múltiples en Anexo 2) Comparando las cuatro condiciones evaluadas, la condición 4 (A= 20%, t= 2 min, c= 1.0) mostró el mayor transporte de AZT, obteniendo el mayor J, Kp y cantidad permeada (Tabla 10, Figura 21).

Tabla 10. Parámetros de permeación de zidovudina a través de piel de cerdo (promedio \pm S.D., n=6)

Parámetro	Piel intacta	Pretratamiento con LSS		Sonoforesis utilizando LSS como medio de acoplamiento				Microagujas
		5 min	2 min	Condición 1	Condición 2	Condición 3	Condición 4	200 μ m
				A= 100%, t= 5 min, c= 0.5	A= 100%, t= 2 min, c= 1.0	A= 20%, t= 5 min, c= 0.5	A= 20%, t= 2 min, c= 1.0	
J de 1 a 7 h (μ gcm ⁻² h ⁻¹)	-	1.89 \pm 1.40	1.46 \pm 2.02	2.51 \pm 1.003	14.06 \pm 4.01	1.97 \pm 1.69	27.52 \pm 4.08	30.41 \pm 6.64
K _p x 10 ⁻³ (cm/h)	-	0.945	0.73	1.25	7.03	0.98	13.76	15.21
AZT en el receptor a las 24 h (μ g/cm ²)	22.76 \pm 4.70	160.19 \pm 27.61	75.41 \pm 32.43	71.75 \pm 37.46	255.32 \pm 44.89	196.88 \pm 19.89	390.57 \pm 48.32	562.10 \pm 51.73
AZT retenida en piel a las 24 h (μ g/cm ²)	76.62 \pm 25.77	173.72 \pm 73.40	160.95 \pm 59.66	72.97 \pm 19.49	131.71 \pm 29.40	221.39 \pm 74.96	296.42 \pm 65.10	353.58 \pm 112.14

Lauril Sulfato de Sodio (LSS); amplitud (A); tiempo (t), ciclo (c), Flujo (J); coeficiente de permeabilidad (K_p= J/Co); Co= Concentración de zidovudina en el compartimento donador.

Sin embargo, a pesar de que la condición 4 muestra los mejores resultados en cuanto al transporte de AZT a través de la piel, aparentemente no hubo una relación directa entre los datos obtenidos de la permeación y los valores de TEWL, ya que como se puede observar en las tablas 9 y 10, de las cuatro condiciones probadas, fue la condición 4 la que tuvo un valor promedio de TEWL más bajo. No obstante, al realizar un ANOVA y una prueba de comparaciones múltiples para los valores de TEWL obtenidos con todas las condiciones probadas (Anexo 2, Tablas 24 y 25), se encontró que si hay una diferencia significativa en la TEWL de piel intacta y la condición 4. Como se mencionó se utilizó LSS como medio de acoplamiento, para el pretratamiento con sonoforesis, por lo que estábamos interesados en determinar si usar solo LSS tendría algún impacto en el transporte de AZT. Por lo tanto, se realizaron permeaciones en piel pretratada con LSS (sin aplicar sonoforesis), probando dos tiempos de contacto, 2 y 5 min. El LSS es conocido por sus propiedades como promotor de la absorción. [67, 68] En la Tabla 10 se puede observar que el paso de AZT a través de la piel se ve favorecido al pretratar la piel con LSS, comparado con la piel intacta (sin tratar). Con un tiempo de contacto de 5 min, la cantidad total permeada se incrementa 7 veces, comparada con la piel intacta. El tiempo de contacto también es importante, ya que los valores de J y K_p , fueron 1.3 veces más altos con un tiempo de contacto de 5 min, comparados con un tiempo de contacto de 2 min, y la cantidad total permeada fue 2 veces mayor con 5 min en relación con 2 min. En cuanto a los valores de TEWL (Tabla 9), se observa que para tiempos de contacto de 2 y 5 min con LSS, estos son muy parecidos a los de piel intacta, sin que se encontraran diferencias significativas entre ellos (Anexo 2, Tablas 24 y 25), lo cual afirma que no necesariamente hay una relación directa entre TEWL y permeabilidad. En contraste, la cantidad retenida en piel al final de la permeación, para estos tiempos de contacto fue prácticamente la misma. Según Dragicevic y cols. [35], el efecto potenciador de los tensioactivos aniónicos, como el LSS se puede atribuir a su interacción con las estructuras lipídicas y proteicas de la piel. Aunque algunos autores han reportado un efecto sinérgico entre LSS y sonoforesis [27, 29, 34], la condición 1 ($c= 0.5$, $t= 5$ min) mostró un valor más bajo de la cantidad total permeada en relación con un tratamiento solo con LSS durante

5 min (Tabla 10, Figura 21). De hecho, de todos los tratamientos, la condición 1 resultó en la menor cantidad de AZT permeada hacia y a través de la piel. Las condiciones 2 y 4 (ciclo de trabajo de 1.0, tiempo de aplicación de 2 min) incrementaron el transporte de AZT en relación con el tratamiento sólo con LSS, siendo la condición 4, como ya se mencionó, la que lo incrementó más. Varios mecanismos de acción explican el efecto promotor de la sonoforesis, tales como: (i) cavitación; (ii) convección; (iii) efectos térmicos (en general el aumento de temperatura está relacionado con la intensidad del ultrasonido y el ciclo de trabajo); (iv) extracción de lípidos; (v) hidratación del estrato córneo (el ultrasonido puede aumentar la fracción de regiones acuosas en el estrato córneo) [35]. De todos ellos, la cavitación parece ser la más importante. Se ha informado que durante la cavitación, el colapso de las burbujas en la solución da como resultado la formación de una onda de choque, causando la desorganización de la bicapa lipídica del estrato córneo. Esta pérdida en la integridad estructural de los lípidos favorece la penetración del medio de acoplamiento en el estrato córneo y por lo tanto la inserción de LSS en la bicapa lipídica. Por lo tanto, la incorporación de agua y surfactante dentro de la bicapa lipídica, ayuda a aumentar la desorganización de esta, abriendo así vías para la permeación del soluto [66, 69].

Diferentes autores han probado el uso de promotores físicos para promover el transporte de AZT a través de la piel. Entre ellos, Wearley y Chien [23] encontraron que el flujo de AZT fue tres veces mayor usando iontoforesis que por difusión pasiva. Estos autores reportaron que el flujo aumentaba 75 veces sobre la piel humana cuando se usa N-decilmethylsulfóxido como promotor de la permeación, sin observar un efecto sinérgico al combinarlo con la iontoforesis. Takmaz y cols. [56] ha estudiado el paso transdérmico de AZT formulado en películas poliméricas a través de piel dorsal de ratas Wistar de espesor completo. Los autores evaluaron el efecto de la iontoforesis (0.1 y 0.5 mA/cm²) vs un tratamiento con soluciones alcohólicas de DMSO (al 1% y 5% p/p). En general, los resultados mostraron una relación de mejora más alta para aplicaciones de corriente de 0.5 mA/cm² (cantidades acumuladas de AZT de 72.5 µg/cm² para una solución de 2 mg/mL y de 60.35

$\mu\text{g}/\text{cm}^2$ para la AZT incluida en una película). En este caso, la cantidad permeada fue muy inferior a la cuantificada en nuestro trabajo (Tabla 10).

Oh y cols. [58] también estudiaron el efecto de la iontoforesis en la permeación de la AZT a través de piel de ratón sin pelo de espesor completo. Los autores encontraron que el flujo aumentó 40 veces al utilizar iontoforesis, dependiendo de la densidad de corriente eléctrica, en relación con la difusión pasiva. Asimismo, confirmaron el efecto sinérgico de la iontoforesis y promotores químicos tales como ácido oleico/propilenglicol. En este caso los autores reportaron valores de flujo superiores a los obtenidos en este trabajo. Por ejemplo para una densidad de corriente de $0.5 \text{ mA}/\text{cm}^2$ con una concentración de AZT de $20 \text{ mg}/\text{mL}$, el flujo fue de $109.3 \mu\text{gcm}^{-2}\text{h}^{-1}$. Esto es de 3.6 a 3.9 veces mayor que el flujo obtenido con microagujas y con la condición 4 de sonoforesis, respectivamente. Los autores encontraron que la formulación de AZT en matrices de goma karaya que contienen ácido oleico/propilenglicol aumentó drásticamente el flujo hasta $391.2 \mu\text{gcm}^{-2}\text{h}^{-1}$, con cantidades totales permeadas de más de $8000 \mu\text{gcm}^{-2}$. Comparando los resultados obtenidos por Oh y cols. [58] con los del presente trabajo, conviene tener en cuenta que el modelo animal era diferente, además la concentración de AZT en el compartimento donador fue mucho más alta, y la aplicación de iontoforesis se produjo a lo largo de los estudios de permeación. En nuestro caso se aplicó la sonoforesis como pretratamiento durante un tiempo máximo de 5 min.

Pelucio-Lopes y cols. [70] estudiaron la permeación de AZT a través de extirpados de piel humana y piel de ratón sin pelo, aplicando ultrasonido en modo continuo, con una intensidad de $1.5 \text{ W}/\text{cm}^2$ y una frecuencia de 1.1 MHz durante 20 min. Es importante mencionar que los autores mantuvieron la temperatura del compartimento donador de las celdas de Franz a $28 \text{ }^\circ\text{C}$ mediante un recirculador de agua. Esto destaca el efecto térmico causado por el ultrasonido, y por lo tanto el daño potencial que puede causar en la piel si las condiciones de aplicación no están controladas [66]. Los autores no encontraron diferencias en los flujos obtenidos para la piel tratada con ultrasonido y el control (piel intacta) y atribuyen este hecho a la supresión del efecto térmico de la piel. Hoy en día, es bien sabido que los

ultrasonidos de baja frecuencia (frecuencias por debajo de 100 kHz) son más eficaces en la promoción de los fármacos a través de la piel. No obstante, la frecuencia utilizada por estos autores puede ser clasificada en un rango de frecuencias desde medio a alto, y sus aplicaciones son principalmente en el área de la fisioterapia o diagnóstico, mostrándose ineficaz como promotor de la absorción [71-73].

6.11. Estudios de permeación de zidovudina en piel pretratada con microagujas

A pesar del efecto promotor favorable observado con la condición 4 de sonoforesis, el transporte del fármaco mejoró significativamente al utilizar microagujas, cuyo uso para atravesar el estrato córneo ha sido ampliamente explicado [e.g., 73-75]. Comparando los resultados de las microagujas con los de la condición 4, se obtuvieron los siguientes incrementos: 1.1 veces para el J y K_p (para las primeras 7 h), y aproximadamente 1.5 veces para la cantidad permeada a la solución receptora a las 24 h, así como la cantidad retenida en piel. Se encontraron diferencias significativas entre la condición 4 y las microagujas para estos dos parámetros con una $p < 0.05$. Es más, comparando los resultados de la piel pretratada con microagujas vs la piel intacta, se observó un aumento de casi 25 veces en el total de la cantidad permeada en el receptor a las 24 h, sin tiempo de latencia, y un aumento del doble en la TEWL, de acuerdo a los resultados mostrados en las Tablas 9 y 10, con una diferencia significativa entre la TEWL de piel intacta vs microagujas (Anexo 2, Tablas 24 y 24). Por otra parte, como penetró una mayor cantidad de AZT, la cantidad retenida en piel al final de los estudios de permeación aumentó en promedio 4.6 veces (Tabla 10, Figura 21). De todos los tratamientos estudiados, el pretratamiento con microagujas resultó ser el mejor promotor físico para este fármaco.

Para lograr una concentración terapéutica en plasma de $0.3 \mu\text{g/mL}$, algunos autores como Kumar y Panchagnula [76] han calculado que se requiere de un flujo de $500 \mu\text{gcm}^{-2}\text{h}^{-1}$; otros como Suwanpidokkul y cols. [77] consideran un flujo de $208 \mu\text{gcm}^{-2}\text{h}^{-1}$. En cualquier caso, aunque el flujo obtenido en este trabajo al pretratar la piel con sonoforesis o microagujas, está lejos de los valores reportados por estos autores, se esperaría un aumento del flujo al: (i) utilizar una mayor concentración del fármaco; (ii) modificar el esquema de aplicación de la sonoforesis; (iii) combinar la sonoforesis con alguna formulación que contenga promotores químicos para lograr un efecto sinérgico; (iv) formular la AZT en un sistema de administración

transdérmica con microagujas, con el fin de promover el paso continuo del fármaco a través de la piel.

7. CONCLUSIONES

En este trabajo se desarrollaron y validaron métodos analíticos por HPTLC y por espectrofotometría UV, los cuales permitieron cuantificar AZT durante los estudios de permeación y garantizar la estabilidad de las soluciones del fármaco almacenadas antes de su análisis.

Se eligieron las condiciones óptimas para la aplicación de la sonoforesis, mediante un pretratamiento, a través de un diseño de experimentos, evaluando el efecto de la amplitud, ciclo de trabajo y tiempo de contacto.

Se comparó el efecto del pretratamiento con sonoforesis y con microagujas sobre el transporte de AZT a través de la piel, mediante estudios de permeación in vitro, encontrando los siguientes resultados: La permeabilidad de AZT a través de la piel intacta fue muy baja debido a sus propiedades fisicoquímicas. El pretratamiento de la piel con sonoforesis aumentó el pasó de AZT, reduciendo significativamente el tiempo de latencia, encontrando que con una amplitud del 20%, y un tiempo de aplicación de 2 min en modo continuo, se presentó el flujo más alto y la mayor cantidad total permeada durante las primeras 7 h. El uso de microagujas aumentó aún más el flujo y la cantidad total permeada, con relación a la sonoforesis.

El efecto de la sonoforesis se constató además mediante técnicas como FTIR-ATR, encontrando una relación entre el desplazamiento hacia números de onda menores de la banda correspondiente a Amida II y el incremento en la permeabilidad de AZT. Por otro lado, la microscopía electrónica de barrido evidenció alteraciones superficiales en piel pretratada con sonoforesis y con microagujas en relación a la piel intacta.

Aunque los resultados de este trabajo son alentadores en términos de promover el transporte de la zidovudina a través de la piel usando sonoforesis o microagujas como promotores físicos, se deben realizar más estudios, considerando los factores que afectan su desempeño, con el fin de lograr valores de flujo que garanticen concentraciones plasmáticas efectivas. No obstante, los resultados obtenidos en

este estudio serán útiles en el desarrollo de un sistema de liberación transdérmico efectivo para la zidovudina.

8. CONGRESOS

A continuación se enumeran los congresos en los que se presentó alguna parte de este trabajo:

1. HPTLC, International Symposium for High-Performance Thin-Layer Chromatography. Cartel: "Validation of an HPTLC method for the determination of zidovudine during *in vitro* permeation studies". Berlin, Alemania: julio 2017.
2. Tercer Congreso Ciencia, Educación y Tecnología. Cartel: "Comparación de la permeación *in vitro* de zidovudina a través de piel intacta y mediante el uso de microagujas". Cuautitlán, México: julio 2017.
3. L Congreso Nacional de Ciencias Farmacéuticas. Cartel: "Permeación *in vitro* de una solución de zidovudina a través de piel de cerdo pretratada con microagujas sólidas. Tequila, Jalisco: septiembre 2017.
4. QUIMIUNAM. Cartel: "Permeación *in vitro* de una solución de zidovudina a través de piel pretratada con microagujas". Ciudad Universitaria, México: agosto 2018

9. ARTÍCULO

Irene de Jesús Martínez-Segoviano, Flora Adriana Ganem-Rondero, Enhancement of the transdermal delivery of zidovudine by pretreating the skin with two physical enhancers: microneedles and sonophoresis. DARU Journal of Pharmaceutical Sciences 2021; 29: 279-290. ISSN: 2008-2231 (Electrónico). <https://doi.org/10.1007/s40199-021-00402-y>

10. ANEXO 1: VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS

En el anexo se describen brevemente cada uno de los parámetros que se evaluaron en la validación de los métodos analíticos que se emplearon en el presente trabajo.

