

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA  
UNIDAD XOCHIMILCO

División de Ciencias Biológicas y de la Salud  
Departamento de Sistemas Biológicos

Maestría en Ciencias Farmacéuticas

Línea de investigación:  
Diseño y producción de formas farmacéuticas

**“ESTUDIO DE LA ABSORCIÓN A TRAVÉS DE PIEL DE ZOLMITRIPTÁN  
FORMULADO EN NIOSOMAS”**

Comunicación Idónea de Resultados para obtener el grado de  
Maestra en Ciencias Farmacéuticas

Presenta

Q.F.B. MARÍA TERESA PINEDA HERNÁNDEZ  
MATRÍCULA 2121801467

Comité Tutorial

Tutor: Dra. Flora Adriana Ganem Rondero  
Asesor: Dra. Luz María Melgoza Contreras  
Asesor: Dra. María Guadalupe Nava Arsaluz

diciembre, 2014

**“ESTUDIO DE LA ABSORCIÓN A TRAVÉS DE PIEL DE ZOLMITRIPTÁN  
FORMULADO EN NIOSOMAS”**

Tutor:

---

Vo.Bo. Dra. Flora Adriana Ganem Rondero

Asesores:

---

Vo.Bo. Dra. Luz María Melgoza Contreras

---

Vo.Bo. Dra. María Guadalupe Nava Arzaluz

Alumna:

---

Q.F.B. María Teresa Pineda Hernández

Matrícula 2121801467

**“ESTUDIO DE LA ABSORCIÓN A TRAVÉS DE PIEL DE ZOLMITRIPTÁN  
FORMULADO EN NIOSOMAS”**

Jurado de examen de grado

Presidenta

---

Dra. María Josefa Bernad Bernad

Vocal

---

Dra. Elizabeth Piñón Segundo

Secretario

---

Dra. Luz María Melgoza Contreras

## RESUMEN

El objetivo de este trabajo consistió en utilizar los niosomas como un sistema acarreador del fármaco zolmitriptán, el cual es utilizado en el tratamiento de la migraña. Como entre los síntomas de la migraña, el paciente puede presentar vómito y náusea, la administración de este fármaco por vía oral se ve restringida, por lo que un sistema de liberación transdérmica sería una excelente alternativa para su administración.

Los niosomas son sistemas útiles para encapsular fármacos lipofílicos e hidrofílicos ejemplo del segundo el zolmitriptán, al encapsular el fármaco en estos sistemas, se espera mejorar su permeación a través de piel en comparación al fármaco en solución.

Este proyecto constó de varias etapas:

1. Desarrollo y optimización de una formulación a base de niosomas, evaluando las siguientes variables: tipo de tensoactivo, tiempo de sonicación, número de filtraciones y método de preparación.
2. Caracterización del sistema niosomal óptimo, tanto placebo, como conteniendo el fármaco, por tamaño de vesícula, potencial zeta y eficiencia de encapsulamiento.
3. Validación de los métodos analíticos empleados para la cuantificación del fármaco en el medio receptor durante los estudios de permeación pasiva *in vitro*, así como el fármaco retenido en la piel al final de dichos estudios.
4. Estudios de permeación pasiva *in vitro* en celdas de difusión verticales tipo Franz en donde se determinó el flujo, la cantidad de fármaco permeado y el coeficiente de permeabilidad, tanto del zolmitriptán incluido en los niosomas, como de una solución acuosa del fármaco.

Los resultados mostraron una mejora en la permeación de zolmitriptán cuando este se administró incluido en niosomas que a la administración en forma de solución, por lo que el uso de niosomas como acarreador del fármaco zolmitriptán es una buena opción para el diseño de un sistema de liberación transdérmica.

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco a la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco y a la Maestría en Ciencias Farmacéuticas por la educación de alta calidad que me fue proporcionada.

Al Laboratorio de Investigación y Posgrado en Tecnología Farmacéutica, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán/UNAM, campo 1 y campo 4, por las instalaciones y equipos que me prestaron.

Agradezco el apoyo brindado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología a través de la beca proporcionada número 272135.

Al proyecto 129320 y proyecto PAPIIT (UNAM) 216313.

Agradezco a mi tutora, Dra. Adriana Ganem Rondero, por la asesoría y apoyo que me brindó en la elaboración del trabajo.

A mis asesoras, Dra. Luz María Melgoza Contreras y Dra. Lupita Nava por resolverme cada duda y el gran apoyo moral.

**A MI ESPOSO LUIS QUE NUNCA ME HA DEJADO RENDIRME,  
A MI PADRE† Y A MI MADRE POR SU AMOR INCONDICIONAL,  
A MIS HERMANOS Y AMIGOS POR LOS BUENOS MOMENTOS  
Y SOBRE TODO A PAPÁ DIOS.**

<b>I. INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
<b>II. ANTECEDENTES</b>	<b>3</b>
<b>III. MARCO TEÓRICO</b>	<b>6</b>
<b>A. ZOLMITRIPTÁN</b>	<b>6</b>
a. Migraña	6
b. Mecanismo de acción de los fármacos antimigrañosos.	8
c. Propiedades fisicoquímicas del zolmitriptán	10
d. Farmacocinética del zolmitriptán	10
e. Efectos adversos	12
<b>B. PIEL</b>	<b>12</b>
a. Sistemas de liberación transdérmica.	14
b. Permeación transdérmica	16
<b>C. NIOSOMAS</b>	<b>17</b>
a. Definición	18
b. Métodos de preparación	20
c. Ventajas de los niosomas	21
d. Caracterización	22
<b>IV. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b>	<b>23</b>
<b>V. HIPÓTESIS</b>	<b>24</b>
<b>VI. OBJETIVOS</b>	<b>24</b>
<b>A. OBJETIVO GENERAL</b>	<b>24</b>
<b>B. OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b>	<b>24</b>
<b>VII. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>25</b>
<b>A. MATERIALES</b>	<b>25</b>
Material biológico	25

Equipos	25
<b>B. MÉTODOS</b>	<b>26</b>
a. Validación del método analítico para la cuantificación de zolmitriptán en los estudios de permeación pasiva <i>in vitro</i> .	26
b. Validación del método analítico para la extracción de zolmitriptán retenido en piel.	27
c. Preparación de niosomas.	30
1. Método de preparación de niosomas por hidratación de película.	30
2. Método de preparación de niosomas por inyección de éter.	33
d. Caracterización de niosomas	35
1. Tamaño de partícula y potencial zeta	35
2. Encapsulamiento de zolmitriptán en niosomas.	35
e. Estudio de permeación pasiva <i>in vitro</i> .	36
<b>VIII.RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>37</b>
<b>a. Validación del método analítico para la cuantificación de zolmitriptán en los estudios de permeación pasiva <i>in vitro</i>.</b>	<b>37</b>
<b>b. Validación del método analítico para la cuantificación de zolmitriptán retenido en piel.</b>	<b>38</b>
<b>c. Preparación de niosomas.</b>	<b>40</b>
1. Método de preparación de niosomas por hidratación de película	40
2. Método de preparación de niosomas por inyección de éter	44
3. Niosomas para los estudios de permeación pasiva <i>in vitro</i> .	46
<b>d. Estudio de Permeación pasivo <i>in vitro</i>.</b>	<b>48</b>
<b>IX. CONCLUSIONES</b>	<b>55</b>
<b>X. REFERENCIAS</b>	<b>56</b>
<b>XI. ANEXOS</b>	<b>60</b>
<b>1. Curvas de calibración</b>	<b>60</b>



1.1 Curva estándar en solución amortiguadora de fosfatos pH $7.4 \pm 0.02$ en contacto con piel.	60
1.1.1 Resultados de la validación del método analítico.	61
1.2 Curva estándar de metanol en contacto con piel	63
1.2.1 Resultados de la validación del método analítico	64
<b>2 Prueba de Múltiple Rangos para el tamaño de vesícula para tres lotes de niosomas.</b>	<b>66</b>
<b>3 Estudio de permeación pasiva <i>in vitro</i>.</b>	<b>67</b>
3.1 Flujo y microgramos promedio para la referencia y niosomas.	67
3.2 Coeficientes de permeabilidad.	67

## I. INTRODUCCIÓN

La migraña es una enfermedad crónica, recurrente, una condición incapacitante que afecta a millones de personas en todo el mundo. Un tratamiento oportuno y adecuado es esencial para el pleno retorno de la función y la productividad del paciente. Los triptanes son generalmente eficaces, bien tolerados y seguros para el tratamiento de esta enfermedad. En la actualidad hay siete triptanes disponibles en todo el mundo (no todos disponibles en todos los países) con varias vías de administración, dando a los médicos y pacientes una amplia variedad (Johnston & Rapoport, 2010).

A pesar de las similitudes de los triptanes, estos tienen diferentes perfiles de eficacia, diferente metabolismo y farmacocinética (Pascual & Muñoz, 2005), todos los triptanes son superiores al placebo en los ensayos clínicos, y algunos, como el rizatriptán (dosis 10 mg), eletriptán (dosis 40 mg), almotriptán (dosis 12,5 mg), y zolmitriptán (dosis 2,5 y 5 mg) y el prototipo “sumatriptán” (dosis 100 mg) son muy similares entre sí. Estos cinco son conocidos como los triptanes de acción rápida, el aumento de la dosificación puede ofrecer una mayor eficacia, pero puede conferir un mayor riesgo de eventos adversos, que suelen ser leves o moderados y de naturaleza transitoria (Johnston & Rapoport, 2010).

El zolmitriptán es un agonista selectivo del receptor 5-HT<sub>1B/1D</sub> de la serotonina lo que resulta en la reversión de la vasodilatación y disminución de la inflamación neurogénica además de la disminución de la nonicepción central y previene la sensibilización central.

Algunas de las formas farmacéuticas disponibles para zolmitriptán son tabletas (vía oral), tabletas de desintegración oral y spray nasal (ODT y NS respectivamente, por sus siglas en inglés) (Rapoport *et al.*, 2004); En estudios recientes Sridha *et al.* (2012) desarrollaron un parche bucal y Kusam *et al.* (2011) un sistema de liberación transdérmico (TDDS por sus siglas en inglés, Transdermal Drug Delivery System) para la administración de zolmitriptán.

Los TDDS son formas de dosificación que implican el transporte de fármacos por la piel para proporcionar un efecto terapéutico local mientras una fracción muy importante de fármaco es transportado a la circulación sistémica (Shingade *et al.*, 2012).

Los TDDS tienen como ventajas que se pueden aplicar en una gran área superficial, la cual es fácilmente accesible, emplean una vía de administración no invasiva (mínima), tienen posibilidad tanto de acción local como de liberación sistémica, es posible lograr una liberación sostenida y/o controlada, evitan metabolismo de primer paso y el tránsito por el tracto gastrointestinal (TGI), así como facilidad de autoadministración, entre otras (Ganem Rondero, 2011).

Debido a que algunas de las propiedades fisicoquímicas del zolmitriptán no son las ideales para un TDDS es necesario el uso de un sistema acarreador como los niosomas, los cuales al estar compuestos por tensoactivos no iónicos y colesterol logran encapsular al fármaco en su interior y así aumentar la biodisponibilidad del mismo.

En este trabajo se propone la inclusión de zolmitriptán en una suspensión de niosomas para su administración transdérmica, evaluando y comparando la permeación a través de piel *in vitro* de esta formulación y de una solución acuosa del fármaco.

## II. ANTECEDENTES

Los triptanes son considerados la terapia de primera línea para la migraña leve a grave y para ataques que no responden a los analgésicos no específicos (Gilmore & Michael, 2011). Aunque el sumatriptán es el único triptán recomendado por la Guía de Práctica Clínica para el Manejo de la Cefalea Tensional y de la Migraña en el Adulto (Secretaría de Salud, 2007-2012), éste presenta una baja biodisponibilidad en comparación con otros análogos. Se ha reportado que la biodisponibilidad absoluta media de zolmitriptán es del 40%, aproximadamente tres veces más que la de sumatriptán (Ezpeleta, 2005).

La administración por vía oral es la más aceptada por los pacientes, sin embargo tiene varias limitaciones y no es la adecuada en los pacientes con vómitos desde el principio de la crisis migrañosa; las vías de administración no orales se idearon para evitar esos problemas (Ezpeleta, 2005).

Existen estudios en donde se han desarrollado algunas vías de administración no orales para diferentes triptanes como la administración intranasal y TDDS como parches, implantes y geles.

Para la vía de administración intranasal, Mufassir Mushtaque *et al.* (2014) desarrollaron microesferas de etil celulosa, carboximetilcelulosa de sodio de rizatriptán, Vyas *et al.* (2013) elaboraron una microemulsión por el método de titración, de zolmitriptán, Kolsure *et al.* (2012) un gel para administración nasal de Pluronic F-127 y F-68 y polímeros bioadesivos y zolmitriptán.

Por otro lado durante las últimas décadas numerosas investigaciones exploran la vía de administración transdérmica debido a que la piel presenta un área relativamente grande y fácilmente accesible, la piel tiene una superficie de 1-2 m<sup>2</sup> disponibles para la absorción. La administración por vía transdérmica es un procedimiento no invasivo que permite la intervención continua (reposicionamiento, eliminación o sustitución), permitiendo una liberación sostenida y controlada durante períodos largos de tiempo (Naik *et al.*, 2000).

Además, la piel es de fácil acceso para el suministro de agentes terapéuticos tanto para el reparto local como sistémico, ya que dispone de extensión del músculo liso que es relativamente vascularizado, inmóvil, abundante, tiene un rápido tiempo de recuperación después de la exposición a estrés (irritación, parches) y el fármaco puede ser protegido de la degradación en el ambiente ácido del estómago (Sridha *et al.*, 2012).

Se han desarrollado sistemas de liberación transdérmica para diferentes triptanes como Praneetha, *et al.* (2014) elaboraron un parche de eletriptán con el fin de controlar la liberación del fármaco por 48 horas, El-Nabarai *et al.* (2013) películas de Eudragit® RS-100 y RL-100 y plastificantes de sumatriptán

Por lo expuesto anteriormente, la vía transdérmica, puede ser una excelente vía de administración, por lo que el diseño de sistemas submicrónicos como nano- y microemulsiones, niosomas, liposomas y nanopartículas (se caracterizan por tener un tamaño  $<1 \mu\text{m}$ ) que favorezcan la permeación a través de la piel es una alternativa sumamente interesante.

Para este trabajo se pretende el diseño de niosomas como acarreador del fármaco zolmitriptán por sus ventajas para encapsular fármacos hidrofílicos y su composición (tensoactivos no iónicos y colesterol). Únicamente se han utilizado éstos acarreadores para el sumatriptán para su administración nasal (Gayathri *et al.*, 2000) por lo que podría considerarse novedoso los niosomas para el diseño de un TDDS. Además de que con el zolmitriptán no se han elaborado niosomas solo nanopartículas sólidas lipídicas (Singh *et al.*, 2012) y nanopartículas biodegradables de quitosan (Mandlik *et al.*, 2013) y el TDDS diseñado por Kusam *et al.* (2011) no utiliza un sistema acarreador para el fármaco.

Actualmente en enero de 2013, la FDA (Food Drug Administration) aprobó un sistema de liberación transdérmico por iontoforesis para el fármaco sumatriptán, (nombre comercial Imitrex), en forma de parche que puede colocarse envolviéndolo en el antebrazo o el muslo denominado Zecuity®, el parche que funciona con pilas es fabricado por la compañía farmacéutica NuPathe. Tiene

alrededor de 8 pulgadas de largo y 4 pulgadas de ancho y utiliza una corriente eléctrica para hacer circular el medicamento a través de la piel durante el transcurso de cuatro horas. Una pequeña batería y un chip electrónico regulan la carga para asegurar que el paciente reciba la dosis correcta.

### III. MARCO TEÓRICO

#### A. ZOLMITRIPTÁN

El zolmitriptán es un inhibidor potente y selectivo de los receptores (5-HT<sub>1B/1D</sub>) de la serotonina; estos receptores son blanco para el tratamiento de la migraña debido que al aumentar su estimulación eliminan la señal del dolor. El zolmitriptán es un triptán de segunda generación y se utiliza en el tratamiento agudo de ataques de migraña con o sin aura y dolores de cabeza en racimo. El zolmitriptán también ha demostrado eficacia en el tratamiento de dolor de cabeza de migraña persistente y / o recurrente (Kusam *et al.*, 2011).