Especificidad

Durante el desarrollo del método, fue importante detectar si existía alguna interferencia debida a la matriz biológica (en este caso, piel de cerdo) que pudiera interferir con la cuantificación de la AZT. Para ello se analizó un blanco, el cual se preparó de la siguiente forma: [48, 49]

- Validación del método para cuantificar AZT durante los estudios de permeación: se prepararon 500 mL de PBS pH 7.4 y se colocaron en un vaso de precipitados de 600 mL. Este medio se puso en contacto con la parte interna de piel de cerdo, con agitación mecánica constante, durante 24 h. La intención fue simular las condiciones de la permeación con las celdas de Franz, donde el medio receptor está en contacto con la piel.
- Validación del método para cuantificar AZT remanente en piel: a 500 mL de etanol (en un vaso de precipitados) se agregó piel de cerdo cortada en fragmentos, con agitación mecánica constante durante 24 h.

En ambos casos, una vez transcurridas las 24 h, la solución se se filtró a través de un pre-filtro de microfibra de vidrio (Whatman, Fisher Scientific, USA) y después a través de una membrana de nylon de 0.45 μm (Merck, Millipore Ltd, Irlanda). Posteriormente se realizó un barrido de 200 a 300 nm del blanco y se observó si aparecía alguna señal a la longitud de onda máxima de absorción del fármaco. Finalmente se comparó el barrido de los blancos con una solución muestra de AZT a una concentración conocida.

Linealidad

Para la linealidad se preparó una solución estándar de concentración conocida (solución stock) y se realizaron diluciones para obtener 5 niveles de concentración por triplicado. Al final se calculó el coeficiente de correlación, el coeficiente de determinación, los intervalos de confianza para el intercepto y para la pendiente. [48, 49]

Repetibilidad

Para la repetibilidad se prepararon tres niveles de por quintuplicado y se determinó el %C.V de cada nivel. [48]

Precisión intermedia

La precisión intermedia se realizó inter-día (es decir, día 1, día 2), para lo cual se prepararon 3 niveles de concentración por triplicado en diferentes días y se obtuvo el %C.V de cada nivel de concentración. [48]

Exactitud

Para la exactitud se prepararon 3 muestras independientes de 3 niveles de concentración y se obtuvo el % de recobro de cada muestra por nivel y el % C.V de cada nivel. [48]

Límite de detección y cuantificación [78]

El límite de detección se calculó con la siguiente fórmula:

$$LD = \frac{3\sigma}{S}$$

El límite de cuantificación se calculó con la siguiente fórmula:

$$QL = \frac{10\sigma}{S}$$

Donde:

σ = es la desviación estándar de la respuesta.

S= es la pendiente de la curva de calibración.

La pendiente S se determinó a partir de la regresión lineal de la curva de calibración del analito y la σ se determinó de la respuesta del blanco.

11. ANEXO 2: TABLAS DE RESULTADOS

11.1. Estudios de permeación

A continuación se muestran los resultados de las permeaciones realizadas tratando la piel bajo las diferentes condiciones descritas en el documento, considerando que el área de la Celda de Franz utilizada fue de 0.7854 cm².

Cantidad de AZT en el medio receptor

Tabla 11. Resultados de la permeación en piel pretratada con sonoforesis bajo las condiciones: A= 100%, t= 5 min, c= 0.5

Tiempo / Número de muestra	Cantidad de AZT en el medio receptor (μg de AZT/cm ²)						Promedio	s
	1	2	3	4	5	6		
1 h	7.17	0.00	0.79	0.00	0.00	3.14	1.85	2.87
3 h	8.66	0.79	3.51	4.43	0.00	1.72	3.18	3.15
5 h	23.90	5.02	9.87	14.41	0.82	7.72	10.29	8.08
7 h	26.69	9.46	17.30	17.78	2.82	12.86	14.48	8.14
9 h	28.30	10.36	27.00	22.91	4.65	20.78	19.00	9.48
24 h	64.97	73.47	98.61	128.12	35.45	29.90	71.75	37.46

Tabla 12. Resultados de la permeación en piel pretratada con sonoforesis bajo las condiciones: A= 100%, t= 2 min, c= 1.0

Tiempo / Número de muestra	Cantidad de AZT en el medio receptor (μg de AZT/ cm^2)						Promedio	s
	1	2	3	4	5	6		
1 h	21.08	1.92	3.24	4.33	2.23	8.11	6.82	7.34
3 h	41.48	11.61	16.29	29.05	14.23	22.37	22.51	11.21
5 h	73.46	28.51	33.96	64.83	33.52	50.87	47.53	18.57
7 h	119.63	66.63	65.42	126.91	71.23	103.59	92.23	27.92
9 h	151.07	86.96	85.95	166.94	94.65	135.64	120.20	35.52
24 h	294.58	201.42	187.94	317.82	217.50	260.74	246.67	52.73

Tabla 13. Resultados de la permeación en piel pretratada con sonoforesis bajo las condiciones: A= 20%, t= 5 min, c= 0.5

Tiempo / Número de muestra	Cantidad de AZT en el medio receptor (μg de AZT/ cm^2)						Promedio	s
	1	2	3	4	5	6		
1 h	91.04	99.10	106.18	65.91	114.42	82.06	93.12	17.47
3 h	91.04	99.10	106.18	65.91	138.82	82.06	97.18	24.75
5 h	100.61	99.10	108.30	65.91	144.01	89.29	101.20	25.60
7 h	104.05	99.10	109.59	85.25	144.01	89.29	105.22	21.05
8 h	118.14	122.02	125.74	97.53	155.84	102.30	120.26	20.70
24 h	210.41	215.63	216.17	175.46	201.50	172.44	198.60	19.83

Tabla 14. Resultados de la permeación en piel pretratada con sonoforesis bajo las condiciones: A= 20%, t= 2 min, c= 1.0

Tiempo / Número de muestra	Cantidad de AZT en el medio receptor (μg de AZT/ cm^2)						Promedio	s
	1	2	3	4	5	6		
1 h	103.86	88.25	81.04	122.90	62.59	72.00	88.44	21.99
3 h	199.22	168.21	175.74	222.88	138.57	140.29	174.15	33.02
5 h	240.51	206.51	230.93	282.09	181.94	183.60	220.93	38.33
7 h	274.63	232.91	277.56	320.89	215.90	216.07	256.33	41.85
8 h	283.64	244.78	289.61	333.71	226.76	228.64	267.86	42.00
24 h	396.31	363.29	429.00	463.71	348.57	342.52	390.57	48.32

Tabla 15. Resultados de la permeación en piel pretratada con lauril sulfato de sodio (LSS) durante 2 min.

Tiempo / Número de muestra	Cantidad de AZT en el medio receptor (μg de AZT/ cm^2)						Promedio	s
	1	2	3	4	5	6		
1 h	0.00	12.27	8.92	46.15	44.91	6.76	19.83	21.54
3 h	0.00	12.27	8.92	46.15	44.91	6.76	19.83	21.54
5 h	2.38	12.27	8.92	52.61	44.91	8.02	21.52	22.85
7 h	16.21	15.00	8.92	52.61	44.91	9.05	24.45	19.76
9 h	19.69	16.30	8.92	56.52	44.91	15.50	26.97	20.38
24 h	118.96	63.62	30.54	84.91	83.86	70.60	75.41	32.43

Tabla 16. Resultados de la permeación en piel pretratada con lauril sulfato de sodio (LSS) durante 5 min.

Tiempo / Número de muestra	Cantidad de AZT en el medio receptor (μg de AZT/ cm^2)						Promedio	s
	1	2	3	4	5	6		
1 h	30.21	42.47	51.22	53.35	60.78	37.46	45.92	11.27
3 h	30.21	42.47	51.22	53.35	60.78	37.46	45.92	11.27
5 h	39.68	42.47	60.93	55.69	60.78	39.84	49.90	10.34
7 h	42.18	42.47	66.46	60.07	68.60	40.43	53.37	13.11
9 h	49.81	48.00	66.46	65.65	68.60	50.53	58.17	9.64
24 h	153.97	152.36	147.86	162.58	212.62	131.81	160.20	27.61

Tabla 17. Resultados de la permeación en piel pretratada con microagujas sólidas de 200 μm .

Tiempo / Número de muestra	Cantidad de AZT en el medio receptor (μg de AZT/ cm^2)						Promedio	s
	1	2	3	4	5	6		
1 h	148.11	130.12	146.23	151.12	121.86	161.60	143.17	14.57
3 h	220.22	215.77	245.07	219.87	204.11	219.01	220.67	13.40
5 h	266.80	314.42	313.53	264.38	258.10	268.88	281.02	25.78
7 h	310.65	364.77	367.79	298.30	305.72	307.61	325.81	31.63
8 h	339.58	385.78	394.24	312.87	323.14	320.28	345.98	35.31
24 h	532.61	577.06	638.46	497.71	597.33	529.42	562.10	51.73

Tabla 18. Resultados de la permeación en piel intacta a las 24 h.

Muestra	Cantidad de AZT en el medio receptor (μg de AZT/ cm^2)
1	29.85
2	21.06
3	27.10
4	19.97
5	17.47
6	21.12
Promedio	22.76
s	4.70

Cantidad de zidovudina retenida en piel

En la siguiente tabla se muestra la cantidad de AZT retenida en piel después de los estudios de permeación.

Tabla 19. Cantidad de AZT retenida en piel.								
Muestra	μg de AZT/ cm^2							
	Piel intacta	Cond. 1	Cond. 2	Cond. 3	Cond. 4	LSS 2 min	LSS 5 min	Microagujas
1	111.50	96.57	105.70	224.24	378.75	216.49	298.48	392.11
2	73.48	94.52	108.25	214.34	255.53	131.97	160.34	288.13
3	102.73	65.58	105.11	168.63	251.96	246.07	168.74	379.88
4	65.00	67.38	153.82	143.40	376.32	83.27	146.93	216.21
5	63.42	68.26	143.42	359.73	231.32	146.70	73.58	303.65
6	43.41	45.39	173.65	217.53	284.64	141.20	194.22	540.68
Promedio	76.59	72.95	131.66	221.31	296.42	160.95	173.72	353.44
s	25.77	19.44	29.39	74.93	65.10	59.66	73.40	112.10

11.2. Análisis estadístico

Zidovudina en el medio receptor

En la Tabla 20 se muestra el análisis de varianza (ANOVA) realizado para comparar la cantidad de AZT (μg) en el medio receptor a las 24 h. Los resultados muestran que existe una diferencia significativa ($p < 0.05$) entre los distintos tratamientos aplicados a la piel. La Tabla 21 presenta los resultados de la prueba de Tukey y entre qué tratamientos se encontraron diferencias significativas.

Tabla 20. Análisis de varianza de la cantidad total de AZT en el medio receptor a las 24 h.

Ordinary one-way ANOVA ANOVA results					
Are SDs significantly different ($P < 0.05$): Yes					
ANOVA table	SS	DF	MS	F (DFn, DFd)	P value
Treatment (between columns)	1221547	5	244309	F (5, 30) = 165.6	P<0.0001
Residual (within columns)	44260	30	1475		
Total	1265807	35			

Tabla 21. Prueba de Tukey de la cantidad total de AZT en el medio receptor a las 24 h.

Ordinary one-way ANOVA Multiple comparisons						
Number of families	1					
Number of comparisons per family	15					
Alpha	0.05					
Tukey's multiple comparisons test	Mean Diff.	95.00% CI of diff.	Below threshold?	Summary	Adjusted P Value	
Piel intacta vs. Condición 1	-49.02	-116.5 to 18.43	No	ns	0.2628	A-B
Piel intacta vs. Condición 2	-232.6	-300.0 to -165.1	Yes	****	<0.0001	A-C
Piel intacta vs. Condición 3	-174.1	-241.6 to -106.7	Yes	****	<0.0001	A-D
Piel intacta vs. Condición 4	-368.0	-435.4 to -300.5	Yes	****	<0.0001	A-E
Piel intacta vs. Microagujas	-539.6	-607.0 to -472.1	Yes	****	<0.0001	A-F
Condición 1 vs. Condición 2	-183.5	-251.0 to -116.1	Yes	****	<0.0001	B-C
Condición 1 vs. Condición 3	-125.1	-192.6 to -57.66	Yes	****	<0.0001	B-D
Condición 1 vs. Condición 4	-318.9	-386.4 to -251.5	Yes	****	<0.0001	B-E
Condición 1 vs. Microagujas	-490.5	-558.0 to -423.1	Yes	****	<0.0001	B-F
Condición 2 vs. Condición 3	58.44	-9.012 to 125.9	No	ns	0.1197	C-D
Condición 2 vs. Condición 4	-135.4	-202.8 to -67.95	Yes	****	<0.0001	C-E
Condición 2 vs. Microagujas	-307.0	-374.4 to -239.5	Yes	****	<0.0001	C-F
Condición 3 vs. Condición 4	-193.8	-261.3 to -126.4	Yes	****	<0.0001	D-E
Condición 3 vs. Microagujas	-365.4	-432.9 to -298.0	Yes	****	<0.0001	D-F
Condición 4 vs. Microagujas	-171.6	-239.0 to -104.1	Yes	****	<0.0001	E-F

Zidovudina retenida en piel

En este caso se optó por realizar el ANOVA de Brown-Forsythe y el de Welch, esto porque las varianzas entre los distintos grupos que se están comparando son diferentes. Como se observa en la Tabla 22, en ambos casos se obtiene un valor de $p < 0.0001$ que implica que sí hay diferencias entre los tratamientos. En la Tabla 23 se muestra el análisis de comparación múltiple correspondiente.

Tabla 22. Prueba de ANOVA Brown-Forsythe para AZT retenida en piel.

Brown-Forsythe ANOVA test	
F* (DFn, DFd)	20.41 (5.000, 14.17)
P value	<0.0001
P value summary	****
Significant diff. among means (P < 0.05)	Yes
Welch's ANOVA test	
W (DFn, DFd)	20.75 (5.000, 13.51)
P value	<0.0001
P value summary	****
Significant diff. among means (P < 0.05)	Yes

Tabla 23. Prueba de Dunnett's para AZT retenida en piel.

Brown-Forsythe and Welch ANOVA tests						
Multiple comparisons						
Number of families	1					
Number of comparisons per family	15					
Alpha	0.05					
Dunnett's T3 multiple comparisons test	Mean Diff.	95.00% CI of diff.	Below threshold?	Summary	Adjusted P Value	
Intact skin vs. Condition 1	3.642	-46.06 to 53.35	No	ns	>0.9999	A-B
Intact skin vs. Condition 2	-55.09	-113.8 to 3.604	No	ns	0.0710	A-C
Intact skin vs. Condition 3	-144.8	-283.1 to -6.425	Yes	*	0.0408	A-D
Intact skin vs. Condition 4	-219.8	-335.6 to -104.0	Yes	**	0.0014	A-E
Intact skin vs. Microneedles	-277.0	-477.8 to -76.13	Yes	*	0.0108	A-F
Condition 1 vs. Condition 2	-58.73	-113.0 to -4.470	Yes	*	0.0320	B-C
Condition 1 vs. Condition 3	-148.4	-283.6 to -13.26	Yes	*	0.0327	B-D
Condition 1 vs. Condition 4	-223.4	-342.0 to -104.9	Yes	**	0.0021	B-E
Condition 1 vs. Microneedles	-280.6	-494.8 to -66.38	Yes	*	0.0163	B-F
Condition 2 vs. Condition 3	-89.69	-222.9 to 43.48	No	ns	0.2511	C-D
Condition 2 vs. Condition 4	-164.7	-282.8 to -46.58	Yes	**	0.0086	C-E
Condition 2 vs. Microneedles	-221.9	-424.2 to -19.53	Yes	*	0.0329	C-F
Condition 3 vs. Condition 4	-75.02	-224.0 to 74.00	No	ns	0.6425	D-E
Condition 3 vs. Microneedles	-132.2	-339.8 to 75.45	No	ns	0.3462	D-F
Condition 4 vs. Microneedles	-57.16	-263.1 to 148.8	No	ns	0.9758	E-F

Diseño de experimentos

En la Tabla 24 se muestra el análisis de varianza (ANOVA) realizado para comparar la TEWL en piel intacta, en piel pretratada con LSS, las 4 condiciones de sonoforesis seleccionadas y microagujas, como se puede observar existe una diferencia significativa ($p < 0.05$) entre las distintas condiciones. En la Tabla 25 se muestra el análisis de comparación múltiple correspondiente.

Tabla 24. Prueba de ANOVA de la TEWL en piel intacta, piel pretratada con LSS, piel pretratada con sonoforesis y microagujas.

Ordinary one-way ANOVA ANOVA results					
ANOVA table	SS	DF	MS	F (DFn, DFd)	P value
Treatment (between columns)	9927	7	1418	F (7, 40) = 171.4	P<0.0001
Residual (within columns)	331.0	40	8.274		
Total	10258	47			

Tabla 25. Prueba de Tukey de la TEWL en piel de cerdo pretratada con LSS, sonoforesis, microagujas.

Ordinary one-way ANOVA Multiple comparisons						
Tukey's multiple comparisons test	Mean Diff.	95.00% CI of diff.	Below threshold?	Summary	Adjusted P Value	
Piel intacta vs. Condición 1	-31.87	-37.18 to -26.56	Yes	****	<0.0001	A-B
Piel intacta vs. Condición 2	-30.28	-35.59 to -24.97	Yes	****	<0.0001	A-C
Piel intacta vs. Condición 3	-34.77	-40.08 to -29.46	Yes	****	<0.0001	A-D
Piel intacta vs. Condición 4	-23.85	-29.16 to -18.54	Yes	****	<0.0001	A-E
Piel intacta vs. LSS 2 min	-2.170	-7.479 to 3.139	No	ns	0.8910	A-F
Piel intacta vs. LSS 5 min	0.7987	-4.769 to 6.366	No	ns	0.9998	A-G
Piel intacta vs. Microagujas	-29.18	-34.30 to -24.07	Yes	****	<0.0001	A-H
Condición 1 vs. Condición 2	1.583	-3.725 to 6.892	No	ns	0.9783	B-C
Condición 1 vs. Condición 3	-2.900	-8.209 to 2.409	No	ns	0.6581	B-D
Condición 1 vs. Condición 4	8.017	2.708 to 13.33	Yes	***	0.0005	B-E
Condición 1 vs. LSS 2 min	29.70	24.39 to 35.01	Yes	****	<0.0001	B-F
Condición 1 vs. LSS 5 min	32.67	27.10 to 38.23	Yes	****	<0.0001	B-G
Condición 1 vs. Microagujas	2.683	-2.432 to 7.799	No	ns	0.7015	B-H
Condición 2 vs. Condición 3	-4.483	-9.792 to 0.8253	No	ns	0.1525	C-D
Condición 2 vs. Condición 4	6.433	1.125 to 11.74	Yes	**	0.0084	C-E
Condición 2 vs. LSS 2 min	28.11	22.80 to 33.42	Yes	****	<0.0001	C-F
Condición 2 vs. LSS 5 min	31.08	25.51 to 36.65	Yes	****	<0.0001	C-G
Condición 2 vs. Microagujas	1.100	-4.015 to 6.215	No	ns	0.9969	C-H
Condición 3 vs. Condición 4	10.92	5.608 to 16.23	Yes	****	<0.0001	D-E
Condición 3 vs. LSS 2 min	32.60	27.29 to 37.91	Yes	****	<0.0001	D-F
Condición 3 vs. LSS 5 min	35.57	30.00 to 41.13	Yes	****	<0.0001	D-G
Condición 3 vs. Microagujas	5.583	0.4678 to 10.70	Yes	*	0.0239	D-H
Condición 4 vs. LSS 2 min	21.68	16.37 to 26.99	Yes	****	<0.0001	E-F
Condición 4 vs. LSS 5 min	24.65	19.08 to 30.22	Yes	****	<0.0001	E-G
Condición 4 vs. Microagujas	-5.333	-10.45 to -0.2178	Yes	*	0.0357	E-H
LSS 2 min vs. LSS 5 min	2.969	-2.599 to 8.536	No	ns	0.6844	F-G
LSS 2 min vs. Microagujas	-27.01	-32.13 to -21.90	Yes	****	<0.0001	F-H
LSS 5 min vs. Microagujas	-29.98	-35.37 to -24.60	Yes	****	<0.0001	G-H

12.REFERENCIAS

- [1] Sorrentino S, Remmert L. Manual Mosby de cuidados básicos de enfermería. 6ª Ed. España: Elsevier, 2020; 71-79.
- [2] Wolf K. Dermatología en medicina general. 7ª Ed. Buenos Aires: Médica panamericana, 2009; 63-71.
- [3] Kenneth S. Anatomía fisiología: La unidad entre forma y función. 6ª Ed. México: Mc Graw Hill, 2013; 181-198.
- [4] Rang H, Ritter J, Flower R y cols. Farmacología. 9ª Ed. España: Elsevier, 2018; 166-178.
- [5] Eucerin. Comprendiendo la piel, estructura y función de la piel [Internet]. Estados Unidos: Eucerin. [Consultado 20 Nov 2018]. Disponible en: <https://www.eucerin.es/acerca-de-la-piel/conocimientos-basicos-sobre-la-piel/estructura-y-funcion-de-la-piel>
- [6] Avellato M. Sistemas terapéuticos transdérmicos. Act Terap Dermatol. 2007; 30: 154-156.
- [7] Sanya K, Nirajan S, Irchhaiya R, Kumar N, Akhtar A. A novel transdermal drug delivery system. Int R J Pharm. 2012; 3 (8): 39-44.
- [8] Neely B, Madihally S, Robinson R, Gasem K. Nonlinear quantitative structure-property relationship modeling of skin permeation coefficient. J Pharm Sci. 2009; 98 (11): 4069-4084.
- [9] Betlloch I, Silvestre J. Aspectos cutáneos de los sistemas terapéuticos transdérmicos. Piel. 2002; 17 (1): 18-26.
- [10] Chang H, Wu S, Wang Y, Wang H. Quantification of porcine skin permeability in transdermal diffusion with a numerical model. J Tai Ins Che Eng. 2010; 41: 136-142.

- [11] Ganem A. ¿Qué sabe Ud. Acerca de... la vía de administración transdérmica?. Rev Mex Cien Farm. 2011; 42 (1): 65-68.
- [12] Kumar H. Transdermal drug delivery system: An overview. Int J Res Pharm Sci. 2012; 3 (3): 451-457.
- [13] Pigmentation & texture. Skin 101: Penetración percutánea y vehículos, ¿Cómo y hasta qué punto penetran en la piel los activos cosméticos? [Internet] [Consultado 27 Jul 2021]. Disponible en: <http://pigmentationandtexture.blogspot.com/>.
- [14] Kumar H. Transdermal drug delivery system: An overview. Int J Res Pharm Sci. 2012; 3 (3): 451-457.
- [15] Prasanthi D, Lakshmi P. Vesicles-mechanism of transdermal permeation: A review. Asian J Pharm Clin Res. 2012; 5 (1): 18-25.
- [16] Heather B. Transfersomes for transdermal drug delivery. Expert Opin Drug Deliv. 2006; 3 (6): 727-737.
- [17] Trommer H, Neubert R. Overcoming the stratum corneum: The modulation of skin penetration. Skin Pharmacol Physiol. 2006; 19: 106-121.
- [18] Nino M, Calabrò G, Santoianni P. Topical delivery of active principles: The field of dermatological. Dermatol Online J. 2010; 16 (1): 4.
- [19] Zhang S, Qiu Y, Gao Y. Enhanced delivery of hydrophilic peptides in vitro by transdermal microneedle pretreatment. Act Pharm Sin B. 2014; 4 (1): 100-104.
- [20] Bolzinger M, Briançon S, Pelletier J, Chevalier Y. Penetration of drugs through skin, a complex rate-controlling membrane. Curr Opin in Colloid In. 2012; 17: 156-165.
- [21] Lane M. Skin penetration enhancers. Int J Pharm. 2013; 447:12-21.
- [22] Palma S, Montefuscoli A, Krieger A, Allemandi D. Promotores de la permeación transdermal. Farmacotecnia. 2007; 49: 16-22.
- [23] Prausnitz M. Microneedles for transdermal drug delivery. Adv Drug Deliv Rev. 2004; 56: 581-587.

- [24] Nava M, Calderón I, Quintanar D, Villalobos R, Ganem A. Microneedles as transdermal delivery systems: Combination with other enhancing strategies. *Curr Drug Deliv*. 2012; 9: 57-73.
- [25] Tuan M, McCrudden M, Torrisi B, McAlister E, Garland M, Raghu T, Donnelly R. Microneedles for intradermal and transdermal drug delivery. *Eur J Pharm Sci*. 2013; 50: 623-637.
- [26] Akhtar N. Microneedles: An innovative approach to transdermal delivery- a review. *Int J Pharm Pharm Sci*. 2014; 6 (4): 18-25.
- [27] Larrañeta E, Lutton R, Woolfson A, Donnelly R. Microneedle arrays as transdermal and intradermal drug delivery system: Materials science, manufacture and commercial development. *Mater Sci Eng R*. 2016; 104: 1-32.
- [28] Larrañeta E, McCrudden M, Courtenay A, Donnelly R. Microneedles: A new frontier in nanomedicine delivery. *Pharm Res*. 2016; 33: 1055-1073.
- [29] Piñón E, Nava M. Effect of use of chemical enhancers combined with sonophoresis, electroporation, or microneedles on transdermal drug delivery. En ResearchGate. Percutaneous penetration enhancers physical methods in penetration enhancement. 2017. p. 399-419.
- [30] Mitragotri S, Kost J. Low-frequency sonophoresis a review. *Adv Drug Deliv Rev*. 2004; 56: 589-601.
- [31] Pamornpathomkul B, Duangjit S, Laohapatarapant S, Rojanarata T, Opanasopit P, Ngawhirunpat T. Transdermal delivery of fluorescein isothiocyanate-dextran using the combination of microneedles and low-frequency sonophoresis. *Asian J Pharm Sci*. 2015; 10: 415-424.
- [32] Park D, Park H, Seo J, Lee S. Sonophoresis in transdermal drug delivery. *Ultrasonic*. 2014; 54: 56-65.
- [33] Polat B, Hart D, Langer R, Blankschtein D. Ultrasound-mediated transdermal drug delivery: Mechanisms, scope and emerging trends. *J Con Rel*. 2011; 152: 330-348.

[34] Azagury A, Khoury L, Enden G, Kost J. Ultrasound mediated transdermal drug delivery. *Adv Drug Del Rev.* 2014; 72: 127-143.

[35] Nava M, Ganem A. Effect of the use of chemical enhancers combined with sonophoresis, electroporation, or microneedles on transdermal drug delivery. *Percutaneous penetration enhancers physical methods in penetration enhancement.* United States: Springer; 2017. 399-416.

[36] Vranic E. Sonophoresis-mechanisms and application. *Bosn J Basic Med Sci.* 2004; 4 (2): 25-32.

[37] Oficina de Investigación del SIDA. Visión general de la infección por el VIH [Internet]. Estados Unidos: NIH.gov. [Consultado 6 Oct 2020]. Disponible en: [https://hivinfo.nih.gov/es/understanding-hiv/fact-sheets/el-ciclo-de-vida-del-vih#:~:text=Las%20siete%20etapas%20del%20ciclo,\)%20ensamblaje%20y%20%20gemaci%C3%B3n.](https://hivinfo.nih.gov/es/understanding-hiv/fact-sheets/el-ciclo-de-vida-del-vih#:~:text=Las%20siete%20etapas%20del%20ciclo,)%20ensamblaje%20y%20%20gemaci%C3%B3n.)

[38] B@unam. Virus de Inmunodeficiencia Humana. [Internet]. México: UNAM. [Consultado 28 Oct 2020]. Disponible en: http://uapas2.bunam.unam.mx/ciencias/virus_inmunodeficiencia_humana/

[39] Lorenzo P, Moreno A, Leza J. Velázquez Farmacología básica y clínica. 18ª Ed. México: Panamericana; 2008. p. 52-54.

[40] National Library of Medicine. Zidovudine [Internet]. PubChem. [Consultado 16 Sep 2020]. Disponible en: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Zidovudine>

[41] World Health Organization. HIV/AIDS. 2015. [Acceso el 02 de diciembre de 2015]. Disponible en: http://www.who.int/topics/hiv_aids/en/

[42] CENSIDA. Boletín de atención integral de personas que viven con VIH (2021). [Consultado el 08 de junio de 2022]. Disponible en: https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/684194/BAI_DAI_2021_4.pdf

[43] Sosnik A, Chiappetta D, Carcaboso A. Drug delivery systems in HIV pharmacotherapy: What has been done and the challenges stading ahead. *J Control Release.* 2009; 138: 2-15.

[44] PharmGKB. Zidovudine pathway, pharmacokinetics/pharmacodynamics. [Acceso el 02 de diciembre de 2015]. Disponible en: <https://www.pharmgkb.org/pathway/PA165859361>

[45] Atilay E, Inal ö, Baykara T. Studies on transdermal delivery enhancement of zidovudine. Pharm Sci Tech. 2009; 10 (1): 88-97.

[46] Narishetty S. T.K., Panchagnula R., Transdermal delivery of zidovudine: effect of terpenes and their mechanism of action. J. Control Release. 2004; 95: 367-379.

[47] Habte G, Hymete A, Ismail A. Simultaneous separation and determination of lamivudine and zidovudine in pharmaceutical formulations using the HPTLC method. Analytical Letters. 2009; 42: 1552-1570.

[48] Food and Drug Administration. Guidance for industry: bioanalytical method validation. Septiembre 2013.

[49] Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos de México. Métodos analíticos: guía de validación; 2002.

[50] Secretaría de salud. Norma Oficial Mexicana NOM-073-SSA1-2015, Estabilidad de fármacos y medicamentos, así como de remedios herbolarios. [Acceso 2 de julio de 2016]. Disponible en: https://www.dof.gob.mx/nota_detalle_popup.php?codigo=5440183

[51] Yamashita N, Tachibana K, Ogawa K, Tsujita N, Tomita A. Scanning electron microscopic evaluation of the skin surface after ultrasound exposure. Anat Rec. 1997;247:455–61.

[52] Boucaud A, Montharu J, Mchet L, Arbeille B, Mchet MC, Patat F, Vaillant L. Clinical, histologic, and electron microscopy study of skin exposed to low-frequency ultrasound. Anat Rec. 2001; 264:114–9.

[53] Bernal S, Perez L, Nava M, Ganem A. Alkylglycerol derivatives, a new class of skin penetration modulators. Molecules. 2017; 22(185):1–11. <https://doi.org/10.3390/molecules22010185>.

[54] Brancalion L, Bamberg MP, Kollias N. Spectral differences between stratum corneum and sebaceous molecular components in the mid-IR. Appl Spectrosc. 2000;54:1175–82.