El zolmitriptán fue desarrollado por Wellcome Pharmaceuticals en el Reino Unido con el propósito de crear una tableta oral activa a nivel central con un fármaco más lipofílico y con una absorción más rápida en comparación con sumatriptán (fármaco prototipo). La dosis oral estándar es de 2.5 o 5 mg durante el curso temprano del ataque migrañoso, más la administración de una segunda dosis 2 horas después de la primera si el dolor persiste; para la administración de spray nasal la formulación es de 5 mg. La dosis máxima para cualquiera de sus formulaciones es 10 mg/24 h en Estados Unidos de acuerdo a la FDA (Food and Drug Administration) y de 15 mg/24 h en Inglaterra de acuerdo a las autoridades regulatorias de la Unión Europea (Rapoport *et al.*, 2004).

Es un fármaco bien tolerado en la gran mayoría de los pacientes y sus efectos adversos, de presentarse, suelen ser de leves a moderados y transitorios, resolviéndose espontáneamente sin condicionar la retirada del tratamiento en las futuras crisis (Ezpeleta, 2005).

##### a. Migraña

Según la Guía de Práctica Clínica para el Manejo de la Cefalea Tensional y de la Migraña en el Adulto, la migraña se define como “subtipo de cefalea que se

presenta en ataques agudos que duran de 4 a 72 horas, unilaterales, pulsátil, de intensidad moderada a grave, que aumenta con los esfuerzos y estímulos acompañada de náuseas y/o vómito, fotofobia y fonofobia” (Secretaría de Salud, 2007-2012).

La migraña afecta a una gran fracción de la población mundial, con una mayor prevalencia en mujeres (15%) que en hombres (6%) (Villalón *et al.*, 2003); tiene una alta prevalencia asociada a una gran demanda de atención médica y afectación de la productividad y calidad de vida del paciente (Secretaría de Salud, 2007-2012).

Existen dos formas principales de migraña: migraña sin aura y migraña con aura. La migraña sin aura se caracteriza por dolor debilitante, unilateral y pulsátil, por tener una duración de 4 a 72 horas y se agrava con la actividad física además de ser acompañado de síntomas autónomos tales como vómitos, náuseas, fotofobia y fonofobia. Sin embargo, el ataque también puede ser precedido por síntomas premonitorios (pródromo) en algunos pacientes. En un tercio de los pacientes con migraña, la fase de cefalea está precedida o acompañada de síntomas transitorios focales neurológicos de aura (migraña con aura), éstos suelen ser visuales, pero también puede implicar alteraciones sensoriales, dificultades del habla, y síntomas motores (Guang-Yin *et al.*, 2010) y se presentan en el 30% de los pacientes.

Basado en las características clínicas de la migraña se pueden distinguir tres fases: un gatillo inicial, aura y finalmente el dolor de cabeza. La información sobre el disparador inicial es limitada; esta fase, involucra al tronco cerebral como el "generador de migraña" que puede estar relacionado con una canalopatía familiar (Villalón *et al.*, 2003).

Una vez que el "generador de migraña" se ha encendido, se presenta un decremento en el flujo sanguíneo cerebral, después de una onda de propagación de la depresión cortical (en pacientes en los que el flujo sanguíneo cerebral cae por debajo de un valor crítico, pueden aparecer síntomas de aura) seguido por una vasodilatación, probablemente debido a los cambios en la actividad de las



neuronas que inervan las arterias craneales (por ejemplo, en la duramadre, base del cráneo y el cuero cabelludo) (Villalón *et al.*, 2003).

La vasodilatación craneal conduce a un mayor volumen sanguíneo craneal después de cada pulso cardíaco, con el consiguiente aumento en pulsaciones dentro de los vasos sanguíneos afectados. El aumento de las pulsaciones puede ser detectado por los receptores de "estiramiento" en la pared del vaso y el aumento resultante en la actividad del nervio sensorial perivascular (trigémico), provocando dolor de cabeza y otros síntomas. Esta estimulación del trigémino lleva a la liberación de neuropéptidos, reforzando así la vasodilatación y la actividad nerviosa perivascular (Villalón *et al.*, 2003).

Además de la noradrenalina (NA) y acetilcolina (ACH), estudios inmunohistoquímicos han demostrado la presencia de varios transmisores vasodilatadores en los nervios perivascuales los cuales terminan en las capas musculares lisas de los vasos sanguíneos intracraneales como: péptido intestinal vasoactivo (VIP), óxido nítrico (NO), sustancia P, neuroquinina A y gen relacionado con el gen de la calcitocina (CGRP) (Villalón *et al.*, 2003).

Los fármacos antimigrañosos provocan vasoconstricción de los vasos craneales, reducen la liberación de neuropéptidos e inhiben la transmisión del impulso dentro del sistema trigeminovascular, evitando o eliminando el dolor según sea el caso (Villalón *et al.*, 2003).

#### b. Mecanismo de acción de los fármacos antimigrañosos.

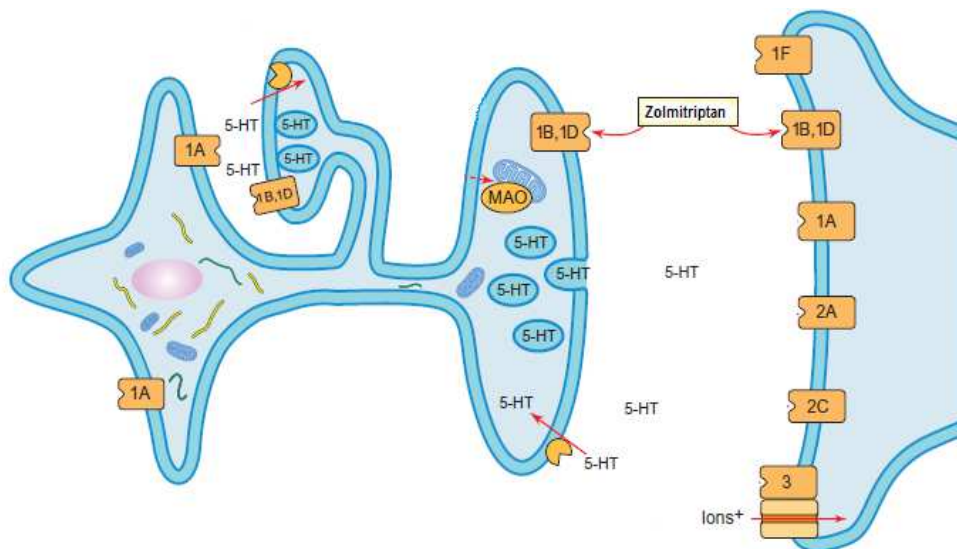
La serotonina es un vasoconstrictor y un neurotransmisor (Villalón *et al.*, 2003), interviene en la transmisión a distintos niveles y por distintos mecanismos; a nivel periférico activa las fibras nociceptivas y a nivel central participa en la modulación inhibitoria del dolor (Ferrandiz, Fisiopatología del dolor, 2013). Se ha observado un decremento de los niveles de serotonina durante el ataque migrañoso dando como resultado una vasodilatación; además cuando se administra una infusión

intravenosa de serotonina la migraña puede ser detenida (Villalón *et al.*, 2003), por lo que el uso del zolmitriptán es una buena opción para el tratamiento de éste padecimiento debido a que es un análogo estructural de la serotonina.

El zolmitriptán es un agonista selectivo de los receptores 5-HT<sub>1B</sub> y 5-HT<sub>1D</sub> de la serotonina, los cuales se encuentran en venas, en nervios presinápticos y nervios sensoriales (Johnston & Rapoport, 2010). Al unirse el fármaco con los receptores (como se muestra en la figura 1) ocurren tres cosas:

1. La inhibición periférica de la liberación del gen relacionado con el gen de la calcitonina (CGPR) y sustancia P del trigémino aferente, los cuales son transmisores posinápticos excitatorios y transfieren la información dolorosa.
2. Modulación de neuronas de segundo orden en el camino trigéminocervical incluyendo al núcleo caudalis y tálamo.
3. Una vasoconstricción de los vasos sanguíneos.

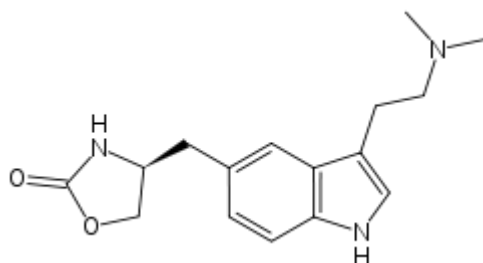
Los triptanes aumentan la estimulación de los receptores de serotonina eliminando la señal del dolor.



**Figura 1.** Neurona serotonérgica. (Hensler, 2012)

### c. Propiedades fisicoquímicas del zolmitriptán

El zolmitriptán es un polvo blanco que debe ser almacenado a 4° C y protegido de la luz y la humedad; la fórmula empírica es  $C_{16}H_{21}N_3O_2$ ; tiene un peso molecular de 287.361  $\text{gramos mol}^{-1}$  y un punto de fusión de 139-141 °C. Su nombre químico es (S)-4-[[3-[2-(dimetilamino)etil]-1H-indol-5-il] metil]-2-oxazolidinona; la estructura química del zolmitriptán puede ser observada en la figura 2. Tiene un pKa de 9.64; es altamente soluble en pH neutros >20 mg/mL (Moore J. , 2007) y un coeficiente de partición octanol/agua (logP) de 1.644; un coeficiente de distribución ( $\log D_{pH7}$ ) de -0.78 (Patel *et al.*, 2009).



**Figura 2.** Estructura química del zolmitriptán.

Las propiedades fisicoquímicas del zolmitriptán le otorgan una buena biodisponibilidad oral, una razonable estabilidad metabólica y cierto grado de penetración a través de la barrera hematoencefálica.

### d. Farmacocinética del zolmitriptán

El zolmitriptán tiene diferentes presentaciones para su administración como son las tabletas (administración por vía oral), tableta de desintegración oral (administración por vía oral pero puede usarse sin el consumo de líquidos) y el spray nasal. Dependiendo de la presentación pueden variar muy poco sus

propiedades farmacocinéticas (Rapoport *et al.*, 2004). En la tabla 1 se muestra una comparación de algunas de las propiedades farmacocinéticas de las diferentes presentaciones de zolmitriptán (Johnston & Rapoport, 2010).

**Tabla 1.** Comparación de algunas de las propiedades farmacocinéticas de las diferentes presentaciones de zolmitriptán.

<b>Forma farmacéutica y su contenido de zolmitriptán en mg</b>	<b>t<sub>max</sub> (h)</b>	<b>Biodisponibilidad (%)</b>	<b>t<sub>1/2</sub> (h)</b>
Tableta oral (2.5)	1.5	40-48	3
Tableta oral (5)	1.5	40-48	2.71
ODT (2.5)	3.3	40-48	2.5-3
Spray Nasal (5)	2	42	2.82

ODT= tabletas de desintegración oral. t<sub>max</sub>= tiempo máximo. t<sub>1/2</sub>= tiempo de vida media

El zolmitriptán es rápidamente absorbido después de su administración oral; sufre de metabolismo de primer paso por el citocromo P450 1A2 (CYP1A2), se forma un metabolito con actividad farmacológica, el N-desmetilzolmitriptán (2-6 veces más potente que el zolmitriptán), y éste después es metabolizado por la monoaminoxidasa A (MAO-A). La excreción renal se lleva a cabo tanto para el zolmitriptán como para su metabolito, ésta es su principal vía de eliminación, pero una cantidad muy pequeña puede ser eliminada por heces (CNS.000-355-841.2.0, 11) y tiene una unión a proteínas del 25%, además de que el consumo de alimentos no afecta su absorción (Rapoport *et al.*, 2004).

Por vía oral, tiene una biodisponibilidad del 40-50% y un volumen de distribución de 400-500 L/Kg; tiene un aclaramiento de 31.5 mL/min/Kg (Moore J. , 2007).

#### e. Efectos adversos

El zolmitriptán es un fármaco bien tolerado en la gran mayoría de los pacientes y sus efectos adversos, de presentarse, suelen ser de leves a moderados y transitorios, resolviéndose espontáneamente sin condicionar la retirada del tratamiento en las futuras crisis (Ezpeleta, 2005).

Entre los efectos adversos comunes (1-10%) se encuentran desórdenes cardiacos como palpitaciones; desordenes gastrointestinales como vómito, boca seca y dolor estomacal, entre otros. En cuanto a efectos adversos no comunes (0.1-1%) se encuentran desórdenes vasculares como aumento en la presión sanguínea, desordenes urinarios como poliuria. Para los efectos adversos raros (0.01-0.1%) se presentan desórdenes en el sistema inmune como anafilaxia y reacciones de hipersensibilidad y desórdenes en piel como urticaria. Y para los efectos adversos muy raros (<0.01%) se presentan desórdenes gastrointestinales como necrosis y desórdenes cardiacos como infarto al miocardio (CNS.000-355-841.2.0, 11).

La mayoría de las personas que presentaron estos efectos adversos eran mayores de edad y con o sin historia de hipertensión (CNS.000-355-841.2.0, 11).

## **B. PIEL**

La piel es el órgano más grande, complejo y multifuncional, contiene muchas células especializadas que se adaptan a diferentes funciones. La piel consiste en una capa superficial (epidermis) que se adhiere estrechamente a la capa más profunda (dermis) por medio de la membrana basal (Powell, 2007) y de una capa subcutánea de tejido graso (como se observa en la figura 3). En promedio la piel cubre un área de 2 m<sup>2</sup> en un humano adulto y recibe un tercio de la sangre circulante en el cuerpo (Latheeshjlal *et al.*, 2011).

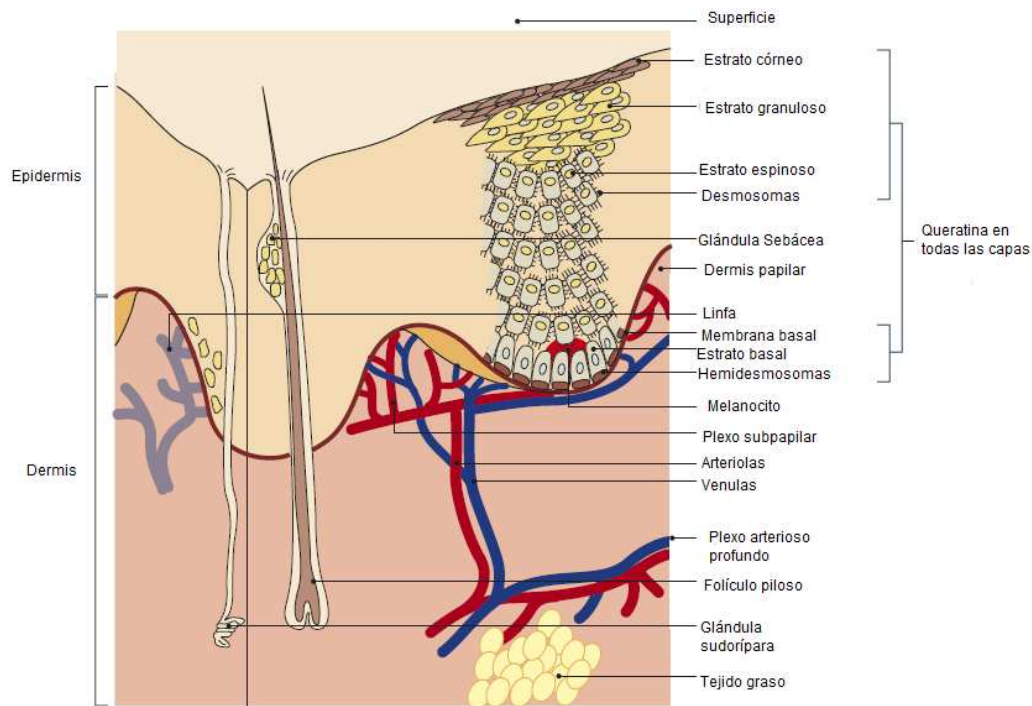
Las funciones de la piel son las siguientes: a) recubrimiento para todos los tejidos blandos; b) protección contra lesiones, invasión bacteriana y desecación; c)

regulación de la temperatura corporal; d) recepción de sensaciones continuas del ambiente; e) excreción de glándulas sudoríparas y f) absorción de la radiación ultravioleta del sol para la síntesis de vitamina D (Moore K. D., 2007).

La epidermis está dividida en 2 partes, el estrato córneo y la epidermis viable; la epidermis viable está constituida por cuatro capas, el estrato lúcido, granuloso, espinoso y germinativo; la epidermis es la barrera principal para la absorción percutánea, su grosor es de aproximadamente 10-15  $\mu\text{m}$  en la mayoría del cuerpo y de 300-400  $\mu\text{m}$  en zonas como las palmas de la mano y las plantas de los pies. La queratina presente en esta zona son fibras proteínicas que forman una red de filamentos que proporcionan cohesión y flexibilidad (Latheeshjlal *et al.*, 2011). El pH de la superficie de la piel está entre 4.0 - 4.9; la epidermis no presenta vascularización (Schmid-Wendtner & Korting, 2006).

En la dermis se lleva a cabo la absorción sistémica, tiene un grosor de 0.2-0.3 cm y está formada por una matriz de proteínas fibrosas como colágeno y elastina. Está dividida en 2 zonas, la membrana papilar (adyacente a la epidermis) y una gruesa capa reticular (la principal capa estructural de la piel). En la dermis se encuentran vasos sanguíneos, nervios sensoriales, glándulas sudoríparas y glándulas sebáceas (Latheeshjlal *et al.*, 2011).

La capa subcutánea de tejido graso, es grasa almacenada que ayuda a conservar el calor y sirve de apoyo a las estructuras delicadas como vasos sanguíneos y nervios. Esta capa no tiene efecto en la absorción percutánea debido a que se encuentra debajo de vasos sanguíneos (Latheeshjlal *et al.*, 2011).



**Figura 3.** Estructura de las diferentes capas de la piel (Powell, 2007)

a. Sistemas de liberación transdérmica.

En la actualidad cerca del 74% de los fármacos son administrados por vía oral, pero no en todos los casos se ha conseguido la efectividad deseada por lo que un sistema de liberación transdérmica puede ser la solución. La liberación de un fármaco a través de la piel (epidermis viable y dermis) para lograr un efecto sistémico se conoce como sistema de liberación transdérmica (TDDS) (Shingade *et al.*, 2012).

El estrato córneo (figura 3) brinda protección contra la entrada de agentes externos lo que limita el transporte de fármacos; para que un fármaco pueda ser administrado en un TDDS debe tener ciertas características como son: peso molecular bajo ( $< 500$  Da), potencia elevada ( $< 50$  mg/día) y lipofilia intermedia. Si estas características no son cumplidas, se requieren dispositivos o métodos que permitan liberar moléculas hidrofílicas y de elevado peso molecular de manera controlada y reproducible. Además es indispensable que la barrera de

permeabilidad se vea comprometida de manera reversible, recuperando su función natural de barrera una vez concluido el tratamiento (Ganem Rondero, 2011).

Algunas de las estrategias empleadas para promover la penetración/absorción de fármacos a través de la piel son (Ganem Rondero, 2011):

- Promotores químicos: solventes o compuestos capaces de alterar de manera reversible la barrera de permeabilidad (etanol, tensoactivos, sales biliares, ácidos grasos, ciclodextrinas, urea, ácido salicílico)
- Iontoforesis: aplicación de corriente constante de bajo voltaje. Promueve el transporte de moléculas con carga (por un mecanismo de repulsión) y neutras (mediante flujo electro osmótico). La velocidad de liberación se modula variando la densidad de corriente.
- Microagujas: arreglos de agujas de talla micrométrica (100–2000  $\mu\text{m}$ ). Traspasan el estrato córneo sin dolor, creando microporos.
- Nanoacarreadores: liposomas, nanopartículas, nano- y microemulsiones, niosomas

Algunas de las ventajas que presentan los TDDS son: evitan el metabolismo de primer paso en hígado; disminuyen la concentración en plasma evitando efectos adversos; reducen fluctuaciones en las concentraciones plasmáticas facilitando la administración de fármacos con bajo índice terapéutico y con tiempos de vida media cortos; fácil eliminación de la forma farmacéutica en caso de toxicidad o irritación; reducen el número de administraciones dándole facilidades al paciente; aumentan la probabilidad del cumplimiento del tratamiento y se puede requerir una menor dosis de fármaco que cuando se administra por vía oral (Shingade *et al.*, 2012).



## b. Permeación transdérmica

La permeación es el movimiento del permeante a través de la membrana, comenzando con la partición en la membrana y continuando con la difusión a través de la membrana hacia la cámara receptora (PermeGear, Inc.), en donde la difusión es el movimiento aleatorio de las moléculas a través de un dominio impulsado por un gradiente de concentración, de alta a baja concentración (PermeGear, Inc.)

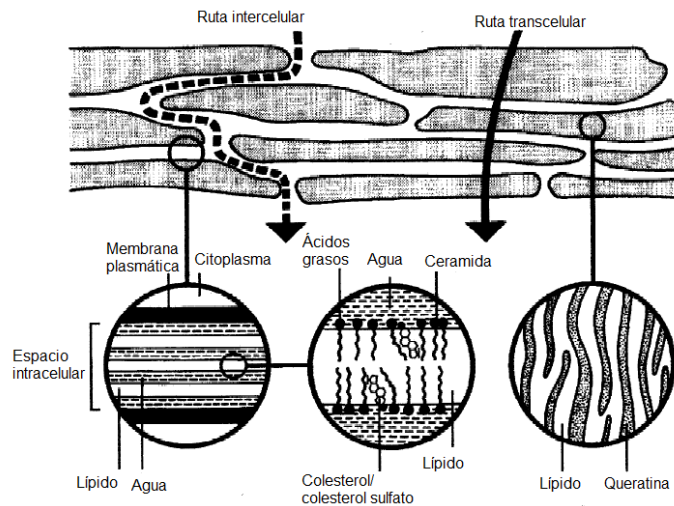
La difusión *in vitro*, es la difusión pasiva de un permeante a partir de un vehículo en la cámara donante, a través de una membrana artificial o biológica, hacia un fluido receptor localizado en una cámara receptora; el permeante es la especie molecular que se desplaza a través del tejido o membrana (PermeGear, Inc.).

La penetración de agua y de moléculas de bajo peso molecular (no electrolitos) a través de la epidermis es proporcional a la concentración y al coeficiente de partición del soluto entre el tejido y el vehículo (Hemanth, 2012)

Existen macro rutas para la penetración del fármaco: la primera son los folículos pilosos asociado a glándulas sebáceas, la segunda glándulas sudoríparas y la tercera a través del estrato córneo que a su vez tiene 2 micro rutas como se muestra en la figura 4, en las que el fármaco puede penetrar tanto de forma intercelular o de forma transcelular (Barry, 2001).

Los fármacos liposolubles utilizan la ruta intercelular por difusión a través de los lípidos intercelulares y por la ruta transcelular atravesando la bicapa lipídica de la membrana celular, en cuanto a los fármacos hidrosolubles atraviesan por la ruta intercelular por medio de canales acuosos asociados con las cabezas polares de los lípidos y por la ruta transcelular a través de poros acuosos en la células epiteliales o por medio de transporte especializado (Veuillez *et al.*, 2001).

El estrato córneo tiene una estructura de “ladrillo y mortero” parecida a una pared en donde los corneocitos y la queratina hidratada forman los ladrillos, puestos sobre el mortero formado por ceramidas, ácidos grasos y colesterol (Barry, 2001).



**Figura 4.** Micro rutas intracelular y transcelular para la penetración de fármaco a través del estrato córneo (Barry, 2001)

La permeación a través de la piel puede ser considerada como un proceso de difusión pasiva y se puede describir por la ecuación de la Ley de Fick:

$$J_s = \frac{dQ_r}{dt} \left( \frac{1}{A} \right)$$

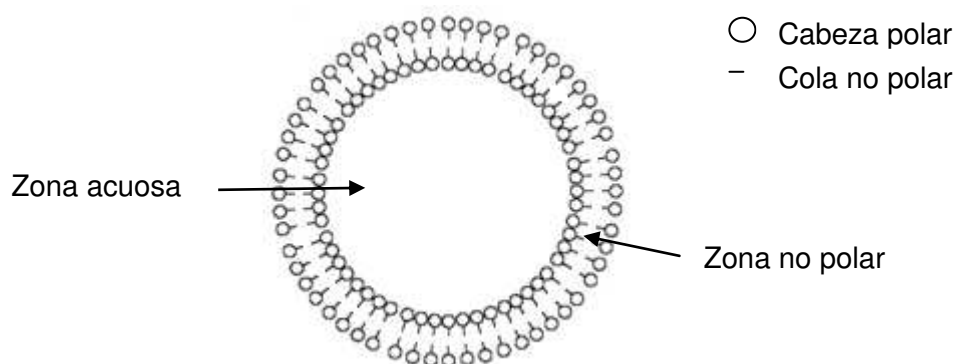
Donde  $J_s$  es el flujo a través de la piel en el estado estable ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2 \cdot \text{h}$ ),  $dQ_r$  es el cambio en la cantidad de material que pasa a través de la membrana al interior del compartimento receptor ( $\mu\text{g}$ ),  $A$  es el área activa de difusión ( $\text{cm}^2$ ) y  $dt$  es el cambio en el tiempo (h).

### C. NIOSOMAS

Debido a que algunas de las propiedades fisicoquímicas del zolmitriptán no son las ideales para un TDDS, es necesario el uso de un sistema acarreador como los niosomas para mejorar la permeación a través de la piel.

### a. Definición

Los niosomas son sistemas vesiculares útiles para acarrearse fármacos, liberándolos de forma controlada para aumentar su biodisponibilidad y alcanzar el efecto terapéutico durante un mayor periodo de tiempo. Este sistema es útil para encapsular tanto fármacos hidrofílicos (en el interior del niosoma; zona acuosa) e hidrofóbicos (en el interior de la bicapa; zona no polar) como se observa en la figura 5 (Mahale *et al.*, 2012).



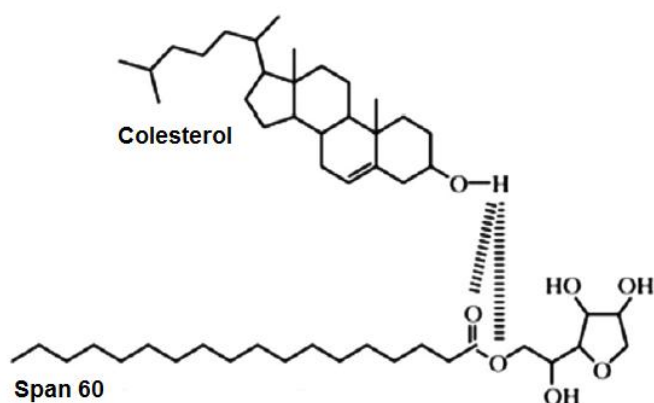
**Figura 5.** Estructura de los niosomas.

Los niosomas están compuestos por tensoactivos no iónicos y lípidos, el lípido comúnmente más utilizado es el colesterol. Los tensoactivos no iónicos están formados por segmentos polares (cabeza) y no polares (cola), tienen mayor estabilidad química que los fosfolípidos, forman bicapas (figura 5), tienen un bajo costo y no son tóxicos; en comparación a otros tensoactivos son menos irritantes; si se ordenaran en forma decreciente en irritabilidad, los más irritantes serían los tensoactivos catiónicos, seguido de los aniónicos y finalmente los no iónicos (Mahale *et al.*, 2012).

Hay diferentes clases de tensoactivos no iónicos como los polioxietileno alquil éter, los ligados a éster, los sorbitán ésteres, polisorbatos entre otros (Yadav *et al.*, 2011). La agregación de los tensoactivos en vesículas en bicapa en lugar de micelas depende de su balance hidrofílico-lipofílico (HLB) y de su estructura

química. Un tensoactivo con un HLB entre 14 - 17 no es adecuado para producir niosomas mientras que uno con un valor de HLB de 8.6 da niosomas con una alta eficiencia de encapsulamiento, la cual disminuye a medida que el valor de HLB disminuye desde 8,6 hasta 1,7. Para  $HLB > 6$ , se debe añadir colesterol con el fin de mejorar la estabilidad de las vesículas (Kumarn & Rajeshwarrao, 2011). En la figura 6 se muestra la interacción estructural entre el colesterol y el Span® 60.

La longitud de la cadena y el tamaño de la cabeza hidrófila del tensoactivo no iónico afectan a la eficiencia de encapsulamiento del fármaco. Los tensoactivos no iónicos con cadenas de estearil (C18) muestran una mayor eficiencia de encapsulamiento que aquellos con lauril (C12). La serie Tween® (polisorbatos) en combinación con colesterol tiene eficiencias de encapsulamiento más altas para fármacos solubles en agua (Kumarn & Rajeshwarrao, 2011).

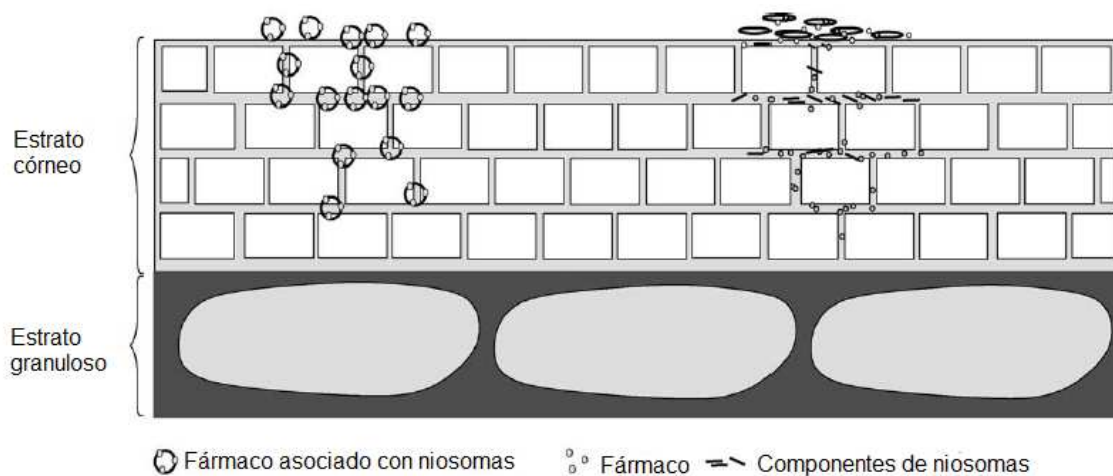


**Figura 6.** Interacción estructural entre el colesterol y el monoesterato de sorbitan (Span® 60) (Kumarn & Rajeshwarrao, 2011)

El uso de los niosomas para administración transdérmica se debe a que pueden actuar como acarreadores del fármaco para ayudar a las moléculas encapsuladas a pasar a través de la piel; actuar como promotores de la penetración del fármaco debido a la interacción con los lípidos de la piel, modificándola reversiblemente; servir como un depósito para la liberación sostenida de fármacos; servir para la

modulación de la absorción sistémica, por lo tanto, proporcionar un entorno controlado para la liberación. (Honeywell-Nguyen & Bouwstra, 2005).

En la figura 7 se muestran las interacciones que pueden tener los niosomas con la piel permitiendo la permeación del fármaco, en donde si los niosomas están actuando como acarreadores del fármaco deberán seguir la misma ruta de penetración y deben mostrar un único perfil de distribución en el estrato córneo (izquierda) y si los niosomas actúan como promotores de la penetración, el perfil de distribución y la vía de penetración no son necesariamente similares (derecha) (Honeywell-Nguyen & Bouwstra, 2005).



**Figura 7.** Interacción de los niosomas con la piel (modificado Honeywell-Nguyen & Bouwstra, 2005)

#### b. Métodos de preparación

Existen diferentes métodos para la preparación de niosomas, generalmente por hidratación de tensoactivos no iónicos (Mahale *et al.*, 2012). El método de elección depende del uso de los niosomas debido a que el método de preparación tiene influencia en el número de bicapas, el tamaño, la distribución de tamaño, la

eficiencia de encapsulamiento y la permeabilidad de las vesículas (Yadav *et al.*, 2011). Algunos de los métodos utilizados para la preparación de niosomas son:

- Método de inyección de éter: los niosomas se forman por la lenta introducción de una solución de tensoactivos disueltos en dietil éter en agua caliente (60°C). El éter es evaporado para la formación de vesículas, unilaminares con un tamaño en el rango de entre 50 a 1000 nm.
- Método de hidratación de película: los tensoactivos no iónicos y colesterol son disueltos en un disolvente orgánico volátil en un matraz bola; el disolvente orgánico es removido con el uso del rotavapor formando una película en la pared del matraz. La película es hidratada con una fase acuosa de 0-60 °C. Las vesículas formadas son multilaminares y de gran tamaño.
- Método de evaporación de fase reversa: Los tensoactivos son disueltos en una mezcla de éter y cloroformo, se le agrega una solución acuosa que contiene el fármaco dando como resultado un sistema con dos fases el cuál es homogenizado y la fase orgánica es evaporada a presión reducida formándose los niosomas unilaminares y de un tamaño de 0.5 µm en la fase acuosa.
- Método de microfluidización: una solución orgánica de tensoactivos y fármaco es bombeada bajo presión de un reservorio a través de una cámara empaquetada a 100 mL/min. Este proceso es repetido hasta alcanzar el tamaño deseado.