- [55] Alvarez-Roman R, Merino G, Kalia YN, Naik A, Guy RH. Skin permeability enhancement by low frequency sonophoresis: Lipid extraction and transport pathways. *J Pharm Sci.* 2003;92:1138–46.
- [56] Takmaz EA, Inal O, Baykara T. Studies on transdermal delivery enhancement of zidovudine. *AAPS Pharm Sci Tech.* 2009;10:88–97.
- [57] Jung ECh, Maibach HI. Animal models for percutaneous absorption. *J Appl Toxicol.* 2015;35:1–10.
- [58] Oh SY, Jeong SY, Park TG, Lee JH. Enhanced transdermal delivery of AZT (Zidovudine) using iontophoresis and penetration enhancer. *J Controlled Release.* 1998;51–161–8.
- [59] Seki T, Kawaguchi T, Juni K, Sugibayashi K, Morimoto Y. Sustained transdermal delivery of zidovudine via controlled release of penetration enhancer. *J Controlled Release.* 1991;17: 41–48.
- [60] Kumar Narishetty ST, Panchagnula R. Effect of L-menthol and 1,8-cineole on phase behavior and molecular organization of SC lipids and skin permeation of zidovudine. *J Controlled Release.* 2005;102: 59–70.
- [61] Thomas NS, Panchagnula R. Transdermal delivery of zidovudine: effect of vehicles on permeation across rat skin and their mechanism of action. *Eur J Pharm Sci.* 2003;18: 71–79.
- [62] Mitragotri S. Sonophoresis: Ultrasound-Mediated Transdermal Drug Delivery. In: Dragicevic N, Maibach HI, editors. *Percutaneous Penetration Enhancers Physical Methods in Penetration Enhancement.* Berlin Heidelberg: Springer Verlag; 2017. pp. 3–14.
- [63] Mitragotro S. Synergistic effect of enhancers for transdermal drug delivery. *Pharm Res.* 2000; 17: 1354-1359.
- [64] Machado M, Salgado TM, Hadgraft J, Lane ME. The relationship between transepidermal water loss and skin permeability. *Int J Pharm.* 2010;384:73–7.
- [65] Lavon I, Kost J. Ultrasound and transdermal drug delivery DDT. 2004;9:670–6.
- [66] Machet L, Boucaud A. Phonophoresis: efficiency, mechanisms and skin tolerance. *Int J Pharm.* 2002;243:1–15.
- [67] Lavon I, Grossman N, Kost J. The nature of ultrasound-SLS synergism during enhanced transdermal transport. *J Controlled Release.* 2005;107: 484–494.

[68] Seto JE, Polat BE, Lopez RFV, Blankschtein D, Langer R. Effects of ultrasound and sodium lauryl sulfate on the transdermal delivery of hydrophilic permeants: Comparative in vitro studies with full-thickness and split-thickness pig and human skin. *J Controlled Release*. 2010;145: 26–32.

[69] Wolloch L, Kost J. The importance of microjet vs shock wave formation in sonophoresis. *J Controlled Release*. 2010;148:204–11.

[70] Pelucio-Lopes C, Machet L, Vaillant L, Lethiecq M, Furet Y, Pourcelot L, Lorette G. Phonophoresis of azidothymidine (AZT). *Int J Pharm*. 1993;96:249–52.

[71] Seto JE, Polat BE, Lopez RFV, Blankschtein D, Langer R. Effects of ultrasound and sodium lauryl sulfate on the transdermal delivery of hydrophilic permeants: Comparative in vitro studies with full-thickness and split-thickness pig and human skin. *J Controlled Release*. 2010;145: 26–32.

[72] Dragicevic N, Atkinson JP, Maibach HI. Chemical penetration enhancers: Classification and mode of action. In: Dragicevic N, Maibach HI, editors. *Percutaneous Penetration Enhancers. Chemical Methods in Penetration Enhancement*. Berlin Heidelberg: Springer Verlag; 2015. pp. 11–27.

[73] Mitragotri S. Devices for overcoming biological barriers: The use of physical forces to disrupt the barriers. *Adv Drug Deliver Rev*. 2013; 65: 100–103.

[74] Ita K. Transdermal delivery of drugs with microneedles: Strategies and outcomes. *J Drug Deliv Sci Tec*. 2015;29:16–23.

[75] Nagarkar R, Singh M, Nguyen HX, Jonnalagadda S. A review of recent advances in microneedle technology for transdermal drug delivery. *J Drug Deliv Sci Tec*. 2020;59: 101923.

[76] Kumar Narishetty ST, Panchagnula R. Transdermal delivery of zidovudine: effect of terpenes and their mechanism of action. *J C Rel*. 2004;95–367–79.

[77] Suwanpidokkul N, Thongnopnua P, Umprayn K. Transdermal delivery of zidovudine (AZT): The effects of vehicles, enhancers, and polymer membranes on permeation across cadaver pig skin. *AAPS Pharm Sci Tech*. 2004;5:1–8.

[78] FDA. ICH guideline: Validation of analytical procedures Q2(R2). [Acceso el 08 de junio de 2022]. Disponible en: https://database.ich.org/sites/default/files/ICH_Q2-R2_Document_Step2_Guideline_2022_0324.pdf

Dear Author,

Here are the proofs of your article.

- You can submit your corrections **online**, via **e-mail** or by **fax**.
- For **online** submission please insert your corrections in the online correction form. Always indicate the line number to which the correction refers.
- You can also insert your corrections in the proof PDF and **email** the annotated PDF.
- For fax submission, please ensure that your corrections are clearly legible. Use a fine black pen and write the correction in the margin, not too close to the edge of the page.
- Remember to note the **journal title**, **article number**, and **your name** when sending your response via e-mail or fax.
- **Check** the metadata sheet to make sure that the header information, especially author names and the corresponding affiliations are correctly shown.
- **Check** the questions that may have arisen during copy editing and insert your answers/ corrections.
- **Check** that the text is complete and that all figures, tables and their legends are included. Also check the accuracy of special characters, equations, and electronic supplementary material if applicable. If necessary refer to the *Edited manuscript*.
- The publication of inaccurate data such as dosages and units can have serious consequences. Please take particular care that all such details are correct.
- Please **do not** make changes that involve only matters of style. We have generally introduced forms that follow the journal's style. Substantial changes in content, e.g., new results, corrected values, title and authorship are not allowed without the approval of the responsible editor. In such a case, please contact the Editorial Office and return his/her consent together with the proof.
- If we do not receive your corrections **within 48 hours**, we will send you a reminder.
- Your article will be published **Online First** approximately one week after receipt of your corrected proofs. This is the **official first publication** citable with the DOI. **Further changes are, therefore, not possible.**
- The **printed version** will follow in a forthcoming issue.

Please note

After online publication, subscribers (personal/institutional) to this journal will have access to the complete article via the DOI using the URL: [http://dx.doi.org/\[DOI\]](http://dx.doi.org/[DOI]).

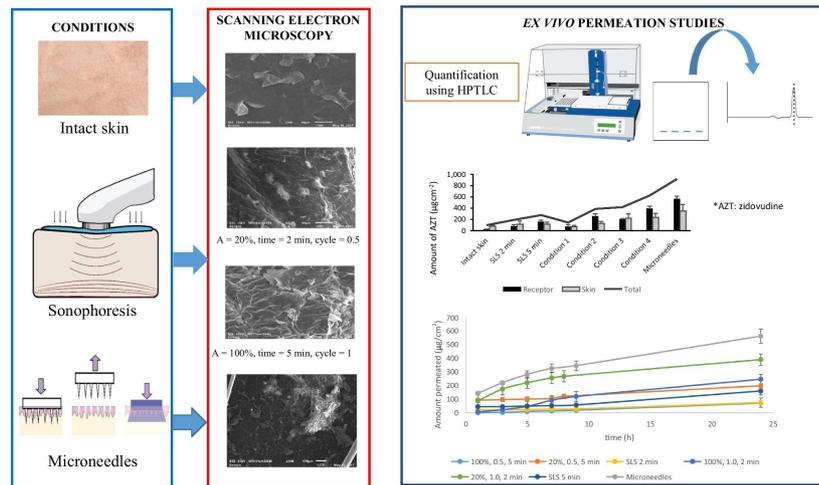
If you would like to know when your article has been published online, take advantage of our free alert service. For registration and further information go to: <http://www.link.springer.com>.

Due to the electronic nature of the procedure, the manuscript and the original figures will only be returned to you on special request. When you return your corrections, please inform us if you would like to have these documents returned.

Metadata of the article that will be visualized in OnlineFirst

ArticleTitle	Enhancement of the transdermal delivery of zidovudine by pretreating the skin with two physical enhancers: microneedles and sonophoresis	
Article Sub-Title		
Article CopyRight	Springer Nature Switzerland AG (This will be the copyright line in the final PDF)	
Journal Name	DARU Journal of Pharmaceutical Sciences	
Corresponding Author	FamilyName	Ganem-Rondero
	Particle	
	Given Name	Adriana
	Suffix	
	Division	División de Estudios de Posgrado (Tecnología Farmacéutica), Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán
	Organization	Universidad Nacional Autónoma de México
	Address	Av. 1o de Mayo s/n, 54740, Cuautitlán Izcalli, Estado de México, Mexico
	Phone	
	Fax	
	Email	ganemq@hotmail.com
	URL	
	ORCID	http://orcid.org/0000-0001-6516-5832
Author	FamilyName	Jesús Martínez-Segoviano
	Particle	de
	Given Name	Irene
	Suffix	
	Division	División de Estudios de Posgrado (Tecnología Farmacéutica), Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán
	Organization	Universidad Nacional Autónoma de México
	Address	Av. 1o de Mayo s/n, 54740, Cuautitlán Izcalli, Estado de México, Mexico
	Phone	
	Fax	
	Email	
	URL	
	ORCID	
Schedule	Received	17 Nov 2020
	Revised	
	Accepted	25 May 2021
Abstract	<p>Zidovudine (AZT) has been the most widely used drug for antiretroviral therapy. In order to improve the therapy with this drug, different alternatives have been proposed, such as the transdermal administration. The use of permeation enhancers is necessary to favor the passage of this drug through the skin, due to its physicochemical properties and to the natural permeation barrier imposed by the skin. To evaluate the effect of two permeation enhancers, sonophoresis and microneedles, on the permeability of AZT through the skin. Permeation studies with an AZT solution were performed using pigskin clamped in Franz-type cells. Sonophoresis was applied under different conditions (i.e., amplitude, duty cycle and application time), selected according to an experimental design, where the response variables were the increase in temperature of the skin surface and the increase in transepidermal water loss. ATR-FTIR was also used to demonstrate the effect of enhancers on membrane components. The permeability of AZT through intact skin was very poor, with a very long lag time. Pretreatment of the skin with sonophoresis increased AZT transport, significantly reducing the lag time. The maximum flux ($27.52 \mu\text{gcm}^{-2} \text{h}^{-1}$) and the highest total amount permeated (about $624 \mu\text{g/cm}^2$) were obtained when applying sonophoresis in continuous mode, with an amplitude of 20%, and an application time of 2 min. Sonophoresis appears</p>	

to have an impact on stratum corneum proteins. The use of microneedles further increased the flux (30.41 $\mu\text{gcm}^{-2}\text{h}^{-1}$) and the total amount permeated (about 916 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$), relative to sonophoresis. The results are encouraging in terms of promoting AZT transport through the skin using sonophoresis or microneedles as permeation enhancers.



Keywords (separated by '-') Zidovudine (AZT) - Sonophoresis - Microneedles - Skin permeation - HIV/AIDS

Footnote Information The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1007/s40199-021-00402-y>.



Enhancement of the transdermal delivery of zidovudine by pretreating the skin with two physical enhancers: microneedles and sonophoresis

Irene de Jesús Martínez-Segoviano¹ · Adriana Ganem-Rondero¹

Received: 17 November 2020 / Accepted: 25 May 2021
© Springer Nature Switzerland AG 2021

Abstract

Background Zidovudine (AZT) has been the most widely used drug for antiretroviral therapy. In order to improve the therapy with this drug, different alternatives have been proposed, such as the transdermal administration. The use of permeation enhancers is necessary to favor the passage of this drug through the skin, due to its physicochemical properties and to the natural permeation barrier imposed by the skin.

Objectives To evaluate the effect of two permeation enhancers, sonophoresis and microneedles, on the permeability of AZT through the skin.

Methods Permeation studies with an AZT solution were performed using pigskin clamped in Franz-type cells. Sonophoresis was applied under different conditions (i.e., amplitude, duty cycle and application time), selected according to an experimental design, where the response variables were the increase in temperature of the skin surface and the increase in transepidermal water loss. ATR-FTIR was also used to demonstrate the effect of enhancers on membrane components.

Results The permeability of AZT through intact skin was very poor, with a very long lag time. Pretreatment of the skin with sonophoresis increased AZT transport, significantly reducing the lag time. The maximum flux ($27.52 \mu\text{gcm}^{-2} \text{h}^{-1}$) and the highest total amount permeated (about $624 \mu\text{g/cm}^2$) were obtained when applying sonophoresis in continuous mode, with an amplitude of 20%, and an application time of 2 min. Sonophoresis appears to have an impact on stratum corneum proteins. The use of microneedles further increased the flux ($30.41 \mu\text{gcm}^{-2} \text{h}^{-1}$) and the total amount permeated (about $916 \mu\text{g/cm}^2$), relative to sonophoresis.

Conclusion The results are encouraging in terms of promoting AZT transport through the skin using sonophoresis or microneedles as permeation enhancers.

Keywords Zidovudine (AZT) · Sonophoresis · Microneedles · Skin permeation · HIV/AIDS

Introduction

In 2019, approximately 38 million people worldwide were recorded with Human Immunodeficiency Virus/ Acquired Immunodeficiency Syndrome (HIV/AIDS). Of these, 36.2 million were adults and 1.8 million were children (< 15 years old) [1], being, today, one of the greatest health problems in the world.

Synthesized in 1964, zidovudine (3'-azido-3'-deoxythymidine, AZT) (Fig. 1), demonstrated in 1985, to have an inhibitory activity against Human Immunodeficiency Virus type-1 (HIV-1), the etiologic agent of AIDS. In fact, it was the first agent approved for clinical use to treat AIDS, and for years it has shown to be effective, becoming the most widely used drug for antiretroviral therapy. The adverse effects associated with antiretroviral therapy constitute the main cause of discontinuation or modification of therapy. In the case of AZT, the main reported adverse effects include hematological complications, headache, nausea, vomiting, myalgia, nail pigmentation, and insomnia. However, the intensity of these effects depends on various factors such as the patient's health status (e.g., disease progression, chronic comorbidities, metabolic diseases), the concomitant use of

✉ Adriana Ganem-Rondero
ganemq@hotmail.com

¹ División de Estudios de Posgrado (Tecnología Farmacéutica), Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Universidad Nacional Autónoma de México, Av. 1o de Mayo s/n, 54740 Cuautitlán Izcalli, Estado de México, Mexico

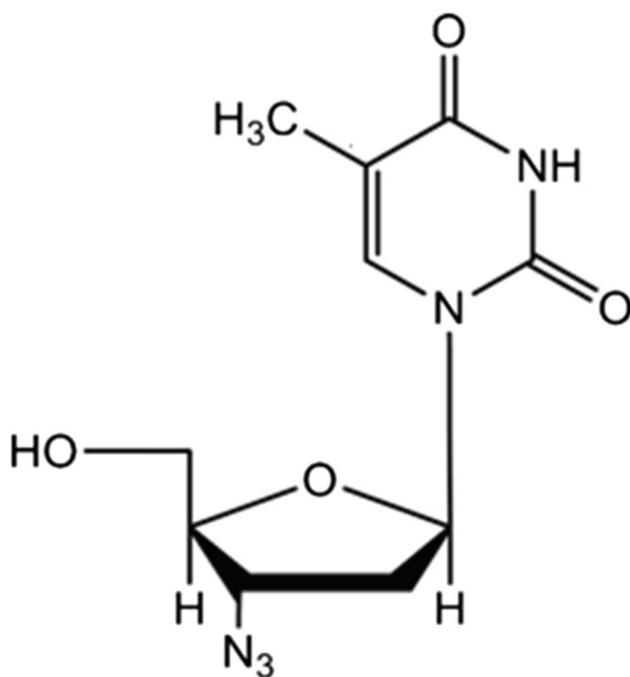


Fig. 1 Chemical structure of zidovudine (3'-azido-3'-deoxythymidine), also known as azidothymidine (AZT). Molecular weight 267.24 g/mol; log Kow=0.05) [2]

50 other medications, the use of illicit substances, and age [3,
 51 4]. Although AZT is administered orally, several drawbacks
 52 are associated with this route of administration, including
 53 its short biological half-life (approximately 1 h) and the
 54 fact that it suffers from significant first-pass metabolism
 55 [5]. That is why it is necessary to administer high doses
 56 (200 mg/kg every 4 h). Therefore, in order to improve
 57 therapy with this drug, different alternatives have been
 58 proposed, such as: (i) the synthesis of prodrugs [6]. (ii) Its
 59 inclusion in novel delivery systems such as sustained-release
 60 transdermal systems including films [7–10], microspheres
 61 [11], microemulsions and lamellar liquid crystalline
 62 systems [12, 13], nanoparticles [14, 15], liposomes [16, 17],
 63 niosomes [18]. (iii) Its administration by a route other than
 64 oral, and with it, the use of chemical or physical permeation
 65 enhancers, e.g., ethanol, propylene glycol [19], terpenes [20,
 66 21], N-methyl-2-pyrrolidone, oleic acid, lauric acid, ethanol,
 67 isopropyl myristate [22], iontophoresis [23, 24]. Most of
 68 these strategies are intended to favor the passage of AZT
 69 through the skin, as an alternative route of administration.
 70 Although the skin seems to be an interesting option for
 71 the release of AZT, the stratum corneum (SC), the main
 72 permeability barrier of the skin, hinders the passage of
 73 molecules, mainly if they have a hydrophilic character such
 74 as AZT. Therefore, the main objective of this work was to
 75 study the capability of sonophoresis and microneedles (two
 76 minimally invasive penetration promoters) to enhance the

permeability of AZT into and through the skin, comparing
 the results with previous reports that make use of permeation
 enhancers. To our knowledge, this is the first time these two
 permeation enhancers are tested to favor the permeability of
 AZT through the skin.