#### c. Ventajas de los niosomas

Existen ventajas en el uso de niosomas en comparación con otros sistemas vesiculares entre ellas se encuentran (Yadav *et al.*, 2011):

- Los niosomas tienen una estructura hidrofílica, anfifílica y lipofílica por lo cual se pueden encapsular fármacos con una amplia variedad de solubilidades.

- Pueden liberar al fármaco de forma controlada.
- Mejoran la biodisponibilidad oral de fármacos poco solubles y mejoran la permeación a través de la piel.
- Pueden ser utilizados para administración oral, parenteral y tópica.
- Los tensoactivos usados en su preparación son biodegradables y biocompatibles, por lo que son seguros
- El almacenamiento no requiere condiciones especiales.

#### d. Caracterización

Los niosomas pueden caracterizarse por tamaño de vesícula, morfología, carga (potencial zeta) y tasa de encapsulamiento.

#### **IV. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

La migraña afecta a una gran fracción de la población mundial, tiene una alta prevalencia asociada a una gran demanda de atención médica y afectación de la productividad y calidad de vida del paciente, el tratamiento es administrado por vía oral la cual tiene varias limitaciones y no es la adecuada en los pacientes con vómitos desde el principio de la crisis migrañosa, por lo que las vías de administración no orales constituyen una alternativa para evitar esos problemas.

El zolmitriptán para el tratamiento de la migraña es utilizado debido a que tiene una mayor biodisponibilidad que otros fármacos; las presentaciones existentes de zolmitriptán para su administración son: tableta oral de 2.5 y 5 mg, ODT de 2.5 mg (tabletas de desintegración oral) y Spray nasal de 2.5 y 5 mg.

La vía transdérmica puede ser una excelente vía de administración debido a que es un sitio conveniente y de fácil acceso para el suministro del agente terapéutico para el reparto sistémico, ya que dispone de extensión del músculo liso que es relativamente vascularizado, inmóvil y abundante además de evitar la degradación enzimática del fármaco.

El diseño de niosomas que favorezcan la permeación a través de la piel, es una alternativa sumamente interesante debido a que el zolmitriptán tiene una biodisponibilidad del 40% por vía oral por lo que al mejorar su absorción se puede reducir la dosis necesaria para alcanzar el efecto terapéutico, disminuyendo la probabilidad de efectos adversos además de que un sistema de liberación transdérmico brinda mayor comodidad de administración en comparación con algunas presentaciones existentes en el mercado.



## **V. HIPÓTESIS**

Si se incorpora el zolmitriptán en niosomas entonces se favorecerá la permeación del fármaco a través de la piel, en comparación a una solución acuosa del mismo fármaco.

## **VI. OBJETIVOS**

### **A. OBJETIVO GENERAL**

Comparar el transporte a través de piel *in vitro* de zolmitriptán formulado en niosomas contra una solución acuosa del mismo fármaco.

### **B. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Preparar niosomas conteniendo zolmitriptán y caracterizarlos por su distribución de tamaño de partícula, potencial zeta y tasa de encapsulación.
- Diseñar métodos analíticos validados para la cuantificación de zolmitriptán durante los estudios de permeación.
- Realizar estudios de permeación *in vitro* a través de piel de zolmitriptán incluido en niosomas.

## VII. MATERIALES Y MÉTODOS

### A. MATERIALES

Zolmitriptán (Sigma Aldrich, USA), metanol (J.T Baker, USA), agua destilada (Equipo Milli-Q, Millipore, USA), fosfato monobásico de potasio (Fermont, México), hidróxido de sodio (Fermont, México), alcohol etílico (Fermont, México), metil etil cetona (Fermont, México), éter etílico anhidro R.A (tsa tecsiquim, México), alcohol iso-propílico (Fermont, México), colesterol (Sigma Aldrich, USA), Tween® 60 (Macropol, S.A DE C.V, México), Tween® 80 (Droguería Cosmopolita, México), Span® 60 (Droguería Cosmopolita, México), Span® 80 (Droguería Cosmopolita, México)

#### **Material biológico**

Orejas de cerdo recuperadas directamente del rastro antes de ser tratadas con agua caliente o vapor.

#### **Equipos**

Espectrofotómetro UV/Vis Cary 50 (Varian, Australia), Potenciómetro Hanna Instrument 8521 (USA), Balanza analítica BBC32 (Boeco, Alemania), Microbalanza E. METTER ser 190403 (Zürich, Alemania), Sonicador 8891 Cole-Parmer (USA), Microcentrífuga EBA 12 Hettich Zentrifugen (Alemania), Rotavapor Laborota 4000 (Heidolph, Alemania), Zetasizer® Malvern Instruments nano-ZS90 (USA), Zetasizer® Malvern Instruments Zen 3600 (USA), Baño de agua (Polyscience, USA), Bomba de inyección NE- 300 (USA).

## B. MÉTODOS

### a. Validación del método analítico para la cuantificación de zolmitriptán en los estudios de permeación pasiva *in vitro*.

- Limpieza de la oreja de cerdo

Lavar las orejas perfectamente al chorro del agua para eliminar residuos de sangre u otra materia orgánica no deseada; cortar los vellos de la parte posterior de la oreja lo más al ras que se pueda, evitando dañar la piel; separar la piel de la parte posterior de la oreja del cartílago y músculo; eliminar el exceso de grasa que pueda haber quedado en la piel; envolver en papel aluminio y almacenar en el congelador hasta su uso.

- Preparación de solución amortiguadora de fosfatos en contacto con piel de la oreja de cerdo.

Esta solución se prepara para emplearla como medio de disolución de la curva de calibración, con el fin de simular la solución receptora en donde se cuantificará el fármaco durante los estudios de permeación. El procedimiento seguido se describe a continuación: preparar la solución amortiguadora de fosfatos pH  $7.4 \pm 0.02$ ; lavar perfectamente la piel de la oreja de cerdo con agua destilada (al menos 3 veces con ayuda de un agitador magnético); poner en contacto la parte interna de la piel de la oreja de cerdo con la solución amortiguadora de fosfatos pH  $7.4 \pm 0.02$  y dejar agitando por 24 horas a temperatura ambiente.

Al pasar las 24 horas desechar la piel y filtrar la solución obtenida; en primer lugar filtrar con papel filtro para eliminar los residuos de mayor tamaño de piel; en segundo lugar filtrar con un prefiltro tipo AP y por último filtrar a través de una membrana hidrofílica Millipore® HVLP con un tamaño de poro de  $0.45 \mu\text{m}$  para obtener una solución transparente. Esta solución será ocupada como blanco además de diluyente para la curva (mantener la solución en refrigeración y si es necesario volver a filtrar antes de su uso).

- Preparación de curva estándar.

Realizar la curva utilizando estándar (STD) de zolmitriptán con una pureza de 98%. La solución madre se preparó de la siguiente forma: se pesaron 5.105 mg de STD en una balanza analítica y se diluyeron en 100 mL de solución amortiguadora de fosfatos pH  $7.4 \pm 0.02$  en contacto con oreja de cerdo (preparado como se describe en el punto anterior); la concentración de la solución inicial es igual a 50.029  $\mu\text{g/mL}$ . Se tomó cierto volumen de la solución inicial para preparar 5 puntos con concentraciones de 2.5, 5, 10, 20, y 40  $\mu\text{g/mL}$ ; cada punto se preparó por triplicado y se leyó en el espectrofotómetro UV-VIS a 270 nm que corresponde a la longitud de onda de máxima absorción para el zolmitriptán.

- Exactitud.

Se hicieron 6 pesadas independientes de aproximadamente 1 mg de zolmitriptán, se diluyeron en 50 mL de solución amortiguadora de fosfatos pH  $7.4 \pm 0.02$  en contacto con oreja de cerdo y se leyeron en el espectro UV-VIS a 270 nm.

- Precisión.

A partir de una solución stock de 50  $\mu\text{g/mL}$  se preparó por sextuplicado un punto de la curva estándar (concentración de 5  $\mu\text{g/mL}$ ) en dos días diferentes.

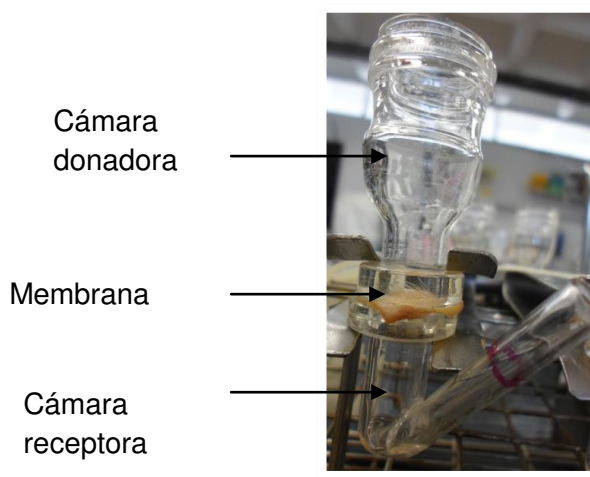
- Repetibilidad.

A partir de la solución stock de 50  $\mu\text{g/mL}$  se prepararon por sextuplicado tres puntos de la curva estándar (concentración de 5, 10 y 20  $\mu\text{g/mL}$ ).

#### **b. Validación del método analítico para la extracción de zolmitriptán retenido en piel.**

Al realizar los estudios de permeación se utilizan las celdas de Franz verticales (figura 8), las cuales están compuestas principalmente por una cámara donadora en dónde se pone la formulación a probar, una “membrana” en este caso la piel de la oreja de cerdo por donde tiene que permear el fármaco y una “cámara

receptora” en donde se coloca la solución receptora (solución amortiguadora de fosfatos pH  $7.4 \pm 0.02$ ) en la cual se cuantifica la cantidad de fármaco que permeó a través de la piel en un tiempo determinado.



**Figura 8.** Celda de Franz vertical.

Además también se necesita cuantificar el fármaco retenido en la membrana biológica al final de las permeaciones. Para ello se debe elegir un disolvente que permita la extracción del zolmitriptán retenido en la piel.

El procedimiento se llevó a cabo de la siguiente manera: se colocaron 100  $\mu\text{L}$  de una solución metanólica de zolmitriptán de concentración conocida en la superficie de la piel y se dejó evaporar a temperatura ambiente por 24 horas, permitiendo la penetración del fármaco en la piel. Después se cortaron cada una de las porciones de piel en pedazos más pequeños y se colocaron en viales con 5 mL de solución amortiguadora de fosfatos pH  $7.4 \pm 0.02$ , metanol y una mezcla 1:1 de solución amortiguadora de fosfatos pH  $7.4 \pm 0.02$  y metanol; los viales se mantuvieron en agitación constante por 24 horas a temperatura ambiente (se utilizó un blanco que consistió en cada uno de los disolventes en contacto con piel).

Una vez transcurrido ese tiempo, se recuperaron las soluciones, se filtraron para eliminar los residuos de piel y se midieron en el espectrofotómetro UV-VIS a 270 nm. Las absorbancias obtenidas se interpolaron en una curva estándar determinándose el porcentaje de principio activo extraído con respecto a la cantidad total colocada.

Se seleccionó el disolvente con un mayor porcentaje de fármaco extraído (metanol). En este disolvente se realizó la curva de calibración y se procedió a validar el método analítico empleado para la cuantificación de zolmitriptán retenido en piel de la siguiente manera:

- La limpieza de la oreja de cerdo se llevó a cabo por el método descrito anteriormente.
- Preparación de solución de metanol con la oreja de cerdo.

Esta solución se prepara para emplearla como medio de disolución de la curva de calibración, con el fin de simular la solución receptora en donde se cuantificará el fármaco durante la extracción. El procedimiento seguido se describe a continuación: lavar perfectamente la piel de la oreja de cerdo con agua destilada (al menos 3 veces con ayuda de un agitador magnético); cortar en trozos pequeños la piel de la oreja de cerdo, agregarla al metanol y dejar agitando por 24 horas a temperatura ambiente.

Al pasar las 24 horas desechar la piel y filtrar la solución obtenida; en primer lugar por papel filtro para eliminar los residuos de mayor tamaño de piel; en segundo lugar filtrar con un prefiltro tipo AP y por último filtrar a través de una membrana hidrofílica Millipore® HVLP con un tamaño de poro de 0.45  $\mu\text{m}$  para obtener una solución transparente. Esta solución será ocupada como blanco además de diluyente para la curva (mantener la solución en refrigeración y si es necesario volver a filtrar antes de su uso).

- Preparación de curva estándar.

Realizar una curva estándar utilizando estándar (STD) de zolmitriptán con una pureza de 98%. La solución madre se preparó de la siguiente forma: se pesaron 5.115 mg de STD en una balanza analítica y se diluyeron en 100 mL

de solución de metanol con oreja de cerdo (preparado como se describe en el punto anterior). Se tomó cierto volumen de la solución inicial para preparar 5 puntos con concentraciones de 2.5, 5, 10, 20, y 40  $\mu\text{g/mL}$ ; cada punto se preparó por triplicado y se leyó en el espectrómetro UV-VIS a 270 nm que corresponde a la longitud de onda de máxima absorción para el zolmitriptán.

- Exactitud.

Se hicieron 6 pesadas independientes de aproximadamente 1 mg de zolmitriptán, se diluyeron en 50 mL de metanol con oreja de cerdo y se leyeron en el espectro UV-VIS a 270 nm.

- Precisión.

A partir de la solución stock de 50  $\mu\text{g/mL}$  se preparó por sextuplicado un punto de la curva estándar (concentración de 10  $\mu\text{g/mL}$ ) en dos días diferentes.

- Repetibilidad.

Se preparó una solución stock pesando 5.115 mg de zolmitriptán, se diluyeron en 100 mL de metanol con oreja de cerdo y se prepararon por sextuplicado tres puntos de la curva estándar (concentración de 5, 10 y 20  $\mu\text{g/mL}$ ).

Se llevó a cabo la extracción de zolmitriptán retenido en piel por triplicado, utilizando 10 mL de metanol.

### **c. Preparación de niosomas.**

Los niosomas están formados por tensoactivos no iónicos y lípidos, de estos últimos, el más comúnmente utilizado es el colesterol. La preparación de los niosomas se llevó a cabo por dos métodos diferentes, el método de hidratación de película y el método de inyección de éter.

#### 1. Método de preparación de niosomas por hidratación de película.

Se prepararon lotes sin fármaco (niosomas placebo) para obtener las condiciones ideales de preparación, variando el tipo de tensoactivo no iónico, tiempo de

sonicación y número de filtraciones, en las que la formulación no presentara sedimentación. Posteriormente, se preparó otro lote con fármaco (niosomas cargados) bajo las condiciones ideales obtenidas.

La obtención de las variables ideales de preparación se hizo de la siguiente manera:

**Tipo de tensoactivo no iónico**

Se pesó el tensoactivo no iónico y el colesterol (en la tabla 2 se muestra la proporción en concentración mili molar (mM) para cada uno de los componentes) y se disolvieron con 5 mL de etanol en un matraz bola de 250 mL; se evaporó el disolvente en el rotavapor a 30 rpm a 50 °C por 15 min, formándose una película en las paredes del matraz bola; se dejó toda la noche para asegurar la pérdida del etanol a temperatura ambiente; se desprendió e hidrató la película con 2 mL de agua destilada por 2 horas; se sonicó durante 20 min a 60 °C y se determinó el tamaño de partícula.

**Tabla 2.** Proporción en concentración mili molar (mM) de tensoactivo no iónico y de colesterol para la preparación de niosomas placebo.

<b>Tensoactivo no iónico</b>	<b>Proporción de tensoactivo no iónico (30 mM)</b>	<b>Proporción de colesterol</b>
Span® 60	1	1
Span® 80	1	1
Tween® 80	1	1
	<b>(10 mM)</b>	
Tween® 60	5	1



### Tiempo de sonicación

Se pesó el Tween® 60 y el colesterol y se realizó el procedimiento anteriormente descrito para la formación e hidratación de la película delgada en el matraz bola, variando el tiempo de sonicación 0, 10, 20 y 30 minutos a 60° C y se determinó el tamaño de partícula.