AQ1 1

Materials and methods

82

Materials

83

Zidovudine was kindly donated by Apotex (Mexico). Potassium phosphate monobasic, sodium hydroxide, methanol, chloroform, toluene, anhydrous ethanol and sodium lauryl sulfate, were all purchased from J.T. Baker (USA). Water was obtained from a Milli-Q® system (Millipore® Corp., MA; USA). TLC aluminum plates (17 cm × 5 cm) pre-coated with silica gel G were obtained from Macherey–Nagel (Dueren, Germany). All the reagents were of analytical grade and were used without further purification. Pig's ear skin was obtained from a local slaughterhouse, immediately after the slaughter of the pigs and before the animals were treated with hot water or steam.

84

85

86

87

88

89

90

91

92

93

94

95

Methods

96

Ex vivo permeation of zidovudine (AZT) through pigskin

97

Permeation experiments were conducted with porcine ear skin using Franz-type cells (diffusion area 0.78 cm²) for a period of 24 h. The pigskin was removed from the cartilage, was cut with the aid of a dermatome (Zimmer 901, Ohio, USA) to a thickness of approximately 750 μm, and was stored at -20 °C until its use. On the day of the study, the skin was thawed and clamped between the donor and the receptor compartment of the Franz cells, with the stratum corneum towards the donor compartment. The receptor compartment was filled with 2 mL of phosphate-buffered saline (PBS) pH 7.4, maintained at 37 °C in a water bath under constant stirring with a magnetic bar during the whole experiment, using a multi-stirrer IKA-WERKE (model RO-15, Germany). The donor solution consisted of 1 ml of AZT in PBS pH 7.4 (2 mg/mL). The complete receptor media was withdrawn from the sampling port at predetermined time intervals, replacing immediately the volume with fresh medium, previously heated at 37 °C.

98

99

100

101

102

103

104

105

106

107

108

109

110

111

112

113

114

115

Once the permeation study was completed, the drug solution was removed from the donor, rinsing the skin profusely with PBS pH 7.4. Then, the skin was cut into small fragments with the help of scissors, and it was placed in a closed container with 5 mL of ethanol. The samples prepared in this way were kept at room temperature for 24 h, with constant magnetic stirring, in order to extract the remaining drug

116

117

118

119

120

121

122

123 from the skin. The samples were analyzed by High Perform- 159
 124 mance Thin Layer Chromatography (HPTLC). The cumula- 160
 125 tive amount permeated per unit area was plotted versus time, 161
 126 and the flux (J) was determined from the slope at the steady- 162
 127 state. The permeability coefficient (K_p) was calculated as 163
 128 the ratio of the flux and the drug concentration in the donor 164
 129 (flux/drug concentration). The cumulative amount of AZT 165
 130 that permeated at the end of the study, as well as the amount 166
 131 of drug extracted from the skin were registered. The experi- 167
 132 ment was carried out six times. 168

133 Permeation studies of AZT by pretreating the skin 159 134 with microneedles 160

135 In the case of experiments with microneedles, a roller (MTS- 161
 136 Roller, USA) was used, with an array of microneedles of 162
 137 200 μm in length. Before mounting the skin in Franz's cells, 163
 138 the skin was fixed on a styrofoam surface with the help of 164
 139 tacks, passing the roller over the skin surface a total of five 165
 140 times in each direction, according to the scheme shown in 166
 141 Fig. 2. After this procedure, the skin was mounted in Franz's 167
 142 cells, carrying out the permeation experiments as already 168
 143 described in [Ex vivo permeation of zidovudine \(AZT\)](#) 169
 AQ2 [through pigskin.](#) The experiments were performed six times. 170

145 Permeation studies of AZT by pretreating the skin 171 146 with sonophoresis 172

147 Permeation studies applying sonophoresis were performed 173
 148 using a Hielscher ultrasonic processor UP50H (working fre- 174
 149 quency: 30 kHz \pm 1 kHz) with an MS2 sonotrode (tip diam- 175
 150 eter 2 mm). Once the skin was mounted in Franz's cells, 176
 151 1 ml of an aqueous solution of SLS 1% (w/v), used as a 177
 152 coupling medium, was added to the donor compartment, 178
 153 placing the sonotrode at a distance of 1 cm above the skin 179
 154 surface, and operating the ultrasound equipment under the 180
 155 conditions previously determined, according to a 2³ factor- 181
 156 ial design. The following factors were taken into account: 182
 157 Amplitude (20 and 100%, considering a maximum ampli- 183
 158 tude of 220 μm), time (2 and 5 min), and duty cycle (0.5 184

159 and 1). After completion of the ultrasound treatment, the 160
 161 SLS solution was removed, rinsing the skin surface thor- 162
 163 oughly with PBS pH 7.4. The permeation test was then car- 164
 165 ried out according to the procedure previously described in 165
 166 [Ex vivo permeation of zidovudine \(AZT\) through pigskin.](#) AQ3 166
 167 The experiments were performed six times. Furthermore, in 167
 168 order to determine if the use of SLS had any effect on skin 168
 169 permeability, permeations were carried out without apply- 169
 170 ing ultrasound, but leaving the skin in contact with the SLS 170
 171 solution during the same time of pretreatment of the skin 171
 172 with sonophoresis. 172

173 Analytical methods for the quantification of zidovudine 173

174 Zidovudine quantification was carried out by High Perform- 175
 175 mance Thin Layer Chromatography (HPTLC). Samples 176
 176 were applied to the TLC plates using an Automatic TLC 177
 177 sampler 4 (CAMAG, Switzerland), by the spray-on tech- 178
 178 nique, in the form of 6 mm long bands at a speed of 10 nL/ 179
 179 sec (PBS solutions) and 25 nL/sec (ethanol-based solutions). 180
 180 The development of the plates was carried out by an ascend- 181
 181 ing technique, in a twin- through chamber using chloroform/ 182
 182 methanol/toluene (8:2:2) as the mobile phase [25]. The 183
 183 chamber was saturated with the solvent mixture for 45 min 184
 184 before introducing the plate. Once the mobile phase reached 185
 185 a migration distance of 5 cm, the plate was removed from 186
 186 the chamber, allowing to air dry. The plates were then read 187
 187 on a TLC Scanner 3 (CAMAG, Switzerland), fitted with a 188
 188 win-CATS 1.4.0 planar chromatography manager software, 189
 189 in the absorbance/reflection mode at 271 nm. The slit dimen- 190
 190 sion was set at 5 mm \times 0.45 mm. The method was validated, 191
 191 evaluating the following parameters: Specificity, linearity, 192
 192 repeatability, precision, accuracy, detection limit and limit of 193
 193 quantification. The validation conditions in each case were 194
 194 the following: 195

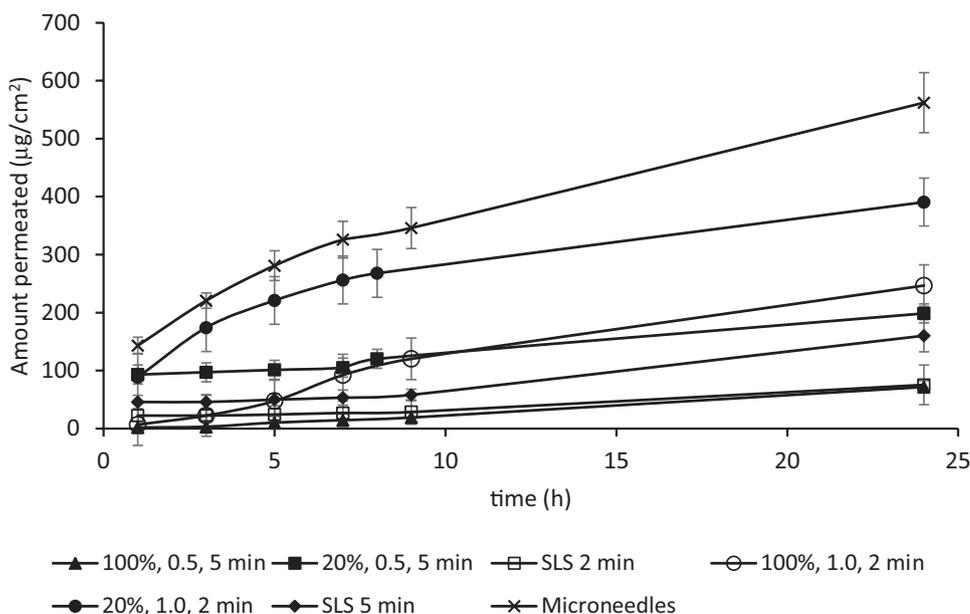
- (i) *Quantification of zidovudine in the receptor solution.* 192
 Solvent: PBS pH 7.4 in contact with pig's ear skin 193
 for 24 h, filtering subsequently through a fiberglass 194
 pre-filter (Merck, Millipore Ltd, Ireland). 195



Fig. 2 Directions in which the microneedle array (MTS-Roller, USA) was rolled over the skin

196	(ii) <i>Quantification of zidovudine remaining in the skin.</i>	cells, FTIR spectra of the following samples were registered:	242
197	Solvent: Ethanol in contact with pig's ear skin for	(i) skin pretreated with an aqueous solution of SLS 1% (w/v)	243
198	24 h, filtering subsequently through a fiberglass pre-	for 2 min, (ii) skin pretreated with an aqueous solution of	244
199	filter (Merck, Millipore Ltd, Ireland).	SLS 1% (w/v) for 5 min, (iii) skin pretreated with SLS 1%	245
		(w/v) + sonophoresis, under the conditions shown in Table 2.	246
200	The results of the validation were included as supplement-	The spectra were compared with those of intact skin.	247
201	ary material to this article.		
202	Scanning electron microscopy	Statistical analysis	248
203	In order to detect possible superficial changes in the skin when	Statistical analysis of the data was performed using the	249
204	treating it with microneedles or with sonophoresis, the skin was	GraphPad Prism 9 Software. Data were compared using one-	250
205	visualized by scanning electron microscopy (JSM-6010LA). The	way analysis of variance (ANOVA), and a Tukey's multiple	251
206	surface of the treated skin was compared to that of intact skin.	comparisons post-hoc test. A value of $p < 0.05$ was consid-	252
		ered statistically significant.	253
207	Measurement of Transepidermal Water Loss	Results and discussion	254
208	Pig ear skin was used to evaluate the effect of sonophoresis	Ex vivo permeation of AZT through pigskin	255
209	and microneedles on the transepidermal water loss (TEWL-	The interest of this work focused on the study and compari-	256
210	a measure of the steady-state water vapor flux crossing the	son of the effect of two physical enhancers, microneedles and	257
211	skin to the external environment). For this purpose, the skin	sonophoresis, on the transport of AZT, in order to be able to	258
212	was excised from the ear removing fatty tissues with a scal-	provide information about their potential application for the	259
213	pel and cutting the skin with an electric dermatome Zimmer	administration of this drug through the skin. Accordingly, AZT	260
214	(Ohio, USA) to a thickness of approximately 750 μm . TEWL	permeations were carried out through intact skin (untreated	261
215	was evaluated with a Tewameter® TM 300 connected to a	skin), as well as through skin treated with microneedles and	262
216	Multi Probe Adapter MPA 5 Courage und Khazaka (Köln,	with sonophoresis. Figure 3 shows the permeation profiles	263
217	North Rhine-Westphalia, Germany). The measurements for	obtained and Fig. 4 includes the amount of AZT in the receptor	264
218	each system were performed in triplicate. The skin sam-	solution at 24 h, the amount retained in the skin at the end of	265
219	ples were mounted in Franz diffusion cells, with a diffusion	permeation experiments, as well as the total amount permeated	266
220	area of 0.78 cm^2 , with the stratum corneum side facing the	(i.e., AZT in the receptor + AZT in the skin).	267
221	donor compartment. The receptor compartment contained	Permeations were carried out by withdrawing the receptor	268
222	2 mL of PBS pH 7.4. The system thus assembled was placed	solution periodically until 8 h, and subsequently at 24 h. In	269
223	inside an acrylic box (built specifically for these purposes),	the case of intact skin, the drug was found in the receptor medium	270
224	for 30 min to ensure an isolated microclimate that allowed	only in the 24-h sample (Table 1, Fig. 4), which showed that	271
225	the measurement of TEWL, independent of ambient air	AZT was capable of permeating through the skin in a very low	272
226	movements. After this time, the basal TEWL was measured.	amount (cumulative amount in the receptor = $22.76 \pm 4.7 \mu\text{g}/$	273
227	TEWL values of the following samples were registered: (i)	cm^2). This amount coincides with that reported by Takmaz	274
228	Intact skin, (ii) skin pretreated with microneedles, (iii) skin	et al. [8], who found a permeated amount of AZT of $24 \mu\text{g}/\text{cm}^2$.	275
229	pretreated with an aqueous solution of SLS 1% (w/v), (iv)	However, this amount was found at 8 h of permeation, which	276
230	skin pretreated with SLS 1% (w/v) + sonophoresis, under the	can be attributed to the higher permeability of rat skin in rela-	277
231	conditions shown in Table 2.	tion to pigskin [26]. Other authors such as Oh et al. [24] quan-	278
232	Attenuated total Reflectance-Fourier-Transform Infrared	tify AZT in the receptor medium, finding a cumulative amount	279
233	(ATR-FTIR) Spectroscopy	of $44 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ at 24 h for an AZT solution of 10 mg/mL , and of	280
234	Infrared spectra of the surface of pigskin were obtained	$82 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ for an AZT solution of 20 mg/mL . The difference	281
235	using an FTIR Spectrophotometer Perkin-Elmer® Frontier	in the permeated amount found by these authors, in relation to	282
236	(Waltham, MA), collecting 16 scans per spectrum, with a res-	what was found in the present work, is fundamentally attributed	283
237	olution of 4 cm^{-1} , in the region from 500 cm^{-1} to 4000 cm^{-1} .	to the fact that they used mouse skin, and that the concentration	284
238	The wavenumbers of the bands associated with lipids and pro-	of the AZT solution was much higher (in the present work, a	285
239	teins were recorded. For this purpose, the skin samples were	2 mg/mL AZT solution was used). Obviously, the permeated	286
240	mounted in Franz diffusion cells, filling the receptor compart-	amount is greater as the concentration of AZT increases, as also	287
241	ment with 2 mL of PBS pH 7.4. Once removed from the Franz	reported by Seki et al. [6]. Practically all authors have found a	288

Fig. 3 Results of AZT permeation through pig ear skin subjected to different treatments: Sodium lauryl sulfate (SLS) 1% (w/v) for 2 and 5 min; sonophoresis under different amplitude, duty cycle and application time conditions; and microneedles. The points correspond to the average of the results and the error bars represent the standard deviation ($n=6$)



low permeability for AZT through the skin with more or less long lag times, depending on the vehicle. For example, Kumar Narishetty & Panchagnula [21] and Thomas & Panchagnula [19], reported fluxes of $11.7 \mu\text{gcm}^{-2} \text{h}^{-1}$ and $23.4 \mu\text{gcm}^{-2} \text{h}^{-1}$, as well as lag times of 14.2 h and 46.9 h, respectively, for AZT aqueous solutions of 50 mg/mL. In our case, it was not possible to obtain a flux value, since as already mentioned, AZT was only quantified in the receptor medium at 24 h.

Permeation studies of AZT by pretreating the skin with sonophoresis

Low-frequency ultrasound or sonophoresis has shown to be effective in promoting drug transport through the skin,

reducing the lag time. Sonophoresis can be applied simultaneously (along with the drug), or by pretreating the skin before applying the drug [27]. In this work, it was decided to pretreat the skin, considering that pretreatment with sonophoresis allows to increase the permeability of the skin during a period of time, in which it is possible to administer a drug. Generally, the application of sonophoresis involves the use of a coupling medium, a liquid present between the ultrasound transducer and the skin, which usually consists of an aqueous solution of a surfactant. In this work, a 1% (w/v) solution of sodium lauryl sulfate (SLS) was used as a coupling medium. Mitragotri [28] showed that the addition of SLS to the coupling medium featured a linear increase in skin permeability in a SLS concentration range of 0–1%.

Fig. 4 Results of the amount of AZT at the end of the permeation studies (24 h): In the receptor medium, retained in the skin, and the total amount permeated (amount in the receptor + amount retained in the skin)

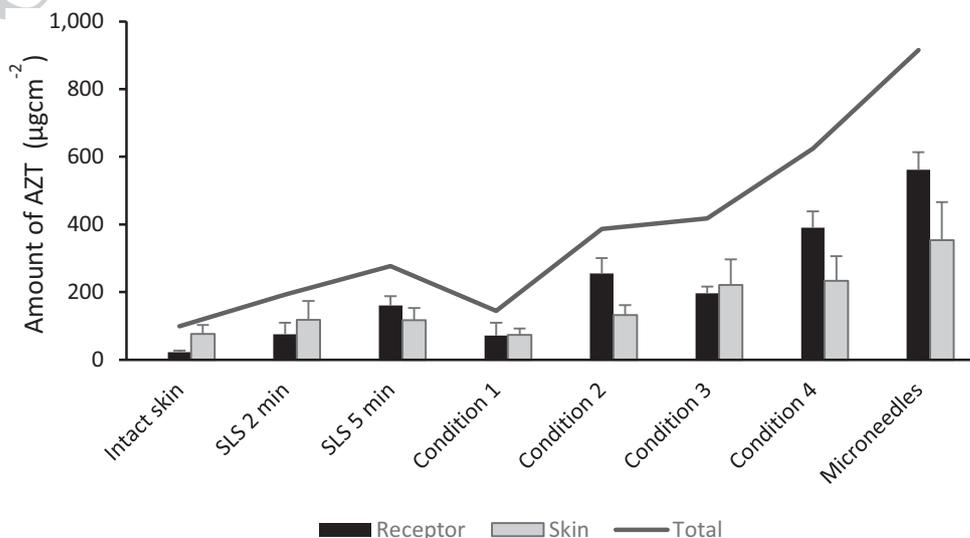


Table 1 Permeation parameters of AZT across pigskin (mean \pm S.D., $n=6$)

Parameter	Intact Skin	Pretreatment with SLS		Sonophoresis using SLS as coupling medium				Microneedles 200 μ m
		5 min	2 min	Condition 1 A = 100%, t = 5 min, c = 0.5	Condition 2 A = 100%, t = 2 min, c = 1.0	Condition 3 A = 20%, t = 5 min, c = 0.5	Condition 4 A = 20%, t = 2 min, c = 1.0	
J from 1 to 7 h ($\mu\text{gcm}^{-2}\text{h}^{-1}$)	-	1.89 \pm 1.40	1.46 \pm 2.02	2.51 \pm 1.003	14.06 \pm 4.01	1.97 \pm 1.69	27.52 \pm 4.08	30.41 \pm 6.64
$K_p \times 10^{-3}$ (cm/h)	-	0.945	0.73	1.25	7.03	0.98	13.76	15.21
AZT in the receptor at 24 h ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	22.76 \pm 4.70	160.19 \pm 27.61	75.41 \pm 34.16	71.75 \pm 37.46	255.32 \pm 44.89	196.88 \pm 19.89	390.57 \pm 48.32	562.10 \pm 51.73
AZT retained in skin at 24 h ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	76.62 \pm 25.77	116.83 \pm 35.68	117.69 \pm 56.27	72.97 \pm 19.49	131.71 \pm 29.40	221.39 \pm 74.96	233.32 \pm 72.73	353.58 \pm 112.14

Sodium Lauryl Sulfate (SLS); Amplitude (A); Application time (t); Duty cycle (c); Flux (J); Permeability coefficient ($K_p = J/\text{Concentration of AZT in the donor}$)

315 SLS has been approved by the FDA for many cosmetic and
316 pharmaceutical products [29, 30].

317 In this work, the influence of amplitude, duty cycle and
318 application time, on the permeability of the skin was evalu-
319 ated, according to an experimental design 2^3 . For each condi-
320 tion, the increase in skin surface temperature was recorded,
321 and transepidermal water loss (TEWL) measurements were
322 performed. It is assumed that an increase in TEWL implies
323 a greater permeability of the skin [31], therefore, of the dif-
324 ferent conditions shown, those that presented the greatest
325 increases in the value of TEWL were chosen. According
326 to the results shown in Table 2, conditions 1, 2, 3 and 4
327 were among those with the greatest increase in TEWL,
328 without the temperature showing a very high increase, and
329 although other conditions such as condition 5 presented the
330 highest TWEL, it was not selected, due to the high increase
331 in temperature [32, 33]. As can be seen in Table 1, a duty
332 cycle of 1.0 (conditions 2 and 4) favored the transport of

AZT through the skin, obtaining higher values of flux (J) 333
and permeability coefficient (K_p) than a duty cycle of 0.5 334
(conditions 1 and 3). Regarding the amount permeated to 335
the receptor solution at 24 h, the average was also higher for 336
a duty cycle of 1.0, with significant differences ($p < 0.05$) 337
among all the treatments, with the exception of intact skin 338
vs condition 1, and condition 2 vs condition 3. The duty 339
cycle refers to the time that ultrasound is ON. In this sense, 340
a duty cycle of 1.0 implies a continuous ultrasound applica- 341
tion, while in a duty cycle of 0.5 the application is in pulses, 342
being 50% of the time ON and 50% of the time OFF. For the 343
amount retained in the skin, significant differences ($p < 0.05$) 344
were found between intact skin vs conditions 3 and 4; and 345
condition 1 vs conditions 2, 3, and 4. Comparing the four 346
conditions evaluated, condition 4 (A = 20%, t = 2 min, 347
c = 1.0) allowed the highest transport of AZT, obtaining the 348
highest J, K_p and total amount permeated (Table 1, Fig. 4). 349
However, despite the fact that condition 4 favored the highest 350

Table 2 Results of the transepidermal water loss (TEWL) and the increase in skin temperature after treating the skin under the following conditions: Intact skin (untreated); SLS (pretreatment with SLS during 2 and 5 min, without sonophoresis); pretreatments 1–8, correspond to the application of sonophoresis, using SLS as coupling medium, varying the amplitude (A), the duty cycle (c) and the application time (t), according to a 2^3 factorial design; microneedles

Pretreatment	Conditions	ΔT ($^{\circ}\text{C}$)	TEWL ($n=6$)	Relative TEWL
None	Intact skin	—	29.32 \pm 0.85	1
Without sonophoresis	SLS, t = 2 min	—	28.52 \pm 2.09	0.973
	SLS, t = 5 min	—	31.49 \pm 2.30	1.074
1	A = 100%, c = 0.5, t = 5 min	2.7 \pm 0.52	61.18 \pm 0.53	2.087
2	A = 100%, c = 1.0, t = 2 min	5.3 \pm 0.52	59.60 \pm 5.09	2.033
3	A = 20%, c = 0.5, t = 5 min	3.0 \pm 1.55	64.03 \pm 3.70	2.184
4	A = 20%, c = 1.0, t = 2 min	3.2 \pm 0.75	53.16 \pm 3.74	1.813
5	A = 100%, c = 1.0, t = 5 min	9.3 \pm 1.15	72.00 \pm 0.92	2.456
6	A = 20%, c = 1.0, t = 5 min	5.7 \pm 0.58	69.83 \pm 3.05	2.382
7	A = 100%, c = 0.5, t = 2 min	3.3 \pm 0.58	31.27 \pm 0.84	1.067
8	A = 20%, c = 0.5, t = 2 min	0.7 \pm 0.58	39.50 \pm 0.61	1.347
Microneedles	200 μ m long	—	58.53 \pm 1.97	1.996

Relative TEWL = TEWL of pretreated skin/TEWL of intact skin

transport of AZT through the skin, apparently there was no a direct relationship between the permeation data and the values obtained from TEWL, since as can be seen in Table 2, of the four conditions tested, it was condition 4 the one with the lowest average TEWL value.

As mentioned, SLS was used as the coupling medium for sonophoresis pretreatment, so we were interested in determining whether using only SLS had any impact on AZT transport. Therefore, permeations were performed by pretreating the skin only with SLS (without applying sonophoresis), testing two contact times, 2 and 5 min. SLS is known for its properties as an absorption enhancer [29, 34]. Its promoting effect is shown in Table 1, where it can be seen that by pretreating the skin with SLS, the passage of AZT was favored, as compared to intact skin (untreated). With a contact time of 5 min, the total amount permeated increased 7 times, compared to intact skin. The contact time was also important, since the values of J and K_p , were 1.3 times higher for 5 min of contact, compared to a contact time of 2 min, and the total amount permeated was twofold greater for 5 min in relation to 2 min. In contrast, the amount retained in the skin at the end of permeation, for these contact times, was practically the same. According to Dragicevic et al. [35], the enhancing effect of anionic surfactants, such as SLS, can be attributed to their interaction with the lipid and protein structures of the skin.

Although some authors have reported a synergistic effect between SLS and sonophoresis [27, 29, 34], condition 1 (duty cycle of 0.5, application time of 5 min) showed a lower value for the total amount permeated, in relation to a 5 min treatment only with SLS (Table 1, Fig. 4). In fact, from all treatments, condition 1 resulted in the lowest total passage of AZT into and through the skin. Conditions 2 and 4 (duty cycle 1.0, application time 2 min) increased AZT transport in relation to treatment only with SLS, being condition 4, as already mentioned, the one that increased it the most. Several mechanisms of action explain the enhancing effect of sonophoresis, such as: (i) Cavitation; (ii) convection; (iii) thermal effects (in general, temperature increases are related to ultrasound intensity and duty cycle); (iv) extraction of lipids; (v) stratum corneum hydration (ultrasound can increase the fraction of aqueous regions in the stratum corneum) [36]. Of all of them, cavitation seems to be the most important. It has been reported that during cavitation, the collapse of bubbles in the bulk solution results in the formation of a shock wave, causing the disruption of the lipid bilayers of the stratum corneum. This loss in the structural integrity of the lipids favors the penetration of the coupling medium into the stratum corneum and the insertion of SLS into lipid bilayers. Therefore, the incorporation of water and surfactant into the lipid bilayer, further enhances its disruption, thereby opening pathways for solute permeation [33, 37].

Different authors have tested the use of physical enhancers to promote the transport of AZT through the skin. Among them, Wearley & Chien [23] found that the AZT flux was three times higher using iontophoresis than by passive diffusion. These authors reported that the flux was increased 75-fold over untreated human skin when using *N*-decylmethyl sulfoxide as permeation enhancer, without observing a synergistic effect when combining iontophoresis and *N*-decylmethyl sulfoxide. Takmaz et al. [8] studied the transdermal passage of AZT formulated in polymeric films through full-thickness dorsal skin of Wistar rats. The authors evaluated the effect of iontophoresis (0.1 and 0.5 mA/cm²) vs a treatment with alcoholic solutions of DMSO (1% and 5%, w/w). In general, the results showed a higher enhancement ratio for 0.5 mA/cm² current application (cumulative amounts of 72.5 µg/cm² for a 2 mg/mL AZT solution and 60.35 µg/cm² for AZT included in a film). In this case, the amount permeated was quite lower than that quantified in our work (Table 1). Oh et al. [24] also studied the effect of iontophoresis on AZT permeation through full-thickness hairless mouse skin. The authors found that the flux increased up to 40 times when using iontophoresis, depending on the electrical current density, in relation to passive diffusion. Likewise, they confirmed the synergistic effect of iontophoresis and chemical enhancers such as oleic acid/propylene glycol. The authors reported flux values much higher than those obtained in this work. For example for a current density of 0.5 mA/cm², with an AZT concentration in the donor of 20 mg/mL, the flux was 109.3 µgcm⁻² h⁻¹. This is 3.6 to 3.9 times higher than the flux obtained with microneedles and with condition 4 of sonophoresis, respectively. The authors found that the formulation of AZT in karaya gum matrices containing oleic acid/propylene glycol, dramatically increased flux up to 391.2 µgcm⁻² h⁻¹, with total permeated amounts of more than 8000 µgcm⁻². Comparing the results obtained by Oh et al. [21] with those of the present work, it should be taken into account that the animal model was different, the concentration of AZT in the donor was much higher, and the application of iontophoresis occurred throughout the permeation experiment. In our case, sonophoresis was applied as a pretreatment for a maximum period of 5 min. Pelucio-Lopes et al. [38] studied the permeation of AZT across excised human skin and hairless mouse skin, applying ultrasound in continuous mode, with an intensity of 1.5 W/cm² and a frequency of 1.1 MHz for 20 min. It is important to mention that the temperature of the donor compartment of Franz cells was kept at 28 °C by a cooling coil. This highlights the thermal effect caused by ultrasound and therefore, the damage that it can potentially cause in skin if application conditions are not controlled [33]. The authors found no differences in the fluxes obtained for skin treated with ultrasound and the control (untreated skin) and attribute this fact to the

457 suppression of the thermal effect of the skin. Nowadays, it
 458 is well-known that low-frequency ultrasound (frequencies
 459 below 100 kHz) is the most effective in promoting drug
 460 transport through the skin. The frequency used by these
 461 authors could be classified in a range of frequencies from
 462 medium to high, and its applications are mainly in the area
 463 of physical therapy or diagnosis, showing to be ineffective
 464 as absorption enhancer [32–36, 39].

465 Permeation studies of AZT by pretreating the skin 466 with microneedles

467 Despite the promoting favorable effect observed with the
 468 condition 4 of sonophoresis, drug transport was significantly
 469 enhanced even further with microneedles, whose use to cross
 470 the stratum corneum has already been widely reported [e.g.,
 471 39–42]. Comparing the results of microneedles with those of
 472 condition 4, the following increases were obtained: 1.1 times
 473 for J and K_p (for the first 7 h), and approximately 1.5 times
 474 for the amount permeated to the receptor solution at 24 h,
 475 as well as for the amount remaining in the skin. Significant
 476 differences were found between condition 4 and micronee-
 477 dles, for these two parameters with $p < 0.05$. Furthermore,
 478 comparing the results of skin pretreated with microneedles
 479 vs the intact skin, an increase of almost 25 times in the total
 480 amount permeated to the receptor at 24 h, without lag time,
 481 was observed (with a two-fold increase in TEWL, according
 482 to the results shown in Table 2). On the other hand, as more
 483 AZT penetrated, the amount retained in the skin at the end
 484 of permeation test increased on average 4.6 times (Table 1,
 485 Fig. 4). From all the treatments studied, microneedle pre-
 486 treatment was the best enhancer for this drug.