### Número de filtraciones

Se pesó el Tween® 60 y el colesterol y se realizó el procedimiento anteriormente descrito para la formación e hidratación de la película delgada en el matraz bola, sonicando durante 20 minutos a 60° C, se filtró la suspensión de niosomas 0, 1, 2 y 3 veces por un filtro a través de una membrana hidrofílica Millipore® HVLP con un tamaño de poro de 0.45  $\mu\text{m}$  y se determinó el tamaño de partícula.

### Preparación de niosomas cargados

Para los niosomas cargados, se pesaron aproximadamente 4 mg de zolmitriptán y se disolvieron junto al Tween® 60 y el colesterol, se realizó la formación e hidratación de la película delgada con el mismo procedimiento que para los niosomas placebo, se sonicaron durante 20 minutos, no se filtran y son caracterizados por tamaño de vesícula, potencial zeta y tasa de encapsulamiento.

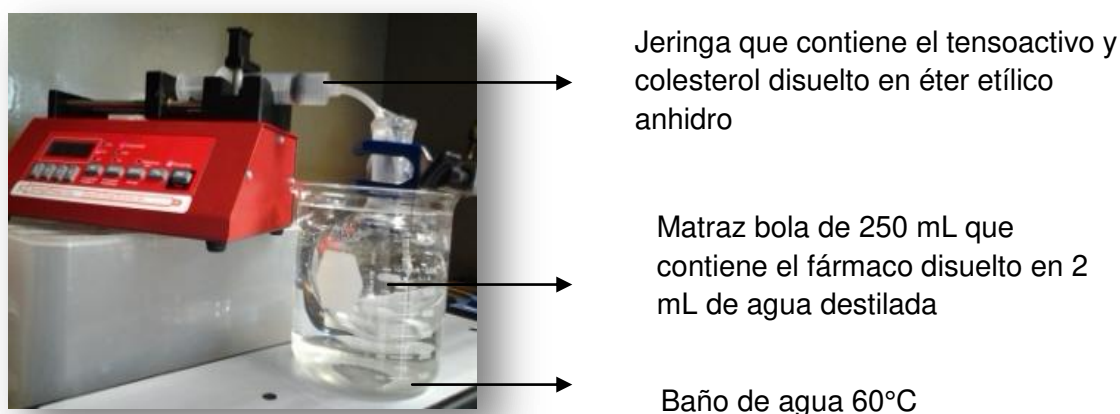
En el esquema 1 se presenta de manera general la obtención de las variables ideales de preparación. El punto clave para su elección fue dejar en almacenamiento por 24 horas a 4 °C para observar la presencia de sedimento en las formulaciones el cual no era esperado. Se eligió como tensoactivo no iónico Tween® 60, tiempo de sonicación de 20 minutos y ninguna vez en cuanto al

número de filtraciones. Al tener las variables ideales de preparación, se prepararon los niosomas por el método de inyección de éter y después fueron caracterizados por tamaño de partícula, potencial zeta y tasa de encapsulamiento para los niosomas cargados.

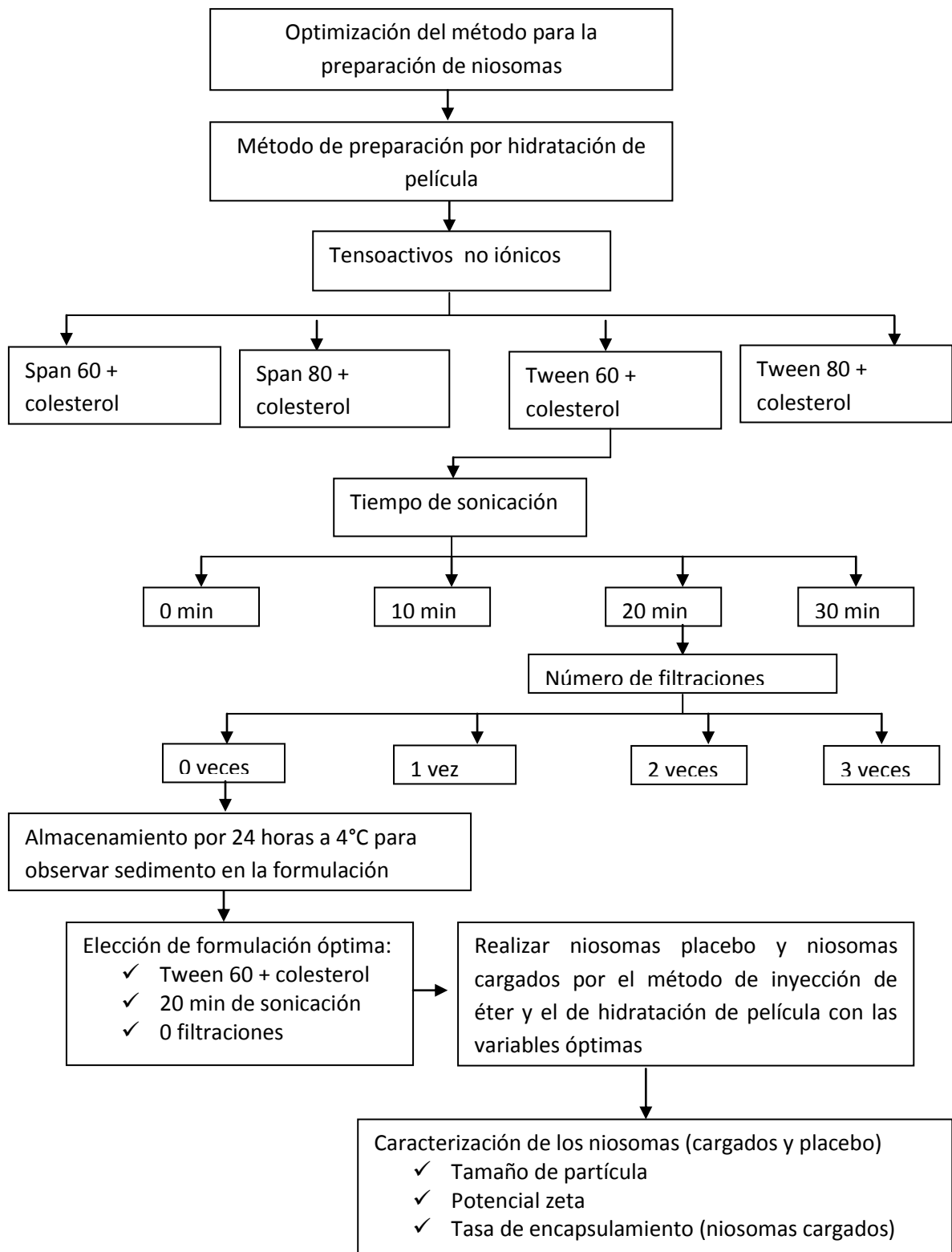
## 2. Método de preparación de niosomas por inyección de éter.

Para este método el tensoactivo no iónico utilizado fue Tween® 60; se pesó el tensoactivo no iónico y el colesterol, se disolvieron en 10 mL de éter etílico anhidro y se introdujeron en una jeringa. En un matraz bola de 250 mL se agregaron 2 mL de agua destilada en un baño a temperatura de 60 °C. Se inyectó la solución de éter en los 2 mL de agua destilada que están en el matraz bola a una velocidad de 1mL/min. El sistema utilizado se muestra en la figura 9 (bomba de inyección NE-300). Se dejó evaporar el éter a temperatura ambiente con agitación mecánica.

Para el lote de niosomas cargados, el fármaco se disolvió en los 2 mL de agua destilada que se encuentran en el matraz bola de 250 mL y se realizó el procedimiento anteriormente descrito. Para caracterizar los niosomas se midió tamaño de vesícula, potencial zeta y tasa de encapsulamiento.



**Figura 9.** Sistema utilizado para preparar niosomas por el método de inyección de éter.



**Esquema 1.** Descripción general de la obtención de variables óptimas para la preparación de niosomas.

#### **d. Caracterización de niosomas**

Se llevó a cabo la caracterización de los lotes de niosomas placebo y cargados elaborados por los dos diferentes métodos de preparación, los parámetros evaluados fueron los siguientes:

##### **1. Tamaño de partícula y potencial zeta**

Para el tamaño de partícula y el potencial zeta, se tomaron 250  $\mu\text{L}$  tanto del lote de niosomas placebo como de niosomas cargados y se les agregó 2 mL de agua destilada, las muestras de tamaño de partícula se leyeron en el equipo Zetasizer® Malvern Instruments nano-ZS90 y el potencial zeta en el equipo Zetasizer® Malvern Instruments Zen 3600.

##### **2. Encapsulamiento de zolmitriptán en niosomas.**

La tasa de encapsulamiento se realizó por la técnica de centrifugación; se tomaron 0.8 mL de niosomas (blanco y cargados) se pusieron en tubos Eppendorf de 1.5 mL y se centrifugaron a 17,500 rpm por 90 min. Se tomaron 300  $\mu\text{L}$  del sobrenadante, se aforaron en un matraz volumétrico de 10 mL con agua destilada, se leyó en el espectrofotómetro a  $\lambda = 270$  nm, utilizando como blanco el sobrenadante de los niosomas placebo para poder cuantificar la cantidad de fármaco que no fuera encapsulado.

Se resuspendió el sedimento (donde se encuentran los niosomas que encapsularon fármaco) con metanol para que se rompieran los niosomas y se pudiera cuantificar la cantidad de fármaco encapsulado, se leyó en el espectrofotómetro a  $\lambda = 270$  nm, utilizando como blanco el sedimento de los niosomas placebo de igual manera resuspendido en metanol.

Para el cálculo de la eficiencia de encapsulamiento (%EE) se utilizó la siguiente fórmula:

$$\%EE = \frac{\textit{fármaco encapsulado}}{\textit{fármaco total}} \times 100$$

#### **e. Estudio de permeación pasiva *in vitro*.**

Para el estudio de permeación se utilizó la piel de la parte posterior de la oreja de cerdo previamente congelada. Con ayuda del dermatoma se cortó la piel a 0.750 mm de espesor y se colocó la piel en las celdas verticales tipo Franz, las cuales se dispusieron en un baño de agua a una temperatura de 37 °C. Se hidrató la piel agregando solución amortiguadora de fosfatos pH 7.4 ± 0.02 en la cámara receptora (1.750 mL) y se dejó en agitación durante 30 min a la temperatura del baño de agua. Posteriormente, se retiró la solución amortiguadora de fosfatos, se colocó nueva solución amortiguadora de fosfatos en el receptor y 100 µL de la formulación en el donador (una celda con los niosomas placebo y seis celdas con los niosomas cargados de la celda 1 a 4 con el lote 1 y las celdas 5 y 6 con el lote 2), además de una solución del fármaco empleada como referencia (una celda) equivalente a la cantidad de fármaco presente en los niosomas cargados, para poder comparar si los niosomas mejoran la permeación de fármaco en comparación de una solución.

Se tomó el receptor por completo y se sustituyó durante 25 horas y se leyeron en el espectrofotómetro a una  $\lambda = 270$  nm. Después se hizo la extracción de fármaco de la piel como previamente fue descrito.

## VIII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### a. Validación del método analítico para la cuantificación de zolmitriptán en los estudios de permeación pasiva *in vitro*.

Para validar el método analítico se evaluaron los siguientes parámetros: linealidad, exactitud, precisión y repetibilidad (tabla 3). Basándose en la guía de validación del Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biológicos México, A.C (CNQFBM), podemos decir que el método es lineal, exacto, preciso y repetible ya que cumple con los criterios establecidos en la guía.

**Tabla 3.** Parámetros evaluados para la validación del método analítico.

Parámetro	Experimental	CNQFBM
Linealidad	$R^2 = 0.9999$	$R^2 \geq 0.98$
Exactitud	CV.= 1.6    %R.= 99	CV < 5    %R.= 97-103
Precisión	CV = 3.61	CV < 5
Repetibilidad	CV = 2.27	CV < 5

CV= coeficiente de variación, %R= porciento de recobro,

En el anexo 1.1 se muestra la tabla de concentraciones y absorbancias por triplicado y la gráfica para la curva estándar en solución amortiguadora de fosfatos pH  $7.4 \pm 0.02$  en piel así como la pendiente y ordenada al origen y en el anexo 1.1.1 los resultados de la validación del método analítico.

**b. Validación del método analítico para la cuantificación de zolmitriptán retenido en piel.**

Para la extracción de fármaco retenido en piel, se probaron como disolventes solución amortiguadora de fosfatos pH  $7.4 \pm 0.02$ , metanol y una mezcla 1:1 de solución amortiguadora de fosfatos pH  $7.4 \pm 0.02$  con metanol, los porcentajes de extracción fueron los siguientes:

**Tabla 4.** Cantidad de zolmitriptán extraída de la piel empleando distintos disolventes

<b>Disolventes</b>	<b>Cantidad extraída (%)</b>
Metanol	31.73
Metanol: solución amortiguadora de fosfatos pH $7.4 \pm 0.02$ (1:1)	5.07
Solución amortiguadora de fosfatos pH $7.4 \pm 0.02$	8.97

Como se puede observar, con el metanol se obtuvo un mayor porcentaje de extracción, debido a que el metanol rompe los enlaces entre los lípidos y proteínas en la piel (Roca, Oliver, & Rodriguez, 2003), liberando más fácilmente al fármaco de las interacciones con éstos, en comparación con la solución amortiguadora de fosfatos de fosfatos pH  $7.4 \pm 0.02$  (en donde el fármaco es muy soluble) y la mezcla metanol: solución amortiguadora de fosfatos.

Se hizo una curva de calibración en metanol en contacto con la piel de cerdo, para poder cuantificar el fármaco extraído; para validar el método analítico se evaluaron los siguientes parámetros: linealidad, exactitud, precisión y repetibilidad (tabla 5). Basándose en la guía de validación del Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biológicos México, A.C (CNQFBM), podemos decir que el método

es lineal, exacto, preciso y repetible ya que cumple con los criterios que se establecen en dicha guía.

**Tabla 5.** Parámetros evaluados para la validación del método analítico.

<b>Parámetro</b>	<b>Experimental</b>		<b>CNQFBM</b>	
Linealidad	$R^2 = 0.9998$		$R^2 \geq 0.98$	
Exactitud	CV = 1.61	%R = 98.76	CV < 5	%R = 97-103
Precisión	CV = 1.57		CV < 5	
Repetibilidad	CV = 4.19		CV < 5	
CV= coeficiente de variación, %R= porcentaje de recobro,				

En el anexo 1.2 se muestra la tabla de concentraciones y absorbancias por triplicado y la gráfica para la curva estándar en metanol así como la pendiente y ordenada al origen y en el anexo 1.2.1 los resultados de la validación del método analítico.

Se extrajo el zolmitriptán remanente en piel utilizando metanol. Como se observa en la tabla 6 los porcentajes obtenidos son mayores al 55 %, en relación a la cantidad de fármaco inicial en el donador.

**Tabla 6.** Cantidad y porcentaje de fármaco extraído por triplicado.

<b>Muestra</b>	<b>Absorbancias</b>	<b>Cantidad extraída (µg)</b>	<b>% Extraído</b>
1	0.3033	180.37	59.95
2	0.3728	223.01	74.12
3	0.2879	170.92	56.81
C.V	14.5		



### **c. Preparación de niosomas.**

Es idóneo que para los TDD el tamaño de los niosomas sea submicrónico (<1  $\mu\text{m}$ ), debido a que el estrato córneo es una barrera muy difícil de penetrar.

#### **1. Método de preparación de niosomas por hidratación de película**

Los niosomas pueden estar formados por diferentes tensoactivos no iónicos, en este trabajo se probaron cuatro: Span® 60, Span® 80, Tween® 60 y Tween® 80, con la finalidad de que al interaccionar con el colesterol (Ch) se formaran niosomas de talla menor a 1  $\mu\text{m}$  y que la formulación no sedimentara a las 24 horas a 4°C. En la tabla 7 se presentan los tensoactivos no iónicos probados con sus respectivos tamaños de vesícula obtenidos tomados de 3 muestras diferentes de cada formulación, así como el número de poblaciones presentes y el porcentaje que representan.