487 To achieve a therapeutic concentration in plasma of
 488 $0.3 \mu\text{g/mL}$, some authors such as Kumar Narishetty & Pan-
 489 chagnula [20] have calculated that a flux of $500 \mu\text{gcm}^{-2} \text{h}^{-1}$
 490 is required; others like Suwanpidokkul et al. [22] consider
 491 a flux of $208 \mu\text{gcm}^{-2} \text{h}^{-1}$. In any case, although the flux
 492 obtained in this work by pretreating the skin with micronee-
 493 dles or with sonophoresis, is far from the values reported
 494 by these authors, it should be expected to further increase
 495 the flux by: (i) Using a higher concentration of the drug;
 496 (ii) modifying the application scheme of sonophoresis; (iii)
 497 combining sonophoresis with some formulation contain-
 498 ing chemical enhancers to achieve a synergistic effect; (iv)
 499 formulating AZT in a transdermal delivery system with
 500 microneedles, in order to promote the continuous passage
 501 of the drug through the skin.

502 Scanning electron microscopy

503 Histological changes observed in the skin after ultrasound
 504 treatment have been reported. In general, alterations in the

505 structure of the skin when applying ultrasound are related
 506 to frequency, intensity, duty cycle, application time and,
 507 of course, the animal model [32]. Microscopic techniques
 508 such as scanning electron microscopy and transmission
 509 electron microscopy have been used to reveal alterations
 510 in the structure of the skin. In this work, the skin sur-
 511 face was observed by scanning electron microscopy, in
 512 order to determine any alteration visible in the skin by
 513 this technique, when subjected to treatment with sono-
 514 phoresis. Figure 5 shows the micrographs of two of the
 515 tested conditions (Table 2): condition 8 ($A = 20\%$, $c = 0.5$,
 516 $t = 2$ min) and condition 5 ($A = 100\%$, $c = 1.0$, $t = 5$ min).
 517 Condition 8 presented the lowest increase in skin temper-
 518 ature and one of the lowest TEWL values, while condition
 519 5 presented the highest increase in skin temperature and
 520 the highest TEWL value. According to this, it would be
 521 expected that the treatment of the skin with sonophore-
 522 sis would be reflected in a structural change of the skin
 523 surface. As can be seen in Fig. 5A, the unexposed skin
 524 presents a fairly smooth surface, while in the images of
 525 the skin treated with sonophoresis the surface is no longer
 526 very smooth, especially for condition 5, with an exposure
 527 time of 5 min, 100% amplitude, and a continuous duty
 528 cycle. Although in both cases it seems that the application
 529 of ultrasound disrupts the outermost layer of the stratum
 530 corneum, this is more evident for condition 5, which may
 531 be related to the results of the increase in temperature
 532 (approximately 9°C) and the increase in TEWL (about
 533 2.45 times relative to intact skin), as shown in Table 2.
 534 However, although this latter condition might have fur-
 535 ther promoted AZT transport through the skin, as already
 536 mentioned, permeation studies were not carried out under
 537 this condition, due to the great increase in the temperature
 538 of the skin.

539 Other authors have studied the histological changes in the
 540 skin when applying sonophoresis under different conditions
 541 of intensity, duty cycle and treatment time. For example,
 542 Yamashita et al. [43], found a total detachment of the stratum
 543 corneum of mouse skin, as well as the formation of pores,
 544 once the skin was exposed for 5 min to ultrasound of 48 kHz,
 545 0.5 W/cm^2 ; whereas in human skin, only slight clearing of
 546 keratinocytes around the hair follicles was observed. Boucaud
 547 et al. [44], reported epidermal detachment and edema of the
 548 upper dermis when applying ultrasound with a frequency of
 549 20 kHz, and an intensity of 5.2 W/cm^2 in pulsed mode; and
 550 even second-degree burns with higher intensities, in in vitro
 551 studies using full thickness human skin. These authors did
 552 not find changes in the structure of the skin when applying
 553 ultrasound with an intensity less than 2.5 W/cm^2 . The authors
 554 attribute these effects mainly to the phenomenon of cavitat-
 555 ion and not to the increase in skin temperature. It is impor-
 556 tant to keep in mind that the alterations in the skin caused
 557 by sonophoresis are not limited only to visible alterations

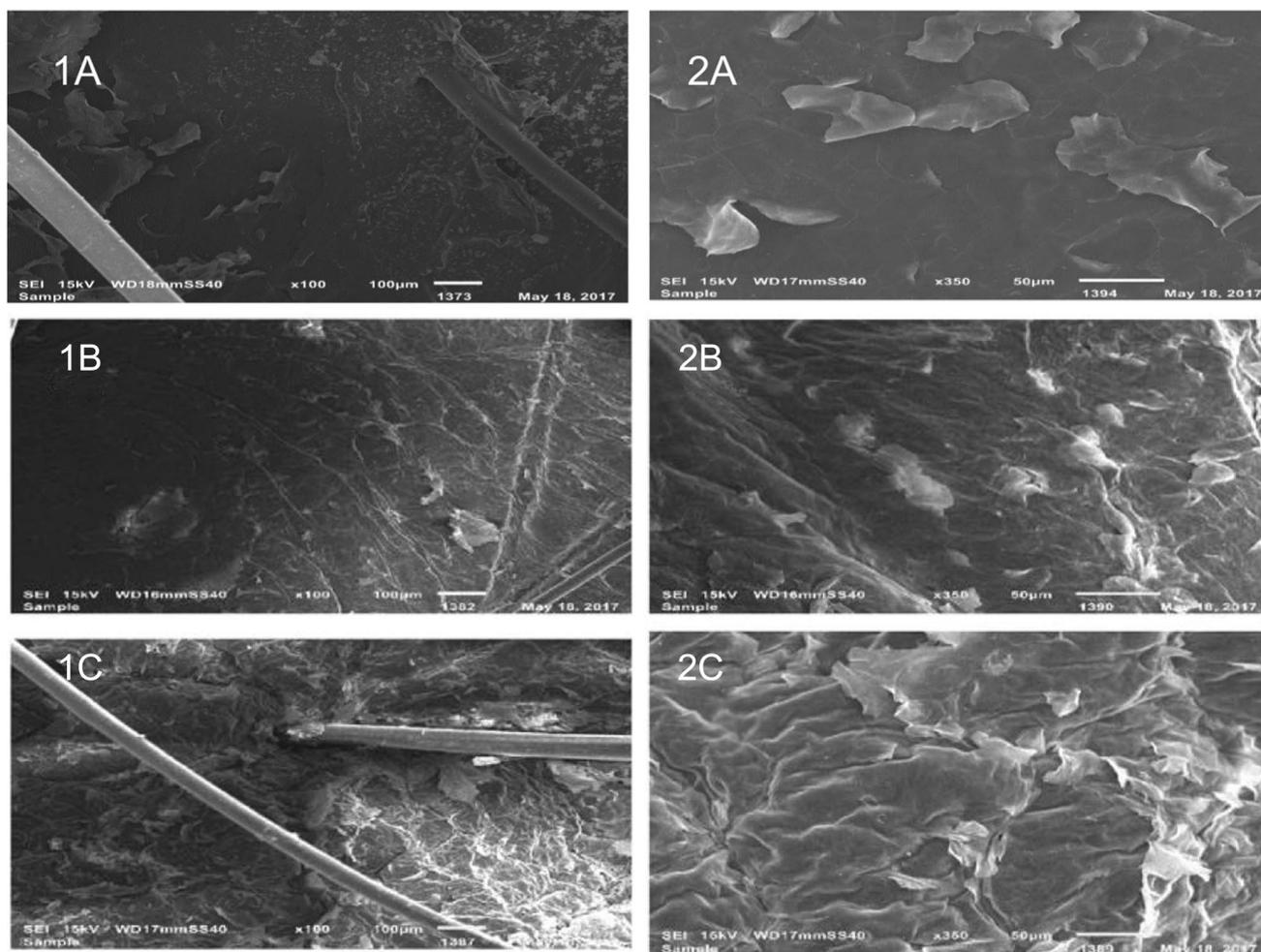


Fig. 5 Micrographs of pigskin obtained by SEM. A) Intact skin (untreated); B) skin pretreated with sonophoresis ($A=20\%$, $c=0.5$, $t=2$ min); C) skin pretreated with sonophoresis ($A=100\%$, $c=1.0$,

$t=5$ min). Number 1 refers to a 100X magnification (the bar corresponds to $100\ \mu\text{m}$), and number 2 refers to a 350X magnification (the bar corresponds to $50\ \mu\text{m}$)

558 on the surface of the skin. Other alterations that may occur
559 depending on the treatment scheme (i.e., application time,
560 duty cycle, intensity, frequency, etc.) include, for example,
561 lipid extraction, epidermal detachment and degeneration of
562 collagen fibers [33].

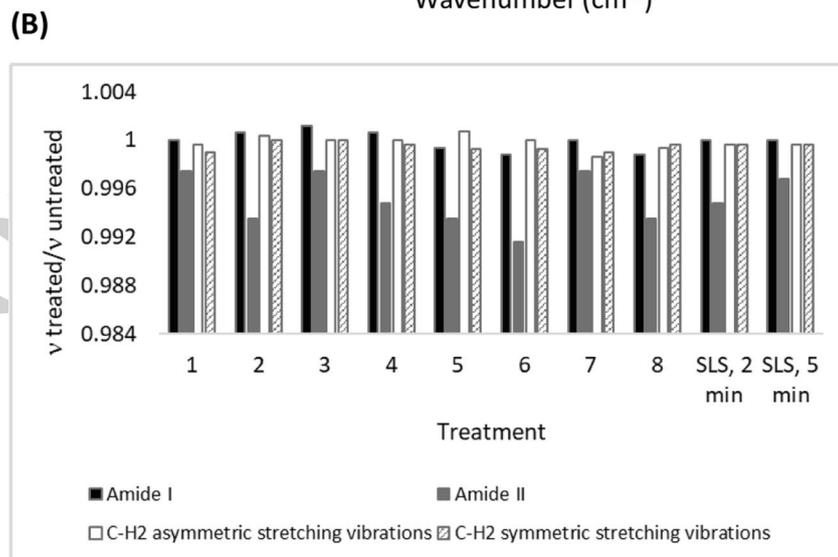
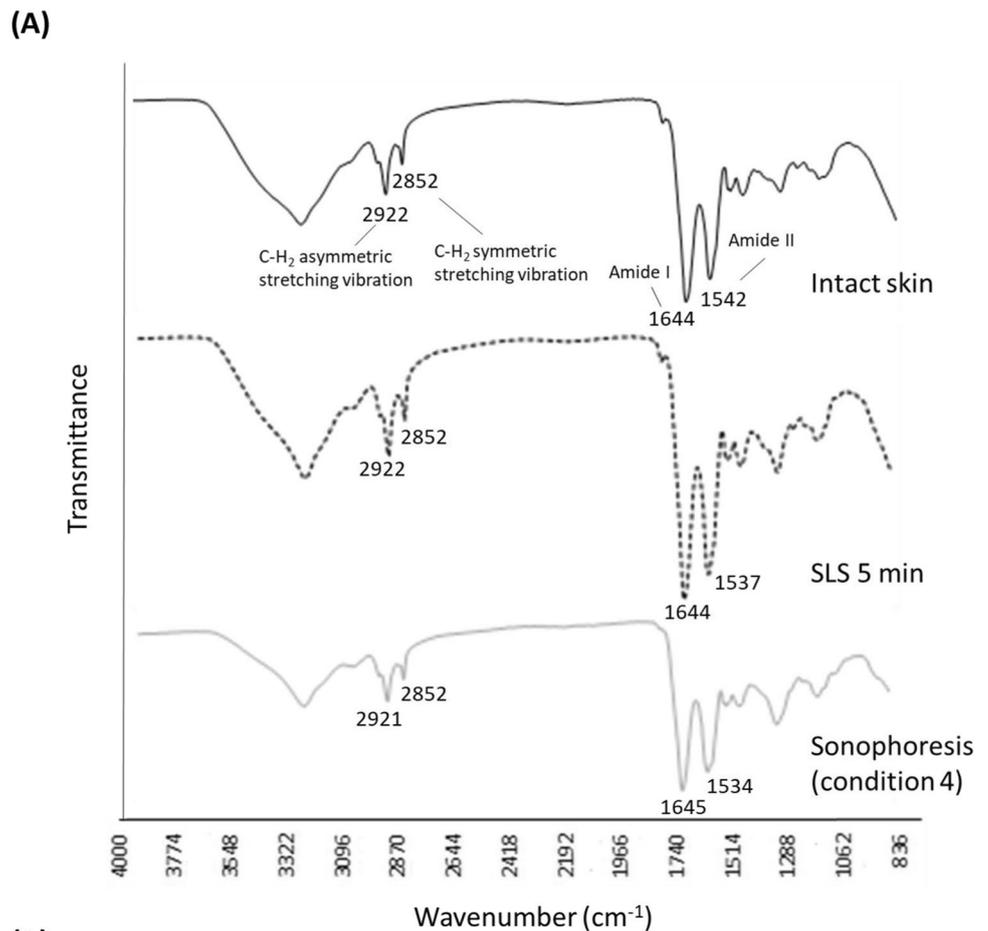
563 ATR-FTIR Spectroscopy

564 Infrared spectroscopy is one of the techniques widely used to
565 reveal the state of the skin's permeability barrier and the effect
566 of absorption enhancers, both chemical and physical, on the
567 structure of membrane components (i.e., lipids and proteins).
568 In the present work, infrared spectra of skin treated with SLS
569 for 2 and 5 min, as well as with sonophoresis according to
570 the different conditions indicated in Table 2, were collected.
571 These spectra were compared with those obtained for intact
572 skin. The protein-related bands appearing near $1645\ \text{cm}^{-1}$
573 (Amide I) and $1540\ \text{cm}^{-1}$ (Amide II) were analyzed; as well

as the bands related to lipids, near $2920\ \text{cm}^{-1}$ and $2850\ \text{cm}^{-1}$,
574 corresponding to the asymmetric and symmetric stretching
575 modes of the hydrophobic alkyl chains. 576

577 Figure 6(A) shows representative infrared spectra of intact skin,
578 skin treated with SLS for 5 min and skin treated with sonophoresis
579 according to condition 4 (Table 2). In Fig. 6(B) the ratio of the
580 wavenumber of the treated skin (with SLS or with sonophoresis)/
581 wavenumber of intact skin was plotted. Thus, a value of 1 indicates
582 that the position of these bands did not change when treating
583 the skin, while values other than 1 are associated with a
584 change in the wavenumber of the bands. In the case of
585 bands associated with lipids, spectral position provides
586 information of the acyl chain packing of the lipids, as well
587 as their conformational order, e.g., trans-gauche isomeriza-
588 tion. It is generally assumed that a shift towards higher
589 frequencies is related to lipid disorder (higher proportion
590 of gauche isomers), which has been called "fluidization". 591

Fig. 6 (A) Representative ATR-FTIR spectra for porcine ear skin treated with: Sonophoresis (condition 4: $A=20\%$, $t=2$ min, $c=1.0$), and SLS for 5 min. For comparison purposes, the spectrum of intact skin is included. (B) Ratio of the wavenumber of skin treated with sonophoresis or with SLS (ν treated) and the wavenumber of intact skin (ν untreated)



592 A shift towards lower frequencies, on the other hand, is
 593 indicative of a higher order in the membrane [45]. The
 594 results in Fig. 6B show that with the exception of the
 595 Amide II band, there was no shift in the rest of the bands.
 596 The Amide II band showed shifts towards lower wavenum-
 597 bers between 4 and 13 units, which some authors attribute

to changes in the secondary structure of proteins [46].
 These shifts appear to be related to the increase in AZT
 permeability. As already mentioned above, conditions 2
 and 4 are those that presented the highest values of J , K_p
 and total amount permeated (Table 1), being also among
 those where the highest displacements of the Amide II

598
 599
 600
 601
 602
 603

band were observed. Therefore, the possibility that the increase in permeability is associated with a modification in the structure of the proteins, due to the effect of sonophoresis, is not ruled out. Some authors also report an increase in permeability, due to the extraction of intercellular lipids as a result of cavitation, a phenomenon reflected as a decrease in the area under the curve of the bands. However, as stated by Alvarez-Román et al. [47], in the present work this was not demonstrated, since the spectra correspond only to the outermost part of the stratum corneum and not to the entire membrane.

Conclusions

AZT hardly permeates through intact skin, as a result of its physicochemical properties. Pretreatment of the skin with sonophoresis increased AZT transport, reducing significantly the lag time, founding that an amplitude of 20%, and an application time of 2 min, in continuous mode, presented the highest flux for the first 7 h, and also the highest total amount permeated. The use of microneedles further increased the flux and the total amount permeated, relative to sonophoresis. Although the results of this work are encouraging in terms of promoting AZT transport through the skin using sonophoresis or microneedles as permeation enhancers, further studies must be carried out, considering the factors that affect their performance, in order to achieve flux values that guarantee effective plasma concentrations. It is expected that the results obtained from this study will be helpful in the development of an effective system for the transdermal release of AZT.

Supplementary Information The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1007/s40199-021-00402-y>.

Acknowledgements The authors would like to thank Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) for the scholarship provided to Martínez-Segoviano (ref. 270497).

Authors' contributions Irene de Jesús Martínez Segoviano—Development of all the experimental part. Analysis of results and manuscript writing.

Adriana Ganem-Rondero—Proposal, administration of the project and planning of activities. Analysis of results and revision of the manuscript.

Data Availability Data available to those who request it.

Declarations

Consent to participate The authors confirm their participation in the article.

Consent for publication The authors give their consent for the publication of the article.

Conflicts of interest On behalf of all authors, the corresponding author states that there is no conflict of interest.

References

- The Global HIV/AIDS Epidemic. In: Global Statistics. HIV.gov. 2020. <https://www.hiv.gov/hiv-basics/overview/data-and-trends/global-statistics>. Date last updated: July 07, 2020.
- Zidovudine C10H13N5O4 - PubChem – NIH, National Library of Medicine, National Center for Biotechnology Information. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Zidovudine>, accessed October 6, 2020.
- Negromonte Azevedo L, de Alencar Ximenes RA, Monteiro P, Ramos Montarroyos U, de Barros M-F. Factors associated to modification of first-line antiretroviral therapy due to adverse events in people living with HIV/AIDS. *Brazilian J Infect Dis*. 2020;24:65–72. <https://doi.org/10.1016/j.bjid.2019.11.002>.
- Mulenga V, Musiime V, Kekitiinwa A, Cook AD, Abongomera G, Kenny J, Chabala C, Mirembe G, Asiimwe A, Owen-Powell E, Burger D, McIlleron H, Klein N, Chintu C, Thomason MJ, Kityo C, Walkert AS, Gibb DM. Abacavir, zidovudine, or stavudine as paediatric tablets for African HIV-infected children (CHAPAS-3): an open-label, parallel-group, randomised controlled trial. *Infection*. 2016;16:169–79. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(15\)00319-9](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(15)00319-9).
- Sosnik A, Chiappetta DA, Carcaboso AM. Drug delivery systems in HIV pharmacotherapy: What has been done and the challenges standing ahead. *J Controlled Release*. 2009;138:2–15. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2009.05.007>.
- Seki T, Kawaguchi T, Juni K. Enhanced delivery of zidovudine through rat and human skin via ester prodrugs. *Pharm Res*. 1990;7:948–52. <https://doi.org/10.1023/A:1015902024664>.
- Seki T, Kawaguchi T, Juni K, Sugibayashi K, Morimoto Y. Sustained transdermal delivery of zidovudine via controlled release of penetration enhancer. *J Controlled Release*. 1991;17:41–8.
- Takmaz EA, Inal Ö, Baykara T. Studies on transdermal delivery enhancement of zidovudine. *AAPS Pharm Sci Tech*. 2009;10:88–97. <https://doi.org/10.1208/s12249-008-9179-9>.
- Mundargi RC, Babu VR, Rangaswamy V, Aminabhavi TM. Formulation and in vitro evaluation of transdermal delivery of zidovudine-an anti-HIV drug. *J Appl Polym Sci*. 2011;119:1268–74. <https://doi.org/10.1002/app.30832>.
- Souza de Araujo GR, de Oliveira Porfirio L, Santos Silva LA, Gomes Santana D, Ferreira Barbosa P, Pereira dos Santos C, Narain N, Vitorino Sarmiento VH, de Souza Nunes R, Ting E, Moreira Lira AA. In situ microemulsion-gel obtained from bio-adhesive hydroxypropyl methylcellulose films for transdermal administration of zidovudine. *Colloids Surf B*. 2020;188:110739. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2019.110739>.
- Abu-Izza KA, Garcia-Contreras L, Lu DR. Preparation and evaluation of sustained release AZT-loaded microspheres: optimization of the release characteristics using response surface methodology. *J Pharm Sci*. 1996;85:144–9.
- Menezes Carvalho AL, da Silva JA, Moreira Lira AA, Freire Conceicao TM, de Souza Nunes R, Cavalcanti de Albuquerque Junior LC, Vitorino Sarmiento VH, Bastos Leal L, Pereira de Santana D. Evaluation of microemulsion and lamellar liquid crystalline systems for transdermal zidovudine delivery. *J Pharm Sci*. 2016;105:2188–93. <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2016.04.013>.
- Carvalho FC, Sarmiento VHV, Chiavacci LA, Barbi MS, Gremiao MPD. Development and in vitro evaluation of surfactant systems for controlled release of zidovudine. *J Pharm Sci*. 2010;99:2367–74. <https://doi.org/10.1002/jps.22005>.

- 711 14. Löbenberg R, Araujo L, Kreuter J. Body distribution of azidothymidine bound to nanoparticles after oral administration. *Eur J Pharm Biopharm.* 1997;44:127–32.
- 712
- 713 15. Dembri A, Montisci MJ, Gantier JC, Chacun H, Ponchel G. Targeting of 3'-azido 3'-deoxythymidine (AZT)-loaded poly(iso-hexylcyanoacrylate) nanospheres to the gastrointestinal mucosa and associated lymphoid tissues. *Pharm Res.* 2001;18:467–73.
- 714
- 715
- 716 16. Phillips NC, Tsoukas C. Liposomal encapsulation of azidothymidine results in decreased hematopoietic toxicity and enhanced activity against murine acquired immunodeficiency syndrome. *Blood.* 1992;79:1137–43.
- 717
- 718
- 719 17. Garg M, Jain NK. Reduced hematopoietic toxicity, enhanced cellular uptake and altered pharmacokinetics of azidothymidine loaded galactosylated liposomes. *J Drug Targeting.* 2006;14:1–11. <https://doi.org/10.1080/10611860500525370>.
- 720
- 721
- 722 18. Ruckmani K, Sankar V. Formulation and Optimization of Zidovudine Niosomes. *AAPS Pharm Sci Tech.* 2010;11:1119–27. <https://doi.org/10.1208/s12249-010-9480-2>.
- 723
- 724
- 725 19. Thomas NS, Panchagnula R. Transdermal delivery of zidovudine: effect of vehicles on permeation across rat skin and their mechanism of action. *Eur J Pharm Sci.* 2003;18:71–9.
- 726
- 727 20. Kumar Narishetty ST, Panchagnula R. Transdermal delivery of zidovudine: effect of terpenes and their mechanism of action. *J Controlled Release.* 2004;95:367–79. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2003.11.022>.
- 728
- 729 21. Kumar Narishetty ST, Panchagnula R. Effect of L-menthol and 1,8-cineole on phase behavior and molecular organization of SC lipids and skin permeation of zidovudine. *J Controlled Release.* 2005;102:59–70. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2004.09.016>.
- 730
- 731 22. Suwanpidokkul N, Thongnoppua P, Umprayn K. Transdermal delivery of zidovudine (AZT): The effects of vehicles, enhancers, and polymer membranes on permeation across cadaver pig skin. *AAPS Pharm Sci Tech.* 2004;5:1–8 (article 48).
- 732
- 733 23. Wearley L, Chien YW. Enhancement of the in vitro skin permeability of azidothymidine (AZT) via iontophoresis and chemical enhancer. *Pharm Res.* 1990;7:34–40. <https://doi.org/10.1023/A:1015827307516>.
- 734
- 735 24. Oh SY, Jeong SY, Park TG, Lee JH. Enhanced transdermal delivery of AZT (Zidovudine) using iontophoresis and penetration enhancer. *J Controlled Release.* 1998;51:161–8.
- 736
- 737 25. Habte G, Hymete A, Ismail A. Simultaneous separation and determination of lamivudine and zidovudine in pharmaceutical formulations using the HPTLC method. *Anal Lett.* 2009;42:1552–70. <https://doi.org/10.1080/00032710902993852>.
- 738
- 739 26. Jung ECh, Maibach HI. Animal models for percutaneous absorption. *J Appl Toxicol.* 2015;35:1–10. <https://doi.org/10.1002/jat.3004>.
- 740
- 741 27. Mitragotri S. Sonophoresis: Ultrasound-Mediated Transdermal Drug Delivery. In: Dragicevic N, Maibach HI, editors. *Percutaneous Penetration Enhancers Physical Methods in Penetration Enhancement.* Berlin Heidelberg: Springer Verlag; 2017. pp. 3–14. <https://doi.org/10.1007/978-3-662-53273-7>.
- 742
- 743 28. Mitragotri S. Synergistic effect of enhancers for transdermal drug delivery. *Pharm Res.* 2000;17:1354–9. <https://doi.org/10.1023/a:1007522114438>.
- 744
- 745 29. Lavon I, Grossman N, Kost J. The nature of ultrasound-SLS synergism during enhanced transdermal transport. *J Controlled Release.* 2005;107:484–94. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2005.06.011>.
- 746
- 747 30. Inactive Ingredient Search for Approved Drug Products. U.S. Food & Drug Administration. <http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/iig/index.cfm>. Accessed November 5, 2020.
- 748
- 749 31. Machado M, Salgado TM, Hadgraft J, Lane ME. The relationship between transdermal water loss and skin permeability. *Int J Pharm.* 2010;384:73–7. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2009.09.044>.
- 750
- 751 32. Lavon I, Kost J. Ultrasound and transdermal drug delivery DDT. 2004;9:670–6.
- 752
- 753 33. Machet L, Boucaud A. Phonophoresis: efficiency, mechanisms and skin tolerance. *Int J Pharm.* 2002;243:1–15.
- 754
- 755 34. Seto JE, Polat BE, Lopez RFV, Blankschtein D, Langer R. Effects of ultrasound and sodium lauryl sulfate on the transdermal delivery of hydrophilic permeants: Comparative in vitro studies with full-thickness and split-thickness pig and human skin. *J Controlled Release.* 2010;145:26–32. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2010.03.013>.
- 756
- 757 35. Dragicevic N, Atkinson JP, Maibach HI. Chemical penetration enhancers: Classification and mode of action. In: Dragicevic N, Maibach HI, editors. *Percutaneous Penetration Enhancers. Chemical Methods in Penetration Enhancement.* Berlin Heidelberg: Springer Verlag; 2015. pp. 11–27. <https://doi.org/10.1007/978-3-662-47039-8>.
- 758
- 759 36. Piñón-Segundo E, Nava-Arzaluz MG, Ganem-Rondero A. Effect of the Use of Chemical Enhancers Combined with Sonophoresis, Electroporation, or Microneedles on Transdermal Drug Delivery. In: Dragicevic N, Maibach HI, editors. *Percutaneous Penetration Enhancers Physical Methods in Penetration Enhancement.* Berlin Heidelberg: Springer Verlag; 2017. pp. 399–419. <https://doi.org/10.1007/978-3-662-53273-7>.
- 760
- 761 37. Wolloch L, Kost J. The importance of microjet vs shock wave formation in sonophoresis. *J Controlled Release.* 2010;148:204–11. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2010.07.106>.
- 762
- 763 38. Pelucio-Lopes C, Machet L, Vaillant L, Lethiecq M, Furet Y, Pourcelot L, Lorette G. Phonophoresis of azidothymidine (AZT). *Int J Pharm.* 1993;96:249–52. [https://doi.org/10.1016/0378-5173\(93\)90234-7](https://doi.org/10.1016/0378-5173(93)90234-7).
- 764
- 765 39. Mitragotri S. Devices for overcoming biological barriers: The use of physical forces to disrupt the barriers. *Adv Drug Deliver Rev.* 2013;65:100–3. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2012.07.016>.
- 766
- 767 40. Nava-Arzaluz MG, Calderón-Lojero I, Quintanar-Guerrero D, Villalobos-García R, Ganem-Quintanar A. Microneedles as transdermal delivery systems: Combination with other enhancing strategies. *Curr Drug Deliv.* 2012;9:57–73. <https://doi.org/10.2174/156720112798376078>.
- 768
- 769 41. Ita K. Transdermal delivery of drugs with microneedles: Strategies and outcomes. *J Drug Deliv Sci Tec.* 2015;29:16–23. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2015.05.001>.
- 770
- 771 42. Nagarkar R, Singh M, Nguyen HX, Jonnalagadda S. A review of recent advances in microneedle technology for transdermal drug delivery. *J Drug Deliv Sci Tec.* 2020;59:101923. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2020.101923>.
- 772
- 773 43. Yamashita N, Tachibana K, Ogawa K, Tsujita N, Tomita A. Scanning electron microscopic evaluation of the skin surface after ultrasound exposure. *Anat Rec.* 1997;247:455–61.
- 774
- 775 44. Boucaud A, Montharu J, Machet L, Arbeille B, Machet MC, Patat F, Vaillant L. Clinical, histologic, and electron microscopy study of skin exposed to low-frequency ultrasound. *Anat Rec.* 2001;264:114–9.
- 776
- 777 45. Bernal-Chávez SA, Pérez-Carretero LY, Nava-Arzaluz MG, Ganem-Rondero A. Alkylglycerol derivatives, a new class of skin penetration modulators. *Molecules.* 2017;22(185):1–11. <https://doi.org/10.3390/molecules22010185>.
- 778
- 779 46. Brancalion L, Bamberg MP, Kollias N. Spectral differences between stratum corneum and sebaceous molecular components in the mid-IR. *Appl Spectrosc.* 2000;54:1175–82. <https://doi.org/10.1366/0003702001950742>.
- 780
- 781 47. Alvarez-Román R, Merino G, Kalia YN, Naik A, Guy RH. Skin permeability enhancement by low frequency sonophoresis: Lipid extraction and transport pathways. *J Pharm Sci.* 2003;92:1138–46. <https://doi.org/10.1002/jps.10370>.
- 782
- 783
- 784
- 785
- 786
- 787
- 788
- 789
- 790
- 791
- 792
- 793
- 794
- 795
- 796
- 797
- 798
- 799
- 800
- 801
- 802
- 803
- 804
- 805
- 806
- 807
- 808
- 809
- 810
- 811
- 812
- 813
- 814
- 815
- 816
- 817
- 818
- 819
- 820
- 821
- 822
- 823
- 824
- 825
- 826
- 827
- 828
- 829
- 830
- 831
- 832
- 833
- 834
- 835
- 836
- 837
- 838
- 839

Journal:	40199
Article:	402

Author Query Form

Please ensure you fill out your response to the queries raised below and return this form along with your corrections

Dear Author

During the process of typesetting your article, the following queries have arisen. Please check your typeset proof carefully against the queries listed below and mark the necessary changes either directly on the proof/online grid or in the 'Author's response' area provided below

Query	Details Required	Author's Response
AQ1	Figure 1, 2 and 6 are blurred image. Please provide replacement. We prefer replacement figures containing vector/editable object rather than embed images. Preferred formats are eps,ai,and pdf.	
AQ2	Please check the Changes, and correct if necessary.	
AQ3	Please check the Changes, and correct if necessary.	