Debido a que el tamaño de vesícula es una característica importante para los niosomas y que fueron diferentes para todas las formulaciones se hizo un análisis de varianza (ANOVA)  $F_{\text{calculado}} (6.5168) > F_{\text{crítico}} (4.0661)$ , indicando que si hay diferencia estadísticamente significativa en el tamaño de vesícula al utilizar los diferentes tensoactivos no iónicos en la elaboración de niosomas.

**Tabla 7.** Tensoactivos no iónicos utilizados para la preparación de niosomas, sus tamaños de vesícula (nm), número de poblaciones y el porcentaje que representan.

Tensoactivo	Muestra	Tamaño de vesícula (nm)			
		Población 1	Porcentaje (%)	Población 2	Porcentaje (%)
Span® 60-Ch	1	311.8	67.5	88.67	32.5
	2	415.1	62.7	132	37.3
	3	385.1	62.7	119.6	37.3
Span® 80-Ch	1	105.9	73.8	507.3	26.2
	2	129.2	100		
	3	126.9	100		
Tween® 80-Ch	1	146.8	62.9	755.1	26.4
	2	136.7	62.3	667.5	28.9
	3	145.9	65.4	498.7	33.5
Tween® 60-Ch	1	367.5	78.6	99.31	16.6
	2	293.3	89.6	69.01	8.5
	3	703.1	55	150.5	43.8

Para la formulación preparada con Span® 80 y con Tween® 80 se pueden observar tamaños menores a 150 nm además para la formulación de Span® 80 hay una sola población.

No obstante, ninguna de las dos formulaciones fue elegida debido a que a las 24 h, presentaban sedimentación al igual que la formulación de Span® 60.

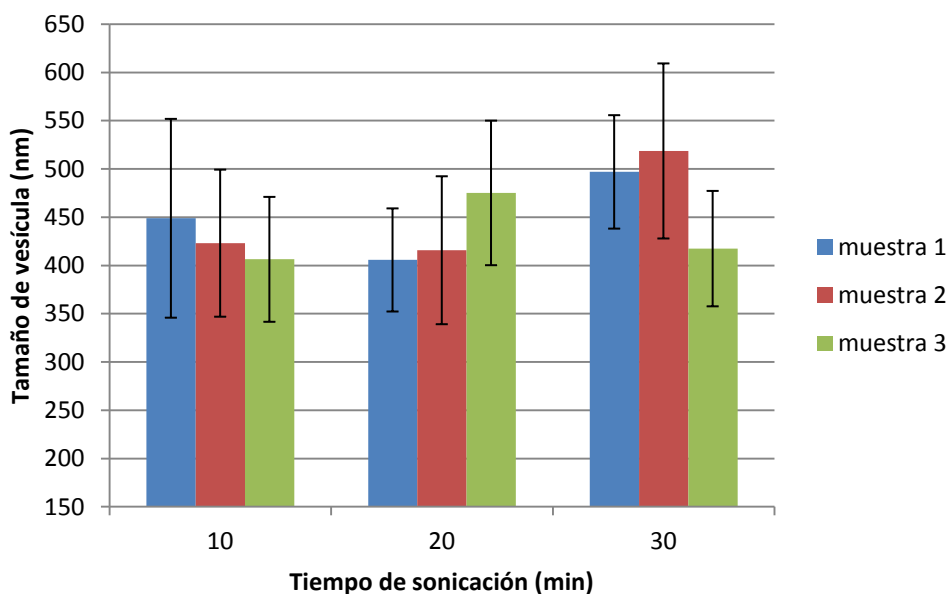
Se decidió utilizar la formulación de Tween® 60 debido a que no presentó sedimento a las 24 h, aunque presentara 2 poblaciones diferentes

Una vez elegido el tensoactivo no iónico, se modificó el tiempo de sonicación y el número de filtraciones de igual manera con el fin de obtener tamaños de vesícula menores a 1µm.

En la tabla 8 se presentan los tamaños de vesícula al variar el tiempo de sonicación de 3 muestras diferentes leídas por triplicado. En la gráfica 1 se puede observar que los tamaños de vesícula son diferentes para las 3 muestras a los diferentes tiempos además de sus barras de error que representan una desviación estándar, se realizó un análisis de varianza (ANOVA) ( $F_{\text{calculado}} (1.5177) < F_{\text{crítico}} (5.1432)$ ) para saber si había diferencia en el tamaño de vesícula a los diferentes tiempos de sonicación y no se encontró una diferencia estadísticamente significativa, por lo que se decidió utilizar el tiempo intermedio de 20 min en donde aparentemente en la mayoría de las muestras se obtiene un tamaño de vesícula menor.

**Tabla 8.** Tamaño de vesícula a diferentes tiempos de sonicación.

Muestra	Tamaño de vesícula (nm)		
	10 min	20 min	30 min
1	543.8	422.8	475.3
	463.8	346	563.6
	339.4	448.7	452.3
2	377.9	381.5	619.5
	511.2	362.5	493.2
	380.6	503.7	443.6
3	460.1	543.9	383.8
	424.7	486.6	382.3
	334.6	395.4	486.6

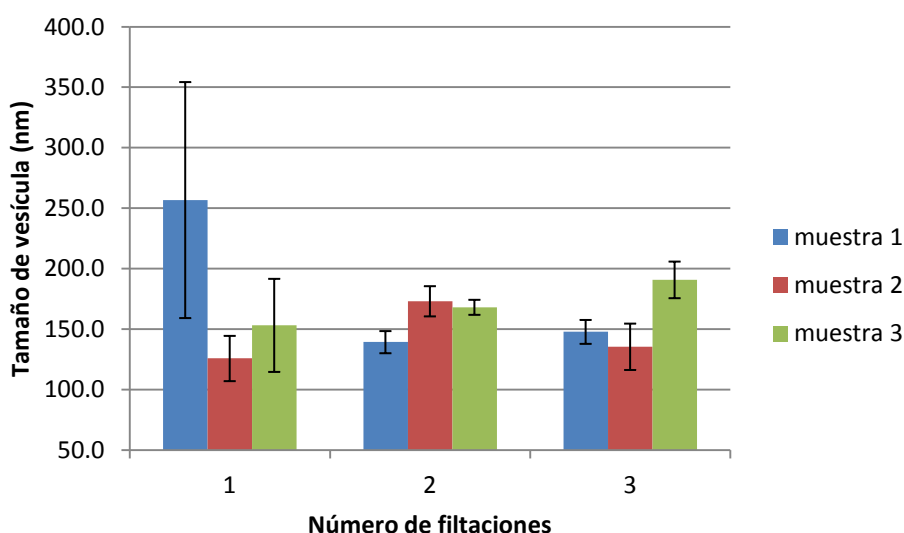


**Gráfica 1.** Tamaño de vesícula vs tiempo de sonicación.

En cuanto al número de filtraciones en la tabla 9 se muestran los tamaños de vesícula para 3 muestras leídas por triplicado. En la gráfica 2 se observa que al hacer un mayor número de filtraciones no hay una disminución evidente del tamaño de vesícula, lo que sí disminuye es la desviación estándar después de filtrar 1 vez, lo que indicaría que la población es más uniforme. Se hizo un análisis de varianza (ANOVA) ( $F_{\text{calculado}} (0.4571) < F_{\text{crítico}} (3.4028)$ ) y no hay diferencia estadísticamente significativa en el tamaño de vesícula al efectuar diferentes números de filtraciones en la muestra. Aunque aparentemente se reduce la variación de tamaño al filtrar la muestra se optó por no realizar ninguna filtración debido a que se pierde mucho tiempo (50  $\mu\text{L}/\text{min}$ ).

**Tabla 9.** Tamaño de vesícula a diferente número de filtraciones.

Muestra	Tamaño de vesícula (nm)		
	1 vez	2 veces	3 veces
1	295.3	144.9	136.5
	145.8	144.2	155.1
	329.2	128.7	151.6
2	112.9	158.7	115.7
	117.1	179.2	136.6
	147.2	181.3	154
3	117.3	173.7	207.2
	148.3	169.1	187.7
	193.8	161.4	177.4



**Gráfica 2.** Tamaño de vesícula vs número de filtraciones.

## 2. Método de preparación de niosomas por inyección de éter

Al obtener las variables óptimas para la elaboración de niosomas por el método de hidratación de película, se probó otro método, el de inyección de éter; en la tabla 10 se muestra el tamaño de vesícula para ambos métodos, para cada uno se prepararon dos muestras de niosomas placebo (sin fármaco) y en la tabla 11 se presenta el potencial zeta.

**Tabla 10.** Tamaño de vesícula de niosomas para dos métodos diferentes de preparación.

Muestra	Tamaño de vesícula (nm)	
	Hidratación de película	Inyección de éter
1	367.5	159.8
2	293.3	157.8
D.E	52.5	1.4

**Tabla 11.** Potencial zeta para niosomas preparados por dos métodos diferentes.

Muestra	Potencial zeta (mV)	
	Hidratación de película	Inyección de éter
1	-37.6	-31.5
2	-39.9	-31.6
3	-47.3	-31.5
D.E	5.1	0.06

Como se puede observar el tamaño de vesícula es menor para el método de inyección de éter, debido a que por este método se ha reportado que las vesículas obtenidas son unilaminares y por el método de hidratación de película multilaminares (Yadav *et al.*, 2011). Se evaluó la tasa de encapsulamiento del zolmitriptán en las vesículas preparadas por ambos métodos; en la tabla 12, se presentan tanto la cantidad, como el porcentaje de fármaco encapsulado en los niosomas en cada método; se decidió utilizar el método de hidratación de película debido a que se encapsuló una mayor cantidad de fármaco que por el método de inyección de éter, además de que por el segundo método es imposible eliminar el éter por completo de la formulación y se tendrían que determinar las trazas por alguna técnica cuantitativa como cromatografía de gases.

Aunque en ambas técnicas son utilizados disolventes orgánicos de la clase 3 de la lista ICH de solventes residuales, los cuales son considerados con baja toxicidad y bajo riesgo a la salud humana (European Medicines Agency, 2010), el éter es considerado un COV (compuesto orgánico volátil) y según el ISTAS (Instituto Sindical de Trabajo Ambiente y Salud) los riesgos para la salud asociados a la emisión de COVs a partir del uso de disolventes orgánicos, se derivan de sus propiedades volátiles, liposolubles, tóxicas e inflamables, causando a largo plazo neurotoxicidad para el caso específico del éter al ser inhalado.

**Tabla 12.** Cantidad y porcentaje de fármaco encapsulado por dos métodos diferentes de preparación de niosomas.

	<b>Hidratación de película</b>	<b>Inyección de éter</b>
Cantidad encapsulada (mg)	0.22	0.13
% Encapsulado	5.5	3.35

### 3. Niosomas para los estudios de permeación pasiva *in vitro*.

Para los estudios de permeación *in vitro* se prepararon 3 lotes de niosomas, uno de niosomas placebo y dos de niosomas cargados (lote 1 y lote 2). Los tres lotes fueron caracterizados, en la tabla 13 se muestra el tamaño de vesícula el número de poblaciones y el porcentaje que representa para una muestra leída por duplicado para cada lote, se observa un aumento en el tamaño de vesícula entre el lote placebo y los lotes cargados que puede deberse a que el fármaco está siendo encapsulado al interior de la vesícula.

Se hizo un análisis de varianza (ANOVA) ( $F_{\text{calculado}} (48.8717) > F_{\text{crítico}} (9.5520)$ ) indicando que si hay una diferencia estadísticamente significativa en los tamaños

de vesícula entre todos los lotes, seguido de una prueba de múltiples rangos para determinar cuáles medias son significativamente diferentes de otras indicando que hay diferencia estadísticamente significativa entre el lote placebo y los lotes cargados, pero no hay una diferencia estadísticamente significativa entre el lote 1 y el lote 2 (anexo 2).

**Tabla 13.** Tamaño de vesícula para tres lotes de niosomas.

	<b>Tamaño de vesícula (nm)</b>				
	<b>Lectura</b>	<b>Población 1</b>	<b>Porcentaje (%)</b>	<b>Población 2</b>	<b>Porcentaje (%)</b>
Lote placebo	1	367.5	78.6	99.31	19.6
	2	293.3	89.6	69.01	8.5
Lote 1	1	772.3	83	121.3	17
	2	884	80.2	127.7	19.8
Lote 2	1	886.3	75.5	199.3	20.7
	2	971.3	70.6	275.8	29.4

En la tabla 14 se observan los valores en mV para el potencial zeta para una muestra leída por triplicado, todos los valores de potencial zeta son negativos con un valor absoluto por arriba de 30 mV que corresponden a micelas negativas estables (Malvern Instruments Ltd., 2004), capaces de repelerse entre sí, evitando la floculación.

**Tabla 14.** Potencial zeta para tres lotes de niosomas.

<b>Lectura</b>	<b>Potencial zeta (mV)</b>		
	<b>Lote placebo</b>	<b>Lote 1</b>	<b>Lote 2</b>
1	-37.6	-38.8	-38.5
2	-39.9	-43.1	-45.4
3	-47.3	-41.4	-44.1



En la tabla 15 se presenta la cantidad y el porcentaje de fármaco encapsulado para cada lote de niosomas cargados. Sólo se pudo encapsular  $4.75 \pm 0.06$  % por lo que es importante hacer los estudios de permeación pasiva *in vitro* para conocer si se favorecerá la permeación del fármaco a través de la piel aunque sólo una cantidad pequeña de fármaco se encuentre encapsulada.

**Tabla 15.** Cantidad y porcentaje de fármaco encapsulado para los lotes de niosomas cargados.

	<b>Lote 1</b>	<b>Lote 2</b>
Cantidad encapsulada (mg)	0.18	0.19
% Encapsulado	4.71	4.8

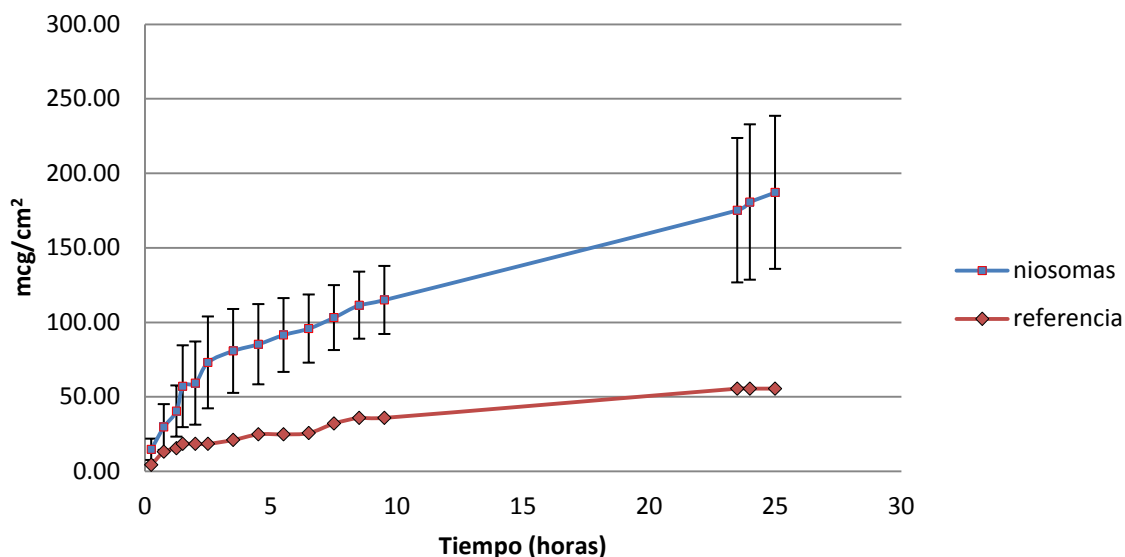
#### **d. Estudio de Permeación pasivo *in vitro*.**

El modelo animal elegido para los estudios de permeación es importante, pues debe aproximarse a las características histológicas y de permeabilidad de la piel humana. Por tal motivo la membrana utilizada fue la piel de cerdo, debido a su semejanza en función y morfología a la piel humana (PermeGear, Inc.), en cuanto al medio receptor debe favorecer la solubilidad del permeante en todo momento.

La cantidad de permeante que cruza por unidad de área, por unidad de tiempo, es conocida como Flujo y es expresada en unidades de masa / área / tiempo (PermeGear, Inc.).

El flujo promedio ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$ ) y la cantidad promedio por  $\text{cm}^2$  (anexo 3, tabla 3.1) fueron calculados para la referencia y para los niosomas cargados. En la gráfica 3, se puede observar que el perfil de permeación presenta dos pendientes, por lo

que existen 2 valores de flujo. En el caso de la solución del fármaco, empleada como referencia, se calculó el flujo 1 de 0.25 h a 1.5 h y el flujo 2 de 1.5 a 25 h; para los niosomas el flujo 1 se calculó de 0.25 h a 2.5 h y el flujo 2 de 2.5 a 25 h, las barras de error representan una desviación estándar.



**Gráfica 3.** Perfil de permeación para el zolmitriptán en solución (referencia) e incluido en los niosomas.

Se hizo el cálculo de los flujos 1 y 2 para cada celda, en la tabla 17 se muestran los dos flujos individuales, se hizo una prueba de t con un intervalo de confianza de 0.95 (IC 0.95) para comparar el flujo 1 (valor de prueba/referencia 10.58,  $t_{calculada}$  (2.991) >  $t_{tabla}$  (2.015)) y el flujo 2 (valor de prueba/referencia 1.63,  $t_{calculada}$  (2.126) >  $t_{tabla}$  (2.015)) de la referencia y de los niosomas y se encontró una diferencia estadísticamente significativa entre el flujo de cada una de las 6 celdas en comparación con la referencia, por lo que el flujo con que el fármaco pasa en solución es menor que para los niosomas.

Como puede observarse en la Gráfica 3, en ambos casos (referencia y niosomas) se tiene un flujo inicial elevado (flujo 1 comparado con el flujo 2), lo cual puede atribuirse a la rápida permeación del fármaco libre (no encapsulado en los

niosomas) al entrar en contacto con la piel, también se muestran las barras de error que representan una desviación estándar.

El porcentaje de fármaco absorbido es raramente lineal con el tiempo, y la cantidad absorbida en 1 h puede no ser proporcional a la cantidad absorbida en un día (Poet & McDougal, 2002). Por otro lado, el hecho de que para los primeros tiempos de la permeación, la cantidad de fármaco que pasa a través de la piel por unidad de área sea mayor, podría deberse a que las rutas por las que el fármaco puede penetrar la piel están libres y conforme pasa el tiempo la membrana comienza a saturarse, permitiendo que pase fármaco pero de una forma más lenta.

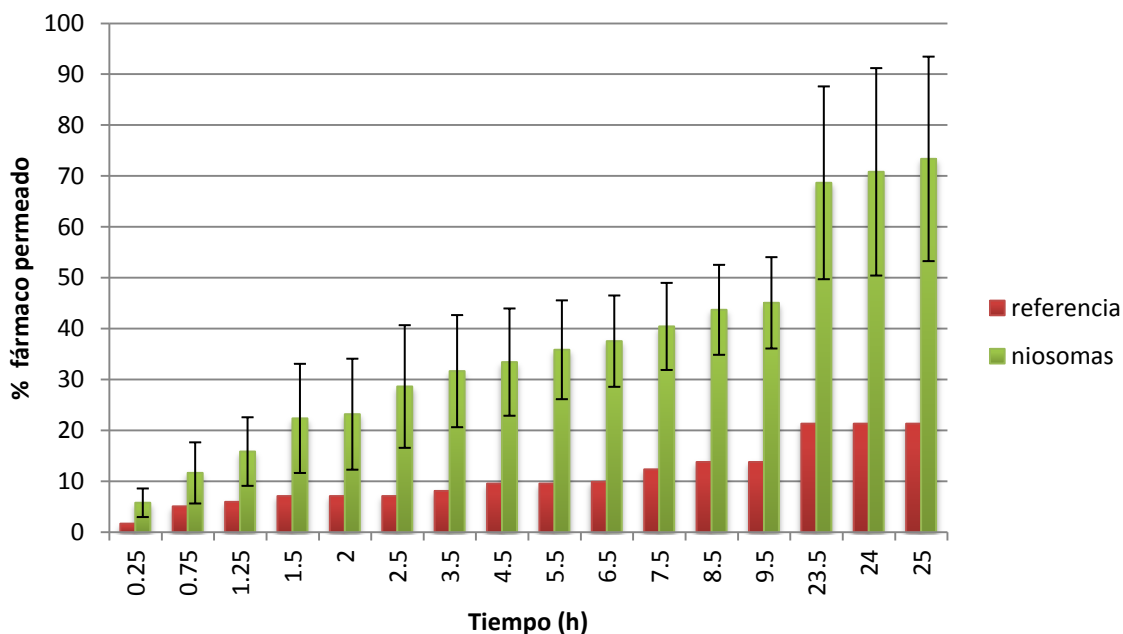
**Tabla 17.** Flujos para cada celda con muestra de niosomas y referencia.

<b>Celda</b>	<b>Flujo 1 (<math>\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}</math>)</b>	<b>Flujo 2 (<math>\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}</math>)</b>
*1	32.01	1.06
*2	16.08	8.80
*3	25.45	1.44
*4	10.11	6.69
*5	25.26	8.86
*6	45.59	2.17
Referencia	10.58	1.63
Promedio	25.75	4.84
D.E	12.42	3.70

De la celda 1 a la 4 tienen el lote 1 y la celda 5 y 6 el lote 2

En cuanto a la cantidad promedio por  $\text{cm}^2$  ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) en la gráfica 3 se observa que es mayor para el zolmitriptán incluido en los niosomas. En la gráfica 4 se presenta el porcentaje de fármaco permeado y las barras de error que representan una desviación estándar. Como puede verse, para los niosomas esta cantidad fue mayor en comparación a la referencia, por lo que el uso de niosomas puede estar favoreciendo el paso de una mayor cantidad de fármaco a través de la piel.

Esto puede deberse a que el surfactante que conforma los niosomas contribuyó a la permeación del fármaco mediante la interacción con la membrana biológica, por la alteración de la función de barrera del estrato córneo, como resultado de la modificación reversible del arreglo de los lípidos (Muzzalupo *et al.*, 2011), actuando como promotores de permeación.



**Gráfica 4.** Porcentaje de fármaco permeado vs tiempo para la referencia y los niosomas.

Al finalizar la permeación se hizo la extracción del fármaco retenido en piel y se cuantificó (tabla 18), sólo se pudo extraer fármaco de las celdas 1, 3, 6 y de la referencia, en las otras celdas el contenido no fue cuantificable. En este caso, la cantidad de fármaco retenido en piel al aplicar el zolmitriptán en forma de solución fue prácticamente el doble que en el caso de los niosomas. Esto puede atribuirse al hecho de que los surfactantes que forman los niosomas alteran la barrera de permeabilidad, promoviendo su paso a través de la membrana, reduciendo con ello la cantidad que pudiera quedar atrapada en la piel.

**Tabla 18.** Cantidad y porcentaje de fármaco extraído de piel.

<b>Celda</b>	<b>Cantidad de fármaco extraída (µg)</b>	<b>Porcentaje extraído (%)</b>
referencia	31.38	15.36
1	16.41	8.21
3	15.95	7.98
6	15.43	7.71

Además se calculó el coeficiente de permeabilidad ( $K_p$ ; cm/h) para los 2 flujos, los de la referencia y los de los niosomas (tabla 19). El  $K_p$  describe la tasa de penetración de permeante expresado en distancia / tiempo (PermeGear, Inc.). Es común encontrar valores de coeficientes de permeabilidad para distintos productos químicos en órdenes de magnitud de  $10^{-6}$  a  $10^{-1}$  cm / h (Poet & McDougal, 2002). Como el  $K_p$  es una función de la permeabilidad de la sustancia a la piel y la resistencia de la membrana a la difusión, indica que la resistencia de la membrana a la difusión se incrementó al ser modificada por los surfactantes presentes en los niosomas. Los coeficientes de permeabilidad para cada celda se encuentran en el anexo 3.2, tabla 3.2.

**Tabla 19.** Coeficientes de permeabilidad (cm/h)

<b>Flujo</b>	<b>Referencia</b>	<b>Niosomas</b>
1	$5.2 \times 10^{-3}$	$1.3 \times 10^{-2} \pm 0.0061$
2	$8 \times 10^{-4}$	$2.4 \times 10^{-3} \pm 0.0018$

En cuanto al tiempo de latencia que es el tiempo que se necesita para penetrar a través de la membrana y difundir en el fluido receptor y, finalmente, alcanzar un estado constante de difusión (PermeGear, Inc.), en este caso, se considera que no hay tiempo de latencia pues al extrapolar la pendiente obtenida correspondiente al primer flujo, se obtiene un valor de cero.

También se calculó la cantidad total permeada. En la tabla 20 se muestran los µg acumulados para cada celda y para la referencia además del porcentaje

correspondiente de fármaco. Se hizo una prueba de t para una muestra (IC 0.95) (valor de prueba/referencia 43.56  $t_{calculada}$  (6.283) >  $t_{tabla}$  (2.015)) y se encontró una diferencia estadísticamente significativa entre la cantidad total permeada con niosomas contra la referencia. Los niosomas incrementaron en promedio 3.3 veces la permeación de zolmitriptán a través de la piel, en relación al fármaco en solución.

**Tabla 20.** Cantidad total permeada.

<b>Celda</b>	<b>Niosomas (<math>\mu\text{g}</math> acumulados)</b>	<b>% Fármaco</b>
1	115.91	58.0
2	197.15	98.6
3	99.95	50.0
4	152.98	76.5
5	190.88	95.0
6	125.18	62.3
Referencia	43.56	21.3
Promedio	147.00	73.4
D.E	40.33	20.1

De acuerdo a los resultados obtenidos en los estudios de permeación pasiva *in vitro*, los niosomas mostraron ser una muy buena opción para la difusión del fármaco zolmitriptán a través de la piel.

Comparando los flujos y la cantidad total de fármaco permeado en los estudios de permeación pasiva *in vitro* de los niosomas formulados contra el estudio de Patel *et al.*, 2009, en donde diseñaron un parche para liberación transdérmica de zolmitriptán por iontoforesis, en el cual obtuvieron un flujo de  $\sim 92 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$  y en promedio  $263.7 \pm 92.7 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  a las 6 horas (tiempo total de la permeación), los niosomas presentaron flujos de 25.75 y  $4.84 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$  y en promedio  $95.76 \pm 22.8$

$\mu\text{g}/\text{cm}^2$  (a las 6.5 horas) y  $187.17 \pm 51.35 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  al finalizar la permeación (25 horas). Aunque los valores sean menores para los niosomas, se debe tener en cuenta que el grosor de la piel fue diferente para la iontoforesis (0.5 mm) que para los niosomas (0.75 mm) y que la iontoforesis implica la aplicación de energía eléctrica, mientras que en el presente trabajo se hizo uso de promotores de tipo químico (i.e., componentes de los niosomas). En este sentido se ha visto que los promotores físicos suelen ser más efectivos en general al promover la permeación de fármacos. No obstante, hay que considerar que estos últimos implican sistemas más costosos y cuya administración por parte del paciente es más complicada, por lo que frecuentemente debe hacerse en un medio hospitalario y por un especialista.

Por otro lado la dosis oral de zolmitriptán es de 2.5 - 5 mg y debido a que su biodisponibilidad oral es de aproximadamente 40 - 48% sólo se necesita que 1 - 2 mg (respectivamente) entren al torrente sanguíneo para obtener un efecto terapéutico (Patel *et al.*, 2009), teniendo en cuenta esto y los  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  que permean con los niosomas, para poder administrar 1 mg de zolmitriptán se necesitaría un parche de 5 x 5 cm y a partir de 1.25 horas se alcanzaría esa dosis.

## IX. CONCLUSIONES

Después de haber realizado los estudios anteriores se puede concluir lo siguiente:

Se obtuvieron niosomas de talla submicrónica, con potenciales Z adecuados para la administración por vía transdérmica, mediante dos métodos de preparación: hidratación de película e inyección de éter. No obstante, se optó por el método de hidratación de película ya que permitió obtener una mayor tasa de encapsulación de zolmitriptán y por ser un método más amable con el ambiente.

Al validar los métodos analíticos se puede asegurar que los resultados son confiables para la cuantificación de zolmitriptán en los estudios de permeación *pasiva in vitro* por medio del método espectrofotométrico empleado, debido a que el método es lineal, exacto, preciso y repetible.

De los estudios de permeación pasiva *in vitro*, se pudo constatar que:

- i). Los niosomas incrementan de manera significativa la cantidad de zolmitriptán capaz de permear a través de la piel (en promedio 3.3 veces más), en relación a una solución del fármaco.
- ii). Los niosomas fueron capaces de promover la permeación de más del 70 % del fármaco incluido en la formulación.

Los resultados obtenidos permiten pensar en los niosomas como una excelente opción para el diseño de un TDDS.



## X. REFERENCIAS

Barry, B. (2001). Novel mechanisms and devices to enable successful transdermal drug delivery. *European Journal of Pharmaceutical science* , 14, 101-114.

CNS.000-355-841.2.0, 11. (s.f.). *Zomig and Zomig Rapimelt Product Information*. Recuperado el 18 de mayo de 2014, de <https://gp2u.com.au/static/pdf/Z/ZOMIG-PI.pdf>

Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos México, A.C. *Guía de validación de métodos analíticos*.

El-Nabarai, M., Elmeshad, A., & Moutasim, M. (2013). Assessment of bioavailability of sumatriptan transdermal delivery systems in rabbits. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Science* , 5 (2), 225-240.

European Medicines Agency. (2010). *ICH Topic Q3C (R4). Impurities: Guideline for Residual Solvents*. United Kingdom: European Medicines Agency.

Ezpeleta, D. (2005). Zolmitriptán: un triptán con cuatro presentaciones. *Kranion* , 00 (1), 148-158.

Ferrandiz, M. (2013). Fisiopatología del dolor. *XV JORNADA DE ACTUALIZACIÓN EN DOLOR*. Barcelona: Hospital de la Santa Creu i Sant Pau.

Ganem Rondero, A. (2011). ¿Qué sabe Ud. acerca de... la vía de administración transdérmica? *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas* , 42 (1), 65-68.

Gayathri Devi, s., Venkatesh, & Udupa, N. (2000). Niosomal sumatriptán succinate for nasal administration. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences* , 62 (6), 479-478.

Gilmore, B., & Michael, M. (2011). Treatment of Acute Migraine Headache. *American Family Physician* , 83 (3), 271-280.

Guang-Yin, X., Wang, F., Jiang, X., & Tao, J. (2010). Aquaporin 1, a potential therapeutic target for migraine with aura. *Molecular Pain* , 6 (68), 1-8.

Hemanth, G. (2012). Transdermal drug delivery system: an overview. *International Journal of research in Pharmaceutical Science* , 3 (3), 451-457.

Hensler, J. (2012). *Basic Neurochemistry. Principles of molecular, cellular and medical neurobiology*. China: Elsevier.

Honeywell-Nguyen, P., & Bouwstra, J. (2005). Vesicles as a tool for transdermal and dermal delivery. *Drug delivery/formulation and nanotechnology* , 2 (1), 67-74.

ISTAS. (s.f.). *éter, éter dietílico*. Recuperado el 18 de junio de 2014, de ISTAS: <http://www.istas.net/fittema/att/di5.htm>

Johnston, M. M., & Rapoport, A. M. (2010). Triptans for the Management of Migraine. *Drugs* , 70 (12), 1505-1518.

Kolsure, P., & Raj Kapoor, B. (2012). Development of zolmitriptan gel for nasal administration. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research* , 5 (3), 88-94.

Kumarn, P., & Rajeshwarao, P. (2011). Nonionic surfactant vesicular systems for effective drug delivery—an overview. *Acta Pharmaceutica Sinica B* , 1 (4), 208-219.

Kusam Subedia, R., Ryoob, J.-P., Moonb, C., & Choia, H.-K. (2011). Influence of formulation variables in transdermal drug delivery system. *International Journal of Pharmaceutics* , 419, 209-214.

Latheeshjhal, L., Phanitejaswini, P., Soujanya, Y., Swapna, U., Sarika, V., & Moulika, G. (2011). Transdermal Drug Delivery Systems: An overview. *International Journal of PharmTech Research* , 3 (4), 2140-2148.

Mahale, N., Thakkar, P., Mali, R., Walunj, D., & Chaudhari. (2012). Niosome: a novel sustained release nonionic stable vesicular systems- an overview. *Advances in colloid and Interfac Science* , 183-184, 46-47.

Malvern Instruments Ltd. (2004). *Zetasizer Nano Series. User Manual*. Inglaterra.

Mandlik, S., Adhikari, S., & Ranpise, N. (2013). Formulation and in-vitro characterization of chitosan biodegradable nanoparticles of zolmitriptan for migraine treatment. *Pharmacie Globale* , 4 (1), 1.

Moore, J. (2007). *Zolmitriptan*. Elsevier Inc.

(2007). Sistema tegumentario. En K. D. Moore, *Anatomía con orientación Clínica*. (págs. 12-16). Médica Paramericana.

Mufassir Mushtaque, M., Saifee, M., Dehghan, M., Zaheer, Z., Khan, S., & Kalam Khan, F. (2014). Effects of solvents: preparation and characterization of sustained release intranasal microspheres of rizatriptan benzoate. *Journal of Innovation in Pharmaceuticals and Biological Science* , 1 (1), 68-71.

- Muzzalupo, R., Tavano, L., Cassano, R., Trombino, S., Ferrarelli, T., & Picci, N. (2011). A new approach for the evaluation of niosomes as effective transdermal drug delivery systems. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* , 79, 28-35.
- Naik, A., Yogeshvar, N., H Guy, K., & H Guy, R. (2000). Transdermal drug delivery: overcoming the skin's barrier function. *PSTT* , 3 (9), 318-326.
- Pascual, J., & Muñoz, P. (2005). Correlation between lipophilicity and tiptans outcomes. *Headache* , 3-6.
- Patel, S., Zhong, H., Sharma, A., & Kalia, Y. (2009). Controlled non-invasive transdermal iontophoretic delivery of zolmitriptán hydrochloride in vitro and in vivo. 72, 304-309.
- PermeGear, Inc. (s.f.). *Diffusion testing fundamentals*. Recuperado el 1 de junio de 2014, de <http://www.permegear.com/primer.pdf>
- Poet, T., & McDougal, J. (2002). Skin absorption and human risk assessment. *Chemico-Biological Interactions* , 140, 19-34.
- Powell, J. (2007). Skin physiology. *The Foundation Years* , 3 (5), 193-196.
- Praneetha, P., Sowjanya Battu, V., Umamaheshwar Rao, A., & Ramyasree. (2014). Design, charecterization and in-vitro correlation studies for eletriptan loaded transdermal parches. *International Journal of Pharmacy* , 4 (1), 374-385.
- Rapoport, A., Bigal, M., & Sheftell. (2004). Zolmitriptan (Zomig®). *Expert Rev Neurotherapeutics* , 4 (1), 33-41.
- Roca, P., Oliver, J., & Rodriguez, A. (2003). *Bioquímica: técnicas y métodos*. Madrid: Hélice.
- Schmid-Wendtner, & Korting. (2006). The pH of the Skin Surface and Its Impact on the Barrier Function. *Skin Pharmacology and Physiology*, (19), 296-302.
- Secretaría de Salud. (2007-2012). *Guía de Práctica Clínica Manejo de Cefalea tensional y Migraña en el adulto*. Recuperado el 12 de junio de 2014, de [http://www.cenetec.salud.gob.mx/descargas/gpc/CatalogoMaestro/047\\_GPC\\_CefaleaMigrana/IMSS\\_047\\_08\\_EyR.pdf](http://www.cenetec.salud.gob.mx/descargas/gpc/CatalogoMaestro/047_GPC_CefaleaMigrana/IMSS_047_08_EyR.pdf)
- Shingade, G., Quazi, A., Sabale, P., Grampurohit, N., Gadhav, M., Jadhav, S., y otros. (2012). Review on: recent trend on transdermal drug delivery system. *Journal of Drug Delivery & Therapeutics* , 2 (1), 6-75.

Singh, D., Garud, N., & Garud, A. (2013). Design and optimization of solid lipid nanoparticles (SLNs) of zolmitriptan for the management of migraine. *Indonesian Journal of Pharmacy* , 24 (4), 247-254.

Sridha, G., Vasavi Reddy, D., Ranjeeth Reddy, Y., & Devireddy, S. (2012). Formulation development and evaluation of mucoadhesive buccal parches of zolmitriptan. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* , 4 (3), 260-263.

Uchegbu, I., & Vyas, S. (1998). Non-ionic surfactant based vesicles (niosomes) in drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics* , 172, 33-70.

Veuillez, F., Kalia, Y., Jacques, Y., Desuses, J., & Buri, P. (2001). Factors and strategies for improving buccal absorption of peptides. *European Journal of Pharmaceutical Biopharma* , 51, 93-109.

Villalón, C., Centurión, D., Valdivia, L., Vries, P., & Saxena, P. (2003). Migraine: Pathophysiology, pharmacology, treatment and future trends. *Current Vascular Pharmacology*. (1), 71-84.

Vyas, T., Babbar, A., R, S., & Misra, A. (2013). Intranasal mucoadhesive microemulsion of zolmitriptan: preliminary studies on brain-targeting. *Journal of Drug Targeting* , 13 (5), 317-324.

Yadav, J., Kulkarni, P., Vaidya, K., & Shelke, G. (2011). Niosomes: a review. *Journal of Pharmacy Research* , 4 (3), 632-636.

## XI. ANEXOS

### 1. Curvas de calibración

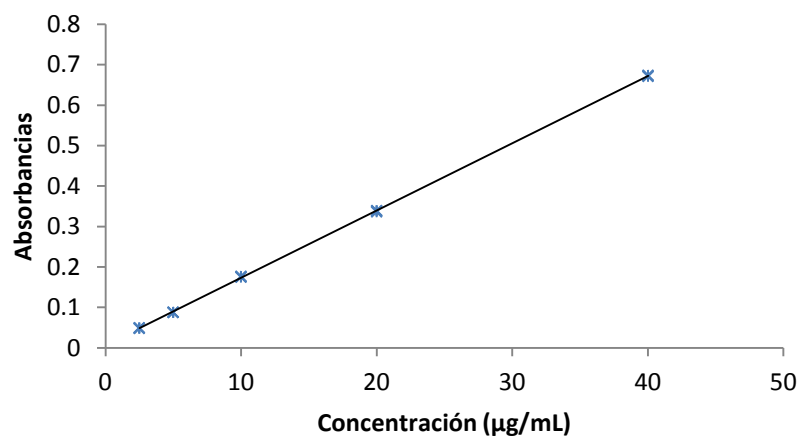
1.1 Curva estándar en solución amortiguadora de fosfatos pH  $7.4 \pm 0.02$  en contacto con piel.

Valores de absorbancia obtenidos para cada punto de la curva por triplicado además de la desviación estándar (DE), coeficiente de variación (CV), linealidad ( $R^2$ ), pendiente y ordenada al origen.

**Tabla 1.1** Valores de absorbancia para la curva estándar en solución amortiguadora de fosfatos pH  $7.4 \pm 0.02$  en contacto con piel.

Concentración ( $\mu\text{g/mL}$ )	Absorbancia 1	Absorbancia 2	Absorbancia 3
2.50	0.0496	0.0483	0.0501
5.00	0.0878	0.0883	0.0883
10.01	0.176	0.1772	0.1751
20.01	0.339	0.3397	0.3365
40.02	0.6741	0.6728	0.6714

DE	0.0011
CV	0.4
$R^2$	0.9999
Pendiente	0.0166
Ordenada al origen	0.0071



**Gráfica 1.1.** Curva de calibración de zolmitriptán en solución amortiguadora de fosfatos pH 7.4 en contacto con piel.

1.1.1 Resultados de la validación del método analítico.

<b>Exactitud</b>				
<b>Muestra</b>	<b>Peso de zolmitriptán (mg)</b>	<b>Absorbancia</b>	<b>Concentración (µg/mL)</b>	<b>% recobro</b>
<b>1</b>	0.965	0.3256	18.914	101.44
<b>2</b>	0.96	0.3113	18.816	97.39
<b>3</b>	0.97	0.3194	19.012	98.95
<b>4</b>	1.045	0.3499	20.482	100.82
<b>5</b>	1.125	0.3657	22.05	97.97
<b>6</b>	1.015	0.3371	19.894	99.92
			<b>C.V</b>	1.6

<b>Precisión</b>		
	<b>Día 1</b>	<b>Día 2</b>
<b>Concentración (µg/mL)</b>	<b>Absorbancia</b>	<b>Absorbancia</b>
5.00	0.0845	0.0787
5.00	0.0855	0.0781
5.00	0.0842	0.0792
5.00	0.0857	0.0804
5.00	0.0862	0.0803
5.00	0.0844	0.083
	<b>Promedio</b>	0.0825
	<b>D.E</b>	0.0030
	<b>C.V</b>	3.61

<b>Repetibilidad</b>		
<b>Concentración (µg/mL)</b>	<b>Absorbancia</b>	<b>Pendiente</b>
5.00	0.0787	0.0157
5.00	0.0781	0.0156
5.00	0.0792	0.0158
5.00	0.0804	0.0161
5.00	0.0803	0.0161
5.00	0.0830	0.0166
10.01	0.1645	0.0164
10.01	0.1660	0.0166
10.01	0.1616	0.0162
10.01	0.1625	0.0162
10.01	0.1651	0.0165
10.01	0.1670	0.0167
20.01	0.3370	0.0168
20.01	0.3312	0.0166
20.01	0.3281	0.0164
20.01	0.3296	0.0165
20.01	0.3265	0.0163
20.01	0.3393	0.0170
	<b>C.V</b>	2.27

## 1.2 Curva estándar de metanol en contacto con piel

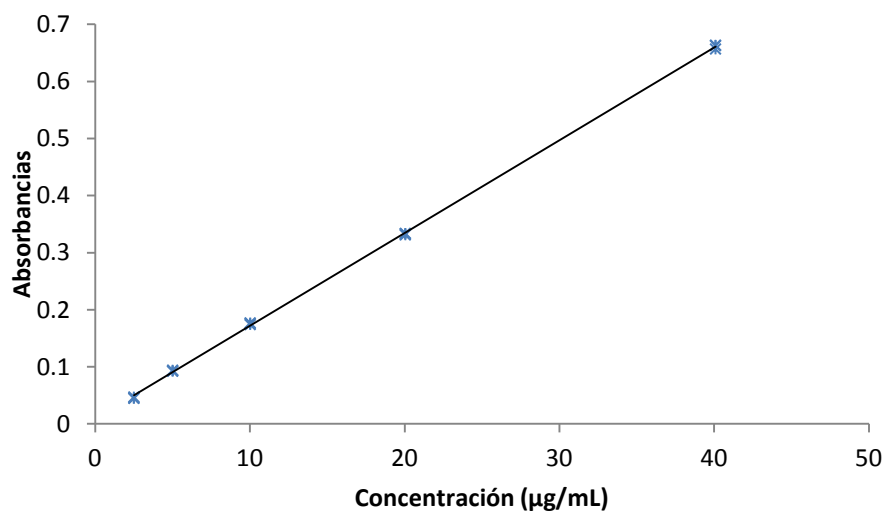
Valores de absorbancia obtenidos para cada punto de la curva por triplicado además de la desviación estándar (DE), coeficiente de variación (CV), linealidad ( $R^2$ ), pendiente y ordenada al origen

**Tabla 1.2** Valores de absorbancia para la curva estándar de metanol en contacto con piel.

<b>Concentración (<math>\mu\text{g/mL}</math>)</b>	<b>Absorbancia 1</b>	<b>Absorbancia 2</b>	<b>Absorbancia 3</b>
2.51	0.0451	0.0454	0.0474
5.01	0.0926	0.0931	0.0944
10.03	0.1760	0.1742	0.1772
20.05	0.3314	0.3341	0.3332
40.10	0.6571	0.6637	0.6630

DE	0.0017
CV	0.66
$R^2$	0.9998
Pendiente	0.0163
Ordenada al origen	0.0093





**Gráfica 1.2.** Curva de calibración de zolmitriptán en metanol/piel.

### 1.2.1 Resultados de la validación del método analítico

<b>Exactitud</b>				
<b>Muestra</b>	<b>Peso de zolmitriptán (mg)</b>	<b>Absorbancia</b>	<b>Concentración (µg/mL)</b>	<b>% recobro</b>
1	1.035	0.3417	20.286	100.53
2	1.000	0.3257	19.600	99.04
3	1.045	0.334	20.482	97.26
4	0.955	0.3083	18.718	98.00
5	1.100	0.3504	21.560	97.06
6	1.040	0.3439	20.384	100.70
			<b>C.V</b>	1.61

<b>Precisión</b>		
	<b>Día 1</b>	<b>Día 2</b>
<b>Concentración (<math>\mu\text{g/mL}</math>)</b>	<b>Absorbancia</b>	<b>Absorbancia</b>
10.03	0.1760	0.1732
10.03	0.1742	0.1768
10.03	0.1772	0.1778
10.03	0.1761	0.1734
10.03	0.1712	0.1790
10.03	0.1706	0.1720
	<b>Promedio</b>	0.1748
	<b>D.E</b>	0.0027
	<b>C.V</b>	1.57

<b>Repetibilidad</b>		
<b>Concentración (<math>\mu\text{g/mL}</math>)</b>	<b>Absorbancia</b>	<b>Pendiente</b>
5.01	0.0855	0.03411
5.01	0.0835	0.03332
5.01	0.0861	0.03435
5.01	0.0837	0.03340
5.01	0.0825	0.03292
5.01	0.0821	0.03276
10.03	0.1542	0.03076
10.03	0.1568	0.03128
10.03	0.1578	0.03148
10.03	0.1534	0.03060
10.03	0.1576	0.03144
10.03	0.1532	0.03056
20.05	0.3063	0.03055
20.05	0.308	0.03072
20.05	0.309	0.03082
20.05	0.3089	0.03081
20.05	0.3081	0.03073
20.05	0.3085	0.03077
	<b>C.V</b>	4.19

## 2 Prueba de Múltiple Rangos para el tamaño de vesícula para tres lotes de niosomas.

Para estas tablas se aplica un procedimiento de comparación múltiple para determinar cuáles medias son significativamente diferentes de otras. La tabla 2.2 muestra las diferencias estimadas entre cada par de medias. El asterisco que se encuentra al lado de los 2 pares indica que estos pares muestran diferencias estadísticamente significativas con un nivel del 95.0% de confianza. En la tabla 2.1, se han identificado 2 grupos homogéneos según la alineación de las X's en columnas. No existen diferencias estadísticamente significativas entre aquellos niveles que compartan una misma columna de X's.

**Tabla 2.1**

Método: 95.0 porcentaje LSD			
Lote	Casos	Media	Grupos Homogéneos
Lote placebo	2	330.4	X
Lote1	2	828.15	X
Lote2	2	928.8	X

**Tabla 2.2**

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
Lote1 – lote2		-100.65	206.277
Lote1 - loteplacebo	*	497.75	206.277
Lote2 - Loteplacebo	*	598.4	206.277

\*Indica una diferencia significativa.

### 3 Estudio de permeación pasiva *in vitro*.

#### 3.1 Flujo y microgramos promedio para la referencia y niosomas.

**Tabla 3.1** Microgramos promedio por centímetro cuadrado y flujo promedio.

Tiempo (h)	$\mu\text{g}$ promedio $\text{cm}^2$		Flujo promedio ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$ )	
	Referencia	Niosomas	Referencia	Niosomas
0.25	4.36	14.75	17.45	58.99
0.75	13.19	29.72	17.59	39.63
1.25	15.49	40.42	12.39	32.34
1.5	18.46	57.08	12.30	38.06
2	18.46	59.19	9.23	29.59
2.5	18.46	73.06	7.38	29.22
3.5	21.07	80.76	6.02	23.07
4.5	24.83	85.27	5.52	18.95
5.5	24.83	91.45	4.51	16.63
6.5	25.70	95.76	3.95	14.73
7.5	32.11	103.14	4.28	13.75
8.5	35.87	111.46	4.22	13.11
9.5	35.87	114.96	3.78	12.10
23.5	55.46	175.18	2.36	7.45
24	55.46	180.69	2.31	7.53
25	55.46	187.17	2.22	7.49

#### 3.2 Coeficientes de permeabilidad.

**Tabla 3.2** Coeficientes de permeabilidad para cada celda (cm/h)

Celda	Flujo 1	Flujo 2
1	$1.6 \times 10^{-2}$	$5.3 \times 10^{-4}$
2	$8.0 \times 10^{-3}$	$4.4 \times 10^{-3}$
3	$1.3 \times 10^{-2}$	$7.2 \times 10^{-4}$
4	$5.1 \times 10^{-3}$	$3.3 \times 10^{-3}$
5	$1.3 \times 10^{-2}$	$4.4 \times 10^{-3}$
6	$2.3 \times 10^{-2}$	$1.1 \times 10^{-3}$
Referencia	$5.2 \times 10^{-3}$	$8.0 \times 10^{-4}